



**HAL**  
open science

# Etude de la formation du duramen chez le douglas : approches biochimique et transcriptomique

Idelette Plazanet

► **To cite this version:**

Idelette Plazanet. Etude de la formation du duramen chez le douglas : approches biochimique et transcriptomique. Autre. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0101 . tel-01480671

**HAL Id: tel-01480671**

**<https://theses.hal.science/tel-01480671>**

Submitted on 1 Mar 2017

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

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

**Université de Limoges**

Ecole doctorale Gay Lussac ED523

LCSN EA 1069

Thèse pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
Spécialité : Biosciences de l'environnement et de la santé

Présentée et soutenue par  
**Idelette Plazanet**

Le 24 novembre 2016

**Etude de la formation du duramen chez le douglas :  
approches biochimique et transcriptomique**

Thèse dirigée par : Dr. Guy Costa et Dr. Philippe Label

JURY :

*Président du jury*

M. Vincent Gloaguen, Professeur, Université de Limoges

*Rapporteurs*

Mme. Fabienne Guillon, Directrice de Recherche INRA, Nantes

M. Christian Jay-Allemand, Professeur, Université de Montpellier

*Examineurs*

M. Daniel Montplaisir, Professeur, Université du Québec à Trois-Rivières

M. Christian Breton, Chargé de Recherche INRA, Orléans

M. Philippe Label, Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand

M. Guy Costa, Maître de conférence-HDR, Université de Limoges





## Remerciements

*Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre de la chaire d'excellence Ressources Forestières et Usages du Bois, financée par la Fondation Partenariale de l'Université de Limoges, la région Limousin puis Nouvelle-Aquitaine et la Commission Européenne.*

*J'adresse en premier lieu mes plus vifs remerciements à Guy Costa, directeur de cette thèse. Me sachant très attachée à ma région, il m'a offert l'opportunité de travailler sur une espèce végétale revêtant une importance significative localement. Il m'a laissé beaucoup de liberté pour traiter ce sujet et m'a fait découvrir un large éventail de techniques analytiques, tout en me permettant de m'évader de temps en temps sur le terrain, pour mon plus grand plaisir! En outre, entre les manips et les congrès, ces travaux de recherche m'ont fait voir du pays, me menant un peu partout en France, ainsi qu'en Belgique, au Maroc et même de l'autre côté de l'Atlantique. Je le remercie donc pour cette expérience très enrichissante, et pour m'avoir encadrée, encouragée, conseillée, supportée (!), et surtout pour avoir pensé à me ravitailler régulièrement en chocolats, gâteaux,... Même si la croisière n'a pas toujours été de tout repos, un grand merci pour tout ! J'adresse également ma reconnaissance à Philippe Label pour avoir accepté de co-encadrer ce travail, pour l'aide apportée dans les analyses bioinformatiques et les conseils et corrections pour la rédaction de ce manuscrit.*

*Je tiens à remercier Fabienne Guillon et Christian Jay-Allemand pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce travail. Merci également aux examinateurs, Daniel Montplaisir, Christian Breton et Vincent Gloaguen d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Mentions spéciales pour Daniel et Christian, au premier pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire au cours d'une formation sur la synthèse des liquides ioniques, au second pour son aide dans la découpe du bois et les extractions d'ARN, ainsi que pour les conversations passionnantes et toujours très instructives.*

*Je remercie Vincent Sol, directeur du LCSN, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.*

*J'exprime toute ma gratitude à Daniel Michaud pour sa participation à mon comité de suivi de thèse, pour nous avoir fait partager ses connaissances sur le douglas et pour nous avoir permis de récolter tout le matériel végétal dont nous avons besoin sur les parcelles du FCBA. Mes sincères remerciements à Lionel Say, directeur général de la CFBL, qui nous a*

*donné libre accès à sa parcelle de douglas de Gimel et nous a autorisés à prélever autant d'arbres que nécessaire. Merci également à Nicolas et Philippe pour l'abattage des douglas.*

*Merci à toute l'équipe UAGPF de l'INRA d'Orléans pour l'accueil et plus particulièrement à Nathalie Boizot-Noël pour son assistance et son aide dans la mise au point du protocole d'extraction des ARN. Je n'oublie pas non plus Kevin Ader et Jean-Paul Charpentier qui ont sans cesse bataillé avec le robot broyeur pour qu'il fonctionne quand j'en avais besoin! Je remercie également Bénédicte Le Guerroué (ONF) pour le génotypage des douglas et Philippe Rozenberg pour les analyses de microdensitométrie.*

*Un grand merci à Rachida Zerrouki pour avoir fait de moi une apprentie chimiste, pour avoir partagé mes prises de têtes sur l'analyse des spectres RMN, et merci pour tous les bons moments de convivialité, au labo ou en dehors. Merci également à Sabine Solokwan-Lhernould pour les nombreux conseils techniques durant ces 3 années et pour avoir consacré du temps à la relecture et à la correction d'une partie de ce manuscrit. Merci à Véronique Blanquet pour sa participation à mon comité de suivi de thèse. Je tiens aussi à remercier Benjamin Boëns, qui m'a encadrée lors de mon passage au CRML (je lui suis très reconnaissante d'avoir expérimenté les dangers de la synthèse des liquides ioniques avant moi! Et le nettoyage de la hotte par la même occasion ...). Merci à Yves Champavier pour les analyses RMN et à Christelle Gady de m'avoir soulagée d'une partie des broyages des carottes de bois, broyages interminables et laborieux... Mes remerciements vont à Evelyne Poli et Dorothee Moine pour avoir dompté le Spotlight et m'avoir ainsi permis de le prendre rapidement en main. Merci aussi à Evelyne pour son aide sur l'analyse des spectres IR. Je remercie Erwan Capitaine et Philippe Leproux d'avoir accepté le challenge d'étudier du bois en microspectroscopie Raman. Merci à Erwan pour tout le temps qu'il a consacré aux essais que nous avons menés et pour avoir tenté de m'expliquer maintes fois des rudiments de physique. Merci à Lionel Forestier pour m'avoir formée aux techniques de biologie moléculaire et pour avoir réalisé les premiers séquençages sur le Proton. Merci également à Emilie Guérrin de la plateforme de séquençage du CHU. Merci à Claire Carrion de m'avoir formée à la microscopie confocale et à tous les membres de l'atelier Image J pour avoir partagé leurs expériences et tutoriels qui m'ont permis de gagner énormément de temps pour la présentation de mes résultats. Merci à Ayyoub Salmi et Stéphanie Durand pour leur aide dans les analyses bioinformatiques. Je remercie aussi Adeline Rigaud, Sylvie Laval et Odile Duval pour leur réactivité et leur disponibilité.*

*Je souhaite également remercier Céline Vainapoulos pour nous avoir fait partager ses « trucs et astuces » pour obtenir de jolies coupes fines de bois de douglas et Benoît Jourez pour nous avoir accueillis dans ses laboratoires à Gembloux.*

*Merci à Michel Defaye et François Didolot, du CRPF, pour m'avoir appris à observer les arbres et avoir fait de moi une « forestière en herbe ».*

*Et bien sûr, un grand merci à tous mes collègues et anciens collègues du LCSN : les anciens doctorants naturellement (Olivier, Rihab, Manu, Amandine, Mac, Kérim, Jean-Pierre, Nicolas...), les doctorants actuels-courage ! (Benjamin, Florent, Florian, Zineb, Guillaume, Aurélie, Amaury, Manon, Tom, Mohammad, Salim, Henri ...), les stagiaires qui se sont succédés au labo (Hafsa, Lamia...), les permanents... A toutes ces personnes, merci sincèrement pour tous les bons moments partagés et pour avoir contribué à maintenir une atmosphère agréable et joyeuse au laboratoire. Et longue vie aux TRG ! Dédicace spéciale à Cédric et ses limousines !*

*Un grand merci à Erell (alias Myrtille) pour avoir rendu les 3 dernières semaines de rédaction moins pénibles ! Merci pour ces crises de fou rire qui m'ont aidée à finir ce manuscrit (l'écriture de ces remerciements restera mémorable...)! A ton tour maintenant !!!*

*Une pensée particulière à Julien, toute ma famille et mes amis.*

## Droit d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

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

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



# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le douglas.....</b>	<b>5</b>
1.1.1. Taxonomie, origine géographique, diffusion en Europe .....	5
1.1.2. Caractéristiques phénotypiques .....	6
1.1.3. Caractéristiques génétiques.....	8
1.1.4. La ressource et la production de bois de douglas .....	9
1.1.4.1. En France .....	9
1.1.4.2. En limousin.....	10
1.1.5. Provenance de la ressource de douglas.....	11
1.1.6. Caractéristiques mécaniques et usages du bois de douglas.....	12
<b>1.2. Du bois au duramen .....</b>	<b>14</b>
1.2.1. Le bois dans l'arbre.....	14
1.2.2. Organisation phénologique.....	14
1.2.3. Organisation anatomique.....	15
1.2.4. Organisation cellulaire .....	16
1.2.5. Organisation pariétale .....	19
1.2.5.1. La lamelle moyenne.....	19
1.2.5.2. La paroi primaire.....	20
1.2.5.3. La paroi secondaire .....	21
1.2.6. La composition moléculaire du bois.....	22
1.2.6.1. La cellulose.....	22
1.2.6.2. Les hémicelluloses .....	23
1.2.6.2.1. Les xyloglucanes (XGs).....	23
1.2.6.2.2. Les xylanes.....	24
1.2.6.2.3. Les $\beta$ -glucanes mixtes .....	25
1.2.6.2.4. Les mannanes .....	25
1.2.6.3. Les pectines.....	26
1.2.6.3.1. Les homogalacturonanes (HG <sub>s</sub> ).....	26
1.2.6.3.2. Les rhamnogalacturonanes de type I (RG I).....	27
1.2.6.3.3. Les rhamnogalacturonanes de type II (RG II).....	27
1.2.6.4. Les lignines.....	28
1.2.6.5. Les protéines pariétales .....	29
1.2.6.6. Les hydrates de carbone de réserve.....	30
1.2.6.7. Les extractibles.....	30
1.2.6.8. Les composants inorganiques.....	31
1.2.7. La formation du bois .....	31

1.2.7.1.	Division des cellules cambiales .....	32
1.2.7.2.	Elongation des cellules.....	33
1.2.7.3.	Formation de la paroi secondaire .....	34
1.2.7.4.	Mort cellulaire programmée.....	37
1.2.8.	La formation du duramen .....	38
1.2.8.1.	Aspects physiologiques et biochimiques .....	38
1.2.8.1.1.	Mort des cellules du parenchyme .....	39
1.2.8.1.2.	Biosynthèse des extractibles.....	39
1.2.8.1.3.	Occlusion du système vasculaire.....	41
1.2.8.2.	Aspects génétiques .....	42
1.2.9.	Les fonctions du bois.....	45
1.2.9.1.	Fonction mécanique .....	46
1.2.9.2.	Fonction de conduction .....	48
1.2.9.3.	Fonction de stockage .....	50
1.2.9.4.	Fonction de défense.....	53
<b>1.3.</b>	<b>Objectifs et plan de thèse .....</b>	<b>54</b>
<b>Chapitre 1 : Caractérisation du matériel végétal.....</b>		<b>56</b>
<b>2.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>57</b>
2.1.1	Etude bibliographique.....	57
2.1.1.1	Les marqueurs moléculaires .....	57
2.1.1.1.1	Technique basée sur l'hybridation.....	58
2.1.1.1.2	Techniques basées sur la PCR .....	58
2.1.1.2	Amélioration génétique et propriétés du bois.....	61
2.1.1.2.1	La densité du bois .....	61
2.1.1.2.2	La durabilité du bois.....	62
2.1.2	Objectifs .....	63
<b>2.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>63</b>
2.2.1	Matériel végétal.....	63
2.2.2	Génotypage.....	65
2.2.3	Mesures de croissance.....	67
2.2.4	Densitométrie.....	67
2.2.5	Duraminisation.....	68
<b>2.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>69</b>
2.3.1	Génotypage des douglas .....	69
2.3.2	Caractéristiques de croissance des arbres .....	71
2.3.3	Densité du bois .....	72
2.3.4	Duraminisation du bois.....	76

<b>2.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>82</b>
2.4.1	Analyses du patrimoine génétique des douglas.....	83
2.4.2	Analyses qualitatives du bois .....	84
2.4.2.1	Densité et caractéristiques des cernes du bois.....	84
2.4.2.1.1	Densité totale des cernes.....	84
2.4.2.1.2	Densité du bois initial et du bois final.....	85
2.4.2.1.3	Largeur intra et inter-cernes .....	85
2.4.2.1.4	Proportion de bois final .....	85
2.4.2.1.5	Bois juvénile vs bois mature.....	86
2.4.2.1.6	Duramen vs aubier.....	88
2.4.2.1.7	Phénologie cambiale.....	89
2.4.2.2	Coloration du bois .....	90
2.4.2.3	Proportion de duramen dans le bois.....	91
2.4.2.3.1	Influence du génotype .....	91
2.4.2.3.2	Influence de l'environnement.....	92
2.4.2.4	Période de formation du duramen.....	93
2.4.2.5	Durabilité du bois.....	94
<b>2.5</b>	<b>Bilan.....</b>	<b>95</b>
<b>Chapitre 2 : Glycome et formation du duramen.....</b>		<b>97</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>98</b>
3.1.1	Etude bibliographique.....	98
3.1.2	Objectifs .....	100
<b>3.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>101</b>
3.2.1	Matériel végétal.....	101
3.2.2	Mises au point techniques de la méthode liquide ionique/immunodétection .....	102
3.2.2.1	Premières mises au point.....	102
3.2.2.2	Synthèse des liquides ioniques.....	102
3.2.2.3	Dissolution du bois .....	107
3.2.2.3.1	Par activations micro-ondes .....	107
3.2.2.3.2	Par chauffage .....	107
3.2.2.4	Identification des polysaccharides .....	108
3.2.3	Etude de l'évolution de la composition du bois de douglas .....	110
3.2.4	Analyses microscopiques du bois de douglas .....	111
3.2.4.1	Préparation des échantillons.....	111
3.2.4.2	Immuno-fluorescence.....	111
3.2.4.3	Microspectroscopie infrarouge .....	112
<b>3.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>112</b>
3.3.1	Mises au point techniques de la méthode LI/immunodétection .....	112

3.3.1.1	Premières mises au point.....	112
3.3.1.2	Synthèse des liquides ioniques.....	113
3.3.1.3	Dissolution du bois de douglas.....	114
3.3.1.3.1	Par activations micro-ondes .....	114
3.3.1.3.2	Par chauffage classique .....	116
3.3.1.4	Identification des polymères : comparaison des 6 liquides ioniques.....	117
3.3.1.5	Application à l'étude de la composition de carottes de bois.....	131
3.3.2	Analyses en microscopie du bois de douglas.....	141
3.3.2.1	Composition en lignine .....	141
3.3.2.2	Répartition des polymères pariétaux dans le bois.....	145
<b>3.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>152</b>
3.4.1	Mise au point de la méthode d'analyse de la composition du bois.....	152
3.4.1.1	Synthèse des liquides ioniques.....	153
3.4.1.2	Dissolution des polymères pariétaux par les liquides ioniques.....	154
3.4.1.2.1	Dissolution de la cellulose.....	154
3.4.1.2.2	Dissolution de la lignine .....	154
3.4.1.2.3	Dissolution du bois.....	155
3.4.1.2.4	Paramètres influençant la vitesse de dissolution .....	158
3.4.1.3	Identification des polymères pariétaux.....	159
3.4.2	Composition biochimique du bois.....	163
3.4.2.1	Proportions générales des polymères pariétaux dans le bois .....	164
3.4.2.2	Evolution de la composition du bois de l'aubier externe au cœur du duramen .....	166
3.4.2.3	Composition du bois initial et du bois final.....	168
3.4.2.4	Répartition des polymères pariétaux dans la zone de transition du bois de douglas ....	170
3.4.2.4.1	La lignine .....	170
3.4.2.4.2	Les protéines et polysaccharides pariétaux.....	172
<b>3.5</b>	<b>Bilan.....</b>	<b>175</b>
<b>Chapitre 3 : Transcriptome et formation du duramen .....</b>		<b>179</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>180</b>
4.1.1	Etude bibliographique.....	180
4.1.1.1	Extraction des ARN.....	181
4.1.1.2	Purification des transcrits .....	184
4.1.1.3	Préparation des bibliothèques d'ADNc .....	185
4.1.1.4	Séquençage.....	187
4.1.1.5	Analyses des données.....	192
4.1.1.5.1	Prétraitement des données NGS.....	192
4.1.1.5.2	Assemblage du transcriptome.....	193
4.1.1.5.3	Qualité de l'assemblage.....	194

4.1.1.5.4	Applications de la technique RNA-Seq .....	194
4.1.1.5.5	Les « workflows » pour RNA-Seq.....	195
4.1.2	Objectif.....	195
<b>4.2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>196</b>
4.2.1	Matériel végétal.....	196
4.2.2	Extraction des ARN <sub>total</sub> du bois.....	197
4.2.2.1	Protocole initial d'extraction.....	197
4.2.2.2	Optimisations du protocole d'extraction .....	198
4.2.2.3	Aspects quantitatif et qualitatif des ARN <sub>total</sub> .....	199
4.2.3	Séquençage.....	200
4.2.4	Analyses bioinformatiques.....	200
<b>4.3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>202</b>
4.3.1	Mises au point technique.....	202
4.3.1.1	Extraction des ARN <sub>total</sub> du bois.....	202
4.3.1.1.1	Mise au point du protocole d'extraction .....	202
4.3.1.1.2	Application.....	206
4.3.2	Premiers résultats d'expression .....	211
4.3.2.1	Nettoyage des données de séquençage.....	211
4.3.2.2	Filtrage des transcrits non alignés.....	212
4.3.2.3	Comparaison d'expression entre aubier externe, aubier interne et TZ en hiver.....	213
4.3.2.3.1	Normalisation d'alignement des transcrits filtrés.....	214
4.3.2.3.2	Clustering et analyse en composante principale (ACP) des échantillons.....	215
4.3.2.3.3	Contrôle du taux de faux-positifs (FDR) .....	217
4.3.2.3.4	Analyse de l'expression différentielle avec DESeq2 .....	217
4.3.2.3.5	Etude de quelques transcrits différentiellement exprimés.....	219
<b>4.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>227</b>
4.4.1	Extraction des ARN du bois.....	227
4.4.2	Résultats préliminaires de l'expression des gènes au niveau de la TZ.....	230
4.4.2.1	Profils transcriptomiques de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ.....	230
4.4.2.2	Analyse des gènes surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe .....	231
4.4.2.2.1	Régulation hormonale .....	231
4.4.2.2.2	Contrôle transcriptionnel de la formation du duramen .....	233
4.4.2.2.3	Biosynthèse des extractibles.....	234
4.4.2.2.3	Remodelage de la paroi.....	235
4.4.2.2.3	Déshydratation, défense et mort cellulaire programmée .....	235
<b>4.5</b>	<b>Bilan.....</b>	<b>236</b>
	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>239</b>

<b>Annexes.....</b>	<b>245</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>249</b>

---

## Abréviations

4CL : 4-coumarate:CoA ligase

ABA : acide abscissique

AceA : acide acérique

ACC : aminocyclopropane-1-carboxylate

ACO : aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase

ACS : aminocyclopropane-1-carboxylate synthase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AFEX : ammonia fiber expansion

AFLP : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (« Amplified fragment length polymorphism »)

AGPs : arabinogalactanes protéines

AI : alcool isoamylique

AMF : angle des microfibrilles de cellulose

[Amim]Br : bromure de 1-allyl-3-méthylimidazolium

[Amim]Cl : chlorure de 1-allyl-3-méthylimidazolium

Api : apiose

Ara : arabinose

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATR : réflexion totale atténuée

AX : arabinoxylane

[Bmim]Cl : chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium

BSA : albumine de sérum bovin

C3H : p-coumarate 3-hydroxylase

C4H : cinnamate 4-hydroxylase

Ca : calcium

CAD : alcool cinnamyl déshydrogénase

CCoAOMT : caffeoyl-CoA O-méthyltransférase

CCR : cinnamoyl-CoA réductase

CESA : cellulose synthase

CHI : chalcone isomerase

CHS : chalcone synthase  
COMT : acide cafféique O-méthyltransférase  
COSY : correlation spectroscopy  
CPG : chromatographie en phase gazeuse  
CSL : cellulose synthase like  
CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium  
db : double-brin  
DBUC<sub>4</sub>Br : bromure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène  
DBUC<sub>4</sub>Cl : chlorure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène  
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle  
DFR dihydroflavonol 4-reductase  
Dha : acide 2-kéto-3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique  
DMSO d<sub>6</sub> : Hexadeutérodiméthylsulfoxyde  
DO : densité optique  
dT : désoxythymidine  
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique  
EGTA : acide éthylène-glycol-tétraacétique  
ELISA : dosage immuno-enzymatique sur support solide (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay »)  
[Emim]Ac : acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium  
[Emim]Br : bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium  
ESTs : étiquette de séquence exprimée (« Expressed Sequence Tag »)  
F3'H : Flavonoïde 3'-hydroxylase  
F3H : flavanone-3-hydroxylase  
F5H : férulate 5-hydrolase  
FDR : taux de faux-positifs  
FLS : flavonol synthase  
FT-IR : infrarouge par Transformée de Fourier  
Fuc : fucose  
G : unité guaïacyle de la lignine  
GA : gibbérélines  
Gal : galactose  
GalA : acide galacturonique  
GAX : glucuronarabinoxylane  
Gb : giga paire de bases

Glc : glucose  
GlcA : acide glucuronique  
GRP : protéines riches en glycine  
GX : glucuronoxylane  
H : unité *p*-hydroxyphényle de la lignine  
HCT : P-Hydroxycinnamoyl-CoA:Quinate/ Shikimate P-Hydroxycinnamoyltransferase  
HG : homogalacturonane  
HMBC : Heteronuclear multiple bond coherence  
HMQC : Heteronuclear multiple quantum coherence  
HRGP : glycoprotéines riches en hydroxyproline  
IR : infrarouge  
J : constante de couplage  
Kdo : 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonate  
LI : liquide ionique  
LiCl : chlorure de lithium  
LiDS : lithium dodécyl sulfate  
LIPC : liquide ionique à polarité commutable  
Man : mannose  
Microsatellites ou SSR (Simple sequence repeats), VNTR (Variable number tandem repeats), STR (Short tandem repeats)  
NGS : technologies de séquençage de nouvelle génération  
MS : masse sèche  
AubierExt : aubier externe  
AubierInt : aubier interne  
*p* : pyranose  
PAL : phénylalanine ammonia-lyase  
PCD : mort cellulaire programmée (« programmed cell death »)  
PCR : amplification en chaîne par polymérase (« polymerase chain reaction »)  
Phe : phénylalanine  
PME : pectines méthylestérases  
ppm : partie par million  
PRP : protéines riches en proline  
PVP : polyvinylpyrrolidone  
q.s.p : quantité suffisante pour  
RAD : marqueurs associés à des sites de restriction (« Restriction site associated DNA »)

RAPD : amplification aléatoire d'ADN polymorphe (« Random amplified polymorphic DNA »)

RGI : rhamnogalacturonanes de type I

RGII : rhamnogalacturonanes de type II

Rha : rhamnose

RIN : RNA integrity number

RMN : résonance magnétique nucléaire

s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; qn : quintuplet ; sx : sextuplet ;

m : multiplet ; dt : doublet de triplet ; dq : doublet de quadruplet

RQI : RNA quality index

UV : ultra-violet

S : unité syringyle de la lignine

SAM : S-adénosylméthionine

sb : simple-brin

SNP : Single nucleotide polymorphism

TAG : triacylglycérols

TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TZ : zone de transition

*Vs* : *versus*

XET : xyloglucane endotransglycosidase

XG : xyloglucane

Xyl : xylose

## Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Durabilité fongique et résistance aux insectes à larves xylophages et aux termites du duramen de quelques essences résineuses.....</i>	<i>5</i>
<i>Tableau 2 : Caractéristiques des 8 vergers de douglas français.....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 3 : Usages du douglas en fonction de la largeur des cernes et de la proportion de duramen.....</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 4 : Dates des prélèvements des carottes de bois de douglas en rotation sur 10 arbres.....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 5 : Présentation du motif des microsatellites d'intérêt et des amorces sens et anti-sens utilisées pour les amplifier.....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 6 : Volumes des réactifs PCR.....</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 7 : Taille des amplicons (pb) obtenues sur les 11 locus à partir des amorces présentées dans le tableau 5 pour les douglas de Gimel.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 8 : Taille des amplicons obtenues à partir des amorces présentées dans le tableau 5 pour 9 arbres du génotype 3 carottés à Saint-Gence.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 9 : Caractéristiques générales des 4 génotypes de douglas à Gimel.....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 10 : Diamètres des 10 douglas carottés à Saint-Gence.....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 11 : Moyennes de la densité des cernes, de la densité du bois initial, de la densité du bois final, de la proportion de bois final et de la largeur des cernes pour les 16 douglas de Gimel.....</i>	<i>76</i>
<i>Tableau 12 : Caractéristiques des rondelles de bois des 4 génotypes prélevées à Gimel.....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 13 : Représentation schématique de l'aspect et de la position (numéro de cerne) de la zone de transition des carottes de bois de douglas prélevées mensuellement à Saint-Gence en fonction du mois de prélèvement.....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 14 : Proportions de duramen pour chacun des 10 arbres carottés à Saint-Gence.....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 15 : Masse de chaque LI correspondant à 5,23 mmol et pourcentage massique de bois dans chaque LI.....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 16 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.....</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 17 : Essais d'optimisation de la réaction de synthèse de l'[Emim]Ac.....</i>	<i>114</i>
<i>Tableau 18 : Temps de chauffage nécessaires pour dissoudre totalement la poudre d'aubier de douglas à 80 ou 100°C dans chacun des 6 LIs synthétisés.....</i>	<i>117</i>
<i>Tableaux 19 : Coefficients de régression linéaire (<math>R^2</math>), quantités minimales reconnues par l'anticorps et maximales avant saturation pour chacun des anticorps en fonction du LI.....</i>	<i>119</i>
<i>Tableau 20 : Attribution des fonctions chimiques des différentes bandes d'absorption identifiées dans les spectres de la lamelle moyenne et de la paroi secondaire du bois.....</i>	<i>144</i>

<i>Tableau 21 : Composition biochimique de différents échantillons de bois de douglas.....</i>	<i>169</i>
<i>Tableau 22 : Comparaison des principales plateformes de séquençage .....</i>	<i>192</i>
<i>Tableau 23 : Echantillons séquencés dont les données ont été nettoyées.....</i>	<i>202</i>
<i>Tableau 24 : Teneurs et qualités des ARN<sub>totaux</sub> obtenus suite à une extraction avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié par Beritognolo (2002) à partir de bois d'automne de douglas.....</i>	<i>203</i>
<i>Tableau 25 : Teneurs et qualités des ARN<sub>totaux</sub> obtenus suite à une extraction avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié, à partir de bois prélevé en d'automne (génotype 1).....</i>	<i>204</i>
<i>Tableau 26 : Teneurs et qualités des ARN<sub>totaux</sub> obtenues suite à une extraction des ARN avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié, à partir de bois prélevé en automne.....</i>	<i>205</i>
<i>Tableau 27 : Caractéristiques qualitatives des échantillons d'ARN extraits du bois de douglas.....</i>	<i>209</i>
<i>Tableau 28 : Nombre d'échantillons séquencés par tissu pour chacun des 3 arbres du prélèvement d'hiver.</i>	<i>214</i>
<i>Tableau 29 : Transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe. ....</i>	<i>223</i>

## Liste des figures

<i>Figure 1 : Aires de répartition respectives des 2 sous-espèces de douglas : P. menziesii var. menziesii (vert clair) et P. menziesii var. glauca (vert foncé).....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 2 : A : Douglas vert des Farges de 120 ans (Meymac, 19) ; B : Rameaux et cônes de douglas vert ; C : Rameaux et cônes de douglas bleu ; D : Section transversale de tronc de douglas vert.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 3 : Répartition de la ressource en douglas en France, exprimée en volume sur pied.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 4 : Volume et nombre de tiges de douglas par classe de diamètre.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 5 : Volume de bois en forêt de production par essence en Limousin .....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 6 : A : Charpente en douglas ; B : Pont de Merle en douglas (19) ; C : Maison avec bardage en douglas traité ; D : Maison avec bardage en douglas (bardage horizontal) et mélèze (bardage vertical) non traités..</i>	<i>13</i>
<i>Figure 7 : Représentation schématique de la croissance primaire et secondaire d'un arbre par la superposition successive de couches en forme de cône.....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique d'une section de tronc.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 9 : A) Structure du bois des conifères. B) Trachéide de bois initial et de bois final .....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 10 : Observations en microscopie optique de sections transversales de bois (A et B) et radiale de trachéide (C). A : Bois de Pin Sylvestre (Pinus sylvestris) avec canaux résinifères ; B : Bois de Sapin pectiné (Abies alba) sans canaux résinifères ; C : Section radiale de trachéide avec ponctuations aréolées.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 11 : Représentation schématique de la paroi primaire.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 12 : Représentation schématique de l'orientation des microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire et la paroi secondaire d'une trachéide.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 13 : Chaînes de cellulose reliées entre-elles par des liaisons hydrogène.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 14 : Représentation schématique des xyloglucanes.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 15 : (a) Représentation schématique des xylanes produits par les dicotylédones et les gymnospermes et (b) la séquence unique présente à leur extrémité réductrice.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 16 : (A) Structure primaire des galactomannanes et (B) des glucomannanes.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 17 : (A) Structure des HGs et (B) structure en « boîte à œufs » des HGs.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 18 : Représentation schématique des RG I et RG II .....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 19 : Structure chimique des monolignols à l'origine des unités phénylpropanes H, S et G des lignines.</i>	<i>29</i>
<i>Figure 20 : Voie principale de biosynthèse des 3 monolignols : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique .....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 21 : Voie métabolique simplifiée de la biosynthèse des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 22 : Distribution du bois de tension et du bois de compression dans une section de tige inclinée.....</i>	<i>47</i>

<i>Figure 23 : Chemin emprunté par la sève xylémienne chez le pin rouge (Pinus resinosa) observé après injection de fuschine acide à la base du tronc.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 24 : Fluctuations saisonnières des réserves en amidon, en lipides et en protéines dans le bois des gymnospermes et des angiospermes.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 25 : Photographies A : des 10 arbres carottés ; B : d'une carotte de 5 mm de diamètre prélevée à 1-1,3 m du collet.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 26 : Principales caractéristiques intra-cernes mesurées.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 27 : A : Planchette de bois de douglas (génotype 4, prélèvement d'hiver) ; B : Radiographie correspondante ; C : Profil densitométrique correspondant avec délimitation des cernes annuels.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 28 : Profil densitométrique du bois de douglas.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 29 : Portion des profils de densitométrie obtenus à partir d'arbres prélevés au printemps appartenant aux 4 génotypes.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 30 : A : Densité des cernes ; B : Densité du bois initial ; C : Densité du bois final ; D : Largeur des cernes ; E : Largeur du bois final ; F : Proportion de bois final (en terme de largeur).....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 31 : Photographies des rondelles de bois lyophilisées qui ont été prélevées sur des arbres appartenant aux 4 génotypes en automne et en hiver à 1,3 m de hauteur.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 32 : Photographies des rondelles de bois lyophilisées qui ont été prélevées sur des arbres appartenant au génotype 3 à la base et à 1,3 m à chaque saison.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 33 : Proportion de duramen en fonction du génotype et de la hauteur dans le tronc.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 34 : Radiographies et profils densitométriques de planchettes de bois de pin sylvestre à l'état humide et à l'état sec.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 35 : Chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 36 : Bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 37 : Acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 38 : Chlorure de 1-allyl-3-méthylimidazolium.....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 39 : Bromure de 1-allyl-3-méthylimidazolium.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 40 : Chlorure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène.....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 41 : Bromure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène.....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 42 : Cinétique de dissolution des particules d'aubier de douglas dans l'[Emim]Ac, le [Bmim]Ac, le [Bmim]Cl et le [Bmim]BF<sub>4</sub> suite à un une activation micro-onde à 200 W.....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 43 : Cinétique de dissolution de particules d'aubier de douglas dans l'[Emim]Br à 80°C (A) et 100°C (B).....</i>	<i>116</i>

<i>Figure 44 : Pourcentages relatifs de marquage pour chaque anticorps après dissolution du bois dans chacun des six LIs à 80°C (A) ou 100°C (B) .....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 45 : Intensité du marquage (DO) avec certains anticorps en fonction du temps et de la température de dissolution du bois de douglas .....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 46 : Intensité du marquage (DO) pour les HGs pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 47 : Intensité du marquage (DO) pour les RG I pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 48 : Intensité du marquage (DO) pour les xyloglucanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 49 : Intensité du marquage (DO) pour les AGPs (LM2), les galactanes (LM5) et les arabinanes (LM6) pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 50 : Intensité du marquage (DO) pour les xylanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 51 : Intensité du marquage (DO) pour les mannanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16).....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 52 : Intensité des marquages pour chaque cerne de la carotte de bois de douglas T2 2 en fonction de l'anticorps pour 20 µg de « bois dissout ».....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 53 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les HGs (CCRC-M38, LM19 et JIM7).....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 54 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les RG I (CCRC-M14). .....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 55 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de douglas pour les xyloglucanes (CCRC-M1, LM15 et LM25).....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 56 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les AGPs (LM2), les galactanes (LM5) et les arabinanes (LM6). .....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 57 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les xylanes (LM10 et LM11).....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 58 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les mannanes (LM21 et LM22). .....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 59 : Spectres d'émission de la lignine (en vert et bleu) après excitation à 405 nm et spectre d'émission de l'Alexa 647 (en rouge) après excitation à 633 nm. ....</i>	<i>141</i>

<i>Figure 60 : Observation en microscopie confocale de l'autofluorescence de la lignine du bois après excitation à 405 nm</i> .....	142
<i>Figure 61 : Cartographie ATR/FT-IR à partir d'une coupe de bois de douglas (zone de transition) et extraction de deux spectres IR dans des zones de couleurs différentes.</i> .....	143
<i>Figure 62 : Structures chimiques d'une unité G incorporée dans la lignine (A) et de la cellulose (B).</i> .....	144
<i>Figure 63 : Observation en microscopie confocale à fluorescence d'une coupe de bois de zone de transition de douglas sans immunomarquage (absence d'anticorps primaire mais pas secondaire).</i> .....	145
<i>Figure 64 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final (gauche) et initial (droite) de TZ de douglas avec immunomarquage des HGs.</i> .....	147
<i>Figure 65 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des RG I</i> .....	148
<i>Figure 66 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des xyloglucanes</i> .....	149
<i>Figure 67 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des AGPs, des galactanes et des arabinanes</i> .....	150
<i>Figure 68 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des xylanes</i> .....	151
<i>Figure 69 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des mannanes</i> .....	152
<i>Figure 70 : Principe du système de séquençage SOLiD.</i> .....	189
<i>Figure 71 : Principes des méthodes de séquençage 454, Ion Torrent, SOLiD et Illumina.</i> .....	190
<i>Figure 72 : Workflow du traitement des données de RNA-Seq</i> .....	195
<i>Figure 73 : Demi-rondelle de douglas présentant un marquage des cernes dont le profil d'expression des gènes est étudié</i> .....	197
<i>Figure 74 : Protocole d'extraction des ARN<sub>totaux</sub> à partir de poudre de bois de douglas suivant le protocole de Chang et al. (1993) modifié</i> .....	199
<i>Figure 75 : Teneurs en ARN<sub>totaux</sub> de l'aubier externe obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison.</i> .....	206
<i>Figure 76 : Teneurs en ARN<sub>totaux</sub> de l'aubier interne obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison.</i> .....	207
<i>Figure 77 : Teneurs en ARN<sub>totaux</sub> de la zone de transition obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison.</i>	207

<i>Figure 78 : Distribution des comptages d'alignement filtrés sur le transcriptome de référence. La distribution des comptages d'alignement (courbes rouge et noire) est comparée à celle des comptages filtrés (courbe verte).....</i>	<i>213</i>
<i>Figure 79 : Distribution des comptages selon le mode de transformation des données. A gauche : transformation simple en log + 1 ; Au centre : Transformation RLD ; A droite : Transformation VST. ....</i>	<i>215</i>
<i>Figure 80 : Clustering des échantillons basé sur le profil d'expression global à partir des transcrits.....</i>	<i>216</i>
<i>Figure 81 : A : Projection des échantillons dans le plan principal de l'ACP ; B : Contribution de chaque échantillon dans les dimensions de l'ACP.....</i>	<i>217</i>
<i>Figure 82 : Projection dans les axes principaux de l'ACP des transcrits différentiels entre la zone de transition et l'aubier externe.....</i>	<i>218</i>
<i>Figure 83 : Projection dans les axes principaux de l'ACP des transcrits différentiels entre la zone de transition et l'aubier interne.....</i>	<i>219</i>

# *Introduction*

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la chaire d'excellence Ressources Forestières et Usages du Bois, dont l'acronyme est SylvaLIM. Ce texte fondateur, signé par l'Université de Limoges fin 2013, vise à organiser la recherche pour la filière bois. Cette chaire rassemble plusieurs équipes de recherche du domaine scientifique (le LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et le GEMH : Groupe d'Etude des Matériaux Hétérologues de l'Université de Limoges, l'UAGPF : Unité de recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières de l'INRA d'Orléans, l'unité PIAF : Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier-UMR INRA de Clermont-Ferrand, le CRML : Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques de l'Université du Québec à Trois-Rivières), du domaine des sciences humaines et sociales (GEOLAB-UMR-CNRS antennes de Limoges et Clermont-Ferrand, l'Institut Pascal de Clermont-Ferrand) et du domaine du droit et des sciences économiques (le CREOP : Centre de Recherches sur l'Entreprise, les Organisations et le Patrimoine de l'Université de Limoges).

L'objectif principal de SylvaLIM est d'accélérer la recherche et le développement sur le douglas en partenariat avec l'interprofession (BoisLIM, France Douglas et l'Institut technologique FCBA : Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement). SylvaLIM est organisé en trois axes de recherche :

- Axe 1 : durabilité de la ressource et du matériau (LCSN-GEMH-PIAF-UAGPF)
- Axe 2 : transformation des produits et co-produits de la biomasse (LCSN-UQTR)
- Axe 3 : Nouveaux usages de la forêt et du bois (GEOLAB-CREOPS)

Cette thèse s'inscrit donc dans l'axe 1 de SylvaLIM en s'intéressant à la durabilité biologique du bois de douglas.

La valeur écologique et économique des arbres est déterminée par la formation du bois et l'accumulation de métabolites spécialisés à l'intérieur de celui-ci. Les métabolites spécialisés (dits extractibles) accumulés dans le bois, tels que les substances phénoliques, vont conférer au bois une certaine résistance naturelle vis à vis des organismes lignivores (champignons, insectes à larves xylophages et termites). Cette résistance naturelle, appelée durabilité, varie en fonction de l'essence, de l'âge de l'arbre et de la zone de bois considérée (aubier ou duramen). L'aubier correspond aux couches périphériques du bois, tandis que le duramen (également appelé bois de cœur) fait référence aux couches les plus profondes. Une fois l'arbre abattu, l'aubier, riche en substances nutritives telles que l'amidon, est toujours périssable. En revanche le duramen, riche en tannins et en composés phénoliques, présente une durabilité plus ou moins importante. La durabilité naturelle détermine la faculté des essences à pouvoir être utilisées ou non sans traitement de préservation. Pour répartir les essences en fonction de leur utilisation et donc des risques d'attaque biologique possibles, différentes classes d'emploi ont été définies par la norme NF EN-335 (AFNOR, 2013) : Classe 1, bois ou produit à base de bois convenant pour des usages intérieurs, toujours à l'abri des intempéries et non exposé à l'humidification (parquets, lambris, meubles...) ; Classe d'emploi 2, bois ou produit à base de bois sous abris et entièrement protégé des intempéries mais où une humidité ambiante élevée peut entraîner une humidification occasionnelle mais non persistante (charpente, éléments de toitures...) ; Classe d'emploi 3, bois ou produit à base de bois non abrité, sans contact avec le sol, soumis à une humidification fréquente, soit à l'abri des intempéries (3-1) soit continuellement exposé aux intempéries (3-2) (menuiseries, revêtements extérieurs...) ; Classe d'emploi 4, bois ou produit à base de bois en contact avec le sol ou de l'eau douce, exposition permanente à l'humidification (terrasses, poteaux...) ; Classe d'emploi 5, bois ou produit à base de bois continuellement exposé à l'eau salée (jetées, pontons...). Lorsque le bois n'est pas suffisamment durable par rapport aux risques encourus et à la durée de vie attendue de l'ouvrage, il est nécessaire de le traiter. Différents traitements existent en fonction de la classe d'emploi visée. Dans le cas des classes d'emploi 1 à 3-1, un traitement de surface par aspersion ou trempage est réalisé. Lors du trempage, les pièces de bois sont immergées dans des solutions de produits organiques ou des émulsions avec des molécules actives durant quelques minutes. Le produit de traitement pénètre ainsi dans le bois par capillarité sur quelques millimètres. La profondeur de pénétration est dépendante de l'imprégnabilité de l'essence, de la pièce de bois et de la durée du trempage. Pour les classes d'emploi 3-2 à 4, les traitements sont effectués par autoclave, une partie ou la totalité de l'aubier est alors imprégnée. Pour ce type de traitement, les produits utilisés sont souvent des

produits hydrosolubles de types sels métalliques. De plus en plus soucieux de la préservation de l'environnement et de leur santé, les consommateurs se tournent aujourd'hui d'avantage vers des produits exempts de traitement de préservation. Grâce à ses remarquables propriétés mécaniques, le bois de douglas est un excellent bois de construction. Mais c'est aussi un bois avec une durabilité naturelle élevée. Le duramen du douglas présente des caractéristiques de résistance aux attaques de champignons et d'insectes supérieures à la plupart des autres essences résineuses cultivées en Europe (Tableau 1). Dans le contexte actuel et de par cette durabilité naturelle intéressante, le bois de douglas est donc très recherché pour des utilisations d'extérieur.

En Europe, l'importance des forêts de douglas ne cesse de croître du fait de leur productivité importante (Heidingsfelder and Knoke, 2004), des propriétés intéressantes du bois et de la grande adaptabilité physiologique de cette essence et particulièrement sa tolérance à la sécheresse. En raison du changement climatique, avec l'augmentation des températures et des périodes de sécheresse en été, le douglas est envisagé comme une alternative majeure aux autres conifères d'importance économique (Albrecht et al., 2013).

En France, de nombreuses plantations arrivent à maturité et d'ici une vingtaine d'années, ce sont près de 15 000 hectares qu'il faudra renouveler (Angelier et al., 2004) ou qu'il serait possible de renouveler si les acteurs économiques, politiques et territoriaux retenaient cette option. De par l'importance du massif forestier de douglas, et au regard de sa très grande productivité sur le territoire Limousin, le douglas représente une essence d'avenir sur laquelle pourra s'appuyer une économie permettant de valoriser le bois et les co-produits issus de son exploitation.

Avec l'augmentation de la demande en produits forestiers, notamment pour la construction, les forestiers sont confrontés à plusieurs défis qui consistent à augmenter la productivité et la qualité du bois. La durabilité est un critère de qualité du bois important qui dépend de la composition moléculaire du bois, notamment en métabolites secondaires. Ainsi, la connaissance des processus biologiques et chimiques conduisant à la durabilité naturelle du bois pourrait être mise à profit soit dans des programmes d'amélioration génétique de la durabilité naturelle des essences soit dans des procédés industriels de genèse d'une durabilité «chimique» des bois.

**Tableau 1 : Durabilité fongique et résistance aux insectes à larves xylophages et aux termites du duramen de quelques essences résineuses (AFNOR, 2011). Classe 1 à 5 (norme NF EN-335) ; L3 : niveau de longévité supérieur à 100 ans ; L2 : niveau de longévité compris environ entre 50 et 100 ans ; L1 : compris environ entre 10 et 50 ans.**

	Classe 1	Classe 2	Classe 3-1	Classe 3-2	Classe 4	Classe 5	Résistance aux insectes à larves xylophages	Résistance aux termites
Pin Sylvestre	L3	L3	L1	L1	Non	Non	Oui	Non
Douglas	L3	L3	L2	L1	Non	Non	Oui	Non
Mélèze	L3	L3	L2	L1	Non	Non	Oui	Non
Epicéa	L3	L2	L1	Non	Non	Non	Non	Non
Sapin	L3	L2	L1	Non	Non	Non	Non	Non

La formation du duramen peut ainsi être considérée comme un processus physiologique clé dans le contrôle de la qualité du bois. Pourtant, malgré son importance écologique et économique, les mécanismes conduisant à sa formation, toutes essences confondues, sont loin d'être totalement élucidés. Ce processus physiologique est, entre autre, associé à une mort cellulaire programmée des cellules encore vivantes de l'aubier et à la remobilisation des réserves énergétiques pour produire des extractibles (Spicer, 2005). Ce travail de thèse a pour objectif de comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la formation du duramen chez le douglas.

L'introduction bibliographique qui suit est consacrée dans une première partie à notre objet d'étude, le douglas. La seconde partie présente le bois, en détaillant sa structure, sa composition, sa formation (avec notamment la présentation des données disponibles sur la formation du duramen) ainsi que ses fonctions. L'objectif de cette étude sera ensuite introduit dans une dernière partie avant la présentation du plan de ce travail expérimental.

## 1.1 Le douglas

### 1.1.1. Taxonomie, origine géographique, diffusion en Europe

Le douglas a été découvert dans l'île de Vancouver par Archibald Menzies en 1792. C'est un résineux appartenant à l'ordre des Pinales, famille des *Pinaceae*, sous-famille des *Laricoideae*, genre *Pseudotsuga*. Le douglas, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, est originaire de la partie occidentale de l'Amérique du Nord. L'espèce *menziesii* compte deux sous-espèces : le *subsp menziesii* (douglas vert) des forêts pluviales des côtes pacifiques et le *subsp glauca* des montagnes en zones plus sèches, aux aiguilles bleuâtres (douglas bleu). En Amérique du Nord, l'aire de répartition de *P. menziesii* (Mirb.) Franco s'étend de la Colombie

Britannique au nord de la Californie pour le douglas vert et jusqu'au Mexique pour le douglas bleu (Claire, 2010) (Figure 1). De par cette vaste étendue, il existe de nombreuses variations génétiques entre les deux sous-espèces mais également au sein d'une même sous-espèce en raison d'adaptations aux contextes stationnels très différents entre la Colombie Britannique et la Californie (Angelier, 2007).



**Figure 1 : Aires de répartition respectives des 2 sous-espèces de douglas : *P. menziesii* var. *menziesii* (vert clair) et *P. menziesii* var. *glauca* (vert foncé) (Müller, 2015).**

Le douglas a été importé en Europe en 1827 par David Douglas, botaniste écossais. C'est en 1842 que cet arbre fait son apparition en France dans les parcs et jardins. Sa remarquable capacité d'adaptation aux stations de moyenne altitude du centre de la France a conduit des précurseurs à tenter son acclimatation en forêt dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. En Europe, le douglas vert est plus largement répandu que le bleu. Cette préférence vient du fait qu'il présente des taux de croissance beaucoup plus importants, bien qu'il soit moins résistant à la sécheresse et plus sensible aux gelées tardives que le douglas bleu (Hermann and Lavender, 1999; Reyer et al., 2010).

### **1.1.2. Caractéristiques phénotypiques**

Le douglas vert pousse à des altitudes variant de 0 à 1500 m sous des climats océaniques à montagnards. Il mesure entre 50 et 80 m de haut et jusqu'à 80 cm de diamètre. Il peut

exceptionnellement dépasser les 100 m de haut et les 4 m de diamètre pour un âge souvent supérieur à 300 ans. Les branches, longues et retombantes sont disposées en verticilles. Le douglas vert doit son nom à la couleur verte plus ou moins foncée de ses aiguilles molles qui mesurent de 1,5 à 3 cm de long. L'écorce est d'abord lisse, de couleur grisâtre et couverte de pustules de résine, et se transforme en rhytidome d'épaisseur variable, ligneux, crevassé, brun rougeâtre avec le vieillissement de l'arbre (Figure 2A). Les cônes mesurent de 5 à 10 cm de long avec des bractées trifides saillantes (Figure 2B) (Claire, 2010).

Le douglas bleu mesure en moyenne 30 à 35 m en hauteur, voire jusqu'à 40 m pour des sites favorables, avec un diamètre allant de 0,4 à 1 m. Ce dernier est adapté à un climat continental et montagnard. Il doit son nom à la couleur bleutée de ses aiguilles (Figure 2C). Comparés aux cônes du douglas vert, ceux du douglas bleu sont généralement plus petits, ils présentent également des bractées trifides saillantes (Claire, 2010).

Le bois de douglas a un duramen rose-saumon à brun-rougeâtre, son aubier est plus clair et bien différencié. Les cernes sont bien marqués avec un bois initial et un bois final très démarqués (Figure 2D). Le rapport entre la largeur du bois final et la largeur totale de cerne (la texture) est stable quelque soit la vitesse de croissance de l'arbre, ce qui confère au douglas de bonnes caractéristiques mécaniques. Le bois possède des canaux résinifères fins à moyens, situés surtout dans le bois final, qui ne sont pas visibles à l'œil nu ([www.france-douglas.com](http://www.france-douglas.com)).



**Figure 2 : A : Douglas vert des Farges de 120 ans (Meymac, 19) ; B : Rameaux et cônes de douglas vert ; C : Rameaux et cônes de douglas bleu (<http://luirig.altervista.org>) ; D : Section transversale de tronc de douglas vert.**

### **1.1.3. Caractéristiques génétiques**

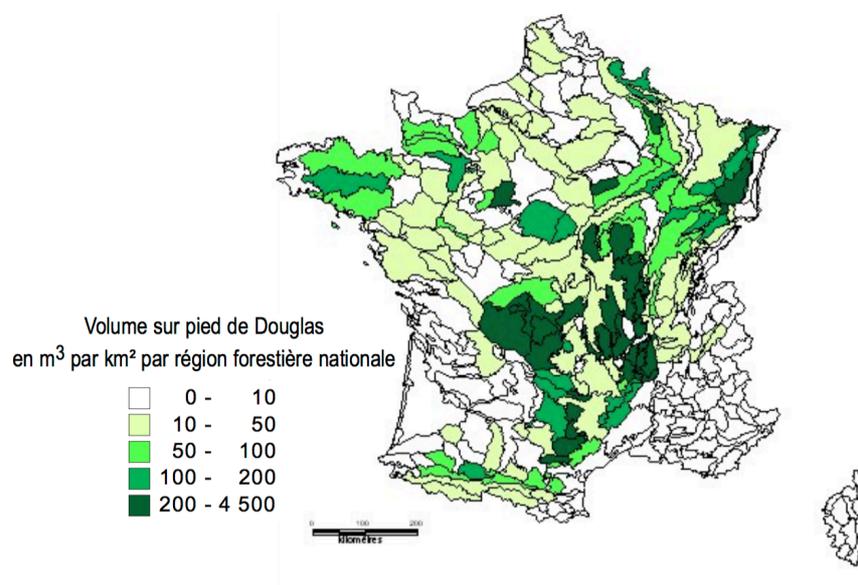
Le douglas est diploïde et possède 26 chromosomes tandis que toutes les autres espèces appartenant à la famille des *Pinaceae* (dont d'autres *Pseudotsuga*) en ont 24 (Doerksen and Ching, 1972). Comme la plupart des conifères, le douglas présente un génome nucléaire grand et complexe ( $3,7 \cdot 10^{10}$  pb) (Howe et al., 2006). Chez le douglas vert, la floraison et la production de graines débute entre 7 et 10 ans (Owston and Stein, 1974). Naturellement, cette essence ne peut pas se reproduire de manière végétative. La pollinisation a lieu au printemps et les graines mûres sont libérées à la fin de l'été ou au début de l'automne de la même année. C'est une espèce monoïque, mais bien que l'autofécondation soit possible, la reproduction se fait principalement par fécondation croisée (allogamie) (Sorensen, 1999). Le douglas est une plante anémophile, d'où une très large dispersion de son pollen (Adams,

1992). Quant aux graines, elles peuvent facilement être dispersées à plusieurs centaines de mètres (Bever and others, 1954).

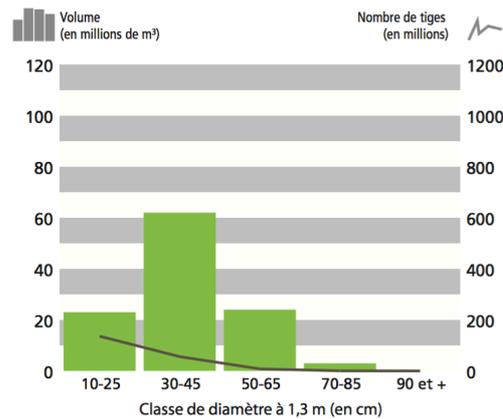
## 1.1.4. La ressource et la production de bois de douglas

### 1.1.4.1. En France

La France est le premier pays européen producteur de douglas, devant l'Allemagne et à un degré moindre la Grande-Bretagne et l'Espagne. Le douglas est une essence très exigeante du point de vue de la pluviométrie (700 mm de précipitations au moins) et par conséquent ne se plaît vraiment que dans les régions à climat océanique, dans les collines et moyennes montagnes françaises : piémont pyrénéen, Ardennes, pourtour des Vosges et dans le Massif central et son pourtour où se concentre l'essentiel de la douglaseraie française (Figure 3) (Claire, 2010). Le douglas occupe une superficie de plus de 400 000 ha en tant qu'essence principale, dont 68 % de cette superficie sous forme de peuplement monospécifique (IGN, 2014). Le volume sur pied de douglas est estimé à 112 Mm<sup>3</sup> avec une prépondérance d'arbres ayant un diamètre compris entre 30 et 45 cm (IGN, 2014, Figure 4). La production brute annuelle de cette essence était de 7,1 Mm<sup>3</sup> en 2007 (Claire, 2010).



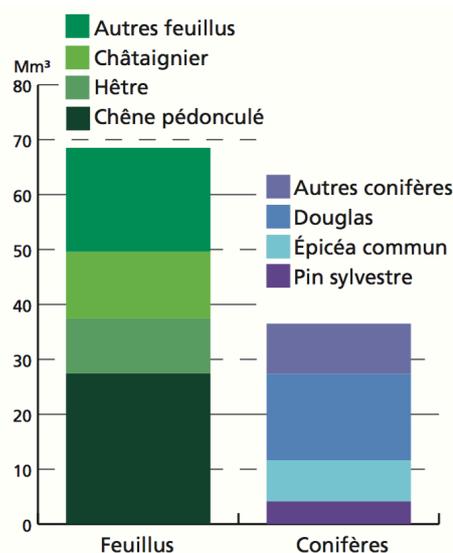
**Figure 3 : Répartition de la ressource en douglas en France, exprimée en volume sur pied (IGN, 2014).**



**Figure 4 : Volume et nombre de tiges de douglas par classe de diamètre (IGN, 2014).**

#### 1.1.4.2. En limousin

La forêt Limousine représente un tiers du territoire régional, soit environ 572 000 ha. Près des trois quarts de cette surface sont occupés par des feuillus avec comme essences principales le chêne pédonculé et le châtaignier. La ressource résineuse de la région est estimée à 37 Mm<sup>3</sup> soit 35 % de la ressource forestière régionale. Le douglas est la première essence résineuse avec 16 Mm<sup>3</sup> (IFN, 2010 ; Figure 5) répartie sur plus de 70 000 ha. Bien que le douglas ne représente à ce jour que la troisième essence forestière du territoire, sa ressource en Limousin est très importante puisqu'elle représente 18 % de la production française de cette essence. La majorité de cette ressource se situe sur les plateaux avec 8 Mm<sup>3</sup> sur le Plateau Limousin et 5 Mm<sup>3</sup> sur le Plateau de Millevaches (IFN, 2010).



**Figure 5 : Volume de bois en forêt de production par essence en Limousin (campagne d'inventaire 2005-2009) (IFN, 2010).**

### **1.1.5. Provenance de la ressource de douglas**

L'origine exacte des peuplements de douglas de première génération est rarement connue, l'information n'ayant pas été conservée lors de la réception des plants il y a 50 ans ou plus (Angelier, 2007).

Du fait des qualités technologiques de son bois et de sa croissance rapide, cette essence a rapidement fait l'objet d'un programme d'amélioration génétique en France. C'est ainsi que dans les années 1960-70, l'Etat a initié la mise en place de vergers à graines publics dont l'objectif était d'améliorer quantitativement et qualitativement la ressource française. Ce programme a abouti à la création de 8 vergers à graines (Tableau 2) installés dans le Sud Ouest de la France, dans le Lot et le Tarn, pour permettre des conditions climatiques favorables à la reproduction. Ces vergers couvrent une surface de 90 ha et alimentent de manière importante le marché des graines et plants forestiers, fournissant jusqu'à 87 % des plants de douglas commercialisés en France durant la campagne de vente 2009-10. Chacun des vergers comporte plusieurs provenances géographiques multipliées par voie végétative. Ces arbres sont originaires du Nord-Ouest Américain, principalement de l'Etat de Washington car ces provenances se sont montrées particulièrement bien adaptées et plus performantes sur notre territoire. Les sélections ont été réalisées par l'INRA lors de tests génétiques ou en forêt, sur divers critères : tardiveté de débournement, vigueur, forme et occasionnellement qualité du bois. Les vergers Darrington et la Luzette sont entrés en production en 1987 et 1996, respectivement. A cette époque, les catalogues des marchands grainiers proposent en plus du matériel biologique issu de ces deux vergers à graines, des graines ayant pour origine des peuplements sélectionnés des Etats de Washington, Oregon et Californie, et également issues de peuplements français sélectionnés. Petit à petit, les importations et les récoltes en peuplements porte-graines ont régressé au profit de la variété « La Luzette ». L'année 2003 marque un tournant dans le marché des plants forestiers de douglas. Suite à la canicule de 2003 et aux dépérissements provoqués dans les peuplements de douglas, les sylviculteurs s'interrogent sur les capacités de cette essence à résister à ces événements climatiques extrêmes. Considérant que le matériel français était de qualité suffisante, le ministère en charge de la forêt a interdit, en 2010, l'importation de graines en provenance des Etats-Unis. En conséquence, la diversification de l'offre des variétés améliorées a été entreprise et les six vergers restants ont été admis en catégorie qualifiée entre 2005 et 2010 et font désormais partis des catalogues grainiers. La contribution de ces six vergers à graines est pour le moment mineure mais est appelée à s'accroître rapidement (Philippe et al., 2011).

**Tableau 2 : Caractéristiques des 8 vergers de douglas français (Philippe et al., 2011)**

Code et nom de verger	Localisation	Année de plantation	Surface	Nombre de clones	Origine des clones
<b>PME-VG-001 Darrington</b>	Bouriane (Lot, nord de Cahors)	1978 + 1990	14 ha	70	Provenance Darrington (États-Unis, Washington), sélection au Danemark
<b>PME-VG-002 La Luzette</b>	Ségala (Lot, nord de Figeac)	1980/81	34 ha	226 (après éclaircie)	États-Unis (surtout Washington) + France (17 peuplements), sélection dans les Vosges et le Limousin
<b>PME-VG-003 Washington</b>	Tarn (Gaillac)	1984/87	8 ha	289	États-Unis (ouest Washington), sélection en pépinière
<b>PME-VG-005 Washington 2</b>	Tarn (Gaillac)	1983	8 ha	135	États-Unis (Washington), sélection en Dordogne
<b>PME-VG-004 France 1</b>	Ségala (Lot, nord de Figeac)	1990	6 ha	110	France (24 peuplements), sélection dans le Limousin
<b>PME-VG-007 France 2</b>	Bouriane (Lot, nord de Cahors)	1989	5 ha	138	France (24 peuplements), sélection dans l'Ariège
<b>PME-VG-008 France 3</b>	Ségala (Lot, nord de Figeac)	1989	10 ha	150	France (24 peuplements), sélection dans les Vosges
<b>PME-VG-006 Californie</b>	Bouriane (Lot, nord de Cahors)	1986	5 ha	116	États-Unis (essentiellement Californie), sélection en région méditerranéenne

### **1.1.6. Caractéristiques mécaniques et usages du bois de douglas**

Les propriétés mécaniques du bois de douglas sont excellentes et supérieures à celles de la plupart des autres résineux (épicéa et sapin) et équivalentes à celles du pin. Avec le bois de mélèze, le bois de douglas est le plus durable des bois de résineux en Europe. Il présente une densité et une stabilité au séchage supérieures à celles des autres résineux. Concernant son élasticité, le douglas a un module de rupture bien plus élevé que celui des autres résineux, ce qui lui confère un caractère très peu cassant recherché en structure. Ces caractéristiques mécaniques sont en partie dépendantes de la largeur des cernes et par conséquent de la sylviculture.

Du fait de ses caractéristiques mécaniques et de sa durabilité, le bois de douglas est l'un des plus polyvalents du marché. Il convient pour des usages aussi bien d'extérieurs que

d'intérieurs (Tableau 3 et Figure 6). Le principal débouché de ce bois est la structure, son utilisation en charpente étant courante. Il est utilisé en menuiserie d'extérieur (bardages, volets, fenêtres) et d'intérieur (ameublement, décoration, parquets) et suivant l'épaisseur des cernes peut aussi être déroulé pour servir de plaquage (Tableau 3). Le bois de douglas est également employé pour le génie hydraulique, la construction navale (mâts, pontons, traverses) et pour des usages moins nobles tels que la fabrication de caisses, d'emballages, de palettes ou en trituration (Angelier, 2007).

**Tableau 3 : Usages du douglas en fonction de la largeur des cernes et de la proportion de duramen (Angelier, 2007 ; Source : normes CTB).**

Proportion du duramen	Largeur des cernes		
	4 mm	6 mm	8 mm
Faible à moyenne			Déroulage, menuiserie
Elevée		Charpente, structure, menuiserie extérieure, déroulage	
Très élevée	Menuiserie extérieure, charpente sans préservation, menuiserie d'intérieur		



**Figure 6 : A : Charpente en douglas ; B : Pont de Merle en douglas (19) ([www.lacorreze.com](http://www.lacorreze.com)) ; C : Maison avec bardage en douglas traité ; D : Maison avec bardage en douglas (bardage horizontal) et mélèze (bardage vertical) non traités.**

## **1.2. Du bois au duramen**

Le bois est le composé biologique le plus abondant de la planète avec une masse sèche de près de 1000 gigatonnes (Groombridge and Jenkins, 2002). Depuis des siècles, le bois est un matériau multi-usages, employé dans la construction, la fabrication d'objets, de papier ou encore comme source d'énergie. Mais avant d'être un matériau utilisé par l'homme, le bois est, avant tout, le matériau de construction de l'arbre. Le bois leur permet en effet d'ériger à des hauteurs de plus de 50 mètres d'imposants houppiers et ceci pendant des siècles, malgré les aléas climatiques (Thibaut et al., 2001).

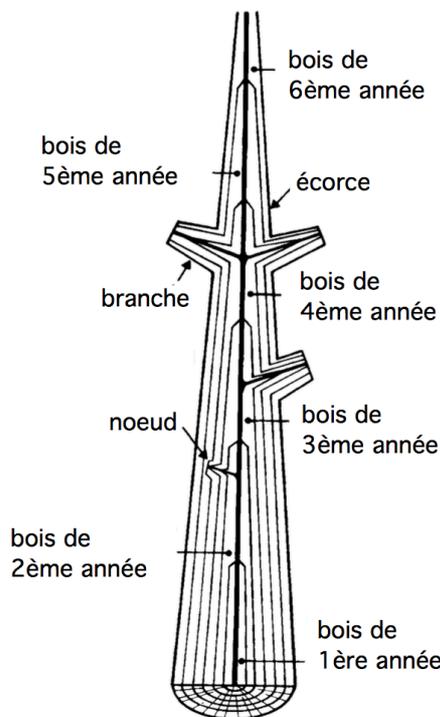
### **1.2.1. Le bois dans l'arbre**

Le bois, également appelé xylème secondaire, est l'un des tissus présent dans les troncs, les branches et les racines d'un arbre. C'est un tissu multifonctionnel : il permet la conduction de la sève xylémienne (eau et éléments minéraux) des racines jusqu'au houppier, le support physique de la biomasse de l'arbre en constante croissance, et le stockage des réserves (nutriments, hydrates de carbone, lipides, eau...) et des composés de défense (Déjardin et al., 2010).

### **1.2.2. Organisation phénologique**

La croissance des arbres est un phénomène complexe résultant d'une part de la mise en place et de l'élongation des axes (croissance primaire) et d'autre part de leur épaississement grâce à une croissance secondaire. Les plantes ont une croissance illimitée grâce à la présence de tissus embryonnaires nommés méristèmes. Les méristèmes sont composés de cellules indifférenciées capables de se diviser potentiellement à l'infini. La croissance primaire des végétaux est assurée par des méristèmes apicaux qui sont situés aux extrémités des racines et dans les bourgeons du système caulinaire. Chez les plantes ligneuses, les parties où la croissance primaire a cessé voient leur circonférence augmentée par l'activité de méristèmes secondaires, dits latéraux : le cambium et le phellogène (Campbell and Reece, 2007). Le cambium, en produisant le bois de l'arbre, assure ainsi la consolidation des axes par leur augmentation en diamètre (Schweingruber et al., 2007). Le cambium est soumis à des cycles saisonniers d'activité et de quiescence, régulés par des facteurs endogènes et environnementaux (Begum et al., 2013). Cette croissance périodique se traduit par l'empilement de couches en forme de cônes concentriques qui forment les cernes de croissance du bois (Figure 7). Le bois formé dans les premières années de croissance de

l'arbre, et qui correspond donc aux cernes les plus internes, est un bois dit juvénile. Chez les essences dites à bois durs (les feuillus), la transition progressive entre bois juvénile et bois mature n'est pas perceptible. En revanche, chez les essences dites à bois tendre (les résineux), le bois juvénile présente généralement des cernes de croissance plus larges que le bois mature. Le bois juvénile est moins dense et moins résistant que le bois mature (Rowell, 2005). Sous les climats tempérés et boréaux, les cycles météorologiques saisonniers sont si prononcés que les cernes de croissance sont visibles à l'œil nu. A l'intérieur de ces cernes de croissance, ou cernes annuels, se différencie deux types de bois : le bois initial produit en début de saison de végétation et le bois final produit plus tardivement. Ces deux types de bois diffèrent par les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules qui les composent (Rowell, 2005).

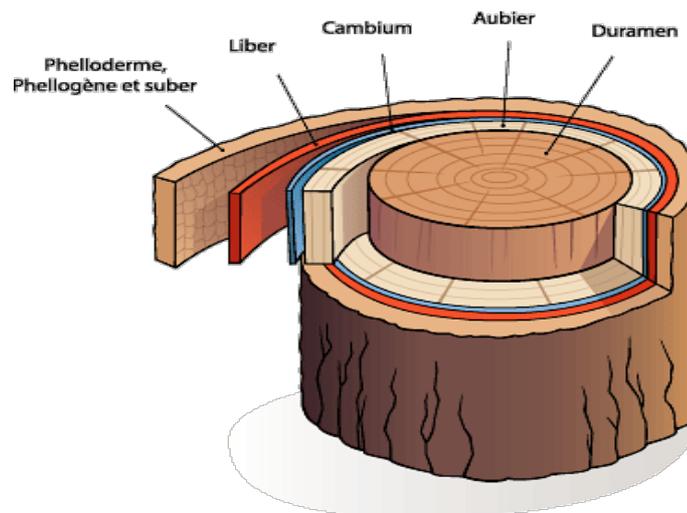


**Figure 7 : Représentation schématique de la croissance primaire et secondaire d'un arbre par la superposition successive de couches en forme de cône (Navi and Heger, 2005).**

### 1.2.3. Organisation anatomique

D'un point de vue anatomique, les couches les plus profondes du xylème constituées de cellules mortes, forment le bois parfait, ou duramen. Lorsqu'il est présent, le duramen se met en place à un stade de maturité biologique dépendant tout à la fois de l'essence et des conditions environnementales (Hillis, 2014). Entre le duramen et le cambium se trouve

l'aubier formé à la fois de cellules vivantes et mortes (Figure 8). Chez certaines essences, le duramen présente une coloration différente de l'aubier (du rouge au brun suivant l'essence) du fait de l'accumulation des extractibles. Cette modification d'aspect est associée à une augmentation de la durabilité naturelle du bois de cœur (Kampe and Magel, 2013). Le cerne qui sépare l'aubier du duramen est appelé zone de transition (TZ) (International Association of Wood Anatomists and Committee on Nomenclature, 1964). A la périphérie de l'aubier, le cambium permet à la fois le renouvellement du xylème grâce à la xylogénèse suivant un processus de différenciation centripète et la formation du phloème (ou liber) au cours d'un processus de maturation centrifuge. Le phloème assure la circulation de la sève phloémienne constituée de photosynthétats, d'eau et d'éléments minéraux. Dans le tronc et les branches se trouve un second méristème secondaire, le phellogène. Ce méristème produit deux tissus protecteurs que sont le phelloderme vers l'intérieur et le suber (ou liège) vers l'extérieur (Figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique d'une section de tronc ([www.cafe-sciences.org](http://www.cafe-sciences.org)).**

#### **1.2.4. Organisation cellulaire**

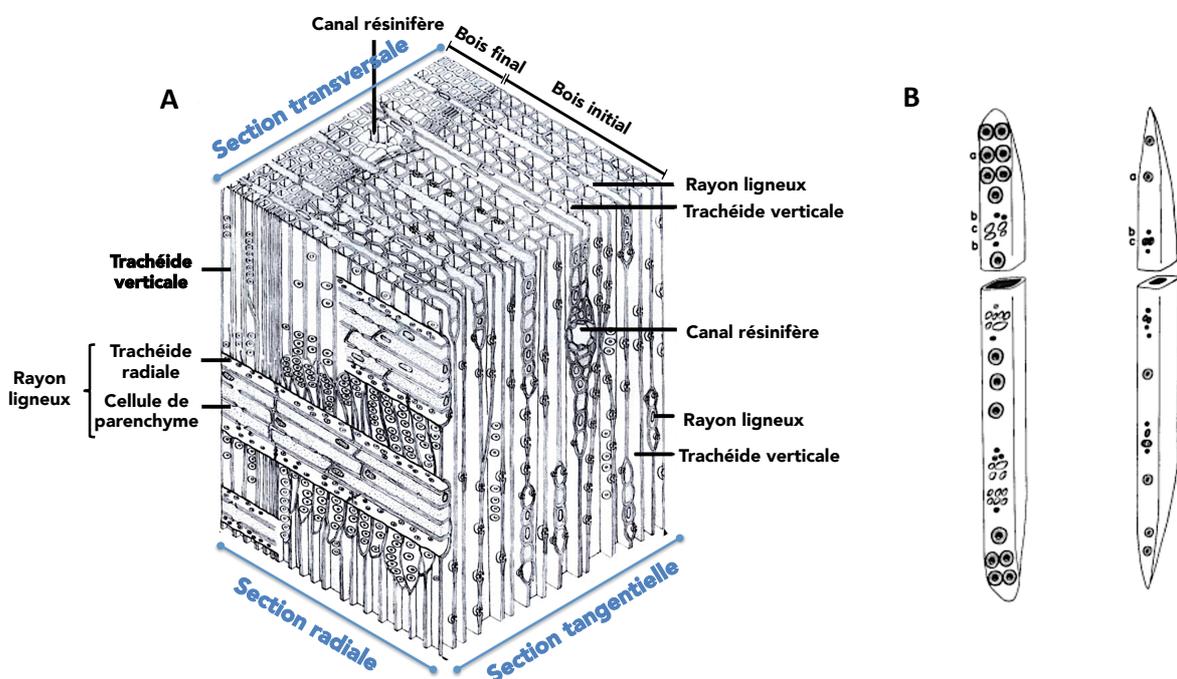
Les arbres se retrouvent au sein de 2 taxons principaux : les gymnospermes (résineux) et les angiospermes (feuillus). Ces deux groupes diffèrent entre-autre par leur mode de reproduction mais aussi par l'organisation cellulaire de leur bois. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux gymnospermes (groupe auquel appartient le douglas) après avoir décrit succinctement l'organisation cellulaire du bois des angiospermes.

Chez ces derniers, plusieurs types cellulaires d'aspect et de morphologie différents remplissent les différentes fonctions du bois, d'où sa qualification de bois hétéroxylé. La conduction de la sève et le soutien sont assurés respectivement par les vaisseaux et les fibres. Les cellules du parenchyme organisées en rayon sont, quant à elles, impliquées dans le transfert des assimilats entre le phloème et le xylème, leur stockage sous forme d'amidon ou de lipides et leur remobilisation (Déjardin et al., 2010).

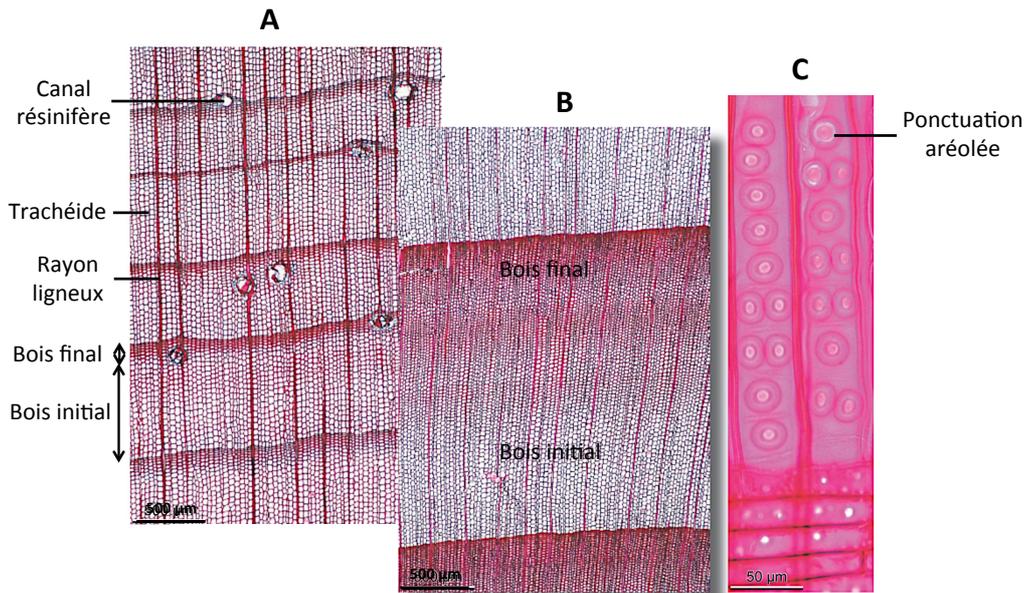
Contrairement aux angiospermes, les gymnospermes et certains angiospermes primaires ont un bois dit homoxylé (Figure 9A). La conduction de la sève et le soutien sont tous deux assurés par un même type cellulaire, les trachéides, qui constituent ainsi jusqu'à 90 % de leur bois. Les trachéides fonctionnelles sont des cellules mortes où ne subsiste que la paroi. Elles ont une forme très effilée et sont environ 100 fois plus longues que larges (Figure 9B) (Pallardy, 2010). Les caractéristiques dimensionnelles de la paroi varient en fonction de la saison en zones tempérées et froides. Les trachéides formées à la sortie de l'hiver ont un diamètre de 30-50  $\mu\text{m}$  et des parois de 2-3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Elles forment le bois initial. Celles formées en fin de saison de végétation voient leur diamètre divisé par 2 ou 3 (15-25  $\mu\text{m}$ ) et présentent des parois beaucoup plus épaisses (4-8  $\mu\text{m}$ ). Ces dernières forment le bois final (Figure 10). Les trachéides du bois initial auraient une plus grande importance dans la conduction de la sève, alors que celles du bois final joueraient un rôle dans le soutien mécanique de l'arbre (Wilson, 1984). Les caractéristiques des trachéides varient également entre bois mature et bois juvénile. D'une manière générale, dans le bois juvénile, la lumière des trachéides est plus étroite comparées aux trachéides du bois normal mature (Rowell, 2005). Les trachéides sont organisées en files de cellules verticales et se chevauchent au niveau de leurs extrémités. La communication entre les différentes cellules du bois est permise grâce à de petites ouvertures dans la paroi, les ponctuations. Différents types de ponctuations sont retrouvés sur les parois radiales des trachéides. De larges ponctuations aréolées sont observées entre deux trachéides axiales adjacentes, de petites ponctuations aréolées entre les trachéides axiales et radiales et des ponctuations semi-aréolées entre les trachéides et les cellules parenchymateuses (cf paragraphe suivant). Les ponctuations aréolées possèdent une membrane commune constituée de paroi primaire et de lamelle moyenne et la paroi secondaire « déborde » sur la cavité pour former la chambre de la ponctuation. Chez la plupart des gymnospermes, la membrane comporte un épaississement central, appelé torus, qui par aspiration peut venir obstruer la ponctuation (Pallardy, 2010). De manière normale,

cette obstruction intervient plusieurs années après la formation des trachéides, marquant le passage de l'aubier au duramen (Plavcová and Jansen, 2015).

Outre les trachéides, le bois des conifères est composé également de cellules parenchymateuses organisées en rayons ligneux (Figure 9A) (Jacquot, 1955). Les rayons ligneux jouent un rôle physiologique important dans le stockage des polysaccharides de réserve et des minéraux, ainsi que dans le transfert radial de l'eau, des minéraux et des composés organiques. Chez certaines espèces, des trachéides horizontales peuvent être présentes dans les rayons ligneux. Ces trachéides possèdent des parois lignifiées épaisses tandis que les cellules parenchymateuses ont de fines parois. Au niveau de l'aubier, les cellules parenchymateuses sont vivantes et vont progressivement mourir lors de la transformation de l'aubier en duramen. Des canaux résinifères entourés de cellules épithéliales ainsi que des cellules verticales du parenchyme peuvent également être retrouvés chez certaines espèces de gymnospermes (Figure 9A) (Pallardy, 2010). La proportion de parenchyme dans le bois est généralement comprise entre 5 et 10 %, principalement sous forme de parenchyme radial. Tandis que pour les angiospermes, ces valeurs sont plus élevées, typiquement entre 20 et 40 % (Plavcová and Jansen, 2015).



**Figure 9 : A) Structure du bois des conifères (modifié d'après Raven et al., 2007). B) Trachéide de bois initial (à gauche) et de bois final (à droite). a, Grandes ponctuations aréolées inter-trachéide; b, petites ponctuations aréolées vers les trachéides radiales ; c, ponctuations semi-aréolées vers les cellules du parenchyme (Pallardy, 2010).**



**Figure 10 : Observations en microscopie optique de sections transversales de bois (A et B) et radiale de trachéide (C). A : Bois de Pin Sylvestre (*Pinus sylvestris*) avec canaux résinifères ; B : Bois de Sapin pectiné (*Abies alba*) sans canaux résinifères ; C : Section radiale de trachéide avec ponctuations aréolées (modifié d'après Schweingruber et al., 2007).**

### 1.2.5. Organisation pariétale

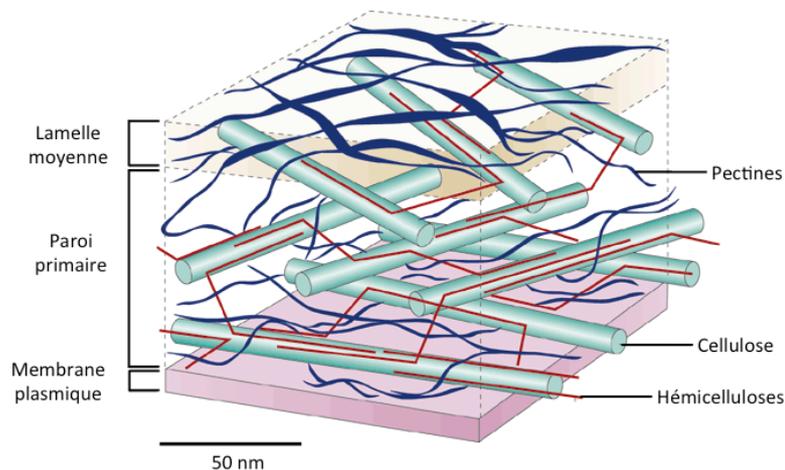
Le bois des gymnospermes est essentiellement formé de trachéides et donc de l'enchevêtrement tridimensionnel de parois de cellules végétales mortes. Tel le squelette des animaux, la paroi végétale a une place déterminante dans la forme des plantes, leur croissance et leur développement. Elle a également un rôle dans les mécanismes de signalisation, de défense et de réponse aux stress environnementaux. Chez tous les végétaux, la paroi est composée de plusieurs couches : la lamelle moyenne, la paroi primaire et pour certains types cellulaires s'ajoute une troisième couche, la paroi secondaire.

#### 1.2.5.1. La lamelle moyenne

La lamelle moyenne est la première strate pariétale à se former après la division cellulaire. Elle ne mesure que 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et est principalement composée de substances pectiques impliquées dans l'adhésion entre cellules voisines. A la fin de la différenciation des cellules présentant une paroi secondaire, de la lignine (un polymère phénolique) peut également se déposer dans la lamelle moyenne. La lamelle moyenne constitue la couche la plus externe de la paroi (Plomion et al., 2001).

### 1.2.5.2. La paroi primaire

La paroi primaire, déposée sur la face interne de la lamelle moyenne, est une couche fine (< 100 nm), souple et hautement hydratée (environ 60 % du poids sec) (Doblin et al., 2010). Cette paroi doit être tout à la fois résistante et extensible pour permettre la dilatation des cellules (Hamant and Traas, 2010). La paroi primaire est organisée autour d'un réseau complexe de polysaccharides (environ 90 %) et de protéines (environ 10 %). Dans certains types cellulaires spécialisés, d'autres molécules telles que la lignine, la cutine ou encore la subérine peuvent entrer dans la composition de la paroi primaire (Fry, 2004). Tous ces polymères sont associés entre eux *via* des liaisons covalentes ou non. Dans tous les types cellulaires, les microfibrilles rigides de cellulose sont enchâssées dans une matrice de polysaccharides non-cellulosiques (pectines et hémicelluloses) (Figure 11). La nature chimique des polysaccharides présents dans la paroi varie suivant l'espèce végétale, le type cellulaire, le stade de développement, ou encore les contraintes biotiques et abiotiques subies par la plante (Doblin et al., 2010). D'une manière générale, les parois primaires des angiospermes dicotylédones et des gymnospermes sont composées de 15 à 40 % de cellulose, de 30 à 50 % de polysaccharides pectiques, de 20 à 30 % de xyloglucanes et dans une moindre mesure d'arabinoxylanes (hémicelluloses). Les pectines sont particulièrement importantes pour l'hydratation de la paroi, nécessaire à sa souplesse et à la séparation des microfibrilles de cellulose durant l'expansion cellulaire (Cosgrove and Jarvis, 2012).

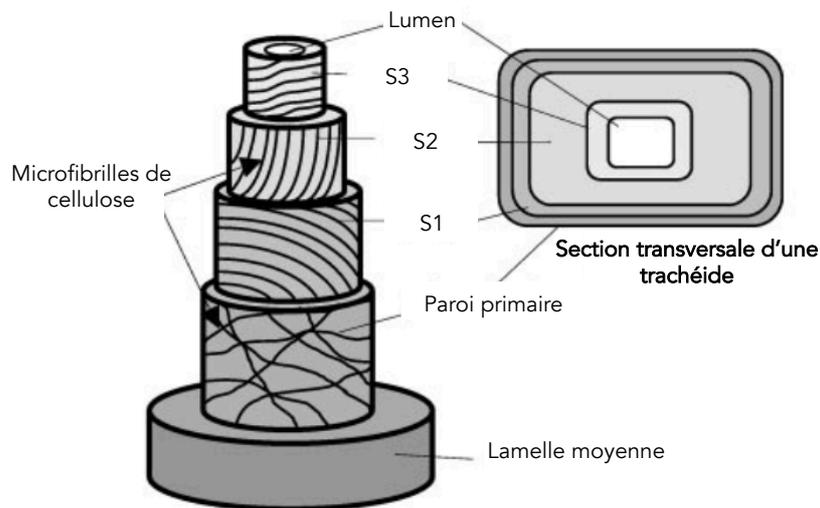


**Figure 11 : Représentation schématique de la paroi primaire (modifié d'après Smith, 2001).**

### 1.2.5.3. La paroi secondaire

Une fois leur croissance terminée, les cellules de certains tissus spécialisés comme les fibres, les trachéides et les vaisseaux, déposent progressivement sur la face interne de la paroi primaire des couches pariétales supplémentaires qui vont constituer la paroi secondaire. Cette paroi est composée de microfibrilles de cellulose associées à de la lignine et des hémicelluloses (xylanes et glucomannanes majoritairement). La paroi secondaire est moins hydratée que la paroi primaire, elle contient environ 30 % d'eau à saturation (Doblin et al., 2010). La paroi secondaire est subdivisée en 3 couches nommées S1, S2 et S3. Ces couches diffèrent principalement par l'orientation des microfibrilles de cellulose qui dans tous les cas sont ordonnées de manière parallèle (Figure 12). La couche la plus fine est la couche S1 qui mesure de 0,1 à 0,35  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Elle ne représente que 5 à 10 % de l'épaisseur totale de la paroi. La couche S1 présente un angle des microfibrilles de 60-80° par rapport à l'axe des cellules. La couche S2, de 1 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est la plus épaisse. Elle représente 75 à 85 % de l'épaisseur totale de la paroi (Fengel and Wegener, 1984). Cette couche joue un rôle primordial dans le soutien mécanique. De par l'importance de la strate S2, l'orientation et/ou les modifications d'orientation des microfibrilles de cellulose ont des conséquences sur les propriétés mécaniques du matériau. Au sein de la couche S2, l'angle des microfibrilles par rapport à la verticale est de l'ordre de 5 à 30° pour le bois normal. La dernière couche, la plus interne de la paroi, est la couche S3. Cette dernière est relativement fine, ne mesurant que 0,5 à 1,1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Bien que les microfibrilles y soient parallèles, elles le sont moins strictement que dans la couche S2. Leur angle par rapport à l'axe des cellules est de 60 à 90° (Plomion et al., 2001). Chez certaines essences comme le douglas, la couche S3 des trachéides longitudinales présente des ornements sous forme d'épaississements spiralés dus à des dépôts de cellulose localement plus importants (Trouy, 2015).

Les 3 couches de la paroi peuvent être modifiées pendant l'étape de maturation des cellules qui peut durer jusqu'à plusieurs jours après la formation des cellules dans le cas du bois. Les quantités de lignines et de cellulose peuvent par exemple être influencées par des facteurs abiotiques tels que des contraintes mécaniques (cf paragraphe 1.5.1). Des différences au niveau de la composition en polymères pariétaux de la paroi secondaire sont également observées entre le bois juvénile et le bois mature. Comparé au bois mature, le bois juvénile contient moins de cellulose mais plus d'hémicelluloses et de lignines (Rowell, 2005).



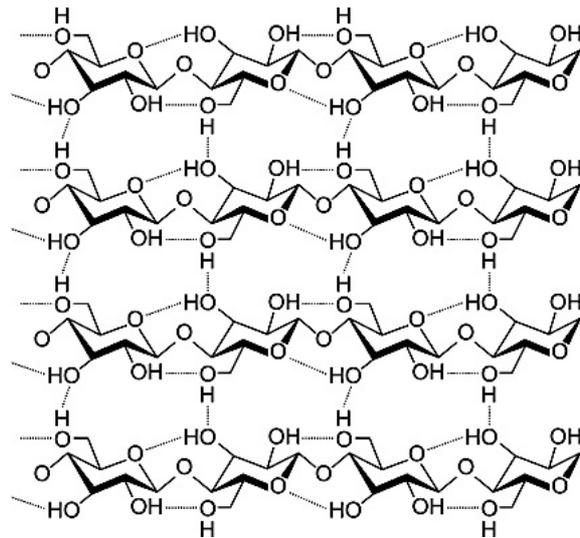
**Figure 12 : Représentation schématique de l'orientation des microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire et la paroi secondaire d'une trachéide (modifié d'après Plomion et al., 2001).**

### 1.2.6. La composition moléculaire du bois

Le bois est un tissu riche en polymères pariétaux, majoritairement composé de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines. Dans une moindre mesure, le bois contient également des pectines, des protéines, des sucres circulants, des réserves glucidiques et lipidiques, des extractibles et des minéraux.

#### 1.2.6.1. La cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant de la paroi des cellules végétales. Elle représente 40 à 50 % de la matière sèche du bois (Plomion et al., 2001). La cellulose est un homopolymère linéaire constituée d'unités D-glucopyranose (D-Glc) liées entre-elles par des liaisons  $\beta$ -(1-4) glucosidiques dont l'unité de base est un disaccharide, le cellobiose. Le degré de polymérisation de la cellulose varie en fonction de la source et de l'âge du tissu. Il est d'environ 6000 dans la paroi primaire et peut atteindre 10 à 15 000 résidus Glc dans la paroi secondaire. Toutes les fonctions alcools du polymère sont susceptibles d'être impliquées dans la formation de liaisons hydrogènes avec d'autres molécules de cellulose formant alors une structure cristalline stable et résistante aux hydrolyses enzymatiques, chimiques et physiques. Les liaisons hydrogènes intermoléculaires sont à l'origine de l'association des chaînes cellulosiques pour former les microfibrilles (Doblin et al., 2010) (Figure 13).



**Figure 13 : Chaînes de cellulose reliées entre-elles par des liaisons hydrogène (wikipedia.org)**

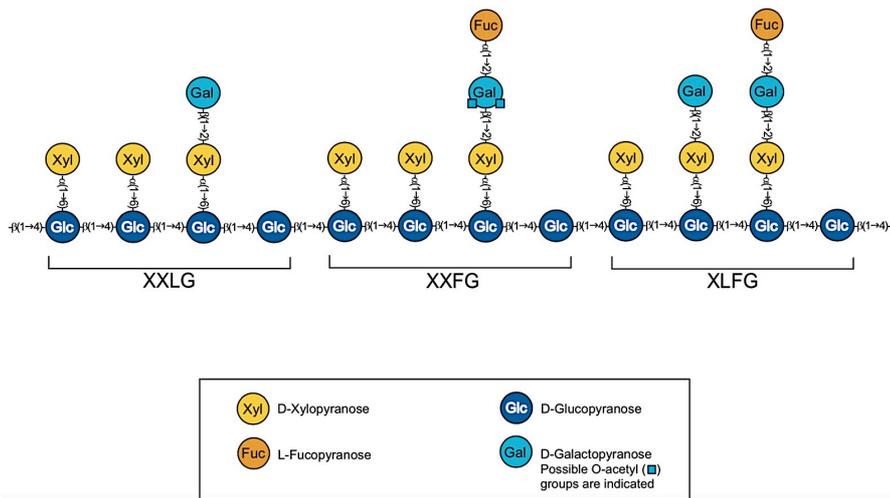
### 1.2.6.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses regroupent tous les polysaccharides présents dans les parois des cellules végétales qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques. Ces molécules ont une structure commune constituée d'un enchaînement de résidus monosaccharidiques liés en  $\beta$ -(1-4) sur lesquelles viennent se greffer de courtes chaînes glucidiques de natures diverses, composés d'unités pyranosyles, furanosyles ou d'acides uroniques. Les hémicelluloses représentent environ 25 % de la matière sèche du bois (Plomion *et al.* 2001).

#### 1.2.6.2.1. Les xyloglucanes (XGs)

Le squelette de base de ce polymère est composé d'unités D-Glcp liées en  $\beta$ -(1-4). Jusqu'à 75 % du glucose est substitué en O6 par des D-xylopyranose (D-Xylp) liés en  $\alpha$ -(1-6). Les Xyl peuvent eux-mêmes être substitués par du galactose (Gal), de l'arabinose (Ara) ou encore du fucose (Fuc). La composition des chaînes latérales est relativement diverse suivant le tissu et l'espèce végétale considérée (Fry, 1989; Vincken *et al.*, 1997). La présence de résidus Fuc est souvent considérée comme étant caractéristique des XGs de dicotylédones. Pour désigner la structure de ces polymères sans ambiguïté, Fry *et al.* (1993) ont mis en place une nomenclature. La molécule de XG est nommée en découpant le squelette en segments représentant un résidu Glc et sa chaîne latérale. A chaque segment est attribué une lettre spécifique en fonction de la composition de la chaîne latérale. La lettre « G » correspond à un résidu  $\beta$ -D-Glcp non substitué, la lettre « X » à un segment comportant un résidu Xyl sur le Glc ( $\alpha$ -D-Xylp-(1-6)- $\beta$ -D-Glcp), la lettre « L » au segment  $\beta$ -D-Galp-(1-2)- $\alpha$ -D-Xylp-(1-6)- $\beta$ -

D-Glcp) et la lettre « F » au segment  $\alpha$ -L-Fucp-(1-2)- $\beta$ -D-Galp-(1-2)- $\alpha$ -D-Xylp (1-6)  $\beta$ -D-Glcp (Figure 14) (Fry et al., 1993). La plupart des XGs sont de type XXXG ou XXGG (Vincken et al., 1997). Les chaînes latérales des Glc empêchent la formation de liaisons hydrogène entre les molécules de XGs, ce qui rend ces molécules à la fois flexibles et solubles. Cependant, les XGs peuvent contracter des liaisons hydrogènes avec la cellulose (Doblin et al., 2010).

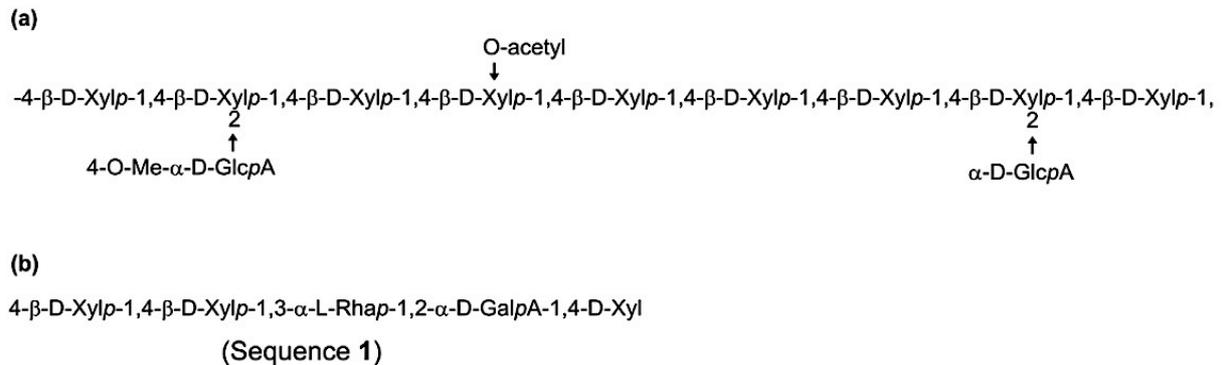


**Figure 14 : Représentation schématique des xyloglucanes (Somerville et al., 2004)**

#### 1.2.6.2.2. Les xylanes

Le squelette des xylanes est composé d'unités D-Xylp liées en  $\beta$ -(1-4). Environ 10 % des résidus Xyl sont substitués au niveau de leurs fonctions alcools des C2 et C3 soit par des résidus d'acide  $\alpha$ -D-glucuronique (GlcAp) ou d'acide 4-O-méthylglucuronique (Me-GlcAp) pour former les glucuronoxylanes (GXs), soit par des résidus de  $\alpha$ -L-arabinofuranose (Araf) pour donner les arabinoxylanes (AXs), ou encore par les deux donnant ainsi les glucuronarabinoxylanes (GAXs). La structure des xylanes est variable entre différentes espèces, mais également entre les tissus d'une même espèce. Les xylanes sont les hémicelluloses prédominantes dans la paroi secondaire des dicotylédones (Ebringerova et al., 2005) et sont des composants minoritaires de celle du bois des gymnospermes (Doblin et al., 2010). La figure 15a représente schématiquement la structure des GXs retrouvés chez les dicotylédones et les gymnospermes. Ces GXs possèdent une séquence unique de résidus glucidiques à leur extrémité réductrice (Figure 15b) (York and Oneill, 2008). Les xylanes interagiraient avec les microfibrilles de cellulose et se lieraient entre-eux et également avec d'autres polymères pariétaux *via* des liaisons hydrogènes en fonction des substitutions

présentes. Les xylanes pourraient aussi se lier de manière covalente à la lignine *via* des liaisons esters avec le GlcA ou éthers avec le Xyl ou l'Ara (Rennie and Scheller, 2014).



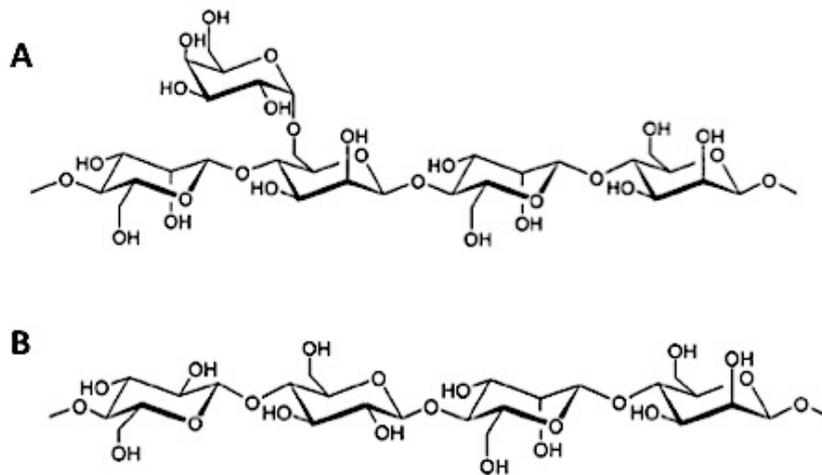
**Figure 15 : (a) Représentation schématique des xylanes produits par les dicotylédones et les gymnospermes et (b) la séquence unique présente à leur extrémité réductrice (York and O'Neill, 2008).**

#### 1.2.6.2.3. Les β-glucanes mixtes

Ce sont des polymères linéaires de Glc contenant en moyenne 30 % de liaisons β-(1-3) et 70 % de liaisons β-(1-4). Le motif de base comporte 3 à 4 Glc liés en β-(1-4). Ces motifs sont ensuite liés entre-eux par des liaisons β-(1-3) pour former le polymère. Les β-glucanes mixtes n'ont jusqu'à maintenant pas été mis en évidence chez les dicotylédones. Ils seraient en effet présents uniquement chez les poacées (Scheller and Ulvskov, 2010).

#### 1.2.6.2.4. Les mannanes

Les mannanes sont divisés en deux classes : les galactomannanes et les glucomannanes. Les premiers ont un squelette linéaire de D-mannopyranose (D-Manp) liés en β-(1-4), tandis que les seconds ont à la fois des D-Manp et des D-Glcp liés en β-(1-4) dans leur squelette. Des chaînes latérales d'α-D-Galp peuvent être présentes sur la fonction alcool du C6 du Man dans les deux cas pour donner respectivement les galactomannanes ou les glucogalactomannanes (Figure 16). Le degré de substitution des mannanes par les Gal influe sur leur capacité à se lier aux microfibrilles de cellulose : plus les mannanes sont substitués, moins ils vont pouvoir établir de liaisons avec la cellulose. Les résidus Manp peuvent également présenter des acétylations sur les positions 2 et 3. La structure de ces polymères dépend de l'espèce et du stade de développement des plantes. Les glucomannanes sont une hémicellulose importante des parois secondaires des cellules du xylème des gymnospermes, tandis qu'elles sont des composants minoritaires de celles des angiospermes (Ebringerová et al., 2005).



**Figure 16 : (A) Structure primaire des galactomannanes et (B) des glucomannanes (Ebringerová et al., 2005).**

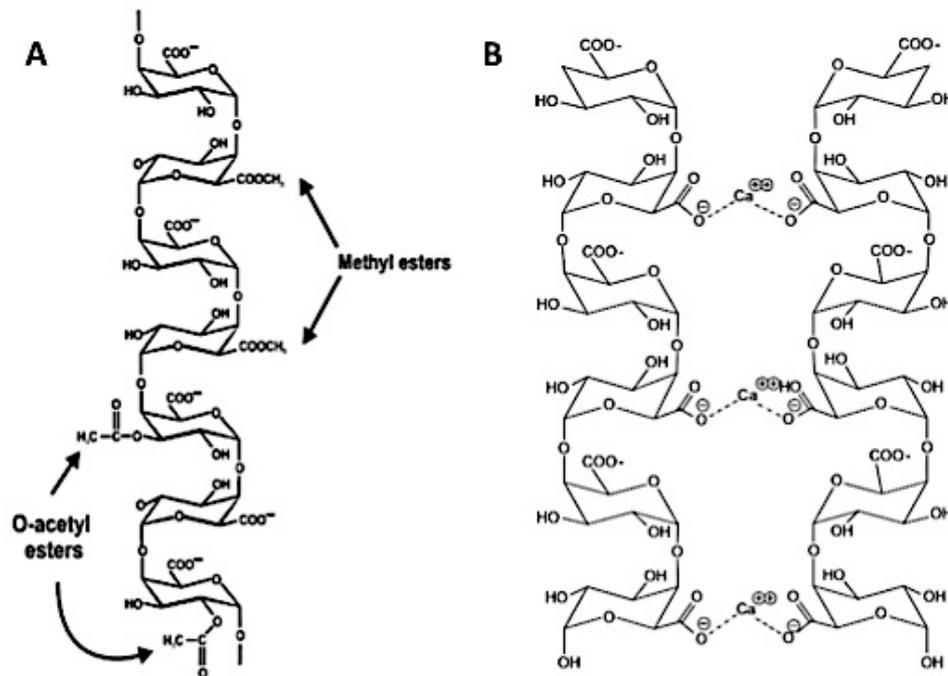
### 1.2.6.3. Les pectines

Les pectines sont les polymères pariétaux les plus complexes, elles représentent plus de 35 % de la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones à l'exception des poacées et autour de 5 % de la paroi du bois. Les pectines ont de multiples rôles, elles interviennent dans la croissance, le développement et la morphogénèse des cellules, dans l'adhésion, la signalisation ou encore dans les processus de défense. Ce sont des polymères riches en acides galacturoniques. Selon leur structure, les polymères pectiques sont divisés en 3 classes : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes I (RG I) et les rhamnogalacturonanes II (RG II). Les données actuelles suggèrent que ces 3 polymères pourraient être liés entre-eux de manière covalente au niveau de leur squelette. Les pectines peuvent également être liées de façons covalente ou non à d'autres polymères pariétaux tels que les XGs et les xylanes (Mohnen, 2008).

#### 1.2.6.3.1. Les homogalacturonanes (HG)

Les HGs sont les polysaccharides pectiques les plus abondants de la paroi primaire. Ils sont constitués d'une chaîne linéaire de D-GalA liés en  $\alpha$ -(1-4). Les D-GalA peuvent subir des modifications telles que la méthylestérification des fonctions carboxyliques ou l'acétylation sur les fonctions alcools secondaires en C2 ou C3 (Figure 17A). Les galacturonanes substitués sont des HGs substitués entre autre par du xylose (xylogalacturonanes) ou de l'apiose (apiogalacturonanes) (O'Neill et al., 1990). Les fonctions carboxyliques non méthylées des HGs sont chargées négativement et peuvent interagir avec du  $\text{Ca}^{2+}$  pour former un gel lorsque

plus de 10 résidus GalA non méthylestérifiés sont contigus. Cette structure est souvent qualifiée de modèle « boîte à œufs » (Figure 17B) (Caffall and Mohnen, 2009).



**Figure 17 : (A) Structure des HGs et (B) structure en « boîte à œufs » des HGs (Caffall and Mohnen, 2009).**

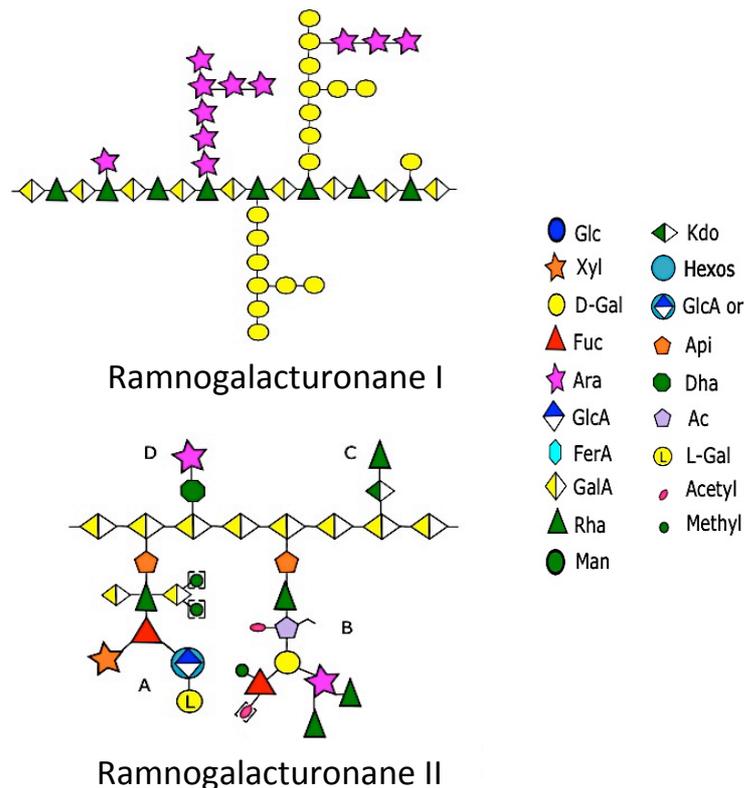
#### 1.2.6.3.2. Les rhamnogalacturonanes de type I (RG I)

Les RG I sont composés d'une chaîne principale présentant la répétition d'une centaine de motifs disaccharidiques  $\alpha$ -(1-4)-D-GalpA- $\alpha$ -(1-2)-L-Rhap (Lerouge et al., 1993). Entre 20 et 80 % des résidus rhamnose (Rha) sont substitués en position C4 par des oligosaccharides acides ou neutres. Ces substitutions peuvent être des résidus uniques de D-Galp liés en  $\beta$ -(1-4) ou des polymères linéaires ou branchés de résidus  $\alpha$ -L-Ara et  $\beta$ -D-Gal. Il s'agit notamment d'arabinanes et/ou de galactanes et d'arabinogalactanes de type I (arabino-4-galactane) ou de type II (arabino-3-6-galactane) (Ridley et al., 2001) (Figure 18). Les résidus de GalA ne sont généralement pas substitués. Les résidus GalA du RG I peuvent être méthylestérifiés ou parfois O-acétylés en position C2 ou C3 (Komalavilas and Mort, 1989).

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

Les RG II représentent 3 à 4 % des constituants de la paroi primaire des dicotylédones. Ils comprennent environ 9 résidus de GalA auxquels sont liées quatre chaînes latérales complexes (A, B, C et D) (Pérez et al., 2003). Ces chaînes latérales contiennent 12 types de

résidus glycosides, parmi lesquels des résidus très rares tels que le D-apiose (Api), l'acide acérique (3-C-Carboxy-5-deoxy-L- xylofuranose) (AceA), le 2-O-méthyl-L-fucose, le 2-O-méthyl-D-Xyl, le L-Gal, l'acide 2-kéto-3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique (Dha), et le 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonate (Kdo) (Figure 18). Malgré sa complexité et leurs faibles proportions, la structure des RG II est globalement conservée au sein du règne végétal, ce qui suggère leurs rôles importants dans la paroi. Les RG II existent essentiellement sous forme de dimères : deux sous-unités de RG II sont reliées entre-elles *via* un atome de bore entre les résidus Api de la chaîne latérale A (Mohnen, 2008; O'Neill et al., 2004).

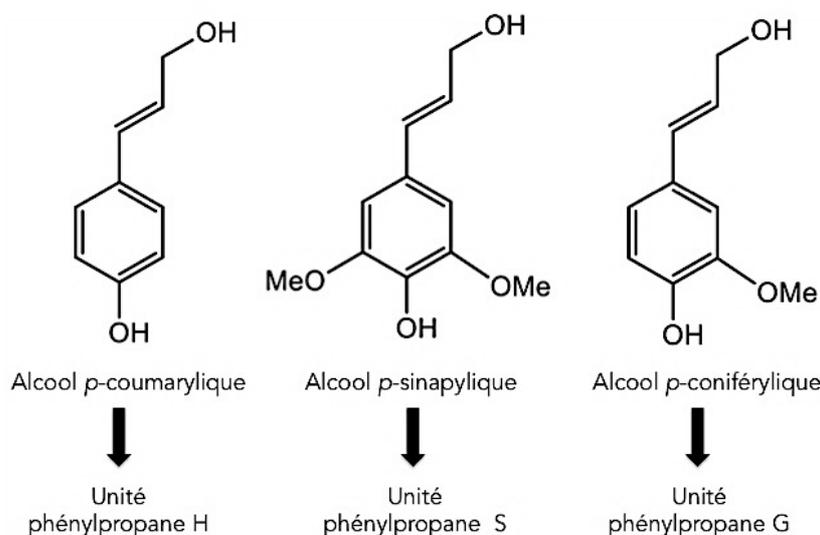


**Figure 18 : Représentation schématique des RG I et RG II (redessiné d'après Doblin et al., 2010 et Pabst et al., 2013).**

#### 1.2.6.4. Les lignines

Les lignines sont des polymères phénoliques qui représentent 25 à 35 % de la matière sèche du bois (Plomion et al., 2001). Ces polymères, apparus il y a 380 millions d'années, ont permis aux végétaux d'acquies un port érigé et de conquies le milieu terrestre (Trouy, 2015). Contrairement à la cellulose qui a une structure bien définie, les lignines ont une composition et une structure très variables. Elles sont constituées de 3 types d'unités phénylpropanes, les unités *p*-hydroxyphényle (H), guaiacyle (G) et syringyle (S). Ces unités sont respectivement issues de 3 alcools précurseurs ou monolignols qui diffèrent par leur degré de méthylation,

l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Figure 19). Ces unités sont liées ensemble par des réactions de couplage oxydatif lors du processus de lignification. Les liaisons retrouvées entre les unités sont de type éther (la liaison éther  $\beta$ -O-4 aryl étant majoritaire) et carbone-carbone. La structure des lignines varie avec l'origine botanique des plantes. Chez les gymnospermes, les lignines sont surtout constituées d'unités G, pouvant être accompagnées de traces d'unités H. Chez les angiospermes dicotylédones, les lignines sont constituées d'unités G et S (Vanholme et al., 2010). Chez les angiospermes monocotylédones, les trois types d'unités sont retrouvées dans les lignines qui contiennent également, chez les poacées, des esters et des éthers d'acides hydroxycinnamiques (Lewis and Yamamoto, 1990). En plus de varier d'un taxon ou d'une espèce à l'autre, la teneur et la structure des lignines varient également en fonction des types cellulaires et des strates pariétales (Vanholme et al., 2010). Les lignines sont cruciales pour l'intégrité de la paroi et donnent rigidité et cohésion au bois. De plus, elles ont un caractère hydrophobe marqué imperméabilisant la paroi et facilitant ainsi le transport de l'eau et des solutés par le système vasculaire. Ces polymères ont également un rôle protecteur contre les pathogènes (Boerjan et al., 2003).



**Figure 19 : Structure chimique des monolignols à l'origine des unités phénylpropanes H, S et G des lignines (d'après Vanholme et al., 2010).**

#### 1.2.6.5. Les protéines pariétales

Une grande diversité de protéines a été mise en évidence au sein de la paroi végétale. Ces protéines ont été réparties en différents groupes en fonction de leur contenu en acides aminés (elles sont généralement riches en 1 ou 2 acides aminés et contiennent des domaines de séquences hautement répétées) et de leur taux de N- ou O-glycosylation. Les protéines pariétales les plus abondantes et les plus étudiées sont les glycoprotéines riches en

hydroxyproline (HRGPs) ou extensines, les arabinogalactanes protéines (AGPs), les protéines riches en glycine (GRPs), les protéines riches en proline (PRPs) et des protéines chimériques contenant des domaines « extensines-like ». L'abondance de ces protéines dans la paroi dépend du type cellulaire. Les extensines et les PRPs sont considérées comme des protéines structurales, elles ont aussi un rôle important dans le développement et la défense des plantes. Contrairement aux précédentes, les AGPs ne sont pas liées de manière covalente à la paroi et n'ont donc pas de rôle structurel (Cassab, 1998). La majorité des AGPs caractérisées ont un contenu en protéine compris entre 1 et 10 % et contiennent plus de 90 % de polysaccharides. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme par exemple dans la prolifération et la croissance des cellules, et également dans les interactions avec des micro-organismes (Ellis et al., 2010). Les GRPs sont des protéines structurales qui sembleraient impliquées, entre autres, dans le développement des tissus vasculaires (Cassab, 1998).

#### **1.2.6.6. Les hydrates de carbone de réserve**

Parmi les hydrates de carbone non structuraux retrouvés dans le bois, se trouvent l'amidon qui est le principal polysaccharide de réserve des plantes et des sucres solubles (mono- et oligosaccharides). L'amidon est une forme de stockage de réserve à long terme composée d'unités D-Glc reliées en  $\alpha$ -(1-4) et présente sous deux formes : l'amylopectine et l'amylose. L'amylopectine est en général le composant principal de l'amidon et consiste en de longues molécules avec de nombreuses chaînes latérales. Contrairement à l'amylopectine, l'amylose est une molécule linéaire contenant de 300 à 1000 résidus Glc. L'amidon constitue des granules et peut être rapidement hydrolysé en sucres solubles. Ces derniers sont mobiles et remplissent de nombreux rôles physiologiques (Plavcová and Jansen, 2015). Les polysaccharides de réserve sont stockés à la fois dans le bois et les tissus de l'écorce. Parmi les sucres solubles, le saccharose est le composé le plus facilement transporté (Pallardy, 2010).

#### **1.2.6.7. Les extractibles**

Les extractibles sont des composants du bois, présents en faible teneur, qui sont solubles dans des solvants organiques neutres (hexane, acétone...) ou l'eau. Ce sont des constituants non structuraux du bois, ils peuvent être de nature lipophile ou hydrophile et sont en général des composés extracellulaires de faible poids moléculaire. Leur composition et leur teneur varient d'une essence à l'autre, d'un individu à l'autre et même d'un tissu à l'autre. Chez les pins par

exemple, le duramen contient typiquement plus d'extractibles que l'aubier. La teneur en extractibles n'excède cependant pas 10 % du poids sec du bois. Les extractibles sont divisés en plusieurs groupes parmi lesquels les terpénoïdes et les stérols, les graisses et les cires ou encore les composés phénoliques. Les terpénoïdes et les stérols sont des dérivés d'unités isoprène retrouvés dans l'oléorésine au niveau des canaux résinifères des résineux. Les monoterpènes et les acides résiniques (diterpènes) sont des constituants importants de l'oléorésine. Les graisses (esters de glycérol et acides gras) et les cires sont encapsulées au niveau des cellules du parenchyme dans lesquelles elles représentent la majorité des composés lipophiles. Concernant les composés phénoliques, nombres d'entre eux dérivent de structures issues de la voie des phénylpropanoïdes. Le duramen et l'écorce en contiennent une très grande variété. Ces composés sont divisés en groupes dont les plus représentés sont les stilbènes, les lignanes, les tannins hydrolysables, les flavonoïdes et les tannins condensés. Les différents types d'extractibles sont nécessaires pour assurer les fonctions biologiques des arbres. Les graisses sont la principale source d'énergie des cellules du bois, tandis que les terpènes et les composés phénoliques protègent le bois de l'attaque des microorganismes ou des insectes. Bien qu'ils ne représentent qu'un faible pourcentage de la composition du bois, les extractibles ont une influence significative sur ses propriétés telles que sa force mécanique ou encore sa couleur (Sjostrom, 2013).

#### **1.2.6.8. Les composants inorganiques**

Le contenu en substances inorganiques du bois fait généralement référence aux cendres obtenues après combustion de la biomasse à des températures comprises entre 550 et 600°C. En général, le contenu en substances inorganiques est inférieur à 0,5 %. De très nombreux éléments minéraux sont compris dans ces substances, dont le calcium, le magnésium et le potassium qui représentent à eux seuls plus de 80 % des cendres. Ces éléments sont retrouvés dans le bois sous forme d'oxalates, de carbonates, de sulfates ou encore liés aux pectines. Le contenu en éléments inorganiques est très variable d'une essence et d'un individu à l'autre et dépend des conditions environnementales dans lesquelles les arbres vivent (Rowell et al., 2005).

#### **1.2.7. La formation du bois**

La formation du bois, ou xylogénèse, est un processus physiologique complexe mettant en jeu plusieurs étapes : la division des cellules cambiales, l'élongation cellulaire, la biosynthèse et le dépôt de la paroi secondaire et la mort programmée des cellules (Plomion et al., 2001).

### 1.2.7.1. Division des cellules cambiales

Le bois est produit par le cambium vasculaire qui est un méristème secondaire dérivé du procambium (Larson, 1994). Ce méristème joue un rôle majeur dans la croissance en diamètre des axes des arbres (tronc, branches et racines). La formation du bois dépend donc de l'activité cambiale. Celle-ci assure la pérennité des arbres grâce au renouvellement régulier de xylème et phloème fonctionnels (Plomion et al., 2001). Dans les zones tempérées et froides, le cambium est soumis à des cycles saisonniers d'activité et de quiescence. Le cambium *sensu stricto* est composé de cellules juvéniles nommées initiales. La zone cambiale englobe le cambium et les cellules mères du xylème et du phloème qui sont issues de la division des initiales cambiales (Larson, 1994). Le nombre de couches de cellules cambiales et leurs aspects morphologiques varient en fonction des conditions environnementales locales et saisonnières comme la lumière, la température, les nutriments du sol et la disponibilité de l'eau (Kozłowski and Pallardy, 1997; Kramer, 1964; Schweingruber, 2007). La production de nouvelles cellules cambiales est génétiquement contrôlée, mais le rythme est déterminé par les contraintes environnementales. En outre, la concurrence, la pollution et les attaques de pathogènes peuvent affecter et altérer l'activité du cambium (Kozłowski and Pallardy, 1997).

Le cambium comprend deux types de cellules qui vont donner les différents éléments constitutifs du bois : 1) les initiales radiales courtes isodiamétriques à l'origine des éléments horizontaux du xylème (parenchyme des rayons) et du phloème et 2) les initiales fusiformes longues à l'origine des éléments conducteurs du xylème (trachéïdes) et du phloème. Les initiales peuvent se diviser selon trois directions. L'intégrité du cambium au travers de son augmentation en circonférence lors de la croissance des axes est maintenue grâce à des divisions anticlines (direction tangentielle). Les cellules fusiformes vont se diviser transversalement. Quant à la majorité des divisions (90 %), elles se font dans la direction radiale *via* des divisions périclines produisant des cellules du xylème dans la direction centripète et les cellules du phloème dans la direction centrifuge (du côté de l'écorce). La division péricline d'une cellule initiale produit une cellule mère du xylème ou du phloème capable de se diviser à son tour avant de se différencier, et une cellule fille qui garde les caractéristiques et la fonction des cellules initiales (Larson, 1994). En principe, les cellules mères du xylème se divisent plus que celles du phloème, ce qui explique la disproportion que l'on observe entre le volume de xylème et celui de liber (Lachaud et al., 1999; Larson, 1994).

### 1.2.7.2. Elongation des cellules

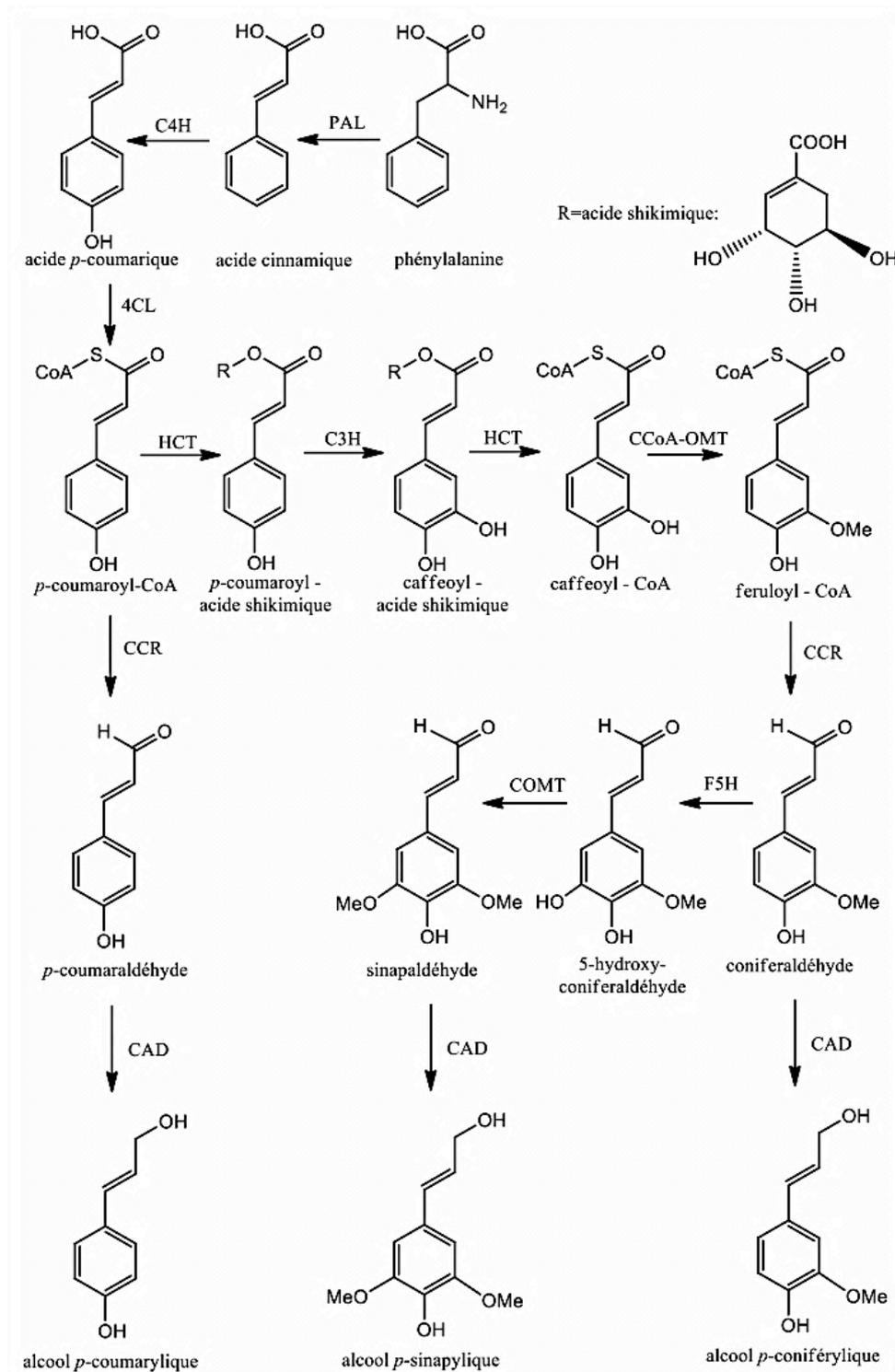
Les cellules produites au niveau de la zone cambiale destinées à devenir un élément du xylème doivent passer par un processus de différenciation afin d'acquérir des caractéristiques morphologiques et physiologiques spécifiques. L'élongation cellulaire est la première étape de cette différenciation et consiste en une augmentation irréversible du volume cellulaire (Plomion et al., 2001). Cette dernière est le résultat d'une diminution du potentiel osmotique entraînant une diminution du potentiel hydrique vacuolaire et en conséquence une augmentation de la pression sur la paroi cellulaire. Ce mécanisme, associé à une relaxation pariétale, modifie les caractéristiques élastique et plastique de la paroi. La restauration des propriétés mécaniques initiales de la paroi est achevée à la fois par le dépôt de nouveaux polymères pariétaux et la restauration des liaisons chimiques intra et intermoléculaires. La cellulose et les polysaccharides de la matrice (pectines et hémicelluloses) sont synthétisés selon des voies différentes. La cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par des complexes protéiques nommés cellulose synthases. Ces complexes transmembranaires sont organisés en hexamères constitués probablement au total de 36 cellulose-synthases (CESA) synthétisant les chaînes linéaires de glucose constitutives des microfibrilles. Le dépôt de la cellulose dans la paroi primaire est ordonné et guidé par le réseau cytosolique de microtubules corticaux (Mutwil et al., 2008). Les polysaccharides de la matrice, quant à eux, sont synthétisés dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases. De nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des hémicelluloses ont été identifiées. Le squelette de certaines hémicelluloses est synthétisé par une famille dénommée « cellulose synthase like » (CSL) du fait d'une forte similarité de ces protéines avec les CESA. Concernant les pectines, il a été déterminé que 67 glycosyltransférases, méthyltransférases et acétyltransférases différentes seraient nécessaires à leur synthèse (Mohnen et al., 2008). Une fois synthétisés dans l'appareil de Golgi, ces polymères sont transportés jusqu'à la membrane plasmique dans de petites vésicules où ils sont libérés par exocytose. Contrairement aux microfibrilles de cellulose, les pectines et les hémicelluloses nouvellement formées peuvent diffuser légèrement à l'intérieur de la paroi, aidées par la pression de turgescence qui met en compression la paroi, augmente sa porosité et fournit un gradient d'énergie pour entraîner les polymères. Les polymères nouvellement synthétisés sont ensuite intégrés dans le réseau pariétal par des interactions physiques et/ou des liaisons chimiques. Les endotransglycosidases, par exemple, sont des enzymes qui coupent et qui relient les glycanes ensembles. Citons la xyloglucane endotransglycosidase (XET) qui coupe spécifiquement le

squelette des xyloglucanes et reforme une nouvelle liaison glycosidique avec l'extrémité libre d'une autre chaîne de xyloglucane, permettant ainsi l'expansion cellulaire. Les expansines sont des enzymes également importantes dans l'élongation des cellules, elles auraient pour rôle de briser les liaisons non-covalentes entre les polysaccharides pariétaux (Cosgrove, 2005). D'autres enzymes interviennent aussi pour remodeler la paroi primaire telles que les pectines méthylestérases (PME), les pectines/pectates lyases ou encore les polygalacturonases (Mellerowicz and Sundberg, 2008).

### **1.2.7.3. Formation de la paroi secondaire**

La formation d'une paroi secondaire épaisse et multicouche est coordonnée par l'expression de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage des polymères pariétaux (Higuchi, 2012). C'est la formation de la paroi secondaire qui mettrait un terme à l'élongation cellulaire (Abe et al., 1997). Le début de la formation de cette paroi est marquée par une augmentation importante du taux de synthèse de la cellulose et également une augmentation de celui des galactoglucomannanes chez les gymnospermes (Higuchi, 2012). Tout comme pour la paroi primaire, la cellulose est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par des cellulose-synthases spécifiques alors que de nouvelles hémicelluloses, synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi, sont progressivement déchargées dans la paroi par exocytose. La présence d'enzymes d'hydrolyse et de transglycosylation dans la paroi secondaire suggère que sa matrice polysaccharidique est, tout comme pour la paroi primaire, modifiée *in muro* (Mellerowicz and Sundberg, 2008). La lignification (synthèse et dépôt de lignine) est l'une des étapes finales de la différenciation des cellules du xylème et se déroule principalement durant la mise en place de la paroi secondaire. Pour chaque couche de la paroi secondaire, le dépôt de lignine est postérieur à celui des polysaccharides. La lignification est influencée par la nature de la matrice polysaccharidique et également par l'orientation des microfibrilles de cellulose. Lorsque la formation de la couche S1 est initiée, la lignification débute au niveau des jonctions tricellulaires des cellules dans la région de la lamelle moyenne et de la paroi primaire. Généralement, la proportion de lignine est plus importante dans la lamelle moyenne et particulièrement au niveau des jonctions tricellulaires des cellules que dans la couche S2. Cependant, la couche S2 étant beaucoup plus épaisse, son contenu en lignine reste supérieur. Lors de la lignification, la lignine peut former des liaisons chimiques avec les hémicelluloses, ce qui a pour conséquence d'éliminer progressivement l'eau et ainsi de former un environnement hydrophobe (Boerjan et al., 2003). Les précurseurs de la lignine, les monolignols, sont synthétisés à partir de la phénylalanine (Phe) qui dérive de la voie de

biosynthèse du shikimate dans les plastes. Certaines enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse de la lignine (Figure 20) sont des protéines membranaires supposées actives sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique. La translocation des monolignols au niveau de la paroi met en jeu des mécanismes qui n'ont à l'heure actuelle pas encore été identifiés. La polymérisation de la lignine se fait ensuite par radicalisation oxydative des phénols, suivi de l'assemblage des radicaux obtenus. L'oxydation des unités phénylpropanes, c'est à dire leur déshydrogénation, impliquent des peroxydases et/ou des laccases (Vanholme et al., 2010).



**Figure 20 : Voie principale de biosynthèse des 3 monolignols : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (modifié d'après Vanholme et al., 2010). PAL : phénylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.24); C4H : cinnamate 4-hydroxylase (EC 1.14.13.11) ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase (EC 6.2.1.12) ; HCT : p-hydroxycinnamoyl-CoA:quinat/shikimate p-hydroxycinnamoyltransférase (EC 2.3.1.133) ; C3H : p-coumarate 3-hydroxylase (EC 1.14.18.1) ; CCoAOMT : caffeoyl-CoA O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) ; CCR : cinnamoyl-CoA réductase (EC 1.2.1.144) ; F5H : férulate 5-hydroxylase (EC 1.14.-.-) ; COMT : acide caféique O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) ; CAD : alcool cinnamyl déshydrogénase (EC 1.1.1.195).**

#### 1.2.7.4. Mort cellulaire programmée

Une fois la lignification terminée, les éléments conducteurs du xylème vont s'engager dans un processus de mort cellulaire programmée entraînant une dégradation complète de leur protoplaste (Fukuda, 1996). Le terme « mort cellulaire programmée » est utilisé pour décrire une suite d'événements génétiquement contrôlés conduisant au suicide d'une cellule (Lockshin and Zakeri, 2001). La mort cellulaire programmée (abrégée par la suite par PCD pour « programmed cell death) joue un rôle majeur dans les processus de défense et de développement des organismes multicellulaires aussi bien végétaux, qu'animaux. Selon des critères morphologiques, deux formes principales de PCD sont distinguées chez les plantes : la mort cellulaire vacuolaire et la nécrose. La nécrose survient généralement lors de stress abiotiques tandis que la mort cellulaire vacuolaire est retrouvée durant la formation et l'élimination de tissus ou d'organes (Van Doorn et al., 2011). C'est cette dernière qui se déroule par conséquent lors de la différenciation des éléments conducteurs du xylème. D'après Groover et Jones (1999), la PCD et la biosynthèse de la paroi secondaire sont intimement coordonnées. En effet, il a été montré que tous les inhibiteurs de la PCD bloquaient également la biosynthèse de la paroi secondaire, suggérant que ces programmes développementaux seraient moléculairement interdépendants. Ces auteurs ont montré que la sécrétion des précurseurs de la paroi secondaire s'accompagne de la sécrétion d'une protéase, provoquant une augmentation de l'activité protéolytique dans la paroi secondaire. Par un mécanisme non encore identifié, cette protéase est responsable d'un influx de  $Ca^{2+}$  dans les cellules. L'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire entraîne ensuite l'implosion de la large vacuole hydrolytique (Groover and Jones, 1999). La dégradation de la vacuole est à l'origine de la libération d'enzymes (cystéine et sérine protéases, lipases, DNases et RNases) qui vont attaquer et détruire les organites. Les premiers organites à être éliminés sont ceux présentant une simple membrane, tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Quelques temps après, les organites à double membrane tels que les chloroplastes et les mitochondries commencent à dégénérer au niveau de leur matrice puis ensuite de leurs membranes avant de disparaître (Fukuda, 2000). La dégradation de l'ADN nucléaire est terminée en moins de 15 min après la dégradation de la vacuole, et l'ensemble de la digestion dure environ 6h (Fukuda, 2004). De plus, les parois primaires sont également partiellement hydrolysées au niveau des zones où elles ne sont pas protégées par la paroi secondaire (Bollhoner et al., 2012), à savoir au niveau des ponctuations. Tous les mécanismes impliqués dans le déclenchement de la PCD ne sont pas encore totalement élucidés. Il a été montré que lors de la différenciation des

éléments de trachéides chez *Zinnia*, les membranes mitochondriales étaient dépolarisées et que des cytochromes c étaient libérés dans le cytosol avant la rupture de la vacuole (Lord and Gunawardena, 2012; Yu et al., 2002). Les polyamines pourraient également jouer un rôle dans le déclenchement de la PCD (Moschou and Roubelakis-Angelakis, 2014).

Dans le xylème de certains conifères (tels que *Pinus* et *Larix*), deux types cellulaires sont présents au niveau des rayons ligneux, les cellules parenchymateuses et les trachéides des rayons. Les trachéides des rayons perdent leurs organites rapidement après leur différenciation (Imagawa, 1984). Chez *Abies sachalinensis*, Nakaba et al. (2006) ont montré que la différenciation et la mort des trachéides des rayons est semblable à celle des trachéides longitudinales. Les cellules parenchymateuses, quant à elles, restent en vie plusieurs années au moins après leur formation (Funada, 2000) et sont impliquées dans la formation du duramen (Hillis, 2014). En revanche, chez *Pinus*, il a été montré que pour les cellules parenchymateuses en contact avec les trachéides des rayons, la mort cellulaire intervenait de manière précoce et que donc ces cellules n'étaient pas impliquées dans la formation du duramen (Nakaba et al., 2008).

### **1.2.8. La formation du duramen**

La quantité d'aubier et de duramen varie grandement entre les individus en fonction de l'essence, de l'âge, du taux de croissance ou encore des conditions environnementales. Chez certaines espèces, telles que l'Eucalyptus, la formation du duramen débute à environ 5 ans ; chez d'autres espèces, elle intervient plus tardivement, entre 15 et 20 ans chez différentes espèces de pins, voire entre 80 et 100 ans pour le hêtre. Il existe même certaines espèces où le duramen ne se forme jamais (*Alstonia scholaris*) (Pallardy, 2010).

#### **1.2.8.1. Aspects physiologiques et biochimiques**

La formation du bois de cœur est l'étape finale du cycle de vie des cellules encore vivantes du xylème. Au niveau de la zone de transition aubier-duramen (TZ), les cellules parenchymateuses meurent suivant un processus de mort cellulaire programmée alors que des extractibles s'accumulent dans le bois et des obstructions se forment au niveau des ponctuations des éléments conducteurs (Spicer, 2005). La formation du duramen pourrait être un processus qui permettrait de réguler la quantité d'aubier et ainsi de diminuer les coûts métaboliques entraînés par une quantité excessive de ce tissu. La quantité d'aubier est en effet très souvent corrélée à la surface foliaire de l'arbre du fait de son rôle primordial dans le

transport de l'eau aux tissus photosynthétiques. La formation du bois de cœur permettrait également de fournir un soutien mécanique et structural à l'arbre. Les résultats histochimiques, biochimiques et génétiques montrent une initiation du processus de formation du duramen à la fin de l'été, le maximum d'activité étant en automne avec un arrêt de ce processus durant la phase de dormance (Kampe and Magel, 2013).

#### **1.2.8.1.1. Mort des cellules du parenchyme**

La mort des cellules du parenchyme est supposée comme étant le résultat, et non la cause, de la formation du bois de cœur (Bamber, 1976). Chez les angiospermes, la mort des cellules parenchymateuses se fait de manière brusque au niveau de la TZ, tandis que chez les gymnospermes, les cellules parenchymateuses meurent progressivement de l'aubier à la TZ. Les hypothèses pouvant expliquer les causes de cette mort cellulaire sont nombreuses: formation des extractibles et/ou des blocages entre les cellules, diminution de l'humidité, augmentation des volumes de gaz (diminution de l'O<sub>2</sub> et augmentation du CO<sub>2</sub>: conditions anoxiques), phytohormones (éthylène) (Spicer, 2005). Puisque les origines de la mort cellulaire des cellules parenchymateuses des rayons diffèrent de celles de la mort cellulaire des trachéides, Nakaba et al. (2008) ont conclu que les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans ces deux cas pourraient légèrement différer.

#### **1.2.8.1.2. Biosynthèse des extractibles**

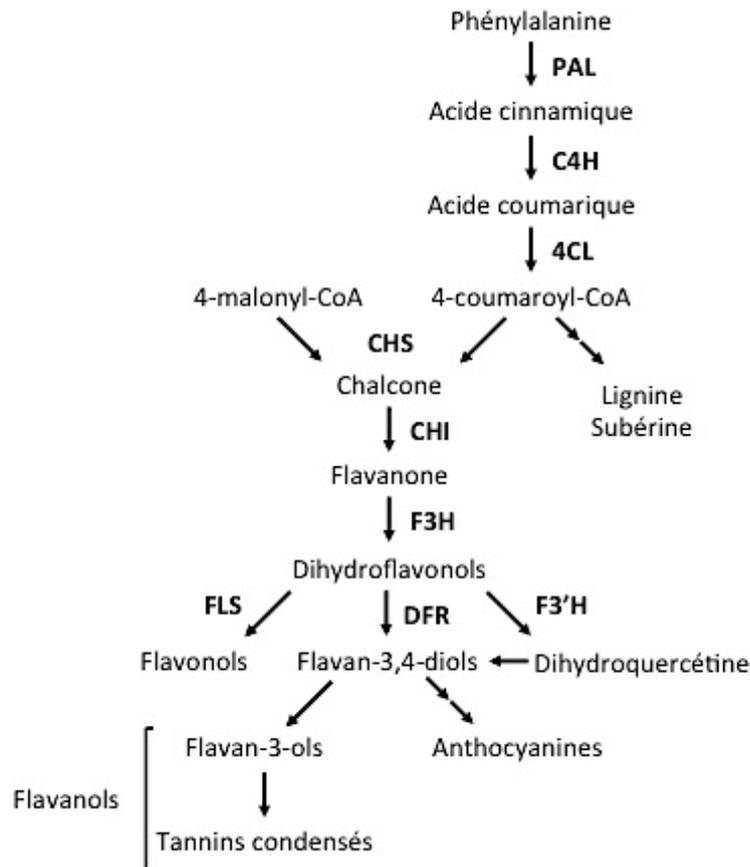
La mort des cellules parenchymateuses s'accompagne d'une perte des substances de réserve (amidon, polysaccharides non structuraux et triglycérides). L'amidon, très abondant dans l'aubier externe, est progressivement hydrolysé à l'approche et jusqu'à la TZ en sucres-phosphates, précurseurs soit des lipides soit des extractibles. Les petites gouttelettes lipidiques présentes dans l'aubier externe augmentent en taille de l'aubier moyen à la TZ. Ces réserves lipidiques et saccharidiques fournissent les précurseurs carbonés nécessaires à la synthèse des extractibles dans les cellules du parenchyme lors de la formation du duramen. Ce dernier ne contenant plus aucune substance de réserve (Kampe and Magel, 2013). Les extractibles sont déposés aux niveaux des parois des cellules voisines et remplissent souvent le lumen du parenchyme. Ils donnent au duramen sa résistance naturelle, sa couleur et réduisent sa perméabilité. Les extractibles sont principalement des composés phénoliques. Parmi ces derniers, les flavonoïdes et les quinones sont responsables du changement de couleur associé à la formation du duramen (Hillis, 2014). Selon des données anatomiques et biochimiques, au moins deux types de mécanismes de formation du bois de cœur ont été mis en évidence : le

type I ou type-*Robinia* caractérisé par un début d'accumulation d'extractibles phénoliques au niveau de la TZ, avec absence de précurseurs dans l'aubier âgé ; et le type II ou type-*Juglans* avec une accumulation graduelle des précurseurs phénoliques dans l'aubier âgé. Au niveau de la TZ, les extractibles sont formés par des réactions primaires (synthèse *de novo*) et/ou secondaires (oxydation, hydrolyse des précurseurs).

Les mécanismes conduisant à la formation du bois de cœur pour le type I ont particulièrement bien été étudiés chez *Robinia pseudoacacia* (robinier faux-acacia). Dans ce cas, il apparaîtrait que la mort cellulaire débute par l'épuisement des réserves amylacées et lipidiques du fait d'une augmentation de l'activité d'hydrolases telles que les amylases, lipases et phosphatases. Pour contrebalancer le manque de squelettes carbonés disponibles dans la TZ par rapport aux besoins pour la synthèse des extractibles, du saccharose est importé de l'aubier externe. Au niveau de la TZ, le saccharose est principalement clivé par la saccharose-synthase (SuSy, EC 2.4.1.13). Au début, le fructose, le glucose et l'UDP-glucose sont majoritairement utilisés pour la production d'énergie *via* la respiration mitochondriale et dans une moindre mesure pour la synthèse des extractibles. Les extractibles phénoliques synthétisés s'accumulent dans le cytosol et pourraient être de puissants inhibiteurs du flux d'électrons mitochondrial. C'est pourquoi les mitochondries pourraient être les premiers organites à cesser leur activité. Suite au dysfonctionnement de ces dernières et à l'accélération de la voie oxydative des pentoses-phosphates, des squelettes carbonés vont s'accumuler avant d'être transformés en composés phénoliques. Cette accumulation des extractibles est en corrélation avec l'augmentation de l'expression et de l'activation d'enzymes clés de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes, telles que la phénylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.24) et la chalcone synthase (CHS, EC 2.3.1.74) (Figure 21). D'autres protéines, aussi impliquées dans la réponse au stress, telles que les protéines de choc thermique ou les lectines, sont également fortement exprimées dans la TZ (Kampe and Magel, 2013).

Peu de données sont en revanche disponibles sur les mécanismes impliqués dans la formation du duramen pour le type II. Ce type est décrit pour des espèces telles que *Juglans* (Burtin et al., 1998), *Pseudotsuga* (Taylor et al., 2007) ou encore *Eucalyptus globulus* (Morais and Pereira, 2012). Pour ces espèces, les précurseurs phénoliques des extractibles sont présents dans l'aubier âgé. De ce fait, la majeure partie des extractibles est formée au niveau de la TZ par des réactions secondaires telles que l'hydrolyse des glucosides phénoliques, l'oxydation, l'inter-conversion et la polymérisation de phénols de faible poids moléculaire. De manière similaire au type I, des quantités modérées de flavonols sont nouvellement synthétisées *in-situ*

par l'accélération de voies métaboliques suite à une hydrolyse des hydrates de carbone (principalement le saccharose) par des invertases acides (Kampe and Magel, 2013). Tout comme pour le type I, le vieillissement de l'aubier est caractérisé par une diminution du nombre de cellules parenchymateuses vivantes et une diminution du contenu en substances de réserve et protéines (Kampe and Magel, 2013).



**Figure 21 : Voie métabolique simplifiée de la biosynthèse des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes. PAL : phénylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.24) ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase (EC 1.14.13.11) ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase (EC 6.2.1.12) ; CHS : chalcone synthase (EC 2.3.1.74) ; CHI : chalcone isomerase (EC 5.5.1.6) ; F3H : flavanone-3-hydroxylase (EC 1.14.11.9) ; FLS : flavonol synthase (EC 1.14.11.23) ; DFR dihydroflavonol 4-reductase (EC 1.1.1.219) ; F3'H : Flavonoïde 3'-hydroxylase (EC 1.14.13.88) (Yang et al., (2004) et Beritognolo et al., (2002) d'après McMurrough and Baert, 1994; Treutter, 1989).**

### 1.2.8.1.3. Occlusion du système vasculaire

Chez les conifères, le taux d'humidité du duramen est moindre que celui de l'aubier (Taylor et al., 2002), le plus faible taux d'humidité étant observé dans la TZ (Nobuchi and Harada, 1983). La réduction de perméabilité intervient lorsque les conduits axiaux sont bloqués par la sécrétion de gels (gommes) et la formation de thylloses dans les vaisseaux des angiospermes

ou thyllosoïdes dans les canaux résinifères des conifères. Le blocage des ponctuations des trachéides et/ou des vaisseaux est une caractéristique importante associée à la formation du duramen, mais elle peut aussi se dérouler dans l'aubier en conditions normales ou en cas de blessure. Les thylloses sont produites par des excroissances des cellules parenchymateuses axiales ou radiales qui s'étendent dans les vaisseaux voisins. Les thyllosoïdes sont similaires aux thylloses, ce sont des excroissances de cellules épithéliales qui s'étendent dans les canaux résinifères. La perméabilité du duramen est également réduite avant la mort des cellules parenchymateuses par la modification de la structure des ponctuations. Dans la TZ des conifères, les torus des trachéides se collent contre les excroissances pariétales secondaires de la cavité de la ponctuation bloquant ainsi tous les flux intercellulaires. Le même phénomène d'aspiration est observé chez les angiospermes, excepté que leurs ponctuations ne comportent pas de torus. Les ponctuations aspirées sont ensuite scellées avec le dépôt de métabolites secondaires (Spicer, 2005).

#### **1.2.8.2. Aspects génétiques**

Malgré l'importance économique et écologique du duramen, la régulation de sa formation reste peu comprise. Ceci s'explique par les caractéristiques physico-chimiques du tissu à savoir la raréfaction des ARN messagers et la présence de composés phénoliques (Kampe and Magel, 2013). Malgré ces difficultés, quelques études ont cependant permis d'apporter des informations quant à l'expression différentielle de gènes impliqués dans la formation du duramen.

La première étude à haut débit de marqueurs de séquence exprimée ou ESTs (Expressed Sequence Tag) de la TZ a été menée par Yang et al. (2003) chez le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*). Ces auteurs ont montré que les gènes impliqués dans les métabolismes spécialisés et hormonal sont plus abondants dans la TZ (9,1 %) que dans l'aubier (1,4 %), tandis que les gènes codants des protéines du métabolisme structural et la paroi sont plus représentés dans l'aubier (3,1 % contre 0,6 %). Il a également été observé une plus grande expression des gènes codant des transporteurs de sucre dans l'aubier, tandis que ceux impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes sont plus exprimés dans la TZ. Les ESTs codant des protéines impliquées dans le métabolisme de la chromatine et de l'ADN, le métabolisme primaire, les réactions de défense et la synthèse et la maturation des protéines sont surexprimés dans la TZ plus fortement en été (juillet) qu'en automne (fin novembre). Cette étude de la TZ a été affinée par l'utilisation de puce à ADN chez le robinier (Yang et al., 2004) et le noyer (Huang et al., 2010). Les résultats obtenus corroborent ceux de Yang et

al. (2003) avec une surexpression dans la TZ des gènes codant les protéines impliquées dans les réactions de défense, l'expression des gènes, la synthèse et la maturation des protéines ainsi que la transduction du signal. Des variations saisonnières d'expression ont également été mises en évidence entre l'été et l'automne. Plus de 50 % des gènes des métabolismes spécialisés et hormonal sont, par exemple, surexprimés au moins deux fois plus en juillet qu'en novembre chez le robinier. Les gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (CHS, F3H et DFR ; Figure 15) ont également un niveau d'expression plus important en été par rapport au printemps ou à l'automne. Contrairement au robinier, il a été montré chez le noyer noir (*Juglans nigra*), de forts niveaux de transcription des gènes codant la PAL, la CHS, la F3H et la DHR dans la TZ en octobre et janvier, suggérant que certaines activités métaboliques liées à la formation du duramen se dérouleraient en automne et en hiver pour cette essence (Beritognolo et al., 2002). Huang et al. (2010) ont cependant observé, au niveau de la TZ en automne, la sous-expression d'un gène orthologue à *At5g13930* d'*A. thaliana* qui code une CHS. Ces auteurs expliquent ce résultat contradictoire par le fait qu'il pourrait y avoir plusieurs gènes codant des CHS, chacun étant régulé différemment en fonction des tissus. Huang et al. (2011) ont, quant à eux, mis en évidence la surexpression du gène *JnCML-like* dans la TZ. Ce gène est similaire à celui codant des protéines grancalcine-like à motif « EF-Hand » liant le calcium chez *A. thaliana* et *Zea mays*. Chez les mammifères, les protéines à motif « EF-Hand » joue un rôle dans la régulation de la croissance et la mort des cellules ainsi que dans l'exocytose. Chez les plantes, leur rôle n'est pas encore connu. Des analyses par RT-PCR quantitative ont révélé que le gène *JnCML-like* est faiblement exprimé dans les tissus végétatifs sains, tandis qu'une expression importante est observée dans les fleurs mâles (rôle possible dans la formation du pollen qui requiert aussi la mort cellulaire). Les transcrits de ce gène sont également plus abondants dans la TZ que dans les autres tissus du xylème, et ceci particulièrement en automne (Huang et al., 2011). Ce constat a également été fait chez le noyer, pour un gène orthologue de *RAP2.6L* (*At5g13330*), qui code une protéine contenant un élément de réponse à l'éthylène (Huang et al., 2013). Ce gène, *JnRAP2-like*, est exprimé de manière plus importante dans la TZ que dans l'aubier, et plus exprimé en été qu'en automne. *JnRAP2-like* pourrait participer à l'intégration des signaux liés à l'éthylène et au jasmonate au niveau de la TZ, prenant ainsi part à la voie de transduction conduisant à la formation du duramen chez le noyer (Huang et al., 2013). Un facteur de transcription, *JnKNAT3-like*, pourrait également participer à la formation du duramen (Huang et al., 2009). Le gène codant *JnKNAT3-like* est surexprimé dans la TZ et l'aubier interne en automne. Chez *A. thaliana*, le facteur de transcription *KNAT7* interagit entre-autres avec des

facteurs de transcription MYB (MYB75). Le complexe formé par MYB75 et les protéines associées serait impliqué dans la régulation de la formation de la paroi secondaire des téguments de la graine et des tiges d'inflorescence (Bhargava et al., 2013).

Yoshida et al. (2012) ont été les premiers à fournir une analyse à haut débit d'ESTs de TZ de conifères. Ces auteurs ont collecté 1029 ESTs, assemblés en 744 séquences uniques, à partir de TZ d'un arbre *Cryptomeria japonica* D. Don (cèdre du Japon) abattu en novembre. L'expression de 20 gènes potentiellement impliqués dans la formation du duramen a ensuite été quantifiée et comparée à des échantillons de TZ prélevée en juin. Parmi ces 20 gènes, 9 ont montré une surexpression dans la TZ en novembre. Un gène codant une invertase, supposée vacuolaire, voit son expression multipliée par 2 en novembre. Deux gènes codant des enzymes de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12) et la phosphoglycérate mutase (EC 2.7.5.3), sont également plus exprimés en novembre. L'expression de ces gènes pourrait contribuer à la production d'énergie pour la formation du duramen et fournir des précurseurs pour la biosynthèse des extractibles. Dans la TZ, un gène codant la méthionine adénosyltransférase (EC 2.5.1.6) est également plus exprimé en novembre. Cette protéine est responsable de la synthèse de S-adénosylméthionine (SAM), qui peut être utilisée comme donneur de groupes méthyles pour la synthèse des métabolites spécialisés et comme précurseur pour la synthèse de l'éthylène. Plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans des processus de défense ou de réponse au stress voient leur expression s'accroître à l'automne. Yoshida et al. (2012) ont également mis en évidence une expression 5 fois plus élevée dans la TZ en juin qu'en novembre d'un gène supposé coder une cystéine protéase de type papaine (EC 3.4.22.2). Ces protéines sont impliquées dans certains cas de PCD (Martinez and Diaz, 2008; Woltering, 2010). Les résultats de Yoshida et al. (2012) démontrent que l'expression des gènes impliqués dans la formation du duramen peut être initiée avant l'apparition des changements cytologiques observés en fin d'été dans le cas du cèdre du Japon.

Une étude transcriptomique récente menée sur le pin sylvestre a permis la comparaison des profils d'expression de la TZ et de l'aubier (Lim et al., 2016). Ces auteurs ont montré, dans la TZ, une surexpression des transcrits codant la saccharose-synthase, des invertases, des enzymes impliquées dans la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la voie du shikimate, suggérant comme précédemment que l'hydrolyse des sucres intervient en aval de la biosynthèse des extractibles. Tous ces gènes sont plus fortement exprimés au printemps. La voie du shikimate connecte le métabolisme primaire (biosynthèse des acides aminés

aromatiques) à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (lignine et métabolites secondaires). Des gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont également surexprimés dans la TZ. Concernant la voie de biosynthèse de l'éthylène, Lim et al. (2016) ont identifié des niveaux d'expression variables des transcrits codant l'aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase (ACO) dans la TZ et l'aubier de différents arbres. Les transcrits codant l'aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS), enzyme limitante de la voie de biosynthèse de l'éthylène (Hudgins et al., 2006), ne sont quant à eux pas exprimés. Ces auteurs remettent donc en question l'importance de l'éthylène dans le déclenchement de la formation du duramen. Des transcrits codant des facteurs de transcription à domaine NAC et MYB-like voient leur expression augmenter dans la TZ, et ceci de manière plus importante en hiver. Les facteurs de transcription à domaine NAC sont impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire et les réponses au stress (Nakano et al., 2015), tandis que les facteurs de transcription MYB sont des régulateurs du métabolisme secondaire des plantes. Lim et al. (2016) ont également montré la surexpression de transcrits codant des protéines « desiccation-related » dans la TZ et suggéré que ces protéines pourraient aider les cellules à tolérer les conditions de désydratation pour continuer leur activité métabolique. De nombreux transcrits codant des enzymes nécessaires pour la lignification et le remodelage des polysaccharides pariétaux, ainsi que de protéines de défense, sont exprimés dans la TZ. La surexpression de transcrits codant une endonucléase (BFN) dans la TZ a permis à ces auteurs de conclure que la mort des cellules parenchymateuses serait physiologiquement programmée et qu'elle ne serait pas induite par l'accumulation d'extractibles. Les niveaux d'expression des transcrits codant cette endonucléase montrent une augmentation en mai, restent stable en été puis diminuent progressivement jusqu'à la fin de l'automne. Ces résultats suggèrent que la PCD intervient en été dans la TZ du pin sylvestre.

Au niveau de la zone de transition, les gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la formation du duramen sont donc surexprimés principalement en été ou en automne suivant l'essence, corroborant les données histochimiques et biochimiques sur la période de formation de ce tissu.

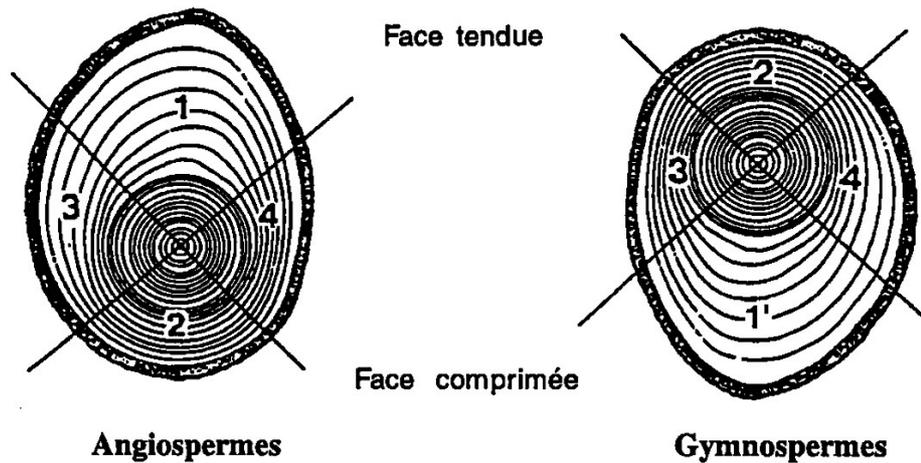
### **1.2.9. Les fonctions du bois**

Le bois est un tissu multifonctionnel. Il assure un soutien mécanique pour l'arbre, il permet la circulation des fluides et de l'information ainsi que la synthèse et le stockage des réserves énergétiques et des composés de défense.

### 1.2.9.1. Fonction mécanique

Dans l'arbre, le bois assure deux types de fonctions mécaniques : une fonction mécanique passive assimilable à un squelette permettant à l'arbre de supporter son propre poids et une fonction mécanique active de type muscle qui permet le maintien d'une posture voire le redressement de l'arbre en cas de mauvaise posture (Moullia and Fournier, 2009). De par la nature physico-chimique et anatomique des fibres pour les angiospermes et des trachéides pour les gymnospermes, ces cellules assurent naturellement des fonctions de soutien mécanique au sein de l'arbre. Les fibres et les trachéides ont une paroi plus épaisse que la plupart des autres cellules du xylème ou du phloème. Cette paroi constituée de fibres de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine doit résister aux forces de traction et de compression au sein de l'arbre. Les fibres de cellulose orientées suivant le plan vertical assurent la résistance en traction dans l'arbre alors que le complexe hémicellulose/lignine joue le rôle de matrice, beaucoup moins rigide mais résistante en compression et en cisaillement (Bergander and Salmén, 2000). De ce fait, les propriétés mécaniques du matériau dépendent de la composition chimique, de la richesse des liaisons chimiques entre les polymères pariétaux ainsi que de l'angle que font les microfibrilles de cellulose avec la verticale (AMF). En effet, si l'AMF augmente, le bois est moins rigide et plus flexible, c'est par exemple le cas du bois juvénile. Ce bois est formé par un cambium juvénile possédant des cellules fusiformes plus courtes que le cambium mature, les cellules de bois formées sont donc plus courtes. De plus, l'AMF dans la couche S2 est plus important que dans le bois mature, d'où une plus grande flexibilité. De par ces caractéristiques, le bois juvénile est moins résistant mécaniquement que le bois mature. Il est possible que ce type de bois soit formé par l'arbre pendant 10 à 15 ans pour dissiper la force du vent dans les branches grâce à sa flexibilité avant d'être recouvert par du bois mature plus rigide (Trouy, 2015).

Lorsque l'arbre est soumis à des contraintes importantes et récurrentes, ou tout simplement lorsque l'arbre forme une nouvelle branche, la répartition des charges entraîne une modification d'inclinaison de l'arbre. Afin de restaurer sa rectitude, le bois va être modifié pour former du bois de réaction. Dans le cas des gymnospermes, le bois de réaction est appelé bois de compression et se développe dans la partie convexe de la courbure pour permettre le redressement du tronc ou des branches. Chez les angiospermes, le bois de réaction est appelé bois de tension et se forme dans la partie concave de la courbure (Figure 22). Le bois se formant à l'opposé du bois de compression ou de tension est appelé bois opposé (Rowell, 2005).



**Figure 22 : Distribution du bois de tension et du bois de compression dans une section de tige inclinée (Chanson, 1989; Jourez, 1997). 1 : Bois de tension ; 1' : Bois de compression ; 2 : Bois opposé ; 3 et 4 : Bois normal.**

Dans l'état actuel de nos connaissances, seuls les angiospermes utilisent du bois de tension pour créer de très grands efforts de tension. Une bonne moitié des espèces examinées possède des fibres très différentes du point de vue anatomique et chimique : les fibres à couche gélatineuse (fibres G) (Fisher and Stevenson, 1981; Grzeskowiak et al., 1996). Dans ce cas, la couche S3 n'existe plus et la couche S2 est totalement ou partiellement remplacée par une couche d'aspect gélatineux constituée uniquement (ou presque) de cellulose (Côté et al., 1969; Norberg and Meier, 1966) dont les fibrilles sont orientées dans l'axe de la fibre (AMF quasiment nul) (Fujita et al., 1974). Il a été démontré que la maturation de cette couche joue un rôle prépondérant dans le niveau de contraction du bois de tension. Selon la situation, un pourcentage plus ou moins élevé ou la totalité des fibres différenciées dans le xylème du bois de tension sont des fibres G. Le niveau de contraction atteint est fortement corrélé au pourcentage de fibres G présentes (Goswami et al., 2008).

La présence de trachéides gélatineuses a aussi été mise en évidence chez certains gymnospermes, comme par exemple dans le phloème secondaire du genévrier commun (Höster, 1970). L'autre moitié des espèces feuillues utilise un bois de tension dépourvu de fibres G mais dont les fibres ont aussi un AMF quasiment nul et une composition chimique bien distincte de celles du bois normal dans la même espèce (Yoshizawa et al., 1993). A *contrario*, tous les gymnospermes et quelques rares angiospermes (le buis par exemple (Höster and Liese, 1966)) utilisent le bois de compression pour créer des efforts de compression. Les trachéides de bois de compression diffèrent fortement des trachéides de bois normal du point de vue anatomique et chimique : leur section transversale est arrondie ce qui

crée des vides (méats) intercellulaires ; la paroi cellulaire est plus épaisse et comporte souvent un épaississement spiralé ; l'AMF dans la couche S2 est toujours élevé (de 35 à 50° alors qu'il mesure de 5 à 30° dans le bois normal) ; la proportion de lignine est nettement plus élevée et sa composition chimique (proportion des différents monomères de base) est très différente de celle du bois normal (Du and Yamamoto, 2007; Trouy, 2015).

Le bois de réaction est une stratégie des arbres pour s'adapter et se développer dans leur environnement, mais ces contraintes mécaniques (contraintes de croissance) ne sont pas sans conséquences technologiques et économiques. En effet, ces efforts internes de croissance emmagasinés tout au long de la vie de l'arbre peuvent se manifester lors de l'abattage ou de la transformation de son bois par un éclatement à la base du tronc, des fentes à cœur ou encore des fentes de déformations des planches au sciage (Alméras et al., 2008).

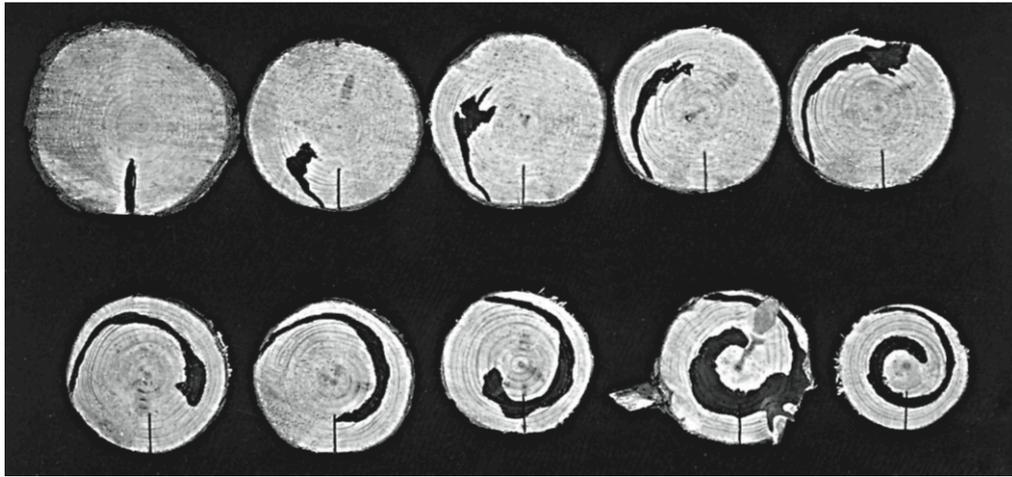
### **1.2.9.2. Fonction de conduction**

Le développement de l'appareil aérien des plantes terrestres a été rendu possible par le développement d'un système vasculaire permettant de rapides mouvements d'eau dans la plante. En effet, sans système vasculaire, les flux hydriques par diffusion de cellule à cellule seraient trop lents et trop réduits pour atteindre les apex caulinaires, siège de la photosynthèse. Grâce à leur système vasculaire, et lors de fortes chaleurs en été, les arbres peuvent ainsi faire circuler plus de 200 L d'eau des racines vers les feuilles, organes parfois séparés de plusieurs dizaines de mètres. La sève ascendante transportée par le xylème, contient majoritairement de l'eau, de 93 à 99 % de la masse, mais également des éléments minéraux et des molécules organiques (acides aminés, glucides) (Richard et al., 2015). La composition de la sève xylémienne est influencée par de nombreux facteurs tels que la disponibilité en nutriments du sol ou encore son potentiel hydrique (Dambrine et al., 1995). La sève xylémienne transporterait également des hormones ou des précurseurs de celles-ci synthétisés au niveau des racines pour informer les parties aériennes de l'état hydrique du sol (Jackson, 1997; Sauter et al., 2001). La sève contient aussi des gaz dissous dans l'eau, le flux de sève permettant de fournir en oxygène les tissus parenchymateux de l'aubier et d'en retirer le dioxyde de carbone (Bailey, 1913).

Au sein du xylème, la fonction de conduction de la sève est assurée par les trachéides chez les gymnospermes et les éléments de vaisseaux chez les angiospermes. Chez les gymnospermes, les cellules conductrices sont des cellules mortes, mises bout à bout, qui communiquent au niveau des ponctuations formant ainsi de véritables petits tubes dans lesquels circulent les

colonnes d'eau. Les deux mécanismes principaux qui se combinent pour faire monter la sève sont la pression négative (ou tension) qui tire la sève vers le haut et la pression positive qui pousse la sève à partir des racines. Le premier mécanisme est dû au phénomène de transpiration-cohésion-tension. Les liaisons hydrogènes liant les molécules d'eau les unes aux autres assurent une grande force de cohésion aux colonnes d'eau. La transpiration au niveau des parties aériennes entraîne une perte d'eau en haut de ces colonnes par évaporation. Grâce à la cohésion des colonnes d'eau en lien avec le gradient de potentiel hydrique entre racines et feuilles, l'eau perdue est compensée par une entrée d'eau par absorption au niveau des racines. La transpiration crée donc une tension dans le xylème, un effet d'aspiration, et la cohésion entre les molécules d'eau permet la transmission du mouvement ascendant sur toute la longueur du xylème jusqu'aux racines (Pallardy, 2010). Le second mécanisme impliqué dans l'ascension de la sève, dans une moindre mesure que le premier, est appelé poussée racinaire. Cette pression positive est provoquée par une augmentation de la pression osmotique suite à l'accumulation de photoassimilats, d'où une augmentation de l'appel d'eau (Pallardy, 2010).

La proportion de xylème impliquée dans le transport de la sève varie grandement en fonction des espèces, tandis que pour une même espèce, une forte relation est observée entre cette proportion et la surface foliaire. Le duramen ne joue pas de rôle dans la conduction de la sève. Chez les arbres matures, cette conduction se limite seulement à une portion de l'aubier. Dans le cas des angiospermes, chez les essences à zone initiale poreuse (chêne, orme, frêne...), la majorité de la sève circule dans les vaisseaux du cerne d'aubier le plus externe. Chez les essences à pores diffus (peuplier, érable, bouleau...), la conduction est assurée par plusieurs cernes de l'aubier. Dans le cas des gymnospermes, la sève xylémienne circule dans plusieurs cernes et principalement, voire exclusivement, dans les trachéides du bois initial de plus large diamètre. En effet, les trachéides du bois final présentent une grande résistance aux mouvements d'eau probablement associée à leur faible diamètre et la présence de peu de ponctuations. Chez beaucoup d'essences de conifères mais aussi chez quelques feuillus, le chemin emprunté par la sève ascendante suit une spirale plutôt qu'une ligne verticale (Figure 23). Ce phénomène résulte probablement de l'agencement des ponctuations au sein des trachéides (Pallardy, 2010).



**Figure 23 : Chemin emprunté par la sève xylémienne chez le pin rouge (*Pinus resinosa*) observé après injection de fuschine acide à la base du tronc (Kozlowski and Winget, 1963). Les sections ont été coupées à intervalles de 60 cm et la ligne verticale se situe au dessus de la zone d'injection.**

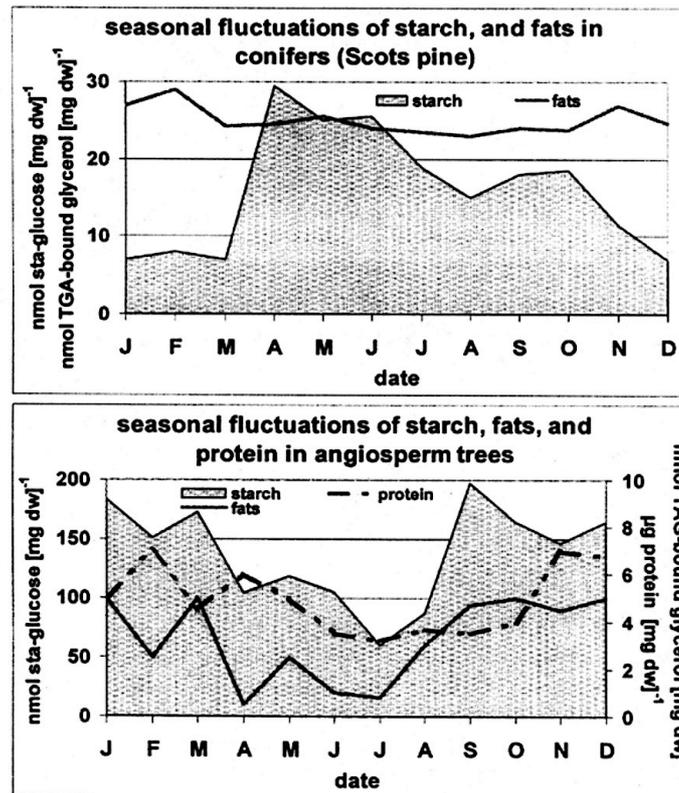
### 1.2.9.3. Fonction de stockage

Chez les arbres appartenant aussi bien au groupe des gymnospermes qu'à celui des angiospermes, les parties vivantes du bois et l'écorce sont les compartiments de stockage prédominants. Ces tissus de réserve sont remplis en période favorable, et vidés en cas de forte demande à savoir lors de la formation et de la croissance des feuilles, de la formation de nouvelles racines ou encore lors de la croissance du cambium au début du printemps et en été. Le carbone est stocké sous forme de polysaccharides non structuraux (amidon, fructosanes et sucres solubles) et de lipides (triacylglycérols). Certaines essences vont accumuler préférentiellement de l'amidon (la plupart des angiospermes à zone initiale poreuse et quelques conifères comme les espèces des genres *Abies* et *Picea*) tandis que d'autres stockeront majoritairement des lipides (la plupart des angiospermes à pores diffus et les espèces du genre *Pinus* (Magel, 2001). Dans les arbres adultes, l'amidon est majoritairement retrouvé dans les rayons parenchymateux et les cellules des parenchymes axiaux. La quantité de réserve en polysaccharides varie avec l'âge des tissus. Les grains d'amidon étant plus abondants dans les rayons ligneux proches du cambium. Il a en effet été montré chez le pin sylvestre, qu'en octobre, les quantités de polysaccharides de réserve (amidon, glucose, fructose et saccharose) étaient très élevées dans l'aubier externe et diminuaient graduellement jusqu'au duramen (Kozlowski, 1992). En hiver, les sucres solubles s'accumulent au dépend de l'amidon (par hydrolyse de celui-ci) et agissent comme des cryoprotecteurs (Guy et al., 1992). Les fluctuations saisonnières des quantités d'amidon diffèrent entre les conifères et les feuillus. Chez les conifères, les réserves minimales en amidon sont observées en hiver et se

reforment rapidement en début de printemps à partir des photoassimilats. Ces derniers sont également la source principale de carbone pour les tissus nouvellement formés, ce qui explique que le pool d'amidon reste relativement stable jusqu'à mai-juin. Ensuite, à la fin de la croissance des tiges et des aiguilles, les contenus en amidon de l'aubier diminuent jusqu'au début de la dormance du fait d'un équilibre entre hydrolyse et synthèse des réserves (Figure 24). Chez les feuillus, l'amidon est synthétisé en début de printemps puis utilisé pour le débourrement des bourgeons et l'activité du cambium. L'accumulation d'amidon dans l'aubier redémarre ensuite lorsque les feuilles sont totalement développées et se poursuit jusqu'à l'automne (Figure 24) (Magel, 2001).

Concernant les lipides contenus dans le bois, ils sont sous forme d'esters de stérols et de glycérols, d'acides gras et de stérols libres et de phospholipides (Höll, 1997). Seuls les triacylglycérols (TAG) contribuent aux réserves énergétiques de l'aubier. Chez les essences qui stockent majoritairement les lipides, les TAG sont les réserves dominantes. Les TAG sont également retrouvés dans l'aubier des essences accumulant majoritairement de l'amidon. Tout comme le pool d'amidon, le pool de TAG diminue de l'aubier externe jusqu'au duramen, des traces de TAG étant cependant encore observées dans le duramen. De manière générale, chez les résineux, les pools de TAG diminuent très légèrement entre mars et septembre. Ceci montre que les réserves internes du bois ne sont pas nécessaires à l'activité cambiale. *A contrario*, des changements importants de quantités et de nature des lipides de réserve sont observés chez les feuillus. Longtemps avant le débourrement des bourgeons et la formation des feuilles, les lipides sont hydrolysés. Les produits de l'hydrolyse sont transportés aux sites demandeurs de carbone, notamment au cambium où ils sont convertis en sucres (Höll, 2000). Les lipides s'accumulent ensuite lorsque les feuilles sont totalement développées (Figure 24).

Les protéines de réserve représentent le troisième groupe de composés de réserve retrouvés dans l'aubier. Des protéines de réserve ont été identifiées aussi bien chez des gymnospermes que chez des angiospermes. Ces protéines sont décrites comme étant principalement des glycoprotéines ayant une masse d'environ 35 kDa et pouvant être retrouvées dans des corps protéiques. Le pool de protéines de réserve de l'aubier diminue rapidement au printemps lors du débourrement des bourgeons et de la formation des feuilles, reste bas en été puis augmente de nouveau à l'automne avant la sénescence des feuilles (Figure 24). La synthèse des protéines dans le bois est corrélée avec l'augmentation des teneurs en composés azotés (Magel, 2001).



**Figure 24 : Fluctuations saisonnières des réserves en amidon, en lipides et en protéines dans le bois des gymnospermes et des angiospermes (Magel, 2001).**

Avec les feuilles et les racines, l'écorce et les cellules parenchymateuses du bois sont également des sites majeurs de stockage des éléments minéraux. Les nutriments mobiles sont transportés de leur lieu de stockage vers les tissus méristématiques lors de la reprise de croissance au printemps bien avant que leur absorption n'ait lieu dans le sol (Pallardy, 2010).

En plus de stocker des réserves énergétiques et minérales, le bois est également un réservoir important d'eau. Le contenu en eau est généralement bien plus faible dans le duramen que l'aubier. Des quantités plus importantes d'eau sont stockées dans l'aubier des gymnospermes par rapport à celui des angiospermes. Chez certaines essences, le contenu en eau peut fortement varier en fonction de la saison, des variations plus importantes étant observées chez les feuillus et ce de manière très variable suivant les essences et leur environnement (Pallardy, 2010). Au sein des tissus végétaux, l'eau peut être stockées de manière intracellulaire ou extracellulaire (Arcikhovskiy, 1931). Contrairement à l'eau stockée dans l'apoplasme des cellules du tronc, l'eau symplasmique est principalement retrouvée dans les tissus vivants, entre l'écorce et le xylème nouvellement formé. D'importantes quantités d'eau sont stockées de manière apoplasmique par capillarité au niveau des espaces intercellulaires ou dans le lumen des éléments conducteurs du xylème embolisés (Holbrook, 1995). Čermák et al. (2007)

ont montré que des vieux douglas (450-480 ans, 1,29 m de diamètre et 57 m de haut pour l'un) contenaient de grandes quantités d'eau libre et que l'aubier du tronc était le site de stockage prédominant. Ces auteurs ont estimé que lorsque la transpiration quotidienne était de 150 à 300 L (valeurs mesurées lors de belles journées entre Juillet et Octobre), la quantité d'eau stockée utilisée quotidiennement était de 25 à 55 L, soit 20 % du flux de sève total. La plus grande quantité de l'eau stockée utilisée provenant de la partie inférieure du tronc.

#### **1.2.9.4. Fonction de défense**

Les arbres présentent au niveau de leur bois deux types de mécanismes de défense, un mécanisme actif et un mécanisme passif. Les mécanismes passifs de défense comprennent des facteurs chimiques, anatomiques et morphologiques qui sont sous contrôle génétique mais non induits par l'attaque de pathogènes. La première source de protection de l'arbre est la lignine, qui compose 20 à 35 % du bois normal et qui est un polymère qui présente une certaine résistance à la biodégradation. La formation du duramen est également un mécanisme de défense passif. En effet, lors de ce processus physiologique, de nombreux métabolites spécialisés (extractibles) sont synthétisés par les cellules parenchymateuses et déposés dans le bois, améliorant ainsi sa résistance aux microorganismes pathogènes (Blanchette and Biggs, 2013).

Bien que la présence de composés antimicrobiens soit plus caractéristique du duramen, l'aubier en contient également de faibles quantités. L'aubier des gymnospermes peut stocker des lignanes, des acides gras, des résines acides, des alcools diterpéniques ou encore des stilbènes comme la pinosylvine chez les pins. Pour les angiospermes, citons en exemple l'acide gallique, la catéchine ou encore les tannins éllagiques. Cependant, les extractibles ne sont généralement pas en teneurs suffisantes pour garantir une résistance aux pathogènes, des mécanismes de défense actifs sont donc nécessaires. Deux types de mécanismes de défense actifs sont observés : des mécanismes anatomiques et des mécanismes chimiques. Concernant ces derniers, de nombreux composés inhibiteurs sont synthétisés dans l'aubier en cas d'infection microbienne. Certains tels que les lignanes et les pinosylvines, déjà présents en faible quantité, voient leur teneur augmentée au niveau de la périphérie de la zone infectée. Les composés de défense sont généralement des composés phénoliques, également retrouvés dans le duramen chez une même espèce. Mais d'autres familles de molécules telles que les terpènes, les flavonoïdes, les résines ou les acides gras sont également impliquées dans les mécanismes de défense et peuvent s'accumuler au niveau du site de l'infection. En réponse à une infection microbienne, des modifications anatomiques des cellules du bois peuvent être

occasionnées. Les cellules parenchymateuses vivantes proches du site d'infection peuvent ainsi subir une lignification et une subérisation de leur paroi pour augmenter leur résistance aux pathogènes. Les éléments du xylème peuvent, quant à eux, être obstrués par la formation de thylloses ou le dépôt de composés chimiques (Blanchette and Biggs, 2013; Gartner, 1995; Yamada, 2001).

### **1.3. Objectifs et plan de thèse**

La durabilité du bois est un critère de qualité déterminant l'évaluation commerciale et les utilisations industrielles du bois de douglas. Bien que la formation du duramen soit le principal processus physiologique conduisant à la durabilité du bois (Hillis, 2014), peu d'études ont porté sur la compréhension des mécanismes conduisant à sa formation. L'objectif, à court terme, de ce travail de recherche est d'apporter des réponses quant aux mécanismes moléculaires qui interviennent dans la formation du duramen chez le douglas, essence d'avenir en France et particulièrement en Limousin. Jusqu'à maintenant, les améliorateurs d'arbres forestiers ont principalement sélectionné les arbres sur des critères phénotypiques de croissance et d'adaptabilité (résistance au froid, période de débourrement...), la qualité du bois étant peu prise en considération (Pâques, 2001). Sur le long terme, cette étude vise par conséquent à apporter des outils de sélection (marqueurs génétiques, biochimiques...) nécessaires à l'amélioration génétique du douglas pour le caractère duramen.

Afin de répondre à notre problématique, deux approches ont été développées : une approche phénotypique et une approche génétique. La première approche a été mise en place dans le but de caractériser la qualité du bois de plusieurs populations clonales de douglas en termes de proportion de duramen, de densité et de composition biochimique. La transformation de l'aubier en duramen étant un processus saisonnier (Kampe and Magel, 2013), nous avons également suivi l'évolution de la zone de transition (TZ) sur une année de végétation pour déterminer la période de formation du duramen chez le douglas. L'approche génétique vise quant à elle à caractériser les gènes impliqués dans le vieillissement de l'aubier. Par la technique de RNA-Seq (séquençage à haut débit du transcriptome entier), qui permet d'identifier et quantifier les gènes exprimés à un moment donné dans un tissu, nous avons comparé les profils d'expression géniques de l'aubier et de la TZ afin d'identifier les gènes préférentiellement exprimés dans cette dernière.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois chapitres :

- **Chapitre 1** : il porte sur la caractérisation du génotype et du phénotype des douglas utilisés dans le cadre de ce travail de recherche. Les données de génotypage, les analyses qualitatives des arbres (hauteur et/ou diamètre) et du bois (densité du bois et proportion de duramen) y seront présentées, ainsi que le suivi de la formation du duramen sur une année de végétation.
- **Chapitre 2** : il vise à observer l'évolution de la composition biochimique (principalement polysaccharidique) du bois de douglas en relation avec la formation du duramen. Pour ce faire, une nouvelle méthode a été développée mettant en jeu la solubilisation de la biomasse ligneuse dans des liquides ioniques suivie d'une analyse des solutions obtenues par des techniques immunologiques avec des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de polymères pariétaux. Les mises au point de la méthode seront présentées ainsi que son application pour déterminer l'évolution de la composition du bois de douglas, cerne par cerne, de l'aubier externe au cœur du duramen à partir des carottes de bois prélevées mensuellement. En parallèle, nous avons utilisé plusieurs méthodes analytiques couplées à la microscopie pour étudier *in-situ* la composition et la structure du bois de douglas : la microscopie confocale couplée à des immunomarquages et la microspectroscopie infrarouge.
- **Chapitre 3** : le but est de caractériser les gènes impliqués dans la formation du duramen chez le douglas. Les analyses transcriptomiques ont été réalisées par la technique RNA-Seq à partir d'échantillons provenant de douglas d'une vingtaine d'années, prélevés à chaque saison et appartenant à une seule population clonale. Afin d'observer les gènes préférentiellement exprimés au niveau de la TZ, nous avons caractérisé les profils d'expression de différentes zones du xylème.

# *Chapitre 1 : Caractérisation du matériel végétal*

## **2.1 Introduction**

### **2.1.1 Etude bibliographique**

Peu de temps après l'introduction des douglas en Europe, le facteur « provenance » (origine des graines) a été reconnu comme un facteur important influençant les caractéristiques phénotypiques des arbres, notamment leur vigueur et leur adaptabilité (Kohnle et al., 2012; Neophytou et al., 2016). Depuis longtemps, l'effet « provenance » sur les phénotypes est considéré comme étant lié aux variations génétiques entre les individus d'origines différentes. Mais ce n'est que récemment que ce lien de causalité a fait l'objet d'investigations afin d'identifier les associations entre les variations phénotypiques et les variations alléliques de gènes candidats (Eckert et al., 2009a). Pour les études d'associations génétiques, la caractérisation de la structure de la population, grâce à des marqueurs génétiques neutres, est une étape importante susceptible d'éviter de mauvaises associations entre phénotype et génotype (Krutovsky et al., 2009). De plus, cette étape permet de caractériser la diversité génétique au sein d'une population (Neophytou et al., 2016). Deux catégories de marqueurs sont retrouvés en génétique et en amélioration des plantes : des marqueurs classiques basés sur le phénotype (marqueurs morphologiques, cytologiques et biochimiques) et des marqueurs moléculaires comme l'ADN. Ces derniers, indépendants de l'environnement, sont définis comme étant des segments particuliers d'ADN révélateurs de mutations/variations, et pouvant être utilisés pour détecter du polymorphisme entre différents génotypes ou différents allèles d'un gène (Jiang, 2013). Ils peuvent être corrélés ou non à l'expression d'un trait phénotypique. L'utilisation de marqueurs moléculaires offre de nombreux avantages comparée à celle des marqueurs classiques. Contrairement à ces derniers, les marqueurs moléculaires basés sur l'ADN sont stables et détectables dans tous les tissus quels que soient leur stade de développement et les conditions environnementales (Agarwal et al., 2008). De ce fait, nous nous intéresserons uniquement à ce type de marqueurs dans le cadre de cette étude.

#### **2.1.1.1 Les marqueurs moléculaires**

Les techniques mettant en jeu les marqueurs moléculaires peuvent être subdivisées en deux catégories : les techniques basées sur l'hybridation et les techniques basées sur la PCR.

#### **2.1.1.1.1 Technique basée sur l'hybridation**

La technique basée sur l'hybridation qui sera développée est la technique de polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisme). Dans ce cas, l'ADN est coupé en fragments de restriction par une endonucléase de restriction et après migration électrophorétique, des profils différenciés sont obtenus suite à des substitutions, des insertions ou des délétions nucléotidiques. Les marqueurs RFLP sont polymorphes, reproductibles, répartis uniformément dans le génome et ils présentent une grande héritabilité. Cependant cette technique n'est pas couramment utilisée car elle est couteuse en temps et implique l'utilisation d'ADN de qualité en grande quantité. C'est pourquoi les techniques basées sur la PCR sont plus largement développées (Jiang, 2013).

#### **2.1.1.1.2 Techniques basées sur la PCR**

Ici le typage moléculaire met en jeu des techniques basées soit sur l'amplification de séquences non spécifiques, soit sur l'amplification de séquences cibles.

##### *RAPD (Random amplified polymorphic DNA)*

La technique RAPD est basée sur une amplification aléatoire par PCR de l'ADN génomique. Pour ceci, des amorces de séquences arbitrairement définies (la plupart du temps, de 10 bases) sont utilisées pour l'amplification. Le polymorphisme est ensuite observé suite à une électrophorèse des fragments amplifiés (Williams et al., 1990). Bien que cette méthode soit rapide à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas de connaissances préalables sur le génome étudié, elle est cependant peu reproductible. C'est pourquoi la technique AFLP a été développée pour surmonter le manque de reproductibilité de la RAPD (Vos et al., 1995).

##### *AFLP (Amplified fragment length polymorphism)*

L'AFLP combine les avantages de la RAPD tout en étant plus fiable du fait de l'utilisation d'adaptateurs et donc d'une amplification par PCR sélective de fragments d'ADN. L'ADN génomique est digéré à l'aide de deux enzymes de restriction (l'une coupant rarement et l'autre plus fréquemment). Puis, des adaptateurs spécifiques sont ligaturés aux extrémités des fragments de restriction. Ces derniers sont amplifiés en utilisant des amorces avec une extrémité de 2-3 nucléotides aléatoires. L'analyse du polymorphisme se fait ensuite par électrophorèse (Jiang, 2013).

### *RAD (Restriction site associated DNA)*

Dans le cas de la technique utilisant des marqueurs RAD, l'ADN est digéré à l'aide d'une seule enzyme de restriction, les segments de restriction sont ligaturés à des adaptateurs puis coupés aléatoirement. Grâce aux adaptateurs (qui sont par exemple biotinylés), les marqueurs RAD sont isolés et peuvent ensuite être utilisés pour la fabrication de puces utilisées pour le génotypage (Miller et al., 2007).

Depuis le séquençage du premier génome de plante en 2000, l'amélioration des techniques d'analyse des génomes a conduit à l'accumulation de plusieurs téraoctets de données (Proost et al., 2009). Ceci a aidé au développement des techniques de génotypage basées sur des séquences spécifiques telles que les microsatellites, le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP : Single nucleotide polymorphism), le RADSeq ou encore la capture d'exome.

### *Les microsatellites*

Les microsatellites sont des séquences formées par une répétition continue de motifs composés de 1 à 6 nucléotides qui sont retrouvés à des fréquences élevées dans tous les génomes eucaryotes (Tautz and Renz, 1984). Appelés SSR (Simple sequence repeats), VNTR (Variable number tandem repeats) ou STR (Short tandem repeats), les microsatellites les plus utilisés contiennent des répétitions de 2, 3 ou 4 nucléotides (Selkoe and Toonen, 2006). La plupart des microsatellites sont extragéniques, cependant les répétitions de 3 et 6 nucléotides sont les classes qui apparaissent le plus souvent dans des régions codantes car elles ne causent pas de décalage du cadre de lecture (Tóth et al., 2000). La longueur des microsatellites varie en général entre 5 et 40 répétitions. Les séquences flanquantes qui encadrent les microsatellites sont généralement très conservées entre individus d'une même espèce, voire, entre différentes espèces. C'est à partir de ces séquences que sont réalisées les amorces utilisées pour l'amplification par PCR. Contrairement aux séquences flanquantes qui sont très conservées, les microsatellites mutent fréquemment, principalement suite au glissement du brin d'ADN lors de sa réplication, entraînant une délétion ou un ajout du motif répété (Schlötterer and Tautz, 1992). Cette différence de longueur des allèles est ensuite détectée par électrophorèse haute résolution. Cette méthode permet un génotypage rapide de nombreux individus en plusieurs loci et ceci à faible coût (Selkoe and Toonen, 2006). De plus, de nombreux microsatellites ont un taux de mutation très élevé (entre  $10^{-2}$  et  $10^{-6}$  mutations par locus et par génération) entraînant une grande diversité allélique profitable aux études génétiques (Schlötterer, 2000). Une cinquantaine de marqueurs microsatellites ont été

identifiés chez le douglas (Amarasinghe and Carlson, 2002) et l'utilisation de 15 d'entre eux a même été décrite comme étant un outil fiable de génotypage du douglas (Slavov et al., 2004).

### *Les SNPs*

La seconde technique basée sur l'amplification de séquences spécifiques repose sur les SNPs. Ce sont des variations d'un nucléotide observées entre individus d'une population au sein de séquences du génome. Les SNPs sont les marqueurs moléculaires les plus abondants du génome. Leur densité et leur distribution varient en fonction des espèces. Chez le douglas, la densité de SNPs a été estimée à 1 pour 42-112 pb en utilisant la méthode Sanger (Eckert et al., 2009b) et à 1 pour 2530 en utilisant des outils de séquençage de seconde génération (Müller et al., 2012). Généralement, les SNPs sont plus fréquents dans les régions non codantes du génome où ils peuvent dans certains cas avoir une influence sur la transcription des gènes. Lorsque les SNPs sont présents dans une séquence codante, ils sont appelés SNPs synonymes s'ils ne changent pas la séquence protéique ou SNPs non-synonymes s'ils changent la séquence d'acides aminés (Sunyaev et al., 1999). Les SNPs synonymes peuvent modifier l'épissage des ARNm et ainsi entraîner des différences phénotypiques (Richard and Beckmann, 1995). La majorité des protocoles de génotypage basés sur les SNPs mettent en jeu un des 4 mécanismes moléculaires suivants : une hybridation allélique spécifique, une extension avec amorce, une ligature d'oligonucléotide ou un clivage invasif (Sobrino et al., 2005). Les méthodes de génotypage à haut débit incluant les puces à ADN, la PCR allèle-spécifique et les approches d'extension par amorce rendent la technique des SNPs très attractive. Ces méthodes conviennent en effet à l'automatisation et sont donc rapides à mettre en œuvre pour de nombreuses applications (Agarwal et al., 2008). Chez le douglas, environ 200 000 marqueurs SNPs ont été identifiés et environ 69 000 d'entre eux sont utilisables pour génotyper les quelques 20 000 gènes grâce à une puce Infinity II (Howe et al., 2013).

### *RAD-Seq*

Dans le cas du RAD-Seq, les marqueurs RAD isolés (suivant les mêmes étapes que précédemment décrit) contiennent en plus des adaptateurs spécifiques pour le séquençage sur des plateformes comme l'Illumina. Le séquençage à haut débit de marqueurs RAD permet ainsi, rapidement et efficacement, le génotypage et la découverte de SNPs (Baird et al., 2008).

### *La capture d'exome*

Concernant la capture d'exome, cette méthode consiste à séquençer les régions codantes des gènes (l'exome). Cette technique permet de révéler les SNPs, les variants rares, les petites

insertions (Bamshad et al., 2011), et elle est de plus en plus utilisée pour la caractérisation du nombre de copie des gènes (Krumm et al., 2012).

### **2.1.1.2 Amélioration génétique et propriétés du bois**

La diversité génétique fournit la base de toute amélioration variétale. Dans le cas des arbres forestiers, les améliorateurs ont jusqu'à maintenant principalement sélectionné les arbres sur des critères phénotypiques de croissance et d'adaptabilité (résistance au froid, période de débourrement...), les propriétés du bois étant peu prises en considération (Pâques, 2001). Parmi les nombreuses propriétés fondamentales du bois, sa densité est considérée comme étant l'une des caractéristiques les plus importantes car elle a une influence majeure sur la résistance du matériau.

#### **2.1.1.2.1 La densité du bois**

La densité du bois correspond à la proportion de paroi et de lumen dans un certain volume de bois. Elle est influencée par l'épaisseur des parois, le diamètre des cellules ou encore par les quantités relatives de bois initial et de bois final (Fabris, 2000). Différentes techniques permettent de caractériser la densité du bois. Les approches volumétriques (American Society for Testing and Materials (ASTM), 1985) et celles par densitométrie aux rayons X (Cown and Clement, 1983; Polge, 1966) sont les plus couramment employées. Ces deux méthodes nécessitent le prélèvement de carottes sur les arbres et sont donc intrusives. Les résultats obtenus avec ces deux approches sont comparables (Isik and Li, 2003). D'autres méthodes alternatives et non destructives ont été développées pour estimer la densité du bois, parmi lesquelles des méthodes basées sur la résistance au forage du bois ou encore sur les propriétés acoustiques de ce dernier. Le Pilodyn (Cown, 1978) et le Resitograph (Winistorfer et al., 1995) sont basés sur la mesure de la résistance au forage le long d'une fine aiguille lorsque celle-ci est enfoncée dans l'arbre avec une force constante. Cependant, le Resistograph n'est pas suffisamment précis pour permettre d'identifier des variations inter et intra-cernes (Chantre and Rozenberg, 1997). Le Director HM200 et le Direcor ST300 sont, quant à eux, deux techniques acoustiques basés sur la vitesse à laquelle les ondes sonores se déplacent à travers le matériau. Les études génétiques suggèrent que la densité du bois est un caractère héréditaire (Johnson and Gartner, 2006). Le premier caractère phénotypique sélectionné dans les programmes d'amélioration du douglas a été la croissance et cette dernière est corrélée négativement avec la densité du bois. A cause de cette corrélation négative, si l'on inclut la

densité dans les caractères de sélection, il n'est pas possible d'atteindre le potentiel maximal de gain pour la croissance (Woods, 1993).

#### 2.1.1.2.2 La durabilité du bois

Une seconde caractéristique du bois, qui prend toute son importance chez le douglas, est la durabilité. En effet, la résistance du matériau bois à la dégradation par des champignons, lorsqu'il est soumis à des conditions humides, est une propriété recherchée par les industriels. La durabilité varie d'une essence à l'autre, d'un arbre à l'autre au sein d'une même essence et également d'une zone à l'autre du duramen au sein d'un même arbre (Pâques and Charpentier, 2015). Le bois de douglas est reconnu comme étant l'un des plus durables parmi les conifères cultivés en Europe (Angelier, 2007). La durabilité du bois est liée à ses caractéristiques anatomiques (comme l'occlusion du système vasculaire qui entraîne une imperméabilité du duramen) et à son contenu qualitatif et quantitatif en extractibles (Pâques, 2001). La durabilité peut être évaluée grâce à des tests sur le terrain/en plein champs selon les normes Européennes EN 252 et, plus classiquement, par des tests en laboratoire selon les normes EN 113. La durée d'un test standard EN 113 utilisant des basidiomycètes est de 16 semaines. Il requiert l'utilisation de 3 souches fongiques certifiées dont une obligatoire, *Coniophora puteana* (champignon entraînant une pourriture brune). Les autres souches peuvent être *Poria placenta*, *Gloeophyllum trabeum*, *Coriolus versicolor* (Paulus, 2005). De petits morceaux de bois normés sont introduits dans une verrerie stérile inoculée avec une seule souche fongique. A l'issue des 16 semaines, la perte massique est mesurée et la durabilité estimée en comparaison à des valeurs de référence (Palanti and Feci, 2013; Plaschkies et al., 2014; Raberg et al., 2005). Contrairement aux essais de terrain, les essais de laboratoire ne prennent pas en considération les interactions entre différentes souches fongiques ainsi qu'avec d'autres microorganismes (Raberg et al., 2005). Outre la durabilité du bois, la proportion en duramen est également un facteur important. Chez les conifères, il semblerait que ce caractère présente une héritabilité importante comme ceci a été montré pour différentes espèces de pins (Fries and Ericsson, 1998; Magnussen and Keith, 1990; Nicholls and Brown, 1974) et de mélèzes (Pâques and Charpentier, 2015). Chez le douglas, les efforts en recherche fondamentale se concentrent, aujourd'hui, de plus en plus sur le développement d'outils de phénotypage à grande échelle permettant d'inclure les caractères relatifs à la qualité du bois dans les programmes d'amélioration. L'un des objectifs étant d'accroître à la fois la durabilité et la proportion de duramen du bois des douglas sélectionnés (Bastien et al., 2013).

## **2.1.2 Objectifs**

L'objectif de cette partie du travail est de caractériser le génotype et le phénotype des douglas étudiés dans le cadre de la thèse. Ces douglas sont issus de populations clonales sélectionnées que nous avons, dans un premier temps, génotypées. Les données de croissance (diamètres et/ou hauteurs) ont été mesurées et la qualité du bois a été étudiée en terme de densité et de proportion de duramen. Pour ce qui est du caractère duramen, un suivi de l'évolution de ce dernier a été réalisé sur une année de végétation. Bien que la composition biochimique du bois soit une caractéristique qualitative, cette étude fait l'objet du chapitre suivant du fait de l'utilisation d'une nouvelle méthode d'analyse, qui sera présentée par la même occasion.

## **2.2 Matériel et méthodes**

### **2.2.1 Matériel végétal**

Pour cette étude, deux sources de matériel biologique ont été utilisées : des douglas appartenant à plusieurs provenances prélevés en Corrèze (19) qui ont été utilisés pour réaliser des analyses transcriptomiques et phénotypiques (aspect du bois, densitométrie, composition biochimique) ; et des douglas appartenant à une seule provenance et situés sur une parcelle en Haute-Vienne (87) qui ont été carottés périodiquement pour suivre la formation du duramen et l'évolution de la composition du bois.

Les douglas utilisés entre autre pour les analyses transcriptomiques proviennent d'une parcelle située à Gimel (19) appartenant à Lionel Say (directeur général de la CFBL) et gérée par le FCBA. La parcelle a été plantée à 1111 tiges à l'ha par le FCBA en 1994, avec des jeunes plants issus de populations sélectionnées sur des caractères phénotypiques d'intérêts pour les sylviculteurs : performance de croissance, date de débourrement, rectitude du tronc, angle d'insertion de la branchaison. La parcelle est organisée en blocs constitués pour chacun d'arbres appartenant à une même provenance. Un dépressage (abattage sélectif d'arbres pour accroître les ressources disponibles aux arbres restants) a été effectué en 2008. Sur l'ensemble du dispositif, 4 provenances (1039, 80 145, 80 189 et 80 315, appelées par la suite population clonale 1, 2, 3 et 4 respectivement) ont été retenues dans le cadre de cette étude de par l'abondance des arbres dans chaque bloc. Un arbre par provenance a été abattu à chaque saison, excepté pour la provenance 80189 pour laquelle 3 arbres ont été abattus en hiver et en été. Les dates de prélèvement sont les suivantes : 14 octobre 2013, 9 janvier 2014, 17 avril

2014 et 23 juillet 2014. Les rondelles de bois prélevées ont été congelées immédiatement après leur prélèvement dans l'azote liquide, avant d'être stockées à -80°C.

La caractérisation de la formation du duramen et de la composition biochimique du bois de douglas a été réalisée à partir de carottes de bois de 5 mm de diamètre prélevées à l'aide d'une tarière sur des douglas de 28 ans se trouvant sur une parcelle à Saint Gence (87) (Figure 25A) et appartenant au FCBA (parcelle conservatoire de clones de douglas). Une carotte a été prélevée chaque mois pendant 15 mois sur 10 arbres issus de multiplication végétative de la provenance 80189 à une hauteur comprise entre 1 m et 1,3 m à partir du collet (Figure 25B).

A



B



**Figure 25 : Photographies A : des 10 arbres carottés ; B : d'une carotte de 5 mm de diamètre prélevée à 1-1,3 m du collet.**

Pour ne pas trop perturber le fonctionnement physiologique de l'arbre et éviter d'augmenter les stress lors des prélèvements, nous nous sommes limités à 4 carottes par arbres. Les carottages ont donc été réalisés en rotation sur les 10 arbres suivant le plan expérimental présenté dans le tableau 4. Au temps  $T_0$ , date de début des prélèvements, les 10 arbres ont été carottés ( $T_0$  ; 21 janvier 2015). Un mois après ( $T_1$ ), les arbres 1 et 6 ont été carottés, un mois après  $T_1$  ( $T_2$ ) les arbres 2 et 7 et ainsi de suite jusqu'aux arbres 5 et 10. Six mois après le premier prélèvement des arbres 1 et 6, les carottages reprennent pour ces deux arbres.

**Tableau 4 : Dates des prélèvements des carottes de bois de douglas en rotation sur 10 arbres. T<sub>0</sub> : date de début des prélèvements. T<sub>1</sub> : prélèvement 1 mois après T<sub>0</sub>, T<sub>2</sub> : prélèvement 2 mois après T<sub>0</sub> ...**

<b>Arbres 1 et 6</b>	<b>T<sub>0</sub></b> 21/01/15	<b>T<sub>1</sub></b> 23/02/15	<b>T<sub>6</sub></b> 23/07/15
<b>Arbres 2 et 7</b>	<b>T<sub>0</sub></b> 21/01/15	<b>T<sub>2</sub></b> 20/03/15	<b>T<sub>7</sub></b> 25/08/15
<b>Arbres 3 et 8</b>	<b>T<sub>0</sub></b> 21/01/15	<b>T<sub>3</sub></b> 20/04/15	<b>T<sub>8</sub></b> 24/09/15
<b>Arbres 4 et 9</b>	<b>T<sub>0</sub></b> 21/01/15	<b>T<sub>4</sub></b> 26/05/15	<b>T<sub>9</sub></b> 21/10/15
<b>Arbres 5 et 10</b>	<b>T<sub>0</sub></b> 21/01/15	<b>T<sub>5</sub></b> 24/06/15	<b>T<sub>10</sub></b> 19/11/15

Une fois prélevées, les carottes sont conservées à -80°C avant d'être visuellement observées afin d'en évaluer l'aspect du bois de la TZ.

Des aiguilles ont été prélevées sur les arbres abattus à Gimel et sur les arbres carottés à Saint-Gence afin de génotyper les douglas étudiés dans le cadre de ce travail.

### **2.2.2 Génotypage**

Le génotypage des douglas a été réalisé par B. Le Guerroué du Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (CGAF, Office National des Forêts). Ce génotypage a été effectué à partir de 11 séquences microsatellites nucléaires qui ont été identifiées chez le douglas par Slavov et al. (2004) (Tableau 5) et décrites comme étant des outils fiables pour l'identification de génotype.

Pour chaque arbre (Gimel et Saint-Gence), quelques aiguilles ont été broyées dans l'azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon. Le kit « DNAeasy plant mini kit » (Quiagen) a été utilisé pour extraire l'ADN à partir de cette poudre d'aiguilles. L'ADN extrait a ensuite été quantifié au microspectrophotomètre (Nanodrop, ND-1000, ThermoScientific).

**Tableau 5 : Présentation du motif des microsatellites d'intérêt et des amorces sens et anti-sens utilisées pour les amplifier (d'après Slavov et al., 2004).**

	Amorce sens	Amorce anti-sens	Motif
<b>1F9</b>	CCTCATGCATTGGACACTC	GGATTCTTGAGCAGGTAGG	(AG) <sub>34</sub>
<b>2C2</b>	TAAATCCGCAGCTCATAGAATC	GGGTGGTGGCTAGGGAAAC	(AC) <sub>32</sub> ...(CT) <sub>4</sub>
<b>2C3</b>	AAAGACAACATTATGAAAGG	GTAATGGTTCGAAAAATAATG	(TC) <sub>24</sub> (AC) <sub>18</sub>
<b>2D4</b>	TTATTGCACATGAGTATTATGA	CAGATGTTGTTTTTATACCAC	(AT) <sub>4</sub> ...(TG) <sub>18</sub> (AG) <sub>26</sub>
<b>2G12</b>	CAAGGACTCATATGGGAAA	AACATCAGTAATAACCTTTT	(AC) <sub>11</sub> ...(AC) <sub>19</sub> ...(GCAC) <sub>5</sub> (GCAC) <sub>4</sub> (AC) <sub>7</sub> ...(AC) <sub>6</sub>
<b>3B2</b>	CTTTGGAGTTCTTAATATAG	GATAATAGCACCCACCATA	(TG) <sub>22</sub> (CG) <sub>7</sub>
<b>3D5</b>	GGCATCCTATTTTCATTTT	GTGATTACCTAACTTGTGC	(TG) <sub>16</sub> (AG) <sub>26</sub>
<b>3F1</b>	GACTAGATCATCGCAACTT	GGTATTCTTATGGTTTTTAT	(TG) <sub>6</sub> ...(TG) <sub>7</sub> (AG) <sub>27</sub> ...(AC) <sub>4</sub>
<b>3G9</b>	ATTCCTTTTGAGACCTACTT	CTTCAAAAATTCCTACAACA	(TG) <sub>12</sub> (AG) <sub>28</sub>
<b>4A7</b>	TTGTAAAAATCCCATGTAT	AAGTGGGGGAGTGTGTAAT	(TG) <sub>5</sub> ...(TG) <sub>5</sub> ...(CG) <sub>7</sub> (TG) <sub>4</sub> ...(TG) <sub>29</sub> ...(ATC) <sub>5</sub>
<b>4G2</b>	ATTTTTTGTATTGTGCTTG	TGGATATATTTGCATTTTAC	(AT) <sub>6</sub> ...(AG) <sub>29</sub>

Les 11 marqueurs microsatellites nucléaires (Slavov et al. 2004) sont regroupés en trois kits multiplexes pour la PCR suivant la procédure développée par B. Le Guerroué (Tableau 6).

**Tableau 6 : Volumes des réactifs PCR.**

Marqueurs	Dmix1				Dmix2			Dmix3		
	2C3	2G12	3B2	3D5	3F1	3G9	4A7	1F9	2C2	4G2
<b>Tampon QIAGEN (µl)</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>Amorce Anti-sens (10 µM) (µl)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,5	0,09	0,08	0,55
<b>Amorce Sens (10 µM) (µl)</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,15	0,5	0,09	0,08	0,55
<b>H<sub>2</sub>O (µl) (q.s.p. 7,4 µL)</b>	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,1	1,4	2,22	2,24	1,3

L'amplification par PCR des microsatellites a été réalisée avec le protocole suivant à l'aide d'un thermo-cycleur Mastercycler® ep gradient : une étape de dénaturation de 15 min à 95°C, puis 30 cycles comprenant 30 s à 94°C, 1 min à 56°C (étape d'hybridation des amorces), 45 s à 72°C (étape d'élongation). L'élongation finale est réalisée à 60°C pendant 10 min. Des témoins ont été placés dans chaque plaque PCR afin de faciliter la lecture des résultats et de confirmer la reproductibilité du processus.

Deux microlitres de produit PCR ont ensuite été ajoutés à 7,7 µL de formamide (Life Technology) et 0,3 µL de GeneScan 600liz (Life Technology). La migration a été effectuée

sur un séquenceur automatique ABI3500 (Applied Biosystem, USA). La lecture des données obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel GeneMapper V4.1 (Applied Biosystem, USA).

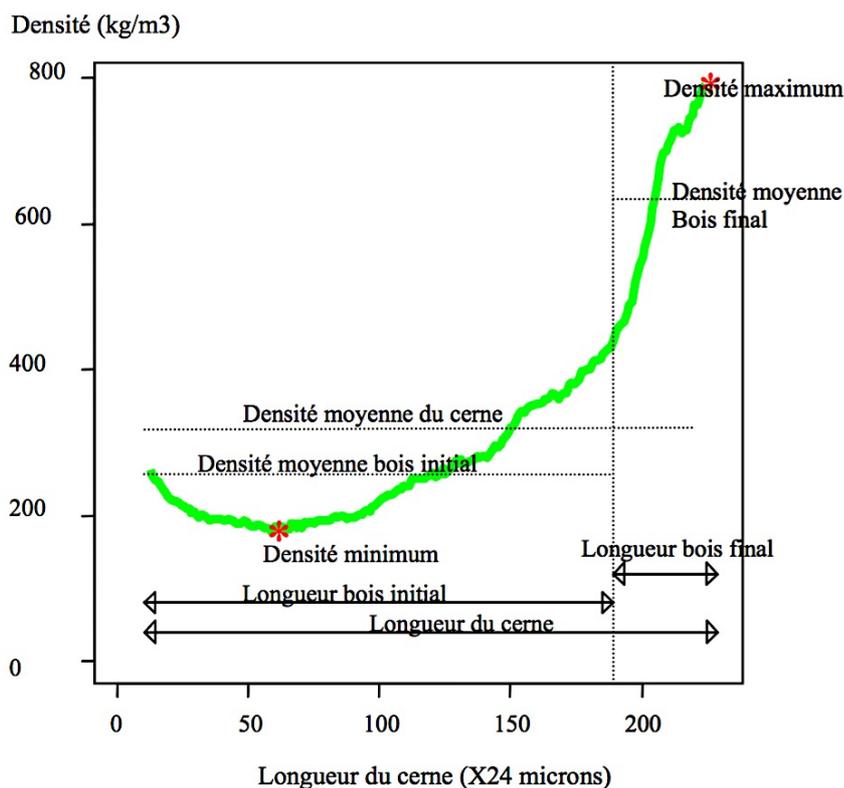
### **2.2.3 Mesures de croissance**

Les douglas de Gimel ont fait l'objet d'un suivi de croissance par le FCBA. Les diamètres de la majorité des arbres de la parcelle ont été mesurés en 2013, ainsi que la hauteur pour certains. Les diamètres ont été relevés à l'aide d'un compas forestier à 1,3 m du collet et les hauteurs à l'aide d'un dendromètre électronique.

Les douglas de Saint-Gence n'ont quant à eux pas fait l'objet de suivi. Nous avons uniquement calculé leur diamètre à partir de la moyenne des mesures des carottes prélevées sur chacun d'entre eux.

### **2.2.4 Densitométrie**

Les analyses de densitométrie ont été réalisées par Philippe Rozenberg à l'INRA d'Orléans pour 16 arbres prélevés à chaque saison à Gimel (4 arbres pour chaque génotype). Des planchettes de bois d'1 cm de largeur et de 2 mm d'épaisseur sont découpées à l'aide d'une scie-fraise à lames jumelles sur le rayon du tronc, de la moelle à l'écorce (2 rayons sont analysés par arbres), à une hauteur de tronc inférieure à 1,3 m. A la hauteur de tronc étudiée, les arbres présentaient entre 16 et 20 cernes. La résine est éliminée des planchettes par trempage dans le pentane pendant 24 h. L'humidité des échantillons était de 11 % lorsque la mesure de la densité du bois a été réalisée *via* un densitomètre de lecture indirecte des rayons X (Polge, 1966). Les profils de densité radial (une mesure de densité tous les 25  $\mu\text{m}$ ) ont été obtenus par analyse des images scannées avec le logiciel WinDENDRO (Guay et al., 1992) et calibrés avec une gamme de densités connues. Les limites de cernes ont été déterminées automatiquement puis vérifiées et éventuellement corrigées avec ce logiciel. A partir des profils bruts de densité, les paramètres suivants ont été calculés à l'aide d'outils développés sous R : densité moyenne et épaisseur des cernes, et pour chaque cerne, densité moyenne et épaisseur du bois final et du bois initial (Figure 26). La densité d'un matériau liquide ou solide est le rapport entre la masse volumique de ce matériau et celle de l'eau. Cette dernière ayant une masse volumique à 4°C de 1  $\text{kg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , la densité d'un solide ou d'un liquide s'exprime donc par la même valeur numérique que sa masse volumique.



**Figure 26 : Principales caractéristiques intra-cernes mesurées (Millier et al., 2006).**

### 2.2.5 Duraminisation

Le bois de douglas présente un aubier de couleur beige tandis que son duramen est de teinte rouge. Nous nous sommes servi de cette caractéristique afin d'observer visuellement la formation du duramen à partir des carottes prélevées mensuellement sur les 10 douglas de Saint-Gence. Sur chaque carotte de bois, le cerne de TZ a été déterminé grâce à la couleur et au taux d'humidité apparent du bois (visuellement, les cernes de duramen sont rouges et paraissent secs tandis que lorsque le cerne de TZ n'a pas fini sa transformation, il paraît humide et donc plus foncé que le duramen). La position du cerne de TZ des 2 côtés de la carotte a été calculée pour chaque arbre en partant du cœur du duramen afin de se baser sur une même référence pour tous les arbres (en effet, il n'était pas possible de compter les cernes à partir du cambium du fait de la formation d'un cerne supplémentaire à partir du printemps).

Le nombre de cernes et la proportion de duramen ont également été déterminés pour les arbres appartenant aux 4 provenances et prélevés à Gimel.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Génotypage des douglas

Les douglas plantés à Gimel proviennent de 4 populations clonales (4 provenances différentes) qui ont été multipliées par voie végétative. Afin de vérifier que le patrimoine génétique de ces douglas était identique entre arbre d'une même provenance et différent entre arbres de provenances distinctes, un génotypage a été réalisé pour tous les arbres prélevés. Pour ceci, 11 séquences microsatellites nucléaires, développés par Slavov et al. (2004), ont été amplifiées. La taille des amplicons obtenue pour chaque locus et pour chacun des arbres des 4 populations clonales est présentée dans le tableau 7 (pour plus de lisibilité, les résultats obtenus pour les 4 arbres d'une même population clonale sont d'une même couleur).

**Tableau 7 : Taille des amplicons (pb) obtenues sur les 11 locus à partir des amorces présentées dans le tableau 5 pour les douglas de Gimel. A : arbre abattu en automne ; H : en hiver ; P : au printemps ; E : en été ; de 1 à 4 : populations clonales 1, 2, 3 et 4.**

Arbre	locus 2G12f		locus 3B2		locus 3D5		locus m2C3		locus 3F1			
	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2		
A1	264	268	149	149	136	140	170	195	213	215		
H1	264	268	149	149	136	140	170	195	213	215		
P1	264	268	149	149	136	140	170	195	213	215		
E1	264	268	149	149	136	140	170	195	213	215		
A2	260	284	144	144	136	150	183	183	213	213		
E2	260	284	144	144	136	150	183	183	213	213		
P2	260	284	144	144	136	150	183	183	213	213		
E2	260	284	144	144	136	150	183	183	213	213		
A3	260	262	114	114	126	150	173	201	203	236		
H3	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234		
P3	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234		
E3	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234		
A4	251	256	163	163	136	142	177	212	218	226		
H4	251	256	163	163	136	142	177	212	218	226		
P4	251	256	163	163	136	142	177	212	218	226		
E4	251	256	163	163	136	142	177	212	218	226		
Arbre	locus 3G9		locus 4A7		locus 1F9		locus 2C2		locus 2D4		locus 4G2	
	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
A1	139	139	311	354	246	248	150	165	136	153	155	155
H1	139	139	311	354	246	248	150	165	136	153	155	155
P1	139	139	311	354	246	248	150	165	136	153	155	155
E1	139	139	311	354	246	248	150	165	136	153	155	155
A2	171	171	216	294	225	229	152	198	152	156	159	161
E2	171	171	216	294	225	229	152	198	152	156	159	161
P2	171	171	216	294	225	229	152	198	152	156	159	161
E2	171	171	216	294	225	229	152	198	152	156	159	161
A3	137	137	241	266	219	240	150	161	125	132	149	167
H3	137	137	241	266	219	240	150	161	125	132	149	167
P3	137	137	241	266	219	240	150	161	125	132	149	167
E3	137	137	241	266	219	240	150	161	125	132	149	167
A4	137	137	230	288	196	227	156	171	150	150	139	151
H4	137	137	230	288	196	227	156	171	150	150	139	151
P4	137	137	230	288	196	227	156	171	150	150	139	151
E4	137	137	230	288	196	227	156	171	150	150	139	151

Nous pouvons constater pour certains locus, comme par exemple pour le 3B2, que les tailles des amplicons, pour un même allèle, sont identiques au sein des arbres appartenant à une

même population clonale tandis qu'elles diffèrent entre arbres qui appartiennent à 2 populations clonales différentes. Pour certains locus, des tailles identiques d'amplicons sont également relevées entre arbres appartenant à des populations clonales différentes. Ceci est le cas pour le locus 3D5 pour lequel la taille de l'amplicon d'un allèle est de 136 pb pour 3 des 4 populations clonales (1, 2 et 4), la taille de l'amplicon du second allèle diffère cependant entre ces 3 populations clonales. Suite à ces résultats, nous observons bien 4 populations clonales distinctes pouvant être assimilées à 4 génotypes distincts, correspondant bien aux informations fournies par le FCBA. En revanche, pour le génotype 3 et pour un allèle du locus 3F1, une différence de taille de l'amplicon de 2 pb est observée pour un des arbres comparé au 3 autres. Pour confirmer ce résultat et éliminer une potentielle erreur de réplication lors de l'amplification des microsatellites, les arbres carottés à Saint-Gence qui appartiennent à ce même génotype ont été génotypés. Un des 10 arbres carottés étant mort, les analyses de génotypage ont été menées sur 9 arbres à partir des mêmes séquences microsatellites que précédemment. Les tailles des amplicons obtenues pour chaque locus sont présentées pour les 9 arbres dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Taille des amplicons obtenues à partir des amorces présentées dans le tableau 5 pour 9 arbres du génotype 3 carottés à Saint-Gence.**

Arbre	locus 2G12f		locus 3B2		locus 3D5		locus m2C3		locus 3F1	
	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
1	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234
2	260	262	114	114	126	150	173	201	203	236
3	260	262	114	114	126	150	173	201	203	236
4	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234
5	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234
6	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234
7	260	262	114	114	126	150	173	201	203	236
9	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234
10	260	262	114	114	126	150	173	201	203	234

Arbre	locus 3G9		locus 4A7		locus 1F9		locus 2C2		locus 2D4		locus 4G2	
	allèle1	allèle2										
1	137	137	241	266	219	240	150	161	136	153	155	155
2	137	137	241	266	219	240	150	161	136	153	155	155
3	137	137	241	266	219	240	150	161	136	153	155	155
4	137	137	241	266	219	240	150	161	136	153	155	155
5	137	137	241	266	219	240	150	161	152	156	159	161
6	137	137	241	266	219	240	150	161	152	156	159	161
7	137	137	241	266	219	240	150	161	152	156	159	161
9	137	137	241	266	219	240	150	161	152	156	159	161
10	137	137	241	266	219	240	150	161	125	132	149	167

Ces résultats confirment les résultats obtenus pour les arbres du génotype 3 de Gimel. Les tailles des amplicons sont identiques pour tous les locus analysés sauf pour un allèle du locus 3F1. Pour cet allèle, 6 des 9 arbres présentent une taille d'amplicon de 134 pb tandis que pour 3 d'entre-eux, cette taille est de 136 pb. Cette différence de taille correspond à l'ajout ou à la suppression d'un dinucléotide dans la séquence microsatellite.

### 2.3.2 Caractéristiques de croissance des arbres

Les douglas prélevés à Gimel ont été plantés en 1994 sur une parcelle expérimentale qui a fait l'objet d'un suivi par le FCBA. Les diamètres de la majorité des arbres ont été mesurés et la hauteur a été déterminée pour 5 individus par génotype en 2013 avant le début des prélèvements. Les résultats de ces mesures nous ont été fournis par le FCBA (Tableau 9).

**Tableau 9 : Caractéristiques générales des 4 génotypes de douglas à Gimel.**

Génotype	Surface (m <sup>2</sup> )	Effectif		Diamètre moyen (cm)	Hauteur moyenne (m)
		1994	2013	2013	2013
1	567	63	40	17,13 ± 2,55	12,44 ± 0,44
2	486	54	28	17,15 ± 2,29	15,00 ± 1,35
3	1044	116	62	16,64 ± 3,49	16,58 ± 1,16
4	648	72	36	17,60 ± 4,08	15,18 ± 1,40

Les diamètres moyens sont comparables entre les 4 génotypes étudiés. La hauteur a été mesurée pour un nombre restreint d'individus. La hauteur moyenne est un peu plus faible pour les arbres du génotype 1 par rapport aux arbres des autres génotypes.

Les diamètres ont également été déterminés pour les arbres carottés à Saint-Gence (Tableau 10).

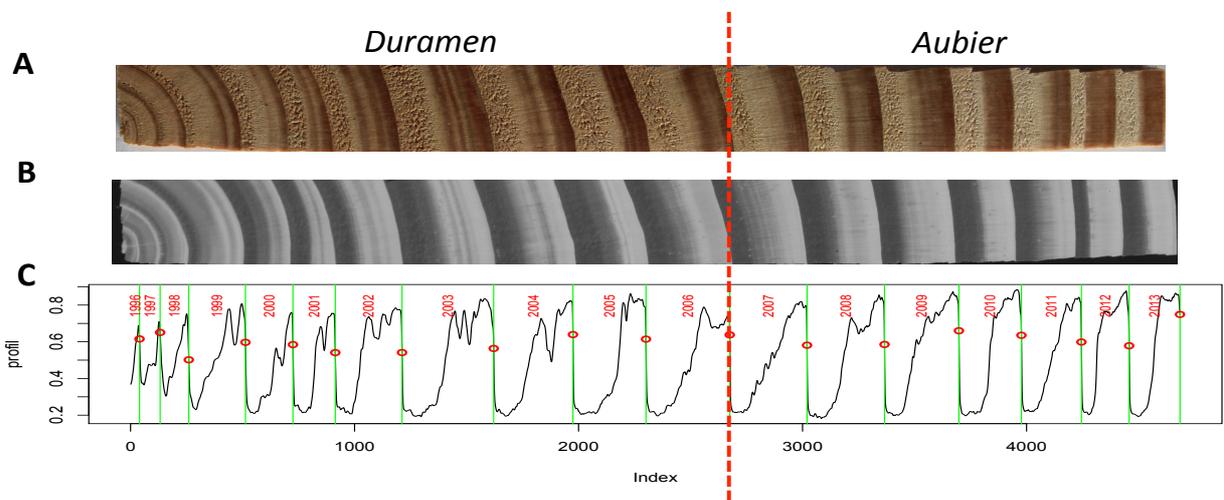
**Tableau 10 : Diamètres des 10 douglas carottés à Saint-Gence.**

Arbre	diamètre (cm)
1	31,4
2	32,5
3	32,8
4	25,1
5	33,0
6	32,7
7	26,8
8	34,1
9	18,3
10	31,3

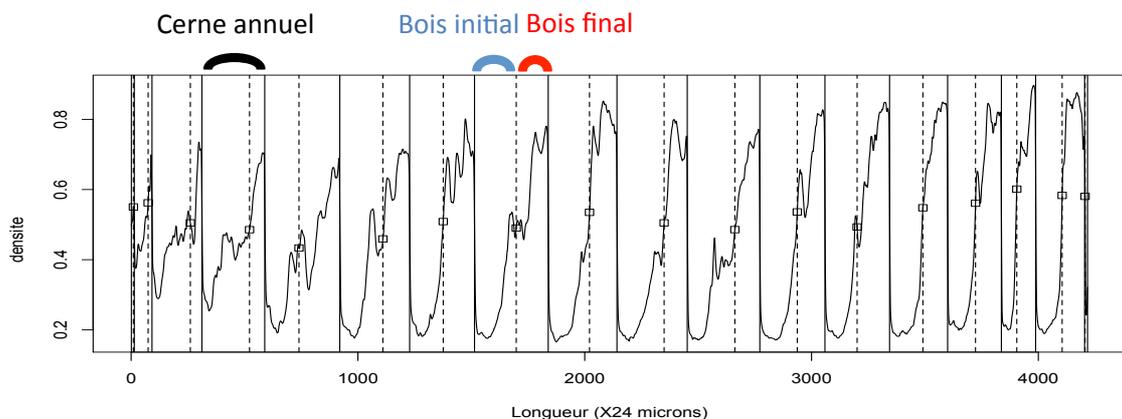
Les douglas carottés à Saint-Gence ont pour la plupart un diamètre supérieur à 30 cm, exceptés deux arbres qui ont un diamètre légèrement inférieur (les arbres 4 et 7) et un (l'arbre 9) qui a un diamètre beaucoup plus petit (18 cm).

### 2.3.3 Densité du bois

Ce paramètre qualitatif du bois a été évalué pour 16 arbres prélevés à chaque saison à Gimel (4 arbres par génotype, 2 rayons analysés par arbre) par microdensitométrie aux rayons X. A épaisseur constante, l'absorption des rayonnements X se fait selon une loi exponentielle en fonction de la densité de l'échantillon traversé. Sous certaines conditions d'intensité, le noircissement du cliché radiographique est proportionnel à l'exposition, ce qui permet d'obtenir une relation linéaire entre la densité du bois et la densité optique de la radiographie (Polge, 1964). Une planchette de bois, la radiographie et le profil densitométrique correspondants sont donnés pour exemple dans la figure 27.



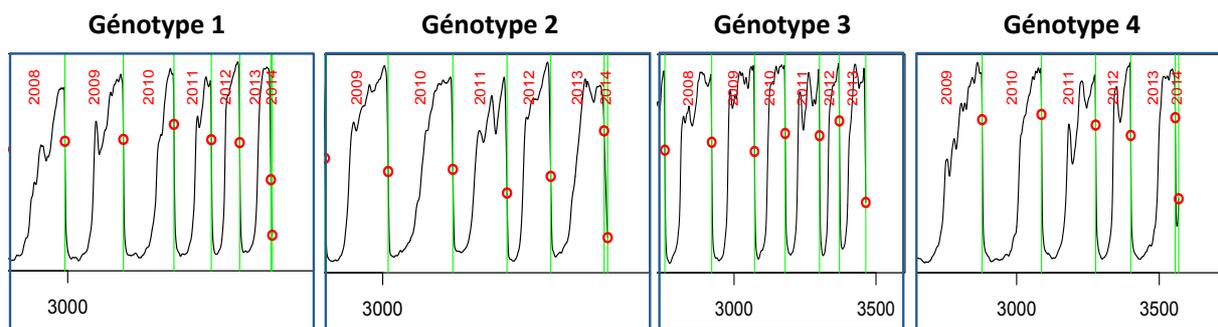
**Figure 27 : A : Planchette de bois de douglas (génotype 4, prélèvement d'hiver) ; B : Radiographie correspondante ; C : Profil densitométrique correspondant avec délimitation des cernes annuels. En pointillés rouge: délimitation du duramen et de l'aubier.**



**Figure 28 : Profil densitométrique du bois de douglas. Délimitation des cernes annuels (trait vertical plein) et du bois initial et du bois final de chaque cerne annuel (trait vertical pointillé) (génotype 1, automne).**

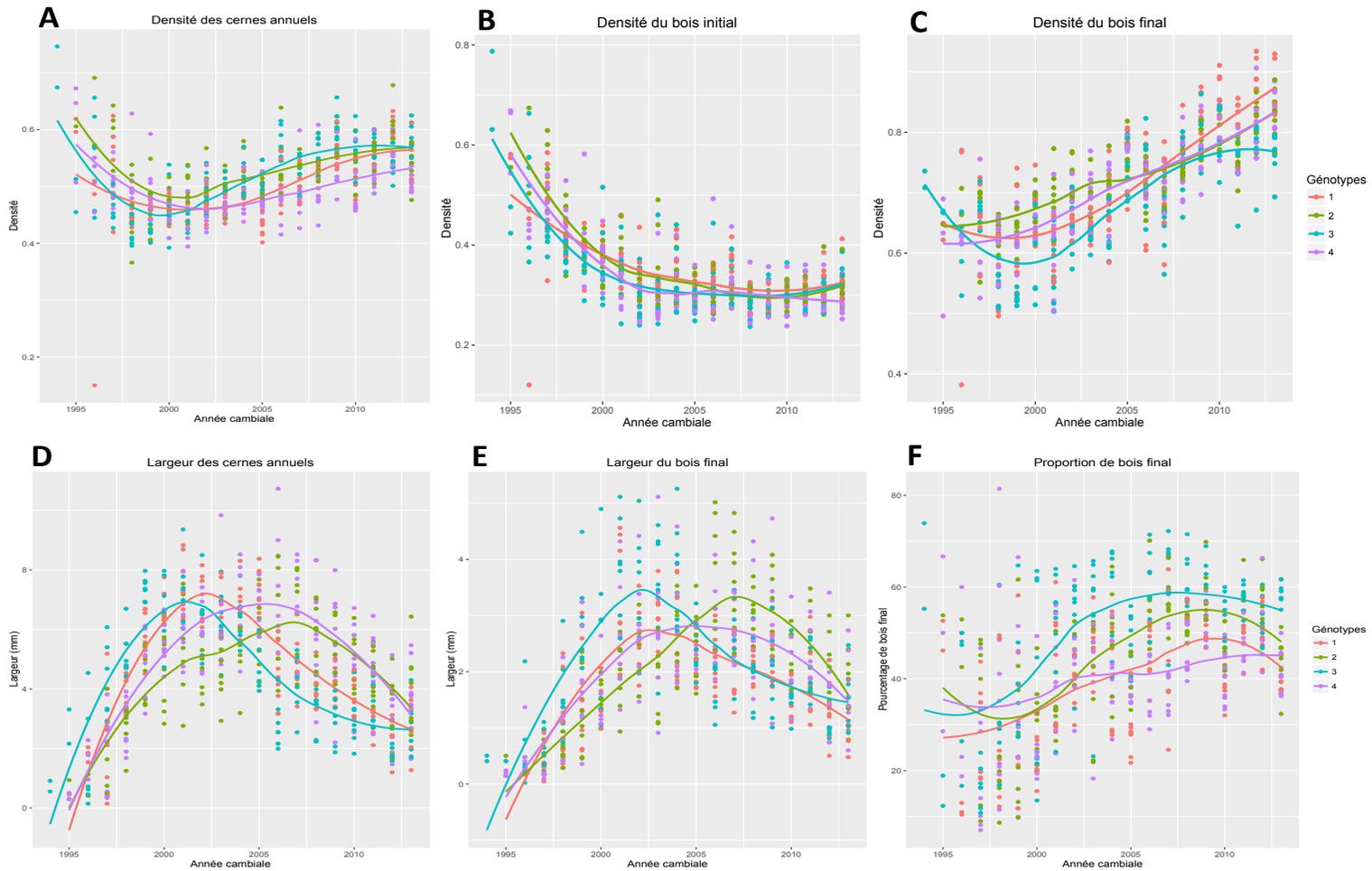
Les profils densitométriques montrent tous (exemple Figure 28) une différence de densité intra-cerne, correspondant à l'alternance entre le bois initial (de faible densité) et le bois final (de plus forte densité, les valeurs seront comparées par la suite). Pour tous les arbres étudiés, les 10 premiers cerne côté moelle présentent une transition progressive entre le bois initial et le bois final. Cette transition devient ensuite de plus en plus nette pour les cerne suivants. Comme montré pour exemple dans la figure 27, nous n'avons pas observé de changement au niveau du profil de densité entre le duramen et l'aubier, et ceci pour tous les génotypes.

Le suivi saisonnier des profils densitométriques permet de montrer une différence de célérité quant à la date de formation du bois initial entre les génotypes (Figure 29). Le prélèvement de printemps, réalisé le 17 avril 2014, présente un début de formation du bois initial du cerne d'aubier externe pour les arbres des génotypes 1, 2 et 4 (Figure 29). En revanche, les profils densitométriques correspondants aux 2 rayons de l'arbre du génotype 3 ne présentent pas de début de formation du cerne pour l'année 2014 (Figure 29).



**Figure 29 : Portion des profils de densitométrie obtenus à partir d'arbres prélevés au printemps appartenant aux 4 génotypes (échelle identique).**

A partir de tous les profils densitométriques obtenus (16 arbres, 2 rayons par arbre), nous avons déterminé la largeur et la densité moyenne des cerne ainsi que la largeur et la densité moyenne du bois initial et du bois final de chaque cerne (Figure 30).



**Figure 30 : A : Densité des cernes ; B : Densité du bois initial ; C : Densité du bois final ; D : Largeur des cernes ; E : Largeur du bois final ; F : Proportion de bois final (en terme de largeur). Pour chaque paramètre, les résultats sont exprimés en fonction de l'année cambiale pour chacun des 4 arbres des 4 génotypes (1 : 1039 ; 2 : 80 145 ; 3 : 80 189 ; 4 : 80 315) avec les courbes de tendance associées.**

La densité moyenne globale des cernes de bois varie majoritairement entre 0,4 et 0,6 (Figure 30A). Les courbes de tendances montrent pour tous les génotypes une diminution de la densité du bois d'un peu plus de 0,1 de la moelle aux 6<sup>ème</sup>-7<sup>ème</sup> cernes, puis une augmentation progressive jusqu'au cerne néoformé qui a une densité moyenne comprise entre 0,5 et 0,6. Les courbes de tendance sont comparables d'un génotype à l'autre, tout comme celles de la densité moyenne du bois initial (Figure 30B). Cette dernière varie entre 0,25 et 0,7. Elle est la plus élevée pour les cernes formés par un cambium jeune et décroît progressivement jusqu'à un âge cambial d'environ 10 ans (année cambiale 2005 environ) puis reste constante à une valeur moyenne de 0,3 jusqu'au cerne formé le plus récemment. Concernant la densité moyenne du bois final (Figure 30C), elle varie entre 0,5 et 0,95 et elle augmente progressivement avec l'âge cambial du bois, excepté pour les arbres du génotype 3 pour lesquelles on observe une diminution de la densité moyenne du bois final dans les premières années de croissance de l'arbre. Ce génotype est également celui qui présente en moyenne la plus faible densité de bois final sur la majorité de son bois.

La largeur des cernes de croissance augmente rapidement dans les premières années de croissance de l'arbre pour passer de moins d'1 mm à 7-8 mm de largeur en moyenne, puis elle décroît aux alentours de 3 mm pour les derniers cernes formés (Figure 30D). Cet accroissement se fait plus rapidement pour les génotypes 1 et 3 (sur les 8-9 premières années de croissance) et plus lentement pour les génotypes 2 et 4 pour lesquels la largeur maximale moyenne est atteinte entre 12 à 14 ans. La largeur moyenne du bois final des cernes suit la même tendance que la largeur moyenne totale des cernes (Figure 30E). Elle augmente de moins de 0,5 mm à environ 3 mm puis décroît aux alentours de 1,5 mm de moyenne pour les derniers cernes formés. En moyenne, les arbres des génotypes 2 et 3 atteignent des valeurs de largeur maximale de bois final supérieures aux arbres des génotypes 1 et 4 (3,5 mm de moyenne pour les premiers, et environ 2,75 mm pour les seconds). La proportion de bois final de chaque cerne pour chaque arbre a été déterminée en terme de largeur du bois final par rapport à la largeur du bois initial (Figure 30F). Nous avons constaté que la proportion du bois final augmente progressivement dans les 15-20 premières années de formation du bois de 30-40 % en moyenne à 45-60 %, puis décroît légèrement. La proportion moyenne de bois final est plus importante pour les arbres du génotype 3 (plus de 15 % en moyenne pour certains cernes comparés à ceux des arbres du génotype 4), elle est la plus faible pour les arbres des génotypes 1 et 4. Cependant, les variations entre les arbres d'un même génotype sont assez importantes au vu de la dispersion des points sur le graphe. Pour le cerne formé en 2004 pour

les arbres du génotype 3, une variation allant jusqu'à 30 % dans la proportion du bois final est observée. Dans le cas du génotype 3, la densité de son bois final est en moyenne légèrement inférieure à celle des autres génotypes, en revanche la proportion de bois final est supérieure, ce qui explique que la densité totale moyenne des cernes soit similaire voire légèrement supérieure à celle des autres génotypes.

Afin de comparer nos résultats avec la littérature, la moyenne a été calculée pour tous les paramètres à partir de la totalité des cernes (Tableau 11).

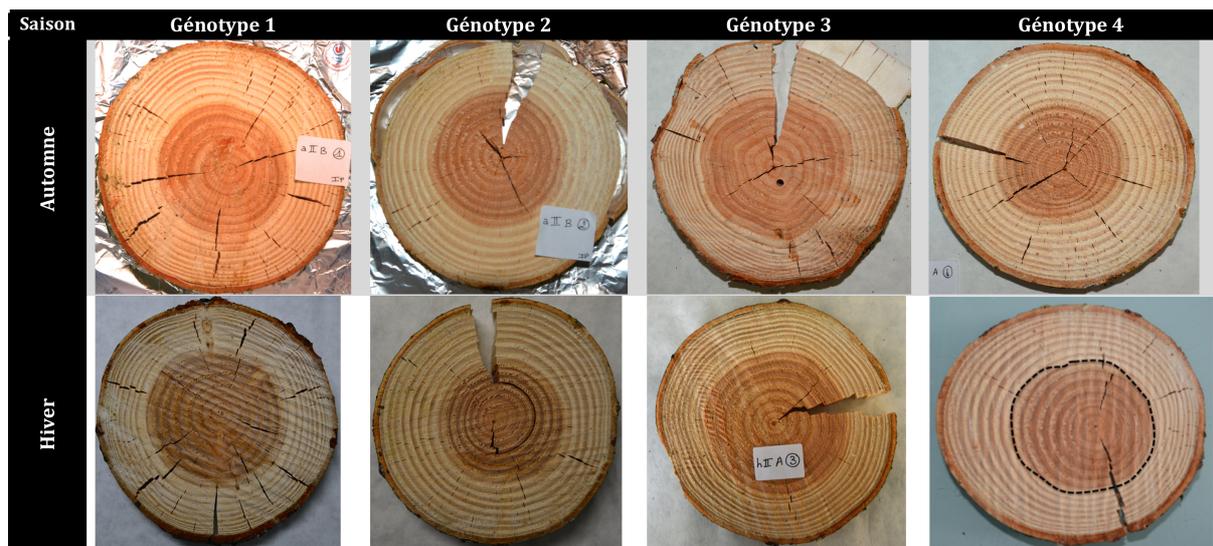
**Tableau 11 : Moyennes de la densité des cernes, de la densité du bois initial, de la densité du bois final, de la proportion de bois final et de la largeur des cernes pour les 16 douglas de Gimel.**

	Moyenne totale
Densité totale	0,51 ± 0,08
Densité bois initial	0,34 ± 0,09
Densité bois final	0,71 ± 0,06
Proportion bois final (%)	43,7 ± 14,5
Largeur cerne (mm)	4,76 ± 1,83

La densité moyenne globale des 16 à 20 premiers cernes des douglas étudiés est de 0,51, celle du bois initial de 0,34, du bois final de 0,71, leur proportion moyenne de bois final est de 43,7 % et la largeur des cernes moyenne de 4,76 mm.

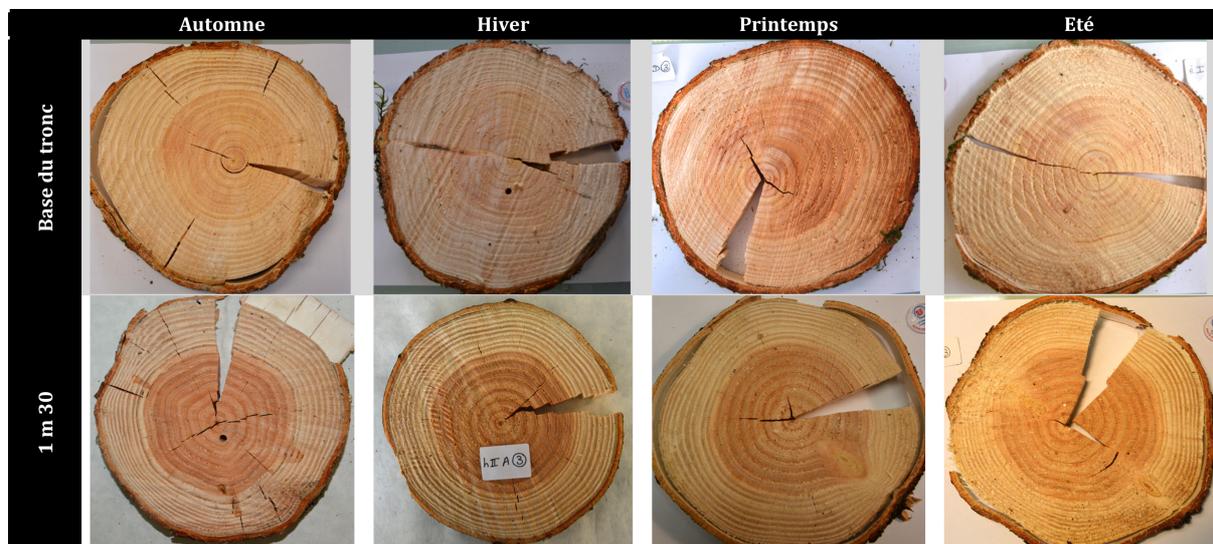
### 2.3.4 Duraminisation du bois

Dans le cadre de cette étude, la duraminisation du bois de douglas n'a été abordée qu'au travers de la variation de coloration du bois de cœur, le bois de duramen étant de couleur rouge, et celui d'aubier beige. Les photographies prises des rondelles de bois prélevées en automne et en hiver (Figure 31) montrent qu'à ces deux saisons, un seul cerne est en cours de transformation excepté lorsqu'il y a présence de bois de compression (cas de l'arbre du génotype 4 prélevé en hiver, cf pointillés noirs Figure 31 ; plusieurs cernes sont en cours de transformation du côté du bois de compression). De plus, il semblerait que la transformation ne se fasse pas de manière homogène sur tout le cerne mais débute à un endroit pour progressivement se propager à partir de cette zone au cerne complet.



**Figure 31 : Photographies des rondelles de bois lyophilisées qui ont été prélevées sur des arbres appartenant aux 4 génotypes en automne et en hiver à 1,3 m de hauteur.**

Bien que la coloration du bois n'ait été appréciée que visuellement, nous avons observé pour tous les arbres que le duramen était de couleur plus claire à la base du tronc qu'à une hauteur de 1,3 m du collet, comme ceci est montré pour les arbres du génotype 3 (Figure 32).



**Figure 32 : Photographies des rondelles de bois lyophilisées qui ont été prélevées sur des arbres appartenant au génotype 3 à la base et à 1,3 m à chaque saison.**

Pour chacun des arbres prélevés appartenant aux 4 génotypes, nous avons déterminé, pour une rondelle prélevée à la base du tronc et une à 1,3 m de hauteur, les paramètres suivants : nombre de cernes total, nombre de cernes de duramen (incluant le cerne de TZ lorsqu'il était

transformé en duramen à plus de la moitié), nombre de cernes d'aubier (incluant le cerne de TZ lorsqu'il était transformé à moins de la moitié), proportion de cernes de duramen par rapport au nombre total de cernes, la moyenne et l'écart-type de cette proportion pour chaque génotype (Tableau 12).

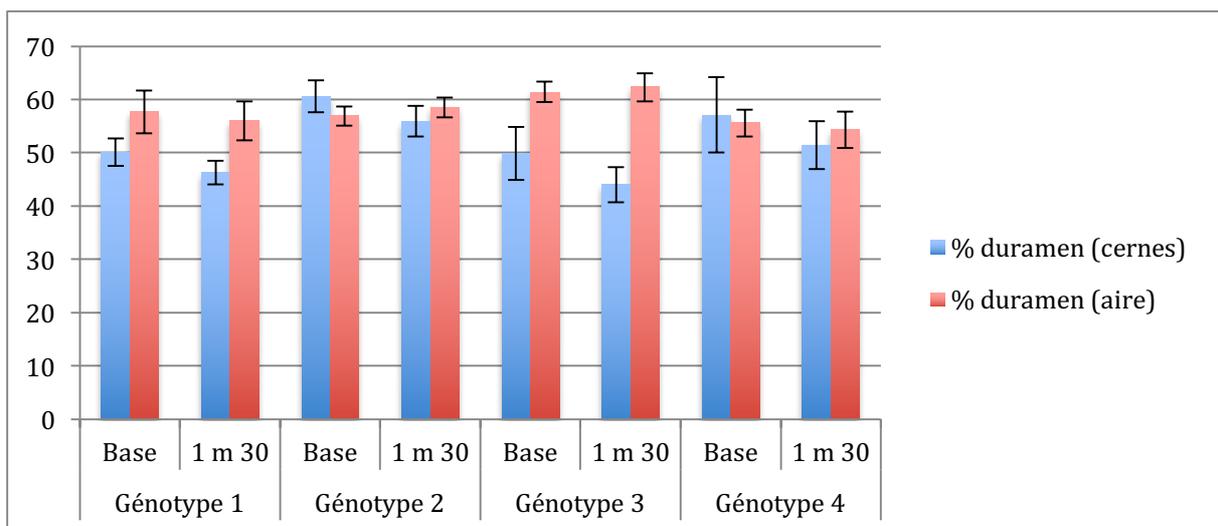
**Tableau 12 : Caractéristiques des rondelles de bois des 4 génotypes prélevées à Gimel.**

			Diamètre (cm)	Nb cernes totales	Nb cernes duramen	Nb cernes aubier	% duramen (cernes)	Moyenne % duramen (cernes)
Génotype 1	Automne	Base		19	10	9	52,6	48,2 ± 3,4
		1,3 m	18,8	16	7	9	43,8	
	Hiver	Base		20	10	10	50,0	
		1,3 m	18,8	17	8	9	47,1	
	Printemps	Base		19	10	9	52,6	
		1,3 m	22	16	8	8	50,0	
	Eté	Base		20	9	11	45,0	
		1,3 m	21	18	8	10	44,4	
Génotype 2	Automne	Base		18	12	6	66,7	58,3 ± 4,5
		1,3 m	17,8	16	9	7	56,3	
	Hiver	Base		19	11	8	57,9	
		1,3 m	15,9	16	8	8	50,0	
	Printemps	Base		19	11	8	57,9	
		1,3 m	18,5	16	9	7	56,3	
	Eté	Base		20	12	8	60,0	
		1,3 m	24,5	18	11	7	61,1	
Génotype 3	Automne	Base		19	10	9	52,6	46,9 ± 5,7
		1,3 m	18,1	17	8	9	47,1	
	Hiver	Base		21	12	9	57,1	
		1,3 m	18,8	17	8	9	47,1	
	Printemps	Base		19	8	11	42,1	
		1,3 m	19,1	16	6	10	37,5	
	Eté	Base		21	10	11	47,6	
		1,3 m	21,2	18	8	10	44,4	
Génotype 4	Automne	Base		19	9	10	47,4	54,3 ± 6,9
		1,3 m	18,8	15	7	8	46,7	
	Hiver	Base		19	10	9	52,6	
		1,3 m	19,1	17	8	9	47,1	
	Printemps	Base		18	12	6	66,7	
		1,3 m	22,3	16	9	7	56,3	
	Eté	Base		21	13	8	61,9	
		1,3 m	23	18	10	8	55,6	

La proportion de cernes de duramen par rapport au nombre total de cernes varie d'un arbre à l'autre au sein d'un même génotype et plus encore entre arbres appartenant à des génotypes différents (de 37,5 à 61,1 %) (Tableau 12). Le génotype 2 a 10 % de plus de duramen que le génotype 3 qui présente, dans le cadre de notre étude, la proportion la plus faible de bois duraminisé. On note une certaine variabilité entre arbres d'un même génotype (au regard des écart-types des moyennes). Pour les génotypes 1 et 3, la proportion de cernes de duramen ne semble pas être influencée par la taille de l'arbre (diamètre). Tandis que pour les génotypes 2

et 4, plus le diamètre à 1,3 m est important, plus l'arbre a un nombre de cernes de duramen important. Les proportions en terme de surface de duramen sont, quant à elles, plus homogènes entre les arbres de génotypes différents. Les arbres du génotype 3 sont ceux qui présentent en moyenne le moins de cernes de duramen alors que la surface de duramen est supérieure comparée aux autres génotypes.

Ces tendances seraient bien sûr à confirmer par des analyses sur un nombre beaucoup plus important d'individus.



**Figure 33 : Proportion de duramen en fonction du génotype et de la hauteur dans le tronc.**

En comparant les proportions de duramen à la base et à 1,3 m (Figure 33), des variations sont visibles dans le nombre de cernes alors que la surface reste relativement stable quelque soit la hauteur dans le tronc et le génotype. Là encore, la surface moyenne de duramen semble plus importante pour le génotype 3 que pour les autres génotypes.

Nous avons également observé visuellement la formation du duramen à partir de carottes prélevées mensuellement sur les 10 douglas d'une vingtaine d'années de Saint-Gence. Les prélèvements des carottes ont débuté au mois de janvier 2015 (temps  $T_0$ ). Pour cette première série de prélèvements, les 10 arbres ont été carottés afin d'établir une référence pour chacun. Tous les mois, ce sont ensuite deux carottages qui ont été réalisés en rotation sur les 10 arbres afin de limiter le nombre de carottages total à 4 par arbre (dans l'optique de limiter l'impact sur le fonctionnement physiologie de l'arbre). A partir de ces carottes, nous avons ensuite déterminé le cerne de TZ de par sa couleur et son aspect en terme d'humidité (visuellement, un cerne de TZ rouge et non sec comme les cernes de duramen, paraît plus foncé que le

duramen). L'évolution de la formation du duramen par l'étude de l'aspect du bois du cerne de TZ est présentée dans le tableau 13.

**Tableau 13 : Représentation schématique de l'aspect et de la position (numéro de cerne) de la zone de transition des carottes de bois de douglas prélevées mensuellement à Saint-Gence en fonction du mois de prélèvement (les cernes sont numérotés à partir du cœur du duramen).**

Arbre	2015												2016		
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	04
1	● ● 10	● ● 10					● ● 11					● ● 11 ● ● 12			
2	● ● 11		● ● 11					○ ○ 13					● ● 12		
3	● ● 11 ● ● 10			/					○ ○ 12 ○ ○ 11					● ● 11 ● ● 10	
4	● ● 10 ● ● 9				● ○ 10					● ○ 10					● ○ 11 ○ ○ 10
5	● ● 11 ● ● 10					○ ○ 12 ○ ○ 11					● ● 12 ● ● 11				● ○ 12 ○ ○ 12
6	● ● 11 ● ● 11	● ● 11					○ ● 12 ● ● 11					● ● 12 ● ● 12			
7	● ● 11 ● ● 10		● ● 11 ● ● 10					○ ○ 11					○ ○ 11 ○ ○ 12		
8	○ ○ 12 ○ ○ 11			○ ○ 12 ○ ○ 11					○ ○ 12 ○ ○ 11					○ ○ 12 ○ ○ 11	
9	● ● 8 ● ● 8				● ○ 8 ○ ○ 9					● ● 8 ● ● 9					● ● 9 ● ● 10
10	● ● 10 ● ● 10					○ ○ 11					● ● 11 ● ● 11				● ● 11 ● ● 11

- Rouge/humide
- Blanc/humide
- Pourri

Il est nécessaire de signaler dans un premier temps que l'arbre 8 est mort avant le début des prélèvements. Les carottages ont néanmoins été réalisés sur cet arbre afin de visualiser si l'aubier continuait encore à se transformer en duramen après la mort de l'arbre. Les 4 prélèvements effectués sur cet arbre montrent que ce n'est pas le cas, aucune transformation de la TZ n'est observée entre le prélèvement de janvier 2015 et celui de février 2016. De plus, le bois d'aubier de cet arbre a commencé à pourrir sur une zone. Les résultats obtenus à partir de l'arbre 8 ne seront pas pris en compte pour la suite de l'analyse.

La carotte prélevée sur l'arbre 3 en avril 2015 n'a pu être analysée car le bois était déchiqueté et de couleur noire, il a donc été impossible de visualiser la TZ.

Les carottages ont débuté en hiver. De janvier à mars 2015, toutes les carottes présentent un cerne de TZ rouge d'aspect humide, cerne qui est par conséquent en cours de transformation

en duramen. A partir du mois de mai 2015, les deux carottes prélevées ont une TZ d'aspect rouge humide d'un côté et de l'autre le cerne qui était en cours d'évolution au moins de janvier a terminé sa transformation en duramen et présente un aspect sec. Dans ce cas, la TZ passe au cerne d'aubier suivant, d'aspect beige humide. De juin à septembre 2015, les carottes présentent un cerne de TZ beige humide, excepté pour l'arbre 1 où la TZ est encore en évolution des 2 côtés et l'arbre 6 où elle ne l'est que d'un côté. D'octobre 2015 à février 2016, excepté pour l'arbre 7, les TZ de tous les autres arbres sont d'aspect rouge humide, signe de leur transformation en duramen. Le prélèvement de mars 2016 n'ayant pu être réalisé, 4 arbres ont été carottés en avril 2016. Pour deux de ces arbres, un côté de la TZ a terminé sa transformation en duramen et se décale donc au cerne d'aubier suivant.

Nous pouvons conclure de ces observations visuelles que, d'une manière générale, le cerne de TZ évolue en duramen (accumulation d'extractibles puis dessiccation) entre le début de l'automne (octobre) et le printemps (avril-mai). Cependant, comme le montrent les prélèvements de juillet sur les arbres 1 et 6, cette transformation n'est soit pas toujours terminée avant l'été ou soit peut débuter avant l'automne (nous avons également observé ce phénomène au moment de l'abattage de certains arbres de Gimel en été, cf Figure 32 génotype 3, été, 1,3 m). Il y aurait alors dans le second cas, la possibilité que plusieurs cernes d'aubier évoluent en duramen sur une année.

Dans certains cas, des décalages anormaux de la position du cerne de TZ ont été remarqués. C'est le cas pour l'arbre 2 pour lequel le cerne de TZ est le 11<sup>ème</sup> cerne en partant du duramen en janvier et mars, il passe en 13<sup>ème</sup> position en août pour revenir en 12<sup>ème</sup> position en janvier de l'année suivante. Ces décalages peuvent provenir, comme nous l'avons vu précédemment de la présence de bois de compression en certaines zones du tronc, mais il est aussi possible qu'ils proviennent de la variation de la hauteur à laquelle les carottages ont été réalisés. En effet, pour certains arbres, du fait de la présence de nœuds sur le tronc à hauteur de prélèvement, des décalages de hauteur de carottage allant jusqu'à une trentaine de cm sur un même arbre ont pu se produire, entraînant ainsi des variations dans le nombre total de cerne.

Le nombre de cernes de duramen varie entre les 10 arbres de 7 à 12. La proportion de cernes de duramen par rapport au nombre total de cernes est relativement constante pour tous les arbres (entre 50 et 55 %) excepté pour l'arbre 9 où elle est légèrement inférieure (45 %) (Tableau 14). La proportion de duramen en terme de surface est de l'ordre de 63 à 70 %. Ces résultats ne sont que très légèrement supérieurs à ceux obtenus pour les arbres de Gimel du génotype 3.

**Tableau 14 : Proportions de duramen pour chacun des 10 arbres carottés à Saint-Gence.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proportion duramen (% cernes)	53,6	55,5	55,0	51,3	53,1	55,5	52,5	55,3	44,8	52,6
Proportion duramen (% aire)	64,9	65,7	63,3	64,7	69,0	68,4	69,7	70,4	69,3	64,7

## 2.4 Discussion

Le programme de sélection du douglas en France a débuté par l'évaluation de graines issues de l'aire naturelle Nord-Américaine et testées dans de nombreux sites à partir des années 50. Les résultats des dispositifs expérimentaux ont montré que les provenances les plus intéressantes étaient originaires de l'ouest de l'état de Washington et du nord-ouest de l'Oregon à basse altitude (< 500 m). Entre 1978 et 1990, ce sont au total 1500 clones qui ont été pré-sélectionnés sur la base des résultats des tests de provenance et de descendance. Ce matériel a ensuite permis la plantation des 8 vergers à graines français et fait encore l'objet d'évaluation sur de nombreux sites disséminés en France (Bastien et al., 2013). Les douglas plantés à Gimel et Saint-Gence proviennent de la multiplication par bouturage de certains de ces clones.

Dans le cas des arbres forestiers, les programmes de sélection visent en premier lieu à accroître leur productivité tout en maintenant leur adaptabilité. La valeur des arbres est ainsi généralement améliorée en sélectionnant les génotypes les plus performants dans des populations bien adaptées à la zone de plantation. La valeur des arbres est tout d'abord déterminée par le volume du tronc et dans un second temps par la qualité du bois (densité, proportion de duramen...). Les premiers efforts de sélection chez le douglas, comme chez les autres essences, ont donc porté sur l'augmentation du volume de bois par la sélection d'arbres à plus forte croissance. Une meilleure croissance permet ainsi soit d'augmenter les rendements lors de la récolte soit de réaliser des rotations de plantations plus rapidement. Dans les programmes d'amélioration, la qualité du bois a été un critère secondaire de sélection car son impact sur la valeur de l'arbre est moindre (moins facilement quantifiable) que le volume du tronc. La propriété du bois qui a reçu jusqu'à maintenant le plus d'attention est sa densité car elle est associée à sa rigidité et à sa résistance mécanique qui conditionnent la valorisation du bois. L'amélioration génétique associée à la qualité du bois est, de ce fait, souvent réalisée dans un second temps à partir d'une population sélectionnée initialement

pour ses propriétés de croissance (Howe et al., 2006). Pour des essences comme le douglas qui présentent un duramen avec une durabilité naturelle élevée, les programmes de sélection commencent à s'intéresser au critère « duramen » (proportion, durabilité) (Pâques and Charpentier, 2015). C'est également dans cet objectif que nous avons étudié le phénotype duramen de différentes populations clonales à partir de rondelles et de carottes de bois de douglas. Après avoir génotypé les arbres, nous avons également caractérisé la densité du bois des douglas prélevés à Gimel afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la qualité du bois en fonction des génotypes et observer d'éventuelles variations de densité avec la formation du duramen.

#### **2.4.1 Analyses du patrimoine génétique des douglas**

Nous avons commencé par vérifier que le patrimoine génétique des douglas étudiés était identique entre arbres d'une même population clonale et différent entre arbres de populations distinctes. Pour des raisons de coût, le génotypage a été réalisé à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires et non des marqueurs SNP, pourtant plus fiables pour ce type d'analyse. Ces analyses ont été réalisées à partir des douglas prélevés à Gimel et des douglas carottés à Saint-Gence. Les microsatellites utilisés ont été identifiés par Slavov et al. (2004). Ces derniers ont mis en évidence, chez le douglas, 22 marqueurs microsatellites très polymorphes à partir de 5 banques d'ADN génomique. Parmi ces 22 marqueurs, 15 d'entre eux (présents sur un seul locus) ont été jugés suffisants pour discriminer les arbres et suivre dans des vergers à graines la filiation des descendants. Pour effectuer le génotypage des douglas de notre étude, 11 de ces 15 marqueurs ont été utilisés, la majorité d'entre eux étant constituée d'un enchaînement discontinu de dinucléotide. Grâce à ces marqueurs microsatellites, nous avons confirmé que les arbres supposés appartenir à un même génotype avaient bien le même patrimoine génétique et que des différences au niveau de certains locus étaient observées entre arbres de génotypes différents. Nous avons cependant constaté, pour l'un des génotypes à un locus étudié, un début de divergence pour quelques arbres (ajout ou suppression d'un motif dinucléotidique dans la séquence du microsatellite). Une étude *via* des marqueurs SNP pourrait permettre d'affiner ces résultats et d'observer si d'autres loci sont concernés par des divergences génétiques au sein d'une même population clonale.

## **2.4.2 Analyses qualitatives du bois**

### **2.4.2.1 Densité et caractéristiques des cernes du bois**

En climat tempéré, la croissance des arbres est rythmée par les saisons : chaque année, un nouveau cerne de croissance se forme. La densité d'un cerne correspond à la proportion de parois et de lumen dans un certain volume de bois. Elle est par conséquent influencée par plusieurs caractéristiques du bois telles que l'épaisseur des parois, le diamètre des cellules ou encore par les quantités relatives de bois initial et de bois final (Fabris, 2000). La microdensitométrie (étude de la variation de la densité à petite échelle) permet à la fois d'apporter des connaissances sur les propriétés physiques du bois mais également sur le fonctionnement de l'arbre année après année (Millier et al., 2006). Nous avons étudié la microdensité des arbres appartenant aux 4 géotypes prélevés à Gimel.

#### **2.4.2.1.1 Densité totale des cernes**

Nous avons constaté que la densité globale moyenne des cernes diminue de la moelle aux 6-7 premiers cernes pour ensuite augmenter de 0,45-0,5 à environ 0,55 jusqu'au dernier cerne formé. En étudiant des douglas de plusieurs provenances répartis sur plusieurs sites en Nouvelle-Zélande, Lausberg et al. (1995) ont montré que la densité des cernes est la plus faible au niveau des 5 premiers cernes côté moelle (0,39) puis elle augmente jusqu'à l'écorce (0,45 pour les cernes entre 26 et 35 ans). La tendance que nous observons est donc différente de celle observée par ces auteurs pour les premiers cernes de croissance. En revanche, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Jozsa et Middleton (1994) et Harris (1978). Ce dernier a observé chez le douglas une diminution de la densité sur les 5 premiers cernes formés puis une augmentation progressive (d'environ 0,4 au niveau de la moelle, la densité augmente jusqu'à 0,52 dans l'aubier externe de douglas de 40 ans). Les résultats de Jozsa et Middleton (1994) ont montré que la densité des cernes au niveau de la moelle était de 0,47, puis cette valeur diminue jusqu'à 0,4 au dixième cerne pour de nouveau augmenter jusqu'à une valeur stable (0,53) aux alentours du trentième cerne. En tenant compte de l'âge des arbres et comparé aux valeurs de densité de cernes que tous ces auteurs ont obtenus, nos résultats montrent que le bois des douglas de Gimel présente une densité moyenne des cernes plus élevée. A un âge cambial donné, la densité du bois de douglas peut être affectée par le site de plantation (Gartner et al., 2002). Mais ce paramètre présente aussi un fort contrôle génétique (Wellwood and Smith, 1962) et des différences significatives ont déjà été observées entre plusieurs familles de douglas (Vargas-Hernandez and Adams, 1992). Chez le douglas,

l'accélération de la croissance en diamètre des arbres par des pratiques sylvicoles adaptées (espacement lors de la plantation, éclaircies, apport d'engrais...) ont peu d'impact sur la densité globale des cernes de croissance (Fabris, 2000; Jozsa et al., 1989). La variabilité observée de la moelle à l'écorce est principalement due à l'âge cambial (Fabris, 2000).

#### **2.4.2.1.2 Densité du bois initial et du bois final**

Concernant la densité du bois initial des douglas de Gimel, nous avons constaté qu'elle était la plus élevée au niveau de la moelle et qu'elle diminuait progressivement dans les 10 premières années de croissance de l'arbre pour se stabiliser pour tous les génotypes à une densité moyenne de 0,3 jusqu'au dernier cerne formé. Ce constat a également été fait par Fabris (2000) qui a également montré que le statut de l'arbre n'influe pas sur ce paramètre. Nous avons observé que la densité du bois final des arbres de Gimel augmentait progressivement de 0,6-0,65 à 0,75-0,85 en moyenne de la moelle à l'écorce. Les résultats obtenus par Fabris (2000) ont montré une tendance similaire, c'est à dire une augmentation de la densité du bois final de la moelle (0,5-0,6) au dixième cerne (0,7), pour ensuite osciller entre 0,7 et 0,75.

#### **2.4.2.1.3 Largeur intra et inter-cernes**

Concernant la largeur du bois final, nous avons observé une augmentation de la moelle vers les 6-7 premiers cernes puis une diminution jusqu'à environ 3 mm pour le dernier cerne de croissance étudié. Les douglas étudiés par Fabris (2000) ont montré une augmentation de la largeur du bois final des cernes jusqu'à 9-10 ans (maximum 2,5 mm) puis une diminution jusqu'à 1-1,5 mm à 25 ans, et pour finir une stagnation de cette valeur. Cet auteur a observé que la largeur du bois final variait avec le statut de l'arbre : elle est d'autant plus importante que l'arbre est dominant. Il a également montré une forte dépendance entre la largeur du bois final et la largeur totale du cerne pour les cernes au delà de 14 ans. Tout comme la largeur du bois final, la largeur totale des cernes est sujette à une augmentation jusqu'à 7-11 ans suivant les génotypes, puis à une diminution. Ce constat a également été fait par Fabris (2000) qui observe après la diminution, une stabilisation des valeurs de largeur de cernes.

#### **2.4.2.1.4 Proportion de bois final**

Les courbes de tendance de la densité du bois final montrent, pour tous les génotypes, une augmentation progressive de la proportion du bois final de la moelle (30-35 %) à l'écorce (40-55 %). Fabris (2000) a observé la même tendance pour des douglas de 50 ans prélevés en Colombie Britannique : la proportion de bois final augmente progressivement de 20 % au

niveau de la moelle à 40-50 % au 20<sup>ème</sup> cerne de bois pour ensuite rester stable. Les paramètres de croissance qui affectent la proportion de bois final sont influencés à la fois par des facteurs environnementaux et génétiques. Pour une année donnée, certains arbres commencent à produire du bois final tôt dans la saison de végétation, tandis que d'autres vont commencer plus tard, toutes choses étant égales par ailleurs, ces derniers vont donc présenter une densité de cerne plus faible que les premiers. Certains arbres produisent également du bois final jusque tard dans la période de croissance et présenteront donc une densité plus importante (Zobel and Buijtenen, 2012). Chez le douglas, il a été suggéré que la proportion de bois final était plus largement affectée par l'environnement que les autres paramètres liés à la densité du bois (Vargas-Hernandez and Adams, 1992). Par exemple, les arbres qui poussent plus doucement (arbres dominés, conditions climatiques ou de sylviculture...) produisent proportionnellement plus de bois final (Grotta et al., 2005). Plusieurs facteurs ont été cités pour induire la transition entre le bois initial et le bois final. La régulation du diamètre des cellules serait hormonale et probablement médiée par l'auxine produite par les bourgeons et les branches en croissance (Larson, 1962). En effet, une production importante d'auxine dans le méristème apical entraîne la formation de cellules à parois fines et de large diamètre. Un arrêt de la croissance des parties aériennes conduit à une diminution drastique de la production d'auxine, ce qui initie la production de bois final. D'autres facteurs tels que la nutrition, la longueur du jour et la disponibilité en eau influenceraient aussi la transition entre bois initial et bois final (Zobel and Buijtenen, 2012). Une étude a montré que la formation de bois final débutait de début juin à fin août (en moyenne mi-juillet) en fonction des arbres et de la sylviculture menée (Grotta et al., 2005).

Nous avons constaté des tendances différentes entre certains géotypes pour la proportion de bois final, la densité du bois final et la largeur totale des cernes et celle du bois final. Cependant les analyses n'ont été menées que sur 4 arbres par géotype, un plus grand échantillonnage serait nécessaire pour déterminer si ces tendances sont significativement différentes.

#### **2.4.2.1.5 Bois juvénile vs bois mature**

Suite à l'étude des profils densitométriques des douglas de Gimel, nous avons observé une transition progressive entre le bois initial et le bois final pour les dix premières années de croissance des arbres. Cette transition devient ensuite de plus en plus tranchée les 5 à 10 cernes suivants. En parallèle de l'augmentation de la densité globale des cernes de la moelle vers l'écorce, nous observons également une augmentation de la proportion de bois final. Ces

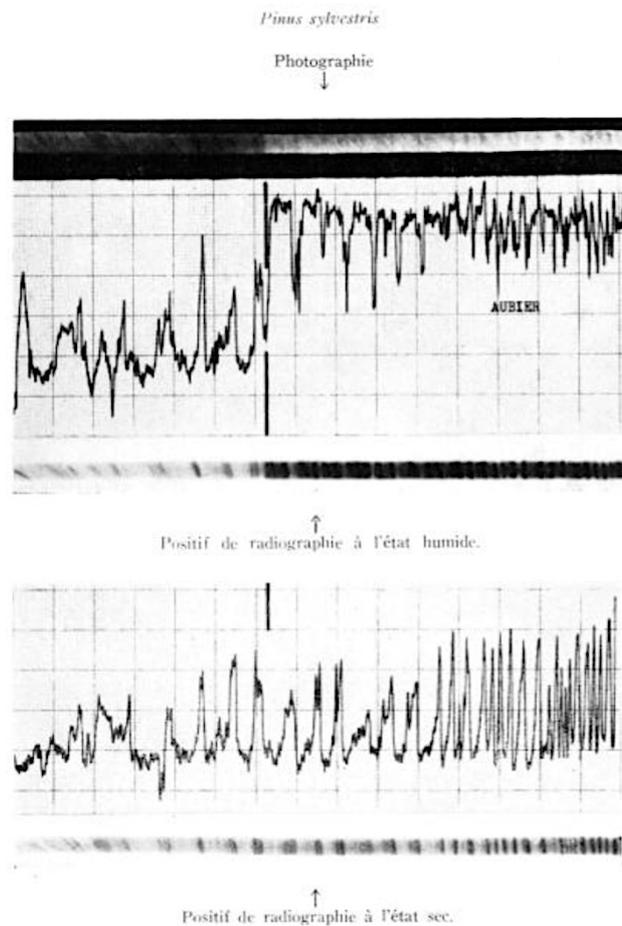
caractéristiques montrent l'évolution du bois, d'un bois juvénile de plus faible densité avec un pourcentage plus faible de bois final à un bois mature. Le bois juvénile correspond à la zone de bois la plus proche de la moelle dans lequel les caractéristiques du bois présentent des changements rapides et progressifs vers les cernes périphériques (Larson et al., 2001). La transition progressive entre bois juvénile et bois mature chez le douglas intervient en général entre 10 et 26 ans (Peterson et al., 2007). Le bois juvénile est présent de la base du tronc à l'extrémité du houppier. Sa proportion relative est fonction de l'essence, de l'âge cambial et de la hauteur dans le tronc. Le point de transition entre le bois juvénile et le bois mature varie en fonction des individus (Fabris, 2000), de la variabilité génétique (Abdel-Gadir and Krahmer, 1993; Vargas-Hernandez and Adams, 1992) et de la hauteur dans le tronc (Fabris, 2000). Le bois juvénile est caractérisé par une variabilité de ses propriétés tandis que le bois mature est plus uniforme. Comparé au bois mature, le bois juvénile présente, outre sa plus faible densité et sa plus faible proportion en bois final, un plus grand angle des microfibrilles de cellulose, des trachéides plus courtes avec des parois moins épaisses, des contenus plus faibles en cellulose et plus forts en lignine (Burdon et al., 2004; Zobel and Buijtenen, 2012; Zobel and Sprague, 1998). Le bois juvénile présente donc des qualités moins intéressantes que le bois mature pour la valorisation du matériau. La sylviculture actuelle du douglas tend à faire diminuer les cycles de production afin d'augmenter les bénéfices dans le temps. Cependant ceci entraîne la production d'un bois plus jeune avec donc une proportion plus importante de bois juvénile (Vikram, 2008).

Pour des douglas de 50 ans de l'Ile de Vancouver à 1,3 m de hauteur à partir du collet, Jozsa et al. (1989) ont estimé que la densité moyenne du bois juvénile (les 20 premiers cernes) était de 0,46, la densité du bois initial de 0,29 celle du bois final de 0,88, que la largeur moyenne des cernes était de 5,8 mm et que la proportion du bois final était de 30 %. Et pour le bois mature, la densité moyenne totale du cerne est de 0,53, celle du bois initial de 0,28, celle du bois final de 0,95, la largeur moyenne des cernes est de 3,2 mm et la proportion de bois final de 43 %. Concernant les douglas de Gimel, la densité moyenne globale des 16 à 20 premiers cernes des douglas étudiés est de 0,51, celle du bois initial de 0,34, celle du bois final de 0,71, la proportion moyenne de bois final est de 44 % et la largeur moyenne des cernes de 4,76 mm. Nous constatons que la densité du bois final est inférieure et celle du bois initiale supérieure aux données collectées par Jozsa et al. (1989). En revanche la densité moyenne du bois juvénile que nous avons obtenue est supérieure, probablement dû à une proportion plus

importante de bois final que ce qui a été trouvé sur les arbres de Vancouver (pour ce paramètre, nos valeurs sont comparables au bois final mature).

#### **2.4.2.1.6 Duramen vs aubier**

Aucune différence de tendance au niveau de la zone de transition aubier-duramen (TZ) n'a été visualisée à partir des profils densitométriques des douglas de Gimel, tous génotypes confondus. Ceci a déjà été montré pour plusieurs essences résineuses. Chez l'épicéa, le mélèze et le pin sylvestre, la différence de densité à l'état sec entre le duramen et l'aubier est généralement faible puisqu'elle n'atteint pas 10 %, ce qui est inférieur aux différences de densités d'un accroissement annuel (environ 30 %). Par conséquent, cette différence de densité entre duramen et aubier pour ces essences n'est pas suffisante pour permettre une délimitation avec cette technique (Polge, 1964). Cependant, cette délimitation est possible à partir de profils densitométriques relevés à l'état frais. En effet, les variations de teneur en eau entre duramen et aubier sont très importantes pour la plupart des essences résineuses, ce qui se traduit par des variations considérables de densité à l'état frais entre ces deux tissus (Figure 34) (Polge, 1964).



**Figure 34 : Radiographies et profils densitométriques de planchettes de bois de pin sylvestre à l'état humide et à l'état sec (Polge, 1964).**

#### 2.4.2.1.7 Phénologie cambiale

L'étude des profils densitométriques nous a également permis de remarquer des différences dans la période de début de formation du bois en fonction des génotypes. Les prélèvements du printemps se sont déroulés le 17 Avril 2015. A cette date, nous avons observé un début de formation du bois initial du cerne en cours de formation pour les génotypes 1, 2 et 4. Pour le génotype 3, ce début de formation n'est pas encore visible sur le profil densitométrique. Dans le nord des Etats-Unis (Oregon), Li et Adams (1994) ont montré que la date moyenne d'initiation de l'augmentation du diamètre était le 14 Avril (soit 23 jours avant la date de débourrement) avec une variation moyenne de 8,6 jours en moyenne entre plusieurs familles de douglas. Suivant les études, le début de croissance du cerne de l'année chez le douglas intervient de mi-avril (Brix and Mitchell, 1980; Emmingham, 1977; Li and Adams, 1994) à mi-mai (Grotta et al., 2005). La fin de croissance du cerne se produit en général en septembre (Grotta et al., 2005), mais peut intervenir plus tôt dans la saison en cas de sécheresse en été (Li and Adams, 1994). Bien que les périodes de début et de fin de croissance soient sous forte

influence génétique chez le douglas (Li and Adams, 1994), elles sont donc aussi influencées par l'environnement. En plus des conditions climatiques, le statut de l'arbre peut moduler ces paramètres. Les petits douglas dominés ont une durée plus courte d'activité cambiale que les dominants (Grotta et al., 2005). Il a été suggéré que les arbres avec des houppiers plus vigoureux avaient une disponibilité plus importante d'auxine, ce qui augmentait la production cambiale (Larson, 1962), tandis que l'initiation de la croissance cambiale était retardée chez les arbres dominés du fait d'une déficience en auxine associée à des houppiers de petite taille (Kozlowski and Peterson, 1962).

#### **2.4.2.2 Coloration du bois**

Nous nous sommes servi de la différence de coloration entre l'aubier et le bois de cœur pour étudier le phénotype duramen. Lors de la transformation de l'aubier en duramen, les cellules parenchymateuses au niveau de la TZ meurent après une intense activité métabolique qui conduit entre autre à l'accumulation de métabolites spécialisés (Kampe and Magel, 2013). Contrairement aux constituants structuraux, les métabolites spécialisés sont d'une grande diversité dans le bois. Cette diversité est à l'origine des différences de durabilité, d'odeur ou encore de couleur observées entre les essences. Les variations de la coloration des bois sont liées principalement à la nature des extractibles polyphénoliques. Chez le douglas, l'aubier contient 0,5 à 1 % (m/m) de composés polyphénoliques, ces teneurs passent à 2 à 3 % (m/m) dans le duramen. Plusieurs de ces composés appartenant à la famille des flavonoïdes ont été mis en évidence. Le duramen de douglas contient des teneurs exceptionnelles en dihydroquercétine, appelée aussi taxifoline (2 % m/m), et en moindre mesure d'autres flavonoïdes également communément retrouvés dans le bois des gymnospermes tels que le dihydrokaempférol (0,3 % m/m) et la pinobanksine (0,2 % m/m) et un flavonol, la quercétine (0,1 % m/m). Ces composés sont néanmoins incolores (Dellus, 1995). Plusieurs hypothèses ont donc été émises par Dellus (1995) quant à l'origine de la coloration du bois de douglas. La première repose sur la réduction de la taxifoline en leucocyanine, un flavane-3,4-diol. Dans les tissus végétaux, la leucocyanine évolue en un chromophore rouge, la cyanidine. Au niveau de la TZ, la leucocyanidine pourrait donc être dégradée lors de la décompartmentation cellulaire en polymères comportant des résidus de cyanidine. La seconde hypothèse repose sur l'oxydation conjointe d'unités de taxifoline et d'unités de lignine. En effet, Dellus (1995) a montré par modélisation la capacité de la taxifoline à former des chromophores rouges, sous l'action de peroxydases, en présence de bois ou d'alcool coniférylique. Quoi qu'il en soit, même si l'origine de la coloration du bois de cœur chez le douglas n'est pas clairement

identifiée, c'est une caractéristique phénotypique intéressante pour le suivi de la formation du duramen. Des différences de coloration du duramen ont été observées en fonction de la hauteur dans le tronc : le duramen de la base du tronc étant moins coloré que le duramen à 1,3 m du collet. Dans la littérature, aucune publication ne fait état de la variation de la couleur du duramen en fonction de la hauteur dans le tronc, quelle que soit l'essence. Dans le cadre de notre étude, la couleur du bois a été évaluée visuellement, mais des mesures quantitatives de ce paramètre peuvent être réalisées à l'aide de spectrocolorimètres et du système CIELAB. Ce système tridimensionnel comporte une échelle de clarté et deux axes de chromaticité vert-rouge et bleu-jaune. Les spectrocolorimètres fournissent les valeurs de réflectance des objets colorés grâce à leurs monochromateurs (séparateurs de longueur d'onde), permettant ainsi le calcul des composantes trichromatiques. Les résultats de mesure de la couleur sont exprimés à l'aide de différents paramètres : les coordonnées chromatiques  $a^*$  (correspond à l'axe vert-rouge) et  $b^*$  (correspond à l'axe bleu-jaune), la clarté  $L^*$ , la saturation de la teinte  $C$  et l'angle de teinte  $h$ . Ainsi, grâce aux 3 nombres  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  et aux nombres associés  $L^*$ ,  $C$  et  $h$ , on peut définir une seule couleur et procéder à des comparaisons numériques (Janin, 1994). Dans le cas du mélèze qui comporte comme le douglas un duramen rosé, Gierlinger et al. (2004) ont observé une valeur élevée pour  $a^*$  qu'ils ont attribué au moins partiellement à des teneurs élevées en composés phénoliques du fait d'une forte corrélation entre ces deux paramètres. Cependant, Pâques et Charpentier (2015) n'ont pas trouvé de corrélation entre ces 2 paramètres, montrant ainsi que les teneurs en phénols ne sont pas suffisantes pour expliquer la couleur du bois et que d'autres facteurs (propriétés anatomiques, structurales...) jouent probablement un rôle.

### **2.4.2.3 Proportion de duramen dans le bois**

#### **2.4.2.3.1 Influence du génotype**

Concernant les arbres carottés à Saint-Gence, leur proportion en termes de surface de duramen est comparable. Ces arbres ont le même patrimoine génétique, le même âge et ont poussé dans le même environnement. Cette homogénéité en termes de proportion de duramen peut donc résulter à la fois de facteurs génétiques communs et des conditions de croissance similaires. Bien qu'ayant poussé dans le même environnement que les autres, l'arbre 9 est de diamètre bien plus petit (arbre dominé) et bien que présentant une aire de duramen du même ordre de grandeur que les autres, le nombre de cernes de duramen à 1,3 m est inférieur (ce qui peut s'expliquer par un nombre de cernes total moindre à cette hauteur comparés aux autres arbres).

Concernant les douglas de Gimel, quelle que soit la hauteur dans le tronc (base et 1,3 m), la proportion de duramen en terme d'aire est très comparable entre les arbres des géotypes 1, 2 et 4. Elle est légèrement supérieure pour les arbres appartenant au géotype 3 alors que ces arbres présentent en moyenne moins de cernes de duramen. Ces arbres ayant poussé dans le même environnement, il semblerait que les facteurs génétiques aient une légère influence sur la proportion de duramen. Quoiqu'il en soit, ces résultats ont été obtenus sur un nombre très restreint d'individus et, afin de confirmer ou non les tendances observées chez le douglas, une plus vaste étude serait nécessaire (plus de géotypes et plus d'individus par géotype).

Chez certaines essences résineuses, la proportion de duramen présente une grande héritabilité. C'est le cas chez plusieurs variétés de pins, *Pinus radiata* D. Don (Nicholls and Brown, 1974), *Pinus banksiana* Lamb. (Magnussen and Keith, 1990), et *Pinus sylvestris* L. (Fries and Ericsson, 1998) et cela a aussi été montré chez le mélèze (Pâques and Charpentier, 2015). D'après nos résultats, chez le douglas, il semblerait que le patrimoine génétique puisse influencer sur la proportion de duramen.

#### **2.4.2.3.2 Influence de l'environnement**

Afin de comparer les arbres de Gimel et de Saint-Gence qui n'ont pas la même vigueur, nous comparerons uniquement la proportion de duramen en termes d'aire. Les arbres de Gimel ont poussé en conditions normales de sylviculture (plantation à 1111 tiges à l'ha puis dépressage), tandis que les arbres de Saint-Gence ont été plantés beaucoup plus espacés (parcelle conservatoire de ressources génétiques). Seul le géotype 3 est présent à ces deux emplacements. Bien que les arbres de Saint-Gence (excepté le 9) aient un diamètre jusqu'à 2 fois supérieur à ceux de Gimel, leur proportion en duramen n'est que très légèrement supérieure. La vigueur des arbres dépend des conditions environnementales (sylviculture, conditions géologiques et climatiques). Au regard de nos données, les facteurs environnementaux ne sembleraient avoir qu'une très légère influence sur la proportion de duramen des douglas. Là encore, une étude sur un plus grand nombre d'individus serait nécessaire pour confirmer ces résultats.

Chez *Pinus sylvestris*, la proportion de duramen est corrélée à la densité de la plantation et au statut de l'arbre. En effet, la proportion de duramen est plus importante dans des parcelles denses et elle décroît de manière significative avec l'augmentation relative de la taille de l'arbre dans une même placette (Ojansuu and Maltamo, 1995). Ericson (1966) a aussi observé, chez cette même essence, un plus faible contenu en duramen des arbres issus des

parcelles éclaircies comparé aux arbres des parcelles non éclaircies. Un élagage important réduit également la croissance des pins sylvestre et augmente leur proportion de duramen (Langström and Hellqvist, 1991). Chez le douglas, Brix et Mitchell (1983) ont montré que suite à un élagage et une fertilisation azotée, le pourcentage de duramen varie peu à 1,3 m (bien que l'épaisseur de l'aubier augmente, son nombre de cerne diminue). Nos résultats semblent donc en accord avec les résultats de Brix et Mitchell (1983). Contrairement à ce qui est observé chez certaines variétés de pins, la proportion de duramen chez le douglas n'est que très peu affectée par les facteurs environnementaux.

#### **2.4.2.4 Période de formation du duramen**

La formation du duramen serait un processus qui permettrait de réguler la proportion d'aubier à un volume suffisant pour accomplir ses fonctions de transport de la sève xylémienne et de stockage des réserves (Hillis, 2014), en permettant ainsi de diminuer les coûts énergétiques qu'entraînerait un surplus de tissus vivants. Les arbres compenseraient donc la formation annuelle d'aubier par l'expansion du duramen. Il a été montré chez plusieurs essences forestières que la formation du duramen était un processus physiologique dépendant de la saison. Chez le noyer (*Juglans nigra*), l'expansion du duramen se déroulerait majoritairement en été et en automne (Beritognolo, 2001). Chez le robinier (*Robinia pseudoacacia*), elle intervient principalement de juillet à octobre et se poursuit doucement jusqu'à mars (Nobuchi et al., 1984). En étudiant plusieurs essences de pins, Yamamoto (1982) a conclu que le duramen se formait en dehors de la période de croissance cambiale, pendant la « dormance » de l'arbre (automne, hiver).

Chez le douglas, nous avons étudié la cinétique de formation du duramen à partir de 10 arbres en nous basant sur la couleur et l'humidité apparente de la TZ. L'apparition de la couleur rouge est due à la synthèse et à l'accumulation d'extractibles lors de la formation du duramen. Chez certaines essences, cette accumulation est associée à la dessiccation de l'aubier. Chez les conifères, le duramen est en effet généralement plus sec que l'aubier (Taylor et al., 2002). Les carottes de bois prélevées présentaient une TZ rouge d'aspect humide principalement d'octobre à avril-mai. Cependant, certaines carottes prélevées au mois de juillet avaient également une TZ rouge humide. Nous avons aussi pu observer sur des rondelles de bois prélevées au mois de juillet et après lyophilisation, qu'une partie du bois initial du cerne de TZ était de couleur rouge. La formation du duramen chez le douglas semble donc principalement se dérouler de l'automne au début du printemps, mais peut, cependant, débuter ou se terminer en été chez certains arbres. Quoi qu'il en soit, les changements physiologiques

que nous avons observés peuvent survenir quelques temps après les premiers changements aux échelles cellulaire et moléculaire. Il a, par exemple, été montré chez le mélèze du Japon (*Larix kaempferi*), que la mort des rayons ligneux de la TZ intervenait du printemps à l'été et l'accumulation des extractibles (et donc le changement de couleur) se déroulait en automne et en hiver (Nakada and Fukatsu, 2012).

#### **2.4.2.5 Durabilité du bois**

Pour des raisons financières, nous n'avons malheureusement pas pu réaliser de tests de détermination de la durabilité des arbres prélevés à Gimel afin d'étudier l'influence du génotype sur ce caractère.

Chez le mélèze, il a été montré que le contenu en extractibles augmentait graduellement de la moelle à la périphérie du duramen, et que cette augmentation de la teneur en extractibles était corrélée avec l'augmentation de la durabilité (Gierlinger and Wimmer, 2004). Pâques et Charpentier (2015) ont observé pour cette essence des contenus en extractibles très variables d'une famille (ensemble de demi-frères) d'arbres à une autre. Quant au douglas, Taylor et al (2003) ont montré qu'il était possible que les pratiques sylvicoles qui influencent la croissance des arbres affectent la durabilité du bois. Cependant ces résultats sont contradictoires avec d'autres études. En effet, Gartner et al. (1999) ont observé chez de jeunes douglas (34 ans) que la durabilité du duramen ne varie ni avec la position dans le tronc ni avec les facteurs du milieu qui influent sur la surface foliaire ou sur la proportion d'aubier. Ces résultats ont été confirmés par Blohm et al. (2014). Pollet et al. (2013) n'ont également observé aucune différence de durabilité entre le bois juvénile et le bois mature vis-à-vis de *Poria placenta*. Ces auteurs ont de plus conclu que la vitesse de croissance ne semblait pas avoir d'impact sur la durabilité, qui est cependant corrélée significativement avec la densité du bois. En effet, Pollet et al. (2013) ont remarqué qu'une augmentation de la densité conduisait à une meilleure résistance à ce champignon. Ces derniers ont aussi observé une variabilité de la durabilité entre sites et entre arbres d'un même site. Il a été suggéré que les facteurs environnementaux contribuaient à cette variabilité, mais que la différence observée entre les arbres était plus largement génétique. Des variations importantes au niveau de la durabilité naturelle ont effectivement été observées chez des douglas provenant d'origines différentes. Suivant l'origine de l'arbre, les extractibles responsables de la durabilité du bois vont varier en quantité et/ou qualité (Akhter and Hale, 2002a, 2002b).

## 2.5 Bilan

Au cours de ce travail, 4 populations clonales de douglas âgés d'une vingtaine d'années ont été caractérisées d'un point de vue génétique et phénotypique. La caractérisation génétique par analyse de microsatellites a révélé qu'il s'agissait bien de 4 génotypes différents, bien qu'un des génotypes ait commencé à diverger pour une des séquences microsatellites. Pour chaque génotype, plusieurs paramètres qualitatifs du bois ont été analysés : la proportion de duramen, la densité totale des cernes et leur largeur, la densité du bois initial et du bois final ainsi que la proportion de bois final dans chacun des cernes. La densité des cernes et la densité du bois final de douglas augmentent de la moelle à l'aubier externe, tandis que la densité du bois initial évolue en sens inverse. La largeur des cernes augmente jusqu'à 7-11 ans suivant les génotypes, avant de décroître. La proportion du bois final augmente de la moelle (30-35 %) jusqu'à l'aubier externe (40-55 %). Des variations entre les génotypes ont été constatées pour la largeur des cernes, la proportion et la densité du bois final, et également au niveau de la période de début de formation du bois au printemps. Ces paramètres sont donc sous influence génétique. Aux alentours d'une dizaine d'années, la densité des cernes, ainsi que la proportion de bois final augmentent, signe de l'évolution progressive d'un bois juvénile de faible densité à un bois mature. Lors de cette étude densitométrique, nous avons constaté que la TZ ne présentait, chez le douglas, pas de profil densitométrique particulier. Concernant la proportion de duramen, du fait des différences observées entre le nombre restreint de génotypes étudiés, nous avons supposé que ce paramètre pouvait être sous influence génétique, comme cela a été démontré pour différentes essences de pins et le mélèze. En revanche, peu de différences ont été observées quant à la proportion de duramen entre arbres d'un même génotype cultivés dans deux environnements différents. Comme cela a déjà été montré chez le douglas, il semblerait que la proportion de duramen ne soit que très légèrement affectée par les conditions environnementales (sylviculture, conditions géochimiques et climatiques...).

En parallèle, une analyse de la période de formation du duramen a été menée au cours d'une période de végétation par carottage mensuel de 10 douglas. L'analyse de la couleur et de l'humidité apparente de la TZ a révélé que l'accumulation des extractibles et la dessiccation du bois se produisaient de l'automne au début du printemps.



## *Chapitre 2 : Glycome et formation du duramen*

## 3.1 Introduction

### 3.1.1 Etude bibliographique

Les qualités du bois sont déterminées non seulement par sa structure mais aussi par sa composition biochimique. Le bois est principalement composé par des parois de cellules mortes. Afin d'en étudier sa composition, nous nous sommes donc, dans un premier temps, intéressés à lister, de façon exhaustive, toutes les méthodes analytiques mises au point pour étudier la composition des parois végétales. Ce travail a fait l'objet d'une revue bibliographique (Costa and Plazanet, 2016). Nous reprendrons ici brièvement les principales méthodes appliquées aux polysaccharides pariétaux (seuls polymères étudiés en détail dans ce chapitre). Pour l'analyse des polymères pariétaux, deux types d'approches peuvent être envisagées : une approche *in-vitro* impliquant la déconstruction de la paroi par des traitements physiques, chimiques et/ou enzymatiques et une approche *in-situ* mettant en jeu différentes techniques analytiques couplées à la microscopie.

Dans le cas de l'approche *in-vitro*, il est tout d'abord nécessaire de purifier ou solubiliser le(s) polymère(s) d'intérêt. Pour ceci plusieurs démarches sont recensées : il est possible d'utiliser soit des méthodes permettant la purification d'une seule ou plusieurs familles de polymères sans préservation des autres, soit des méthodes permettant une extraction séquentielle de tous les polymères (Vanzin et al., 2002). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les différentes familles de polysaccharides pariétaux présentent des structures chimiques et des interactions avec les autres polymères pariétaux qui leurs sont spécifiques. C'est pourquoi, différentes méthodes sont utilisées pour solubiliser chaque type de polymères. Pour ce qui est des traitements chimiques, les pectines méthylestérifiées sont, par exemple, purifiées à l'eau froide (Aspinall et al., 1968) ou chaude (Brett and Hillman, 1985; Garna et al., 2007), les pectines faiblement méthylestérifiées grâce à des chélateurs de cation (Brett and Hillman, 1985), les hémicelluloses avec des solvants organiques ou alcalins (Chanliaud et al., 1995; Hägglund et al., 1956; Lawther et al., 1996; Sjöström and Alén, 1998), ect... (Costa and Plazanet, 2016). Des enzymes peuvent également être utilisées pour purifier les pectines et les hémicelluloses sous forme de polysaccharides ou d'oligosaccharides (Byg et al., 2012; Pauly et al., 2001). Les rendements de purification en ces différents polymères peuvent être améliorés grâce à des prétraitements physiques comme l'explosion à la vapeur, les ultrasons ou l'irradiation micro-ondes (Guo et al., 2012; Palm and Zacchi, 2003; Sun and Tomkinson, 2002). Ces méthodes de purification, d'enrichissement des polymères pariétaux, nécessitent

des quantités de matériel végétal de l'ordre de quelques grammes dans le cas d'extraction séquentielle et entraînent souvent des modifications chimiques des polymères (Selvendran et al., 1985). Une fois purifiés, la caractérisation des polysaccharides pariétaux peut être effectuée par de nombreuses techniques. Classiquement, la composition monosaccharidique est analysée, après hydrolyse ou méthanolyse des polysaccharides, par chromatographie en phases liquide ou gazeuse (CPG) ou par chromatographie haute performance d'échange d'anion (Willför et al., 2009). La spectrométrie de masse peut aussi être utilisée pour caractériser, à partir d'oligosaccharides, le nombre précis d'hexoses, de pentoses, de déoxyoses ou encore d'acides uroniques. Ces oligosaccharides peuvent être obtenus par digestion enzymatique ciblée, directement à partir de matériel végétal. Cette technique, nommée OLIMP (Oligosaccharides Mass Profiling), entraîne la solubilisation d'oligosaccharides dans leur état natif ce qui permet d'identifier les substituants, tels que les groupements esters (Obel et al., 2006). Des techniques de spectroscopie infrarouge (IR) ou Raman sont également employées pour la caractérisation structurale des polysaccharides pariétaux. Ces techniques ont permis de déterminer la structure chimique d'hémicelluloses et de pectines de nombreuses espèces végétales (Chatjigakis et al., 1998; Engelsen and Nørgaard, 1996; Filippov, 1992; Kacurakova et al., 2000; Stewart and Morrison, 1992; Sun and Hughes, 1999; Synytsya et al., 2003). Il a été montré que la spectroscopie Raman était plus adaptée pour étudier la structure de la chaîne principale (liaisons glycosidiques par exemple) tandis que l'IR était plus adapté pour l'étude des groupements fonctionnels des polymères (hydroxyls, carboxyls, détermination du degré de méthylestérification des pectines...) (Chatjigakis et al., 1998; Synytsya et al., 2003). La résonance magnétique nucléaire (RMN) est également une technique analytique appliquée aux polymères pariétaux. Grâce à la RMN  $^{13}\text{C}$  multidimensionnelle, Dick-Perez et al. (2011) ont ainsi pu identifier des interactions entre les polymères pariétaux dans la paroi primaire d'*A. thaliana*. Afin d'identifier et quantifier les polysaccharides et glycoprotéines de la paroi, les techniques immunologiques sont classiquement employées. A l'heure actuelle, environ 200 anticorps monoclonaux avec des différences de spécificités pour les grandes familles de polysaccharides pariétaux sont disponibles. Pour une même famille de polymères, de nombreux anticorps peuvent détecter chacun des motifs spécifiques, permettant ainsi une analyse fine des particularités des parois en fonction de l'espèce végétale (Pattathil et al., 2012).

Les parois végétales font également l'objet d'études *in-situ*, sans étape de déconstruction du réseau tridimensionnel de polymères. Pour ceci, les méthodes analytiques précédemment introduites sont couplées à la microscopie. La microscopie à fluorescence ou la microscopie électronique à transmission permettent, après immunomarquage, de quantifier, d'observer la répartition des polymères et la structure de la paroi (Knox, 2008). Les microspectroscopies IR et Raman sont également des outils intéressants pour l'analyse de la distribution des polymères au sein de la paroi (Agarwal, 2014; Gierlinger and Schwanninger, 2007; Gou et al., 2008), tout comme la spectrométrie de masse couplée à la microscopie (Lunsford et al., 2011).

Les méthodes d'analyse des polymères pariétaux *in-vitro* et *in-situ* sont complémentaires. L'approche *in-vitro* permet une description fine de la composition de la paroi, tandis que la seconde approche, moins résolutive mais non destructive, permet la visualisation de la répartition des polymères au niveau pariétal.

### 3.1.2 Objectifs

Cette partie du travail a pour objectif d'observer l'évolution de la composition biochimique (principalement polysaccharidique) du bois de douglas en relation avec la formation du duramen.

Après avoir recensées les méthodes d'analyse mises au point pour caractériser la composition biochimique de la paroi végétale, nous avons constaté qu'aucune de ces méthodes ne permettait de caractériser rapidement et simplement un grand nombre d'échantillons à partir d'une faible quantité de biomasse (de l'ordre de quelques mg). Un des premiers objectifs de ce travail de thèse a donc été de mettre au point une méthode permettant de répondre à cette problématique. La méthode que nous avons développée met en jeu une solubilisation de la biomasse ligneuse dans des liquides ioniques (LIs) couplée à une analyse des solutions obtenues par des techniques immunologiques (dot-blot ou ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay) utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de polymères pariétaux. Les LIs sont définis comme étant des solutions salines dont le point de fusion est inférieur à 100°C (Seddon, 1997). Ils ont de nombreuses propriétés physicochimiques attractives telles qu'une grande stabilité thermique, une faible pression de vapeur et une bonne capacité à dissoudre des composés polaires, apolaires, organiques ou inorganiques (Lee and Lee, 2005; Welton, 1999). Grâce à ces propriétés, ils ont un vaste champ d'applications (MacFarlane et al., 2002; Patel and Lee, 2012; Tan and MacFarlane, 2009, Welton, 1999) et il a été montré que certains LIs avaient la capacité de solubiliser la

cellulose, la lignine ou encore la biomasse ligneuse et notamment le bois (Sun et al., 2009). Nous avons tout d'abord montré avec un LI commercial, qu'une fois le bois totalement solubilisé, les polymères pariétaux étaient encore reconnus par les anticorps et que le LI n'interférait pas avec cette reconnaissance (Plazanet et al., 2015). Nous avons ensuite cherché à améliorer les processus de dissolution du bois et d'identification par les anticorps en optimisant le choix du LI. Grâce à une collaboration avec le Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques (CRML) de l'Université du Québec à Trois-Rivières, nous avons pu synthétiser et tester plusieurs LIs. Une fois cette méthode au point, nous l'avons ensuite appliquée pour suivre l'évolution de la composition du bois de douglas, cerne par cerne, de l'aubier externe au cœur du duramen, à partir de carottes de bois prélevées mensuellement sur des arbres d'une vingtaine d'années. En parallèle, nous avons cherché à affiner les résultats obtenus *in-vitro* par des immunolocalisations des polymères au sein de la paroi, dans la TZ, à l'aide de la microscopie confocale à fluorescence.

## **3.2 Matériel et méthodes**

### **3.2.1 Matériel végétal**

Les premiers essais de dissolution avec les différents LIs synthétisés ou commerciaux ont été réalisés à partir d'aubier externe d'une rondelle de bois prélevée en automne à Gimel. Le bois a été broyé en une fine poudre ( $< 250 \mu\text{m}$ ) à l'aide d'un broyeur à bille (Dangoumeau).

Nous avons également utilisé une rondelle de bois de douglas prélevée à Gimel au printemps sur le génotype 80189 pour valider la reproductibilité de la méthode que nous avons développée. Pour ceci, la rondelle de bois a été lyophilisée et le bois initial et final de chaque cerne a été récupéré. Ces échantillons ont ensuite été broyés individuellement à l'aide d'un broyeur à billes (Retsch, type MM2, Haan, Germany) dans l'azote liquide pendant 2 min à vitesse maximale (pour environ 80 mg de bois).

Comme décrit précédemment (cf Chapitre 1, Matériel et méthodes), l'évolution de la composition biochimique du bois de douglas a été étudiée à partir de carottes de bois de 5 mm de diamètre prélevées à l'aide d'une tarière sur des douglas d'une vingtaine d'années se trouvant sur une parcelle à Saint-Gence (87). Une carotte a été prélevée chaque mois pendant 15 mois sur 10 arbres d'un même génotype (génotype 80189). Une fois prélevées, les carottes sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant d'être lyophilisées et découpées cerne par cerne au scalpel. Les segments de bois obtenus sont broyés individuellement au broyeur à billes (Retsch, type

MM2, Haan, Germany) dans l'azote liquide pendant 1 min 30 à 2 min 30 (suivant la quantité, entre 30 et 100 mg).

### **3.2.2 Mises au point techniques de la méthode liquide ionique/immunodétection**

#### **3.2.2.1 Premières mises au point**

Les premières mises au point de cette méthode d'analyse seront présentées dans l'article intitulé « Direct immunological detection of wood cell wall polysaccharides after microwave-assisted ionic liquid disruption » (Plazanet et al., 2015).

#### **3.2.2.2 Synthèse des liquides ioniques**

##### *Produits*

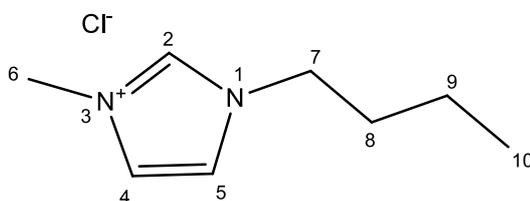
Le 1-méthylimidazole (99 %), le bromoéthane (98 %), l'acétate de potassium (99 %), le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (99 %), le bromobutane (98 %) et le chlorure d'allyl (98 %) proviennent d'Alpha Aesar, le bromure d'allyl (99 %) et le chlorobutane (99,5 %) de Fischer Scientific. L'acétate d'éthyle (99 %) a été acheté chez Carlo Erba, le dichlorométhane (99,9 %) chez SDS, l'éthanol absolu chez VWR et le DMSO  $d_6$  avec 0,03 % de tétraméthylsilane (99,8 % deutéré) chez Eurisotop.

Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Brüker DPX-400 avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton ( $^1\text{H}$ ) et de 100,16 MHz pour le carbone ( $^{13}\text{C}$ ), avec comme solvant le DMSO  $d_6$  à température ambiante. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage  $J$  sont données en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées sont les suivantes : s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; qn : quintuplet ; dt : doublet de triplet, dq ; double de quadruplet ; m : multiplet.

Pour l'analyse des LIs à cation DBU, des études en deux dimensions ont été réalisées : une COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlated spectroscopy), une HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Heteronuclear multiple quantum coherence  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) et une HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Heteronuclear multiple bond coherence  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ).

## Synthèse

### Chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ([Bmim]Cl)

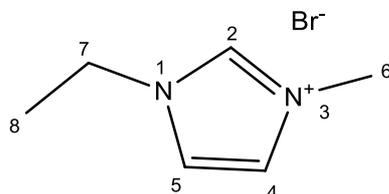


**Figure 35 : Chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium**

Dans un ballon de 500 ml, un mélange de 1-méthylimidazole (82,48 g, 1,0 mol) et de chlorobutane (111,12 g, 1,2 mol) a été mis sous agitation 6 jours à 62°C. L'excès de chlorobutane est ensuite évaporé à sec. Le produit (liquide visqueux jaune pâle) est obtenu avec un rendement de 98 % (174,6 g).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO  $d_6$ ) :  $\delta$  9,35 (1H, s, H-2), 7,83 (1H, t, H-5,  $J_{5,4}=1,7$ ), 7,76 (1H, t, H-4,  $J_{4,5}=1,7$ ), 4,19 (2H, q, H-7,  $J_{7,8}=7,2$ ), 3,67 (3H, s, H-6), 1,77 (2H, q, H-8,  $J_{8,7}=7,3$  ;  $J_{8,9}=14,9$ ), 1,26 (2H, q, H-9,  $J_{9,8}=14,9$  ;  $J_{9,10}=7,4$ ), 0,90 (3H, t, H-10,  $J_{10,9}=7,4$ ).

### Bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium ([Emim]Br)

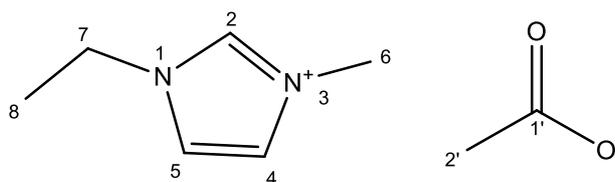


**Figure 36 : Bromure de 1-éthyl-3-méthylimidazolium**

Dans un ballon de 500 ml, un mélange de 1-méthylimidazole (41,06 g, 0,5 mol) et de bromoéthane (65,38 g, 0,6 mol) a été mis sous agitation 20 h à 35°C. Le produit a ensuite été lavé deux fois à l'acétate d'éthyle (2x100 ml) puis évaporé à sec. Le produit est obtenu avec un rendement de 96 % (91,72 g).

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO  $d_6$ ) :  $\delta$  9,44 (1H, s, H-2), 7,92 (1H, t, H-5,  $J_{5,4}=1,7$ ), 7,81 (1H, t, H-4,  $J_{4,5}=1,7$ ), 4,22 (2H, q, H-7,  $J_{7,8}=7,3$ ), 3,87 (3H, s), 1,38 (3H, t, H-8,  $J_{8,7}=7,3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO  $d_6$ ) :  $\delta$  136,24 (C-2), 123,46 (C-4 or C-5), 121,92 (C-4 or C-5), 44,07 (C-7), 35,73 (C-6), 15,18 (C-8).

### Acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium ([Emim]Ac)



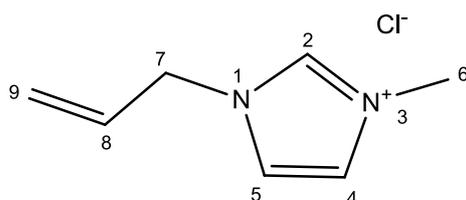
**Figure 37 : Acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium**

L'[Emim]Ac a été synthétisé à partir de l'[Emim]Br suite à une réaction d'échange d'anion selon le protocole Zhang et al. (2008) modifié par Wang et al. (2012).

L'acétate de potassium (3,77 g, 0,0385 mol) est complètement dissout dans 35 ml d'éthanol pur, puis l'[Emim]Br (7 g, 0,0385 mol) est doucement ajouté au mélange. La réaction est réalisée à 40°C pendant 6 h. Le mélange est ensuite placé à -20°C pendant 1 h avant d'être filtré pour retirer le précipité de bromure de potassium. L'éthanol est évaporé à sec et le produit placé à -20°C 24 h avant d'être de nouveau filtré. Le produit est obtenu avec un rendement de 79 % (4,90 g) et une pureté de 85 %. Ce LI n'étant pas pur, nous avons cherché à optimiser le protocole de synthèse. Nous avons testé l'effet d'une augmentation du temps de réaction (24 h), d'une augmentation de la température de réaction (60°C) et l'utilisation de l'éthanol à 96 %. L'[Emim]Ac utilisé pour dissoudre le bois a ainsi été synthétisé à partir du protocole précédent en multipliant par 10 les quantités de chacun des réactifs et en laissant la réaction se dérouler 24 h au lieu de 6 h. Le LI, un liquide visqueux jaune pâle, a été obtenu avec un rendement de 84 % (52,1 g) et une pureté de 89 %.

RMN  $^1\text{H}$  (DMSO  $d_6$ ) :  $\delta$  9,87 (1H, s, H-2), 7,85 (1H, t, H-5,  $J_{5,4}=1,7$ ), 7,76 (1H, t, H-4,  $J_{4,5}=1,7$ ), 4,21 (2H, q, H-7,  $J_{7,8}=7,3$ ), 3,87 (3H, s, H-6), 1,55 (3H, s, H-2'), 1,41 (3H, t, H-8,  $J_{8,7}=7,3$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO  $d_6$ ) :  $\delta$  173,74 (C-1'), 137,18 (C-2), 123,54 (C-4 or C-5), 121,97 (C-4 or C-5), 44,00 (C-7), 35,56 (C-6), 25,74 (C-2'), 15,23 (C-8).

### Chlorure de 1-allyl-3-méthylimidazolium ([Amim]Cl)

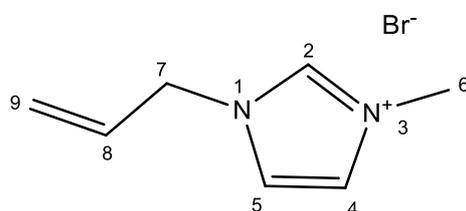


**Figure 38 : Chlorure de 1-allyl-3-méthylimidazolium**

L'[Amim]Cl a été synthétisé selon le protocole de Ren et al. (2003). Le chlorure d'allyle (11,65 g, 0,152 mol) est doucement ajouté à 10 g (0,122 mol) de 1-méthylimidazole (ratio molaire de 1,25:1) dans un ballon de 100 ml placé dans la glace (réaction très exothermique) et à reflux. Après 12 h à 55°C, les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par évaporation. Un liquide visqueux de couleur jaune est obtenu avec un rendement de 97 % (16,94 g).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>) : δ 9,45 (1H, s, H-2), 7,83 (1H, t, H-5, J<sub>5,4</sub>=1,8), 7,81 (1H, t, H-4, J<sub>4,5</sub>=1,8), 6,06 (1H, m, H-8, J<sub>8,9B</sub>=16,9 ; J<sub>8,9A</sub>=10,3 ; J<sub>8,7</sub>=6,0), 5,35 (1H, dq, H-9A, J<sub>9A,8</sub>=1,3 ; J<sub>9A,9B</sub>=1,3), 5,30 (1H, dq, H-9B, J<sub>9B,8</sub>=16,9 ; J<sub>9B,9A</sub>=1,3), 4,90 (2H, dt, H-7, J<sub>7,8</sub>=6,0), 3,90 (3H, s, H-6).

Bromure de 1-allyl-3-méthylimidazolium ([Amim]Br)

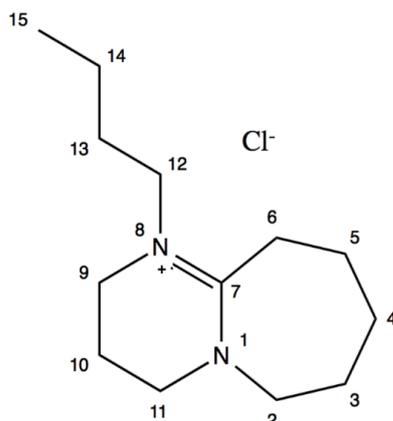


**Figure 39 : Bromure de 1-allyl-3-méthylimidazolium**

Le bromure d'allyle (13,84 g, 0,114 mol) est doucement ajouté à 7,5 g (0,092 mol) de 1-méthylimidazole (ratio molaire de 1,25:1) dans un ballon de 100 ml placé dans la glace et à reflux. Après 48 h à 22°C, les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par évaporation. Un liquide visqueux de couleur marron est obtenu avec un rendement de 96 % (21,06 g).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>) : δ 9,24 (1H, s, H-2), 7,79 (1H, t, H-5, J<sub>5,4</sub>=1,8), 7,76 (1H, t, H-4, J<sub>4,5</sub>=1,8), 6,06 (1H, m, H-8, J<sub>8,9B</sub>=17,0 ; J<sub>8,9A</sub>=10,3 ; J<sub>8,7</sub>=6,0), 5,36 (1H, dq, H-9A, J<sub>9A,8</sub>=10,3 ; J<sub>9A,9B</sub>=1,3), 5,31 (1H, dq, H-9B, J<sub>9B,8</sub>=17,0 ; J<sub>9B,9A</sub>=1,3), 4,89 (2H, dt, H-7, J<sub>7,8</sub>=6,0), 3,89 (3H, s, H-6).

### Chlorure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBUC<sub>4</sub>Cl)

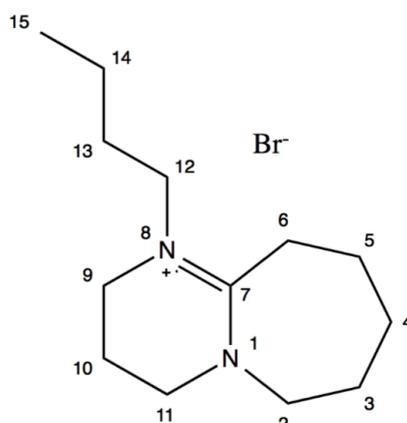


**Figure 40 : Chlorure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène**

La solution contenant le DBU (40,8 g, 0,268 mol) et le chlorobutane (29,77 g, 0,32 mol) est mise sous agitation 12 h à 70°C puis 20 h à 90°C. La gomme orange résultante est lavée au dichlorobutane (2x100 ml), puis ce dernier est évaporé. Le DBUC<sub>4</sub>Cl est obtenu avec un rendement de 96 % (63,07 g).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>) : δ 3,62 (2H, m, H-2), 3,50 (2H, H-12, t, J<sub>12,13</sub>=7,5), 3,47 (2H, t, 9-H, J<sub>9,10</sub>=5,7), 3,44 (2H, t, H-11, J<sub>11,10</sub>=5,7), 2,86 (2H, m, H-6), 1,96 (2H, qn, H-10, J=5,7), 1,66 (2H, m, H-4), 1,62 (4H, m, H-3 et H-5), 1,52 (2H, qn, H-13, J=7,5), 1,30 (2H, sx, H-14, J=7,5), 0,90 (3H, t, H-15, J<sub>15,14</sub>=7,5). RMN <sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>) : δ 165,81 (C-7), 53,84 (C-2), 52,79 (C-12), 48,41 (C-11), 46,50 (C-9), 30,23 (C-13), 27,69 (C-4), 27,01 (C-6), 25,37 (C-3), 22,71 (C-5), 19,50 (C-10), 19,02 (C-14), 13,64 (C-15).

### Bromure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBUC<sub>4</sub>Br)



**Figure 41 : Bromure de butyl-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène**

Le DBU (8,31 g, 0,055 mol) est introduit dans un ballon de 100 ml puis placé dans la glace. 1,2 équivalents de bromobutane (8,98 g, 0,066 mol) sont ajoutés doucement sous agitation. Le ballon est ensuite transvasé dans un bain d'huile puis mis à reflux. La température est progressivement montée à 80°C pendant 2 h, puis 90°C durant 6 h. Les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par évaporation. Un solide marron est obtenu avec un rendement de 96 % (15,11 g).

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>) : δ 3,63 (2H, m, H-2), 3,50 (2H, H-12, t, J<sub>12,13</sub>=7,4), 3,48 (2H, t, H-9, J<sub>9,10</sub>=5,8), 3,45 (2H, t, H-11, J<sub>11,10</sub>=5,8), 2,86 (2H, m, H-6), 1,97 (2H, qn, H-10, J=5,8), 1,68 (2H, m, H-4), 1,63 (4H, m, H-3 et H-5), 1,52 (2H, qn, H-13, J=7,4), 1,30 (2H, sx, H-14, J=7,4), 0,90 (3H, t, H-15, J<sub>15,14</sub>=7,4).

### 3.2.2.3 Dissolution du bois

#### 3.2.2.3.1 Par activations micro-ondes

Les premiers essais de dissolution de la poudre de bois de douglas (aubier externe, broyage au Dangoumeau) ont été réalisés par traitements micro-ondes, à raison de 10 mg de bois dans 1 g de LI. 4 LIs ont été testés : le [Bmim]Cl que nous avons synthétisé, l'[Emim]Ac et le [Bmim]Ac commerciaux (Sigma-Aldrich), et le [Bmim]BF<sub>4</sub> synthétisé et fournit par le CRML (Trois-Rivières, Canada). Les activations micro-ondes ont été réalisées à l'aide d'un micro-onde Ethos 1600 MicroSynth reactor (Milestone, USA). La température de l'échantillon en cours d'activation a été suivie et contrôlée par un thermomètre à fibre optique (Ethos ATC-FO). Chaque échantillon a subi 6 activations d'1 min à 200 W avec une température maximale fixée à 80°C. Entre 2 activations, la solution a été laissée à refroidir jusqu'à température ambiante. L'avancement de la dissolution a été suivi par microscopie optique (Leica, DMI6000B)

#### 3.2.2.3.2 Par chauffage

La poudre de bois de douglas (aubier externe, broyage au Dangoumeau) a été dissoute dans 6 LIs ([Emim]Br, [Emim]Ac, [Amim]Br, [Amim]Cl, DBUC<sub>4</sub>Cl, DBUC<sub>4</sub>Br) à raison de 10 mg de poudre de bois dans 5,23 mmol de LI (ceci équivaut à 1 g de [Emim]Br) (Tableau 15). Nous avons choisi, contrairement à ce que nous avons fait précédemment et à ce qui est décrit dans la littérature, d'opter pour la même quantité molaire de LI et non la même quantité massique (les masses correspondantes à 5,23 mmol de chacun des LIs sont données à titre indicatif dans le tableau 15). Deux températures de dissolution ont été testées : 80°C et 100°C.

Les tubes en verre contenant le LI et la poudre de bois ont été placés sous agitation dans un bain d'huile à 80 ou 100°C jusqu'à complète dissolution des particules de bois. L'avancement de la dissolution a été suivi par prélèvements réguliers de la solution et observation en microscopie optique (Leica, DMI6000B).

**Tableau 15 : Masse de chaque LI correspondant à 5,23 mmol et pourcentage massique de bois dans chaque LI.**

	Masse (g)	% bois/LI (m/m)
[Emim]Br	1,00	1,00
[Emim]Ac	0,90	1,11
[Amim]Cl	0,83	1,20
[Amim]Br	1,06	0,94
DBUC <sub>4</sub> Br	1,51	0,62
DBUC <sub>4</sub> Cl	1,28	0,78

### 3.2.2.4 Identification des polysaccharides

L'identification des polysaccharides du bois de douglas a été réalisée par ELISA avec un panel de 16 anticorps (Tableau 16).

Dans un premier temps, des gammes de polymères commerciaux témoins ont été réalisées afin d'observer l'effet du LI sur la solubilisation d'un polymère isolé et d'éventuelles interférences entre l'anticorps et le LI. Pour ceci, les polymères suivants ont été utilisés : de la gomme de guar de *Cyamopsis tetragonoloba* (Sigma-Aldrich), des  $\beta$ -(1-4)-mannopentaoses (Megazyme), des xylanes de bois de bouleau (Sigma-Aldrich), des xyloglucanes de graines de tamarin (Megazyme), des pectines de citron (Sigma-Aldrich), de la gomme arabique (Sigma-Aldrich), de la gomme Karaya (Sigma-Aldrich) et des arabinanes de betterave à sucre (Megazyme). Dix mg de chaque polymère ont été dissouts indépendamment dans 1 g de chaque LI ([Emim]Br, [Emim]Ac, [Amim]Br, [Amim]Cl, DBUC<sub>4</sub>Cl ou DBUC<sub>4</sub>Br). Les échantillons ont tous été chauffés 3 h à 80°C (temps nécessaire pour que tous ces polymères soient totalement dissouts dans tous les LIs). Les solutions obtenues ont été diluées dans l'eau distillée et des quantités croissantes ont été déposées sur les plaques ELISA.

Les échantillons de bois solubilisé dans les 6 LIs par chauffage à 80 ou 100°C ont été diluées à la concentration souhaitée dans de l'eau distillée afin de diminuer la viscosité de la solution. Des quantités croissantes de bois dissout ont ensuite été déposées sur plaques ELISA.

Des essais ont également été menés à partir de deux échantillons prélevés sur une rondelle de bois de douglas du génotype 3 (bois initial du 9<sup>ème</sup> cerne et bois final du 13<sup>ème</sup> cerne à partir du cambium, broyage dans l'azote liquide) en couplant les deux températures de dissolution. Les échantillons ont été dissouts soit 3 ou 4 jours à 80°C, soit 3 ou 4 jours à 80°C suivi de 2 h à 100°C. La dissolution a été réalisée en triplicata pour chaque condition et chaque échantillon.

Les analyses ELISA ont été réalisées suivant le protocole de Pattathil et al. (2010) légèrement modifié. Cinquante microlitres de solution diluée à la bonne concentration (dépôt de 0,05 ng à 50 µg de bois dissout suivant l'anticorps) sont déposés dans des puits de plaques 96 puits (Nunc, ref 269620 ThermoFischer). Le blanc est effectué avec une solution d'eau contenant le LI à la même concentration que l'échantillon. Les plaques sont placées une nuit à l'étuve à 37°C pour évaporer le liquide. Après un lavage avec 300 µl d'eau distillée, la saturation des plaques est effectuée pendant 1 h avec une solution de TBS (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,6) contenant 1 % (m/v) de poudre de lait écrémé, sous agitation (agitateur Heidolph Titramax 101, 150 rpm). La solution de blocage est ensuite éliminée par retournement de la plaque. Cinquante microlitres d'anticorps primaire (Tableau 16) dilué au 100<sup>ème</sup> dans du TBS sont ajoutés dans chaque puits, les plaques sont ensuite incubées 4 h à température ambiante sous agitation. Après élimination de l'anticorps primaire, les plaques sont rincées trois fois 10 min avec 300 µl de TBS-0,1 % lait écrémé (tampon de lavage). Puis 50 µl d'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (goat anti-mouse IgG ou goat anti-rat IgG, Sigma-Aldrich) dilué au 5000<sup>ème</sup> dans le tampon de lavage sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 h d'incubation à température ambiante sous agitation, l'anticorps secondaire est éliminé et quatre rinçages de 10 min avec le tampon de lavage sont effectués. Pour finir, 50 µl de révélateur 1-Step Ultra TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine)–ELISA Substrate Solution (Life Technologies) sont ajoutés dans chaque puits. Après 20 min d'incubation à température ambiante sans agitation, la réaction est stoppée par l'ajout de 50 µl d'acide sulfurique 0,5 N. La densité optique (DO) de chaque puits est lue à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques (BMG-Labtech, FLUOstar, Omega) à 450 et 655 nm. La DO de chaque puits est ensuite calculée par la soustraction de la valeur à 655 nm sur celle à 450 nm.

Dans le cas de l'analyse des carottes de bois, les résultats sont présentés sous forme de « heatmaps » pour chaque anticorps. Les valeurs de DO, pour une même carotte, ont été ramenées entre 0 et 1. Le traitement des valeurs a été réalisé à l'aide du logiciel R.

**Tableau 16 : Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.**

Anticorps	Polymères reconnus	Animal source	Fournisseur	Référence
LM21	Mannanes, glucomannanes et galactomannanes	Rat	PlantProbes	Marcus et al., 2010
LM22	Mannanes et glucomannanes	Rat	PlantProbes	Marcus et al., 2010
LM10	Xylanes (non et peu substitués)	Rat	PlantProbes	McCartnay et al., 2005
LM11	Xylanes (non et peu substitués) et arabinoxylanes	Rat	PlantProbes	McCartnay et al., 2005
LM15	Xyloglucanes (motif XXXG)	Rat	PlantProbes	Marcus et al., 2008
LM25	Xyloglucanes (motifs XLLG, XLG and XXXG)	Rat	PlantProbes	Pedersen et al., 2012
CCRC-M1	Xyloglucanes, Rhamnoglacturonanes I	Souris	CarboSource	Puhlmann et al., 1994
CCRC-M14	Rhamnoglacturonanes I (squelette)	Souris	CarboSource	Patthatil et al., 2010
CCRC-M35	Rhamnoglacturonanes I	Souris	CarboSource	Patthatil et al., 2010
LM5	(1-4)- $\beta$ -D-galactanes	Rat	PlantProbes	John et al., 1997
LM6	(1-5)- $\alpha$ -L-arabinanes	Rat	PlantProbes	Willats et al., 1998
LM19	Homogalacturonanes (non-estérifiés)	Rat	PlantProbes	Verherbruggen et al., 2009
CCRC-M38	Homogalacturonanes (non-estérifiés)	Souris	CarboSource	Patthatil et al., 2010
LM20	Homogalacturonanes (méthyl-estérifiés)	Rat	PlantProbes	Verherbruggen et al., 2009
JIM7	Homogalacturonanes (partiellement méthyl-estérifiés)	Rat	PlantProbes	Knox et al., 1990
LM2	AGP	Rat	PlantProbes	Yates et al., 1996

### 3.2.3 Etude de l'évolution de la composition du bois de douglas

Pour valider la méthode précédemment développée, nous avons réalisé en triplicata une dissolution à 80°C pendant 4 jours de chaque échantillon de poudre de bois de la rondelle de printemps du génotype 3 (16 cernes avec pour chacun bois initial et bois final) dans l'[Emim]Br (10 mg de poudre pour 1 g de LI). L'identification des polysaccharides a ensuite été réalisée par ELISA avec les 16 anticorps. L'équivalent de 20  $\mu$ g de « bois dissout » a été déposé sur les plaques ELISA dans le cas des anticorps LM20, CCRC-M35, LM2, LM6, CCRC-M1 et LM15 ; 10  $\mu$ g pour les anticorps CCRC-M38, LM19, JIM7 et CCRC-M14 ; 2  $\mu$ g pour LM5 et LM10 ; 1  $\mu$ g pour LM25 ; 0,5  $\mu$ g pour LM11 et LM22 ; et 0,2  $\mu$ g pour LM21.

Puis, suivant les mêmes conditions, chacun des cernes des 40 carottes prélevées mensuellement sur les 10 douglas de Saint-Gence a été analysé.

### **3.2.4 Analyses microscopiques du bois de douglas**

Différentes techniques d'analyses couplées à la microscopie ont été employées pour caractériser la composition de la TZ de bois de douglas à partir de coupes fines : la microscopie confocale associée à des immunomarquages et la microspectroscopie IR.

#### **3.2.4.1 Préparation des échantillons**

Nous avons étudié en microscopie confocale à fluorescence les TZ des 8 carottes suivantes :

- Arbre 1 : T0 (janvier) et T6 (juillet)
- Arbre 2 : T0 (janvier) et T7 (août)
- Arbre 7 : T0 (janvier) et T7 (août)
- Arbre 9 : T4 (mai) et T9 (octobre)

Une moitié de chaque carotte a été immergée dans l'eau distillée à température ambiante pendant 4 jours, puis dans l'eau-glycérol 10 % (v/v) sous vide pendant 4 h 30. Les carottes ont été stockées 3 jours à 4°C dans l'eau-glycérol 10 % (v/v). A l'issue de ces différentes étapes, le cerne de TZ a été découpé au scalpel en débordant légèrement sur le bois initial du cerne d'aubier suivant et sur le bois final du cerne de duramen précédent. L'échantillon de bois a ensuite été déposé sur un plot et fixé à froid avec du gel (Leica Surgipath® FSC 22 Clear). Les coupes de 15 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat (Leica CM 1860 UV) à -23°C. Les coupes sont récupérées sur des lames de verre et le gel est éliminé par rinçage à l'eau distillée.

#### **3.2.4.2 Immuno-fluorescence**

Le même panel d'anticorps que pour les analyses ELISA a été utilisé (Tableau 16).

Les sites de fixation aspécifiques sont saturés avec une solution de blocage (PBS pH 7,4, Tween 20 0,1 %, BSA 2 %) pendant 45 min. Après trois rinçages de 10 min avec du PBS Tween 20 0,1 %, les coupes sont incubées 12 h en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué au 10<sup>ème</sup> dans du PBS Tween 20 0,1 %. Un premier lavage de 10 min est effectué avec la solution de PBS Tween 20 0,1 %, et les trois lavages suivants avec du PBS Tween 20 0,5 %. Les coupes sont ensuite incubées 3 h avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 647 (Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG et Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG, Sigma-Aldrich) dilué au 1000<sup>ème</sup> dans du PBS Tween 20 0,5 %. Après 3 lavages de 10 min dans le PBS Tween 20 0,5 % et un lavage dans l'eau distillée, les coupes sont montées entre lame et lamelle dans l'eau-glycérol (v/v). Le microscope confocale LSM880 (Zeiss) a été utilisé en

mode spectral. L'excitation est réalisée à 405 nm pour l'observation de l'autofluorescence de la lignine et à 633 nm pour la visualisation du marquage à l'Alexa 647. Les spectres d'émission sont enregistrés entre 400 et 700 nm et traités avec le logiciel Zen black (Zeiss).

### **3.2.4.3 Microspectroscopie infrarouge**

Une coupe de 30 µm d'épaisseur de TZ de bois de douglas (arbre 1, T<sub>0</sub>) a été analysée à l'aide de cette technique.

L'imagerie IR a été réalisée à l'aide du système d'imagerie Perkin Elmer Spotlight 400 (Perkin Elmer, Waltham, MA). Les images FT-IR ont été acquises en mode ATR (réflexion totale atténuée) avec l'adaptateur utilisant le cristal de germanium. Les données spectrales ont été collectées entre 4000 et 750 cm<sup>-1</sup>. Les images spectrales ont été acquises avec une taille de pixel de 1,56 x 1,56 µm, avec 2 scans par pixel à une résolution de 16 cm<sup>-1</sup>, sur une région de 200 x 200 µm en contact avec le cristal de l'ATR. La correction atmosphérique a été effectuée pour toutes les mesures et l'algorithme de correction de la ligne de base a été appliqué sur les données en utilisant le logiciel Perkin Elmer Spotlight.

## **3.3 Résultats**

### **3.3.1 Mises au point techniques de la méthode LI/immunodétection**

#### **3.3.1.1 Premières mises au point**

Les premières mises au point de cette méthode d'analyse sont présentées dans l'article qui suit. Les essais de dissolution ont été réalisés à partir de bois de noyer avec un LI commercial, l'[Emim]Ac. La dissolution du bois a été effectuée par chauffage et par activations micro-ondes. Les résultats obtenus en terme d'immunomarquages à partir des solutions de bois dissout ont été comparés à des résultats obtenus suite à une extraction séquentielle des polymères pariétaux et des analyses en CPG et dot-blot.

#### **Article :**

Plazanet I, Zerrouki R, Lhernould S, Breton C and Costa G (2015) « Direct immunological detection of wood cell wall polysaccharides after microwave-assisted ionic liquid disruption », *J. Glycobiol* 3: 115. doi:10.4172/2168-958X.1000115.

Dans cet article, nous avons donc montré avec un LI commercial, qu'une fois le bois totalement solubilisé, les épitopes de polymères pariétaux détectés suite à une extraction séquentielle sont également reconnus dans les solutions contenant le bois dissout dans le LI. De plus, le LI n'interagit pas avec les anticorps. Afin d'optimiser cette nouvelle méthode d'analyse pour le douglas, nous avons ensuite synthétisé et testé l'efficacité d'autres LIs à solubiliser du bois, avant d'étudier leur influence sur l'identification des polymères pariétaux par immunomarquages.

### 3.3.1.2 Synthèse des liquides ioniques

Le premier LI synthétisé a été le [Bmim]Cl, obtenu par mélange d'1 équivalent de 1-méthylimidazole et de 1,2 de chlorobutane pendant 6 jours à 62°C. Ce LI a été obtenu pur avec un rendement de 98 %.

Ensuite, 6 LIs ([Emim]Ac, [Emim]Br, [Amim]Br, [Amim]Cl, [DBUC<sub>4</sub>]Br et [DBUC<sub>4</sub>]Cl) ont été synthétisés afin de comparer leur efficacité à dissoudre du bois de douglas en chauffage classique.

L'[Emim]Br a été synthétisé comme précurseur de synthèse de l'[Emim]Ac. Un mélange de 1 équivalent de 1-méthylimidazole et 1,2 de bromoéthane a été mis sous agitation pendant 20 h à 35°C. Après lavage, le LI pur (solide friable beige) a été obtenu avec un rendement de 96 %. L'[Emim]Ac a été synthétisé à partir de l'[Emim]Br grâce à une réaction d'échange d'anion selon le protocole de Zhang et al. (2008) modifié par Wang et al. (2012). Une solution d'acétate de potassium dans l'éthanol est ajoutée à l'[Emim]Br (ratio molaire 1:1). Après 6 h à 40°C sous agitation, la solution refroidie est filtrée deux fois pour retirer le précipité de bromure de potassium. Un liquide jaune pâle a été obtenu avec une pureté déterminée par RMN de 85 %. Suite à ce résultat, nous avons tenté d'optimiser le protocole de synthèse en augmentant le temps de réaction, la température de réaction ou en utilisant de l'éthanol à 96 % au lieu de l'éthanol pur (Tableau 17). L'augmentation du temps de réaction à 24 h permet d'améliorer la pureté de 4 %, tandis que l'augmentation de la température n'entraîne pas d'amélioration. L'utilisation de l'éthanol à 96 % à la place de l'éthanol pur entraîne, quelque soit le temps de réaction, une diminution de la pureté de l'[Emim]Ac par rapport aux conditions initiales du protocole de Wang et al. (2012) (Tableau 17). Le protocole 2 a donc été sélectionné pour la synthèse de l'[Emim]Ac.

**Tableau 17 : Essais d'optimisation de la réaction de synthèse de l'[Emim]Ac.**

Protocole	Pureté éthanol	Temps de réaction	T°C de réaction	Pureté [Emim]Ac
1	100%	6h	40°C	85%
2	100%	24h	40°C	89%
3	100%	24h	60°C	85%
4	96%	6h	40°C	77%
5	96%	72h	40°C	77%

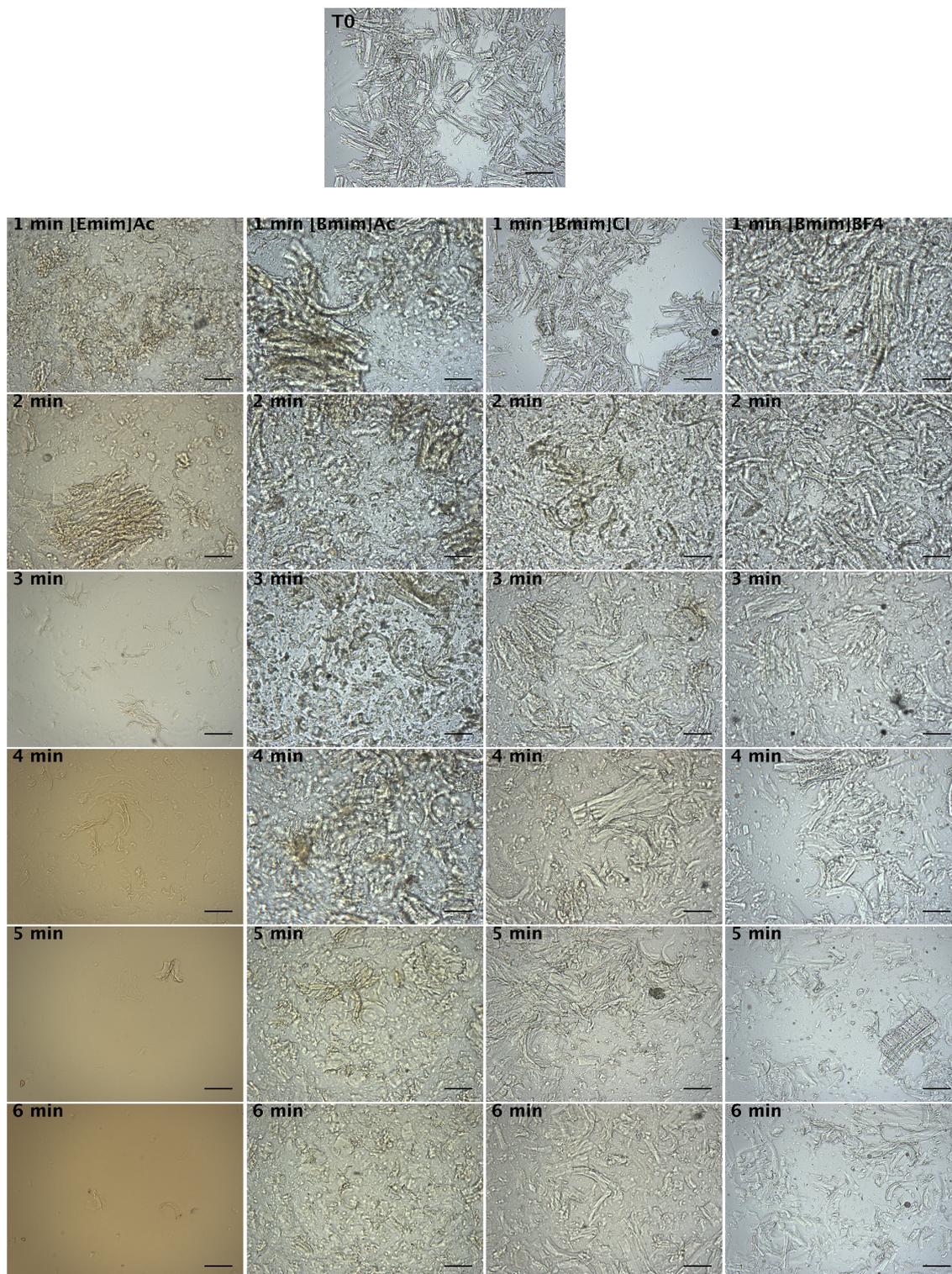
Deux autres LIs ayant pour cation l'imidazolium ont été synthétisés : l'[Amim]Cl et l'[Amim]Br. Le premier a été synthétisé selon le protocole de Ren et al. (2003) par mélange d'une solution de chlorure d'allyle avec du 1-méthylimidazole (ratio molaire 1,25:1) à 55°C pendant 12 h. Le second LI résulte de la réaction entre le bromure d'allyle et le 1-méthylimidazole (ratio molaire 1,25:1) à 22°C durant 48 h. Ces deux LIs ont été obtenus purs avec des rendements de 97 et 96 % respectivement.

Les deux LIs avec un cation DBU, [DBUC<sub>4</sub>]Br et [DBUC<sub>4</sub>]Cl ont été synthétisés à partir d'un équivalent de DBU et de 1,2 équivalent de bromobutane ou chlorobutane. Ces deux LIs ont été obtenus purs avec un rendement de 96 %.

### 3.3.1.3 Dissolution du bois de douglas

#### 3.3.1.3.1 Par activations micro-ondes

Suite aux premiers essais de dissolution du bois de noyer avec l'[Emim]Ac commercial (Plazanet et al. 2015), nous avons tenté de solubiliser le bois de douglas par activation micro-onde avec ce LI ainsi qu'avec le [Bmim]Ac, le [Bmim]Cl et le [Bmim]BF<sub>4</sub>. Six activations de 1 min ont été réalisées à 200 W à une température inférieure à 80°C. L'avancement de la dissolution a été suivi par microscopie optique (Figure 42).



**Figure 42 : Cinétique de dissolution des particules d’aubier de douglas dans l’[Emim]Ac, le [Bmim]Ac, le [Bmim]Cl et le [Bmim]BF<sub>4</sub> suite à un une activation micro-onde à 200 W. Barre d’échelle : 50 µm.**

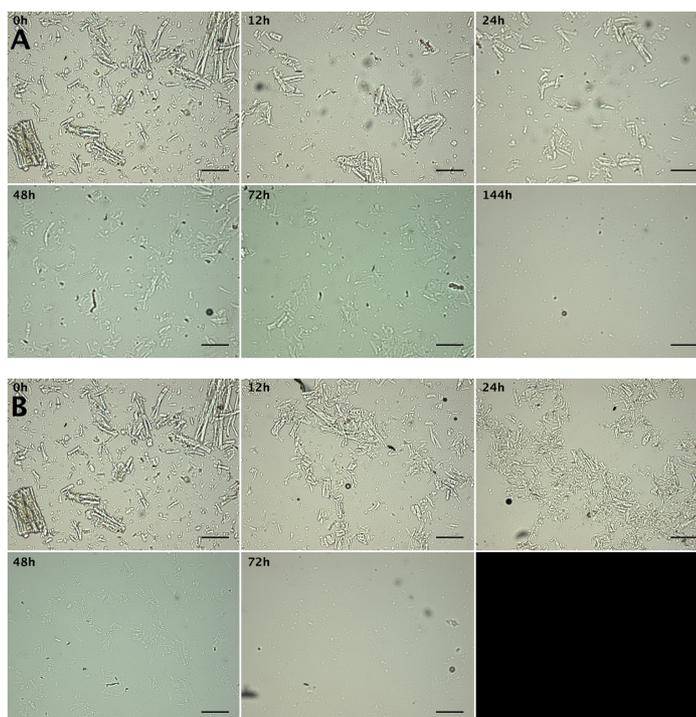
La dissolution totale du bois de douglas est observée après 6 min d’activation micro-onde à 200 W dans l’[Emim]Ac. En revanche à l’issue de ce traitement, des particules de bois sont encore visibles dans les 3 LI à cation [Bmim]. La dissolution est plus avancée dans le

[Bmim]Ac que dans les [Bmim]Cl et le [Bmim]BF<sub>4</sub>. C'est dans ce dernier que le bois de douglas est le moins bien solubilisé. D'après ces résultats, le cation [Emim] est plus efficace pour dissoudre le bois de douglas que le [Bmim]. Dans le cas du cation [Bmim], l'efficacité liée à l'anion est la suivante : acétate > chlorure > tétrafluoroborate.

En seulement 6 min d'activation micro-onde, la poudre de bois de douglas a été totalement dissoute dans l'[Emim]Ac (Figure 42). Afin de réduire les risques de dégradation des polymères au cours de la dissolution, une alternance de séquences d'activation/inactivation a été réalisée pour maintenir la température de la solution inférieure à 80°C. Dans nos conditions, il aura fallu 2 h pour réaliser 6 min d'activation micro-onde avec un cycle d'activation/inactivation de 1 min/20 min. Au regard des résultats obtenus et afin d'optimiser la méthode, nous avons opté pour une dissolution du bois par chauffage classique en bain d'huile.

### 3.3.1.3.2 Par chauffage classique

Les essais de dissolution de la poudre de bois de douglas ont été réalisés avec les 6 LIs synthétisés au laboratoire : [Emim]Br, [Emim]Ac, [Amim]Br, [Amim]Cl, DBUC<sub>4</sub>Br et DBUC<sub>4</sub>Cl. Dix milligrammes de poudre d'aubier ont été solubilisés dans 5,23 mmol de chacun des LIs à 80 ou à 100°C. L'avancement de la dissolution a été suivi par microscopie optique comme l'illustre la figure 43 dans le cas de l'[Emim]Br.



**Figure 43 : Cinétique de dissolution de particules d'aubier de douglas dans l'[Emim]Br à 80°C (A) et 100°C (B). Barre d'échelle : 150  $\mu$ m.**

Les temps pour obtenir une dissolution complète de la poudre d'aubier de douglas dans chacun des 6 LIs sont répertoriés dans le tableau 18.

**Tableau 18 : Temps de chauffage nécessaires pour dissoudre totalement la poudre d'aubier de douglas à 80 ou 100°C dans chacun des 6 LIs synthétisés.**

	80°C	100°C
[Emim]Br	144h	75h
[Emim]Ac	54h	28h
[Amim]Cl	54h	14h
[Amim]Br	96h	72h
DBUC <sub>4</sub> Br	144h	80h
DBUC <sub>4</sub> Cl	96h	75h

Les temps de dissolution de la poudre de bois sont variables d'un LI à l'autre. A 80°C, les LIs les plus performants sont l'[Emim]Ac et l'[Amim]Cl dans lesquels les particules de bois sont totalement dissoutes en 54 h, viennent ensuite l'[Amim]Br et le DBUC<sub>4</sub>Cl (96 h). Les moins efficaces étant l'[Emim]Br et le DBUC<sub>4</sub>Br pour lesquels il faut compter 6 jours pour dissoudre l'aubier de douglas. Quel que soit le LI, la dissolution est plus rapide à 100°C qu'à 80°C. A 100°C, la poudre de bois est totalement dissoute dans l'[Amim]Cl en 14 h. Deux fois plus de temps sont nécessaires avec l'[Emim]Ac et au moins six fois plus avec les autres LIs.

#### 3.3.1.4 Identification des polymères : comparaison des 6 liquides ioniques

Dans le premier article, la technique du dot-blot avait été utilisée pour caractériser la composition du bois de noyer. Cependant, le bois de douglas étant un bois plus coloré, cette technique a montré ses limites : la membrane se colorait par contact avec l'échantillon de bois dissout, ce qui empêchait la visualisation du marquage lors de l'étape de révélation. La technique ELISA a donc été envisagée comme alternative au dot-blot.

Un panel de 16 anticorps dirigés contre les polymères pariétaux a été utilisé. Quatre anticorps reconnaissent des épitopes d'homogalacturonanes (HGs) non-estérifiés (CCRC-M38 (Pattathil et al., 2010) et LM19 (Verhertbruggen et al., 2009)), partiellement méthylestérifiés (JIM7) (Knox et al., 1990) et méthylestérifiés (LM20) (Verhertbruggen et al., 2009). Trois anticorps reconnaissent des épitopes de RG I (CCRC-M14, CCRC-M35 et CCRC-M1) dont

un (CCRC-M1) qui reconnaît également les xyloglucanes fucosylés (Pattathil et al., 2010). LM15 et LM25 reconnaissent également des épitopes de xyloglucanes (motif XXXG pour le premier (Marcus et al., 2008) et XLLG, XXLG et XXXG pour le second (Pedersen et al., 2012)). LM5 reconnaît des épitopes de (1-4)- $\beta$ -D-galactanes (Jones et al., 1997), LM6 de (1-5)- $\alpha$ -L-arabinanes (Willats et al., 1998) et LM2 d'AGP (Yates et al., 1996). Deux anticorps détectent des épitopes de xylanes non ou peu substitués, LM10 et LM11, ce dernier reconnaissant également les arabinoxylanes (McCartney et al., 2005). Pour finir, LM21 et LM22 sont dirigés contre des épitopes de mannanes et glucomannanes. LM21 reconnaît également les galactomannanes (Marcus et al., 2010).

Avant d'analyser par ELISA les échantillons de bois dissout par chauffage à 80 et 100°C dans chacun des 6 LIs, des gammes de polymères commerciaux témoins ont été réalisées. Ces polymères purs ont été dissouts 3 h à 80°C (afin de se rapprocher des conditions de dissolution du bois) dans chacun des 6 LIs. Des quantités croissantes de polymères ont été déposées sur plaque ELISA.

Un marquage est observé avec tous les anticorps pour tous les polymères témoins, quel que soit le LI (Tableau 19). De plus, dans tous les cas, les droites de régression présentent des coefficients de régression linéaires supérieurs à 0,95 (Tableau 19). Le marquage est donc proportionnel à la quantité de polymère déposé, quel que soit le LI. En revanche, des variations quant à la sensibilité de la méthode (quantité minimale de polymère détectée) ont été identifiées. Le traitement des polymères par les LIs peut ainsi entraîner soit une dégradation des polymères soit des modifications chimiques de ces derniers conduisant à une réduction de leur affinité à la matrice de polycarbonate des plaques ELISA. Dans le cas de l'un des LIs, l'[Emim]Ac, le traitement des pectines s'est traduit par une caramélisation de la solution suggérant une dégradation de ces polymères ou la mise en place de réactions chimiques avec le LI. Les anticorps reconnaissant des épitopes précis des polymères, toute modification de ces derniers entraîne, comme dans notre expérience, une diminution de la sensibilité du test. Aucun changement de couleur de solution n'a été observé avec les autres LIs quel que soit le polymère. Les essais avec des polymères témoins n'ont pas été menés pour CCRC-M1 (aucun polymère de xyloglucane fucosylé commercial n'est disponible et absence de reconnaissance de la Gomme Karaya) ainsi que pour LM22 (absence de reconnaissance de la gomme guar ou des  $\beta$ -mannopentoses dissouts dans les LIs ou dans l'eau).

**Tableaux 19 : Coefficients de régression linéaire (R<sup>2</sup>), quantités minimales reconnues par l'anticorps et maximales avant saturation pour chacun des anticorps en fonction du LI.**

<b>CCRC-M38</b>		<b>Quantité de pectines (µg)</b>		<b>LM19</b>		<b>Quantité de pectines (µg)</b>	
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>
EmimBr	0,99	0,01	0,01	EmimBr	0,977	0,05	1
EmimAc	0,978	0,5	0,5	EmimAc	0,996	0,1	1
AmimCl	0,999	0,01	0,01	AmimCl	0,972	0,1	1
AmimBr	0,986	0,01	0,01	AmimBr	0,998	0,05	1
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,999	0,01	0,01	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,993	0,01	1
DBUC <sub>4</sub> Br	0,973	0,1	0,1	DBUC <sub>4</sub> Br	0,996	0,01	1
<b>JIM7</b>		<b>Quantité de pectines (µg)</b>		<b>LM20</b>		<b>Quantité de pectines (µg)</b>	
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>
EmimBr	0,996	0,01	0,5	EmimBr	0,999	0,01	0,1
EmimAc	0,995	0,1	0,5	EmimAc	0,99	0,1	1
AmimCl	0,991	0,001	0,01	AmimCl	0,999	0,001	0,01
AmimBr	0,985	0,0025	0,025	AmimBr	0,934	0,001	0,01
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,981	0,001	0,01	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,998	0,001	0,05
DBUC <sub>4</sub> Br	0,958	0,001	0,01	DBUC <sub>4</sub> Br	0,999	0,001	0,05
<b>CCRC-M14</b>		<b>Quantité de Gomme Karaya (µg)</b>		<b>CCRC-M35</b>		<b>Quantité de Gomme Karaya (µg)</b>	
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>
EmimBr	0,98	0,005	0,5	EmimBr	0,985	0,1	5
EmimAc	0,992	0,005	0,5	EmimAc	0,995	0,5	1
AmimCl	0,984	0,1	1	AmimCl	0,986	0,1	5
AmimBr	0,994	0,005	0,5	AmimBr	0,99	0,05	1
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,998	0,1	1	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,983	0,1	5
DBUC <sub>4</sub> Br	0,95	0,1	1	DBUC <sub>4</sub> Br	0,968	0,1	5
<b>LM15</b>		<b>Quantité de xyloglucanes (µg)</b>		<b>LM25</b>		<b>Quantité de xyloglucanes (µg)</b>	
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>
EmimBr	0,996	0,1	1	EmimBr	0,993	0,001	0,1
EmimAc	0,991	0,05	0,5	EmimAc	0,991	0,001	0,5
AmimCl	0,957	0,5	1	AmimCl	0,996	0,005	0,25
AmimBr	0,973	0,1	2,5	AmimBr	0,978	0,001	0,5
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,997	0,25	2,5	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,988	0,01	1
DBUC <sub>4</sub> Br	0,999	0,1	2,5	DBUC <sub>4</sub> Br	0,99	0,005	1
<b>LM5</b>		<b>Quantité d'arabinanes (µg)</b>		<b>LM6</b>		<b>Quantité d'arabinanes (µg)</b>	
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>
EmimBr	0,983	0,1	1	EmimBr	0,955	0,05	1
EmimAc	0,996	0,1	1	EmimAc	0,96	0,01	2,5
AmimCl	0,996	0,1	1	AmimCl	0,99	0,1	1
AmimBr	0,998	0,1	5	AmimBr	0,999	0,1	2,5
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,988	0,1	0,5	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,999	0,1	2,5
DBUC <sub>4</sub> Br	0,998	0,1	1	DBUC <sub>4</sub> Br	0,997	0,05	0,25
<b>LM2</b>		<b>Quantité de gomme arabique (µg)</b>					
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Minimale</b>	<b>Maximale</b>				
EmimBr	0,983	0,001	0,01				
EmimAc	0,972	0,001	0,1				
AmimCl	0,99	0,005	0,05				
AmimBr	0,988	0,001	0,05				
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,98	0,005	0,05				
DBUC <sub>4</sub> Br	0,998	0,01	0,11				

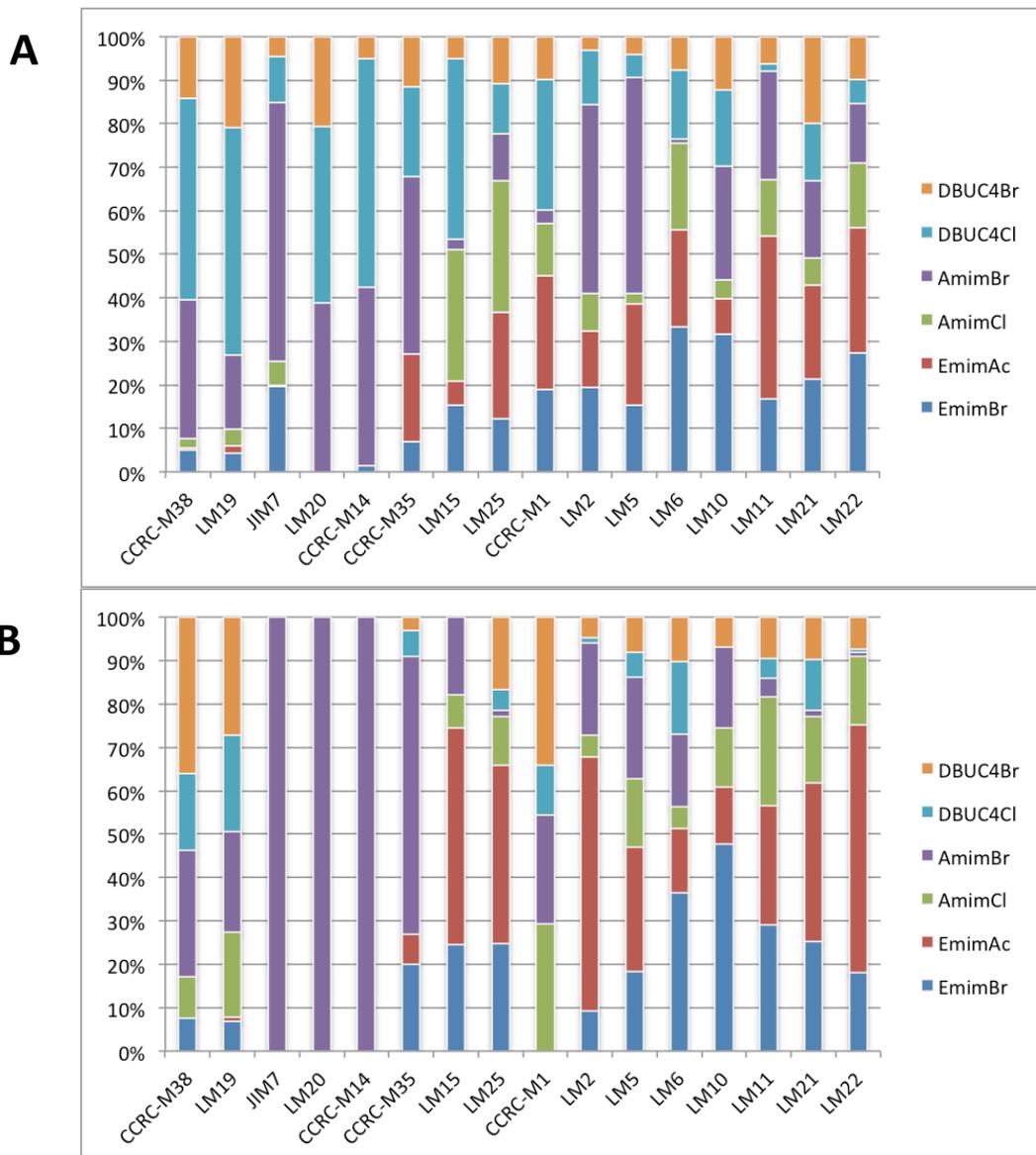
LM10	Quantité de xylanes ( $\mu\text{g}$ )			LM11	Quantité de xylanes ( $\mu\text{g}$ )		
	R <sup>2</sup>	Minimale	Maximale		R <sup>2</sup>	Minimale	Maximale
EmimBr	0,997	0,05	1	EmimBr	0,999	0,1	1
EmimAc	0,909	0,1	2,5	EmimAc	0,992	0,25	5
AmimCl	0,983	0,05	0,5	AmimCl	0,972	0,01	0,1
AmimBr	0,992	0,05	1	AmimBr	0,97	0,25	5
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,998	0,05	0,5	DBUC <sub>4</sub> Cl	0,997	0,1	1
DBUC <sub>4</sub> Br	0,964	0,01	1	DBUC <sub>4</sub> Br	0,973	0,1	2,5

LM21	Quantité de Gomme guar ( $\mu\text{g}$ )		
	R <sup>2</sup>	Minimale	Maximale
EmimBr	0,997	0,005	0,05
EmimAc	0,999	0,01	0,05
AmimCl	0,997	0,005	0,05
AmimBr	0,999	0,01	0,05
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,974	0,1	0,5
DBUC <sub>4</sub> Br	0,999	0,05	0,5

Les 6 LIs testés n'interfèrent pas avec la reconnaissance des polymères par les anticorps et le marquage est proportionnel à la quantité de polymère déposée sur plaque ELISA. Cette technique peut, par conséquent, être appliquée aux échantillons de bois. Les échantillons de bois dissouts dans chacun des LIs ont donc été analysés avec le set des 16 anticorps. Les résultats sont présentés pour un même anticorps sous forme de pourcentage relatifs de marquage (DO) pour chacun des LIs (Figure 44). Pour un même anticorps, les marquages diffèrent en fonction du LI utilisé pour dissoudre le bois. Dans le cas du DBUC<sub>4</sub>Br et pour une température de dissolution de 80°C (Figure 44A), de faibles marquages sont observés avec tous les anticorps. Certains marquages de pectines et de xyloglucanes disparaissent pour une température de dissolution de 100°C (Figure 44B). A 80°C, les marquages sont en général plus importants avec le DBUC<sub>4</sub>Cl, LI pour lequel les marquages des pectines (HG et RG I) sont parmi les plus forts des 6 LIs étudiés. Malgré ces résultats, le DBUC<sub>4</sub>Cl ainsi que le DBUC<sub>4</sub>Br n'ont pas été sélectionnés pour cette méthode du fait d'une forte viscosité de la solution après dissolution du bois. Le bois dissout dans l'[Amim]Cl présente un marquage des plus faibles pour les pectines (HG et RG I) et les xylanes. Des marquages des pectines faibles, voire inexistant, sont également relevés dans le cas de l'[Emim]Ac aussi bien à une température de dissolution de 80°C que de 100°C. Ces deux LIs n'ont donc pas été sélectionnés non plus pour l'application de la méthode. En comparant les résultats obtenus pour l'[Emim]Br et l'[Amim]Br à 80°C (Figure 44A), des marquages plus importants sont observés pour l'[Amim]Br pour les pectines, les AGPs et les galactanes, tandis qu'ils sont plus forts dans le cas de l'[Emim]Br pour les arabinanes, les xyloglucanes et les mannanes. A une température de dissolution de 100°C (Figure 44B), certains marquages de pectines disparaissent dans le cas de l'[Emim]Br. Seul le bois dissout à 100°C dans l'[Amim]Br

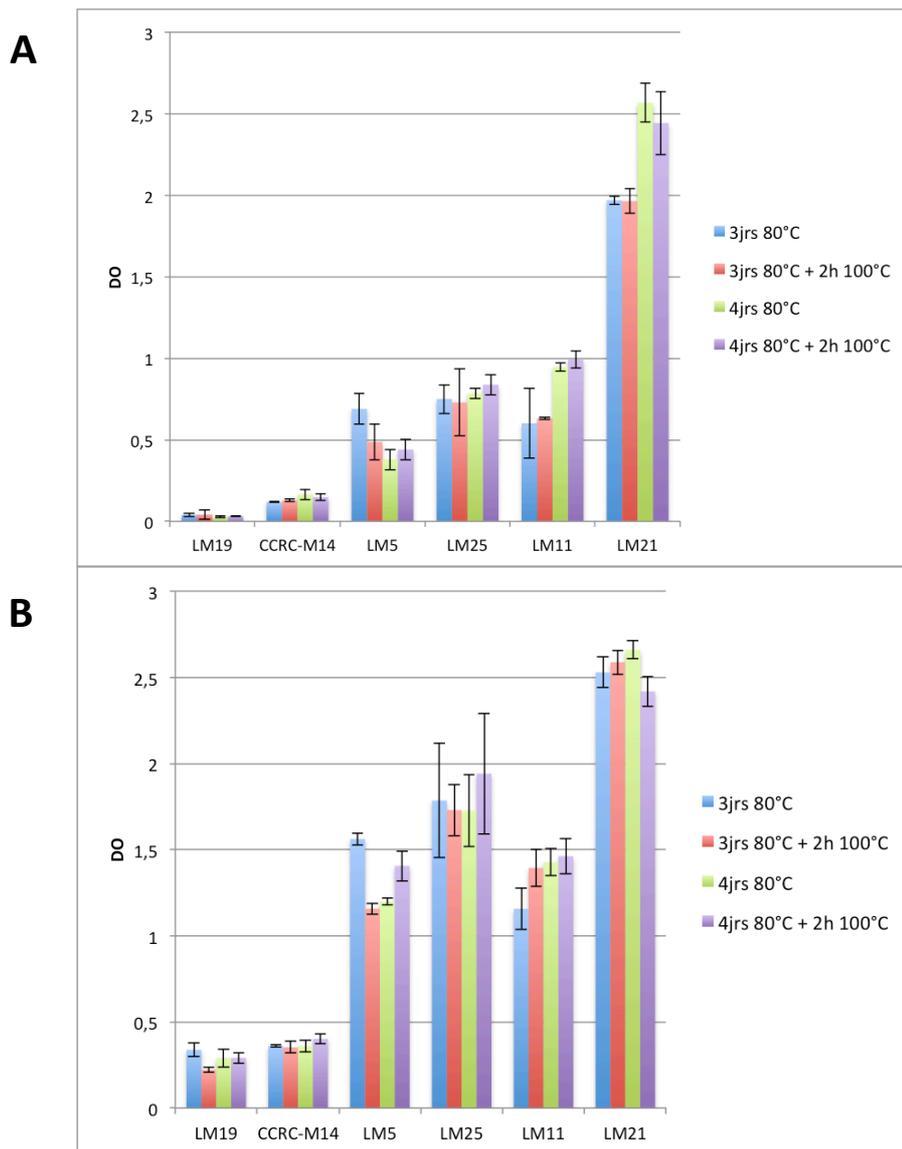
présente un marquage avec les anticorps CCRC-M14, LM20 et JIM7. En revanche dans ce LI, le marquage est plus faible que pour l'[Emim]Br pour les xylanes, les mannanes, les arabinanes et les xyloglucanes. Bien que ces deux LIs présentent tous les deux des spécificités intéressantes pour la solubilisation et la détection des polymères du bois, notre choix s'est porté sur l'[Emim]Br (l'[Amim]Br dégage une odeur désagréable lors de son chauffage, ce qui contraignait son utilisation sous hotte). La température de dissolution de 80°C a été retenue, de par l'observation d'une absence de marquage pour certains polymères après une dissolution à 100°C dans ce LI. Ce constat implique une possible dégradation de ces polymères ou des modifications des épitopes reconnus par les anticorps après une dissolution du bois à 100°C. Ces dégradations/modifications sont également possibles à 80°C. Cependant, dans la mesure où tous les échantillons de bois seront traités de la même manière (même température et même temps de dissolution), ces dégradations/modifications devraient être du même ordre de grandeur pour tous les échantillons permettant ainsi la comparaison de leur composition biochimique à l'aide de la technique IL/ELISA.



**Figure 44 : Pourcentages relatifs de marquage pour chaque anticorps après dissolution du bois dans chacun des six LI à 80°C (A) ou 100°C (B) (les valeurs de DO sont données en annexe 1).**

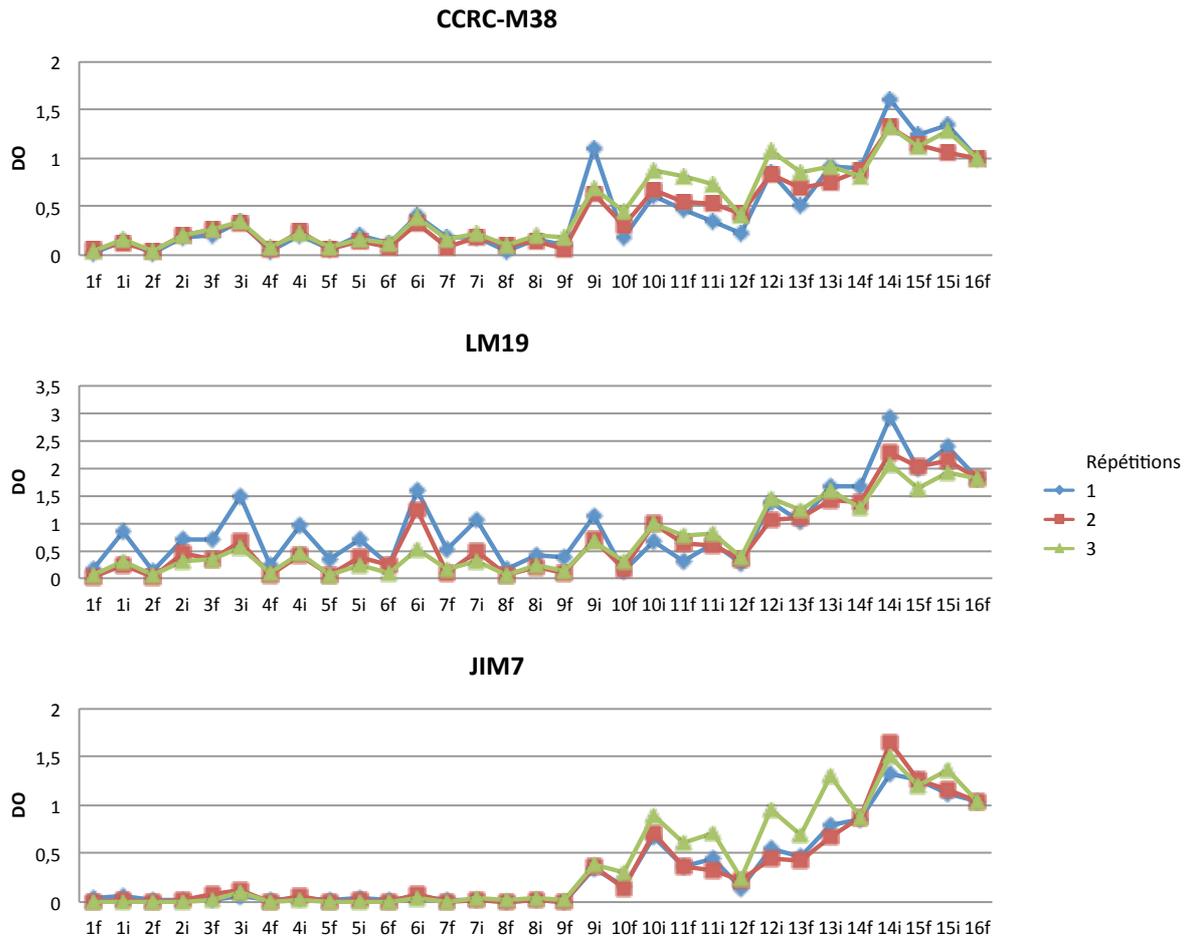
Six jours à 80°C dans l’[Emim]Br étaient nécessaires pour dissoudre complètement la poudre de bois d’aubier externe de douglas broyé au Danguomeau. En revanche, seuls 3 jours dans ce LI ont suffi pour dissoudre totalement la poudre de bois d’aubier ou de duramen broyée dans l’azote liquide au broyeur à bille Retsch. Ceci peut s’expliquer par une plus grande finesse de la poudre broyée dans l’azote liquide. De nouveaux essais ont donc été menés avec l’[Emim]Br à partir de poudre de bois initial et de bois final en combinant le traitement à 80°C et à 100°C afin de voir s’il y avait une amélioration de la sensibilité de la méthode pour les anticorps choisis (un anticorps par type de polymère a été sélectionné dans le cadre de cet essai). Les traitements suivants ont donc été comparés : 3 jours de dissolution à 80°C, 4 jours

de dissolution à 80°C, 3 jours de dissolution à 80°C suivi de 2 h à 100°C et 4 jours de dissolution à 80°C suivi de 2 h à 100°C. Concernant les résultats pour le bois initial (Figure 45), les marquages sont comparables quel que soit le traitement de dissolution pour les anticorps CCRC-M14, LM25, LM19, LM11 et LM21. Pour l'anticorps LM5, le marquage est plus intense pour le traitement de 3 jours à 80°C dans le cas du bois final (Figure 45B) et du bois initial (Figure 45A). Pour ce dernier, une différence de marquage est également observée pour LM21 et LM11 pour lesquels les marquages sont plus intenses après 4 jours à 80°C suivi ou non de 2 h à 100°C. Quoiqu'il en soit les différences de marquage entre les traitements sont faibles, signe que ces différences de temps de dissolution et de température n'impactent que très peu le processus de dissolution ou encore la dégradation des polymères. D'après ces résultats, le traitement retenu pour l'étude de la composition des carottes de bois de douglas est la dissolution à 80°C pendant 4 jours dans l'[Emim]Br.



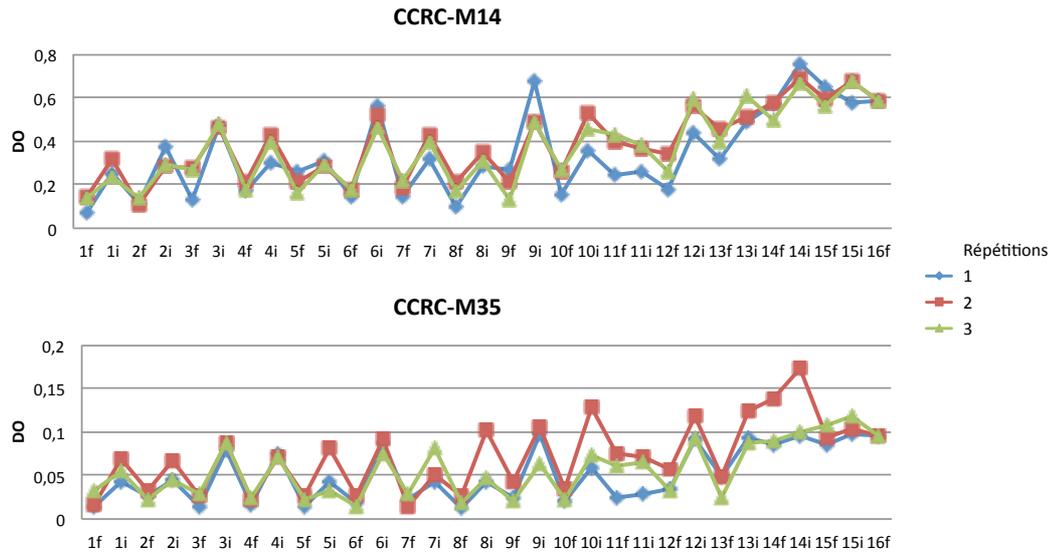
**Figure 45 : Intensité du marquage (DO) avec certains anticorps en fonction du temps et de la température de dissolution du bois de douglas (rondelle de bois du génotype 3, prélèvement de printemps, A : bois initial de la 9<sup>ème</sup> cerne à partir du cambium, B : bois final de la 13<sup>ème</sup> cerne à partir du cambium). Quantités de « bois dissout » déposées : 10 µg pour CCRC-M14 et LM19, 5 µg pour LM25 et LM5, 0,5 µg pour LM11 et 0,2 µg pour LM21. Dissolution en triplicata.**

Avant d'appliquer cette méthode à l'étude de la composition des carottes de bois de douglas, une répétition en triplicata (dissolution et analyse ELISA) a été réalisée à partir du bois initial et du bois final de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas (génotype 3, printemps) avec les 16 anticorps (Figures 46 à 51).



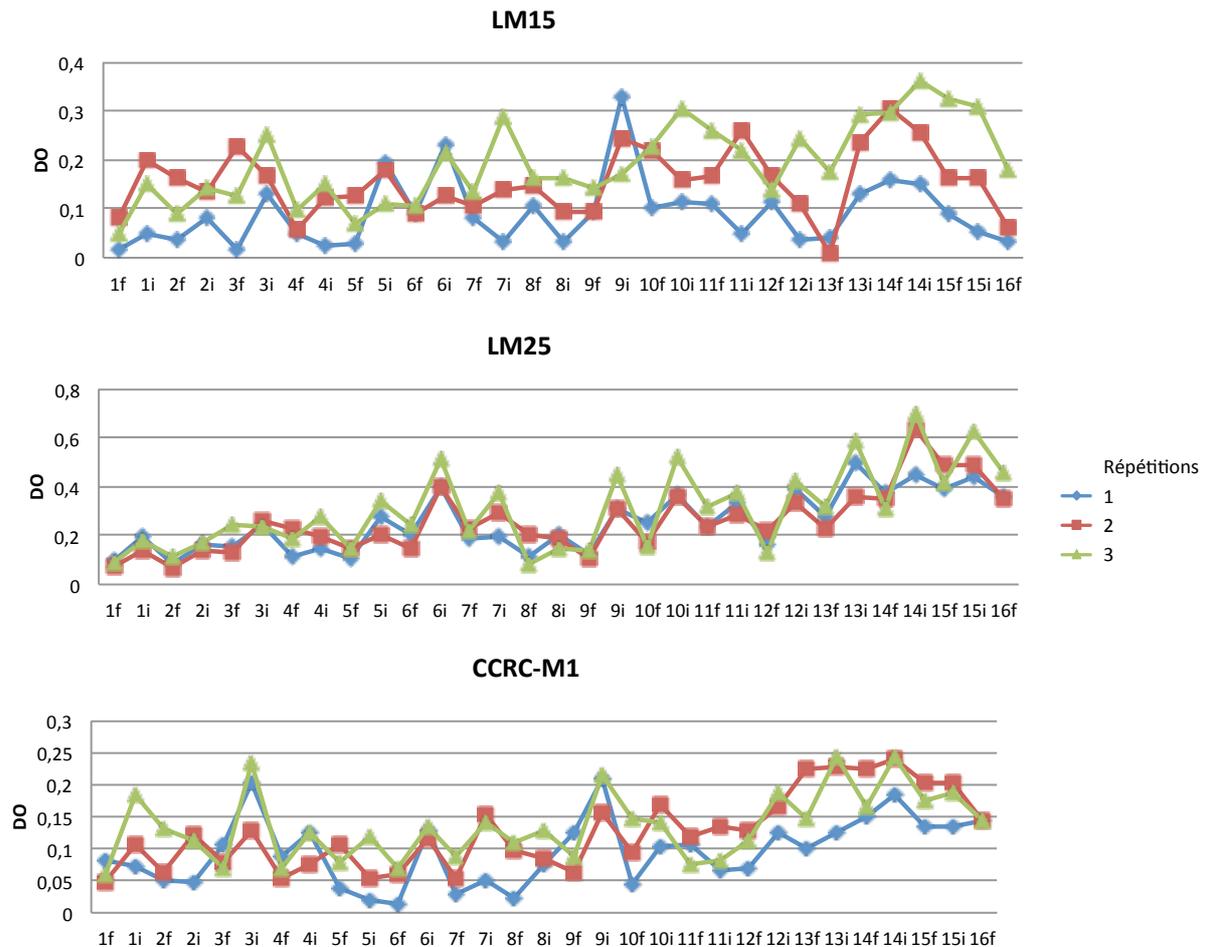
**Figure 46 : Intensité du marquage (DO) pour les HGs pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cerne d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

Concernant les HGs (anticorps CCRC-M38, LM19 et JIM7, Figure 46), bien que quelques variations de marquage soient observées pour certains échantillons pour l'une des trois répétitions, les tendances de marquage restent les mêmes. Ce test a également permis de voir des différences en terme de proportion d'HGs en fonction du type de bois. En effet, des proportions plus importantes sont observées dans le bois initial comparé au bois final. Aucun marquage n'a pu être visualisé pour l'anticorps LM20.



**Figure 47 : Intensité du marquage (DO) pour les RG I pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cerne d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

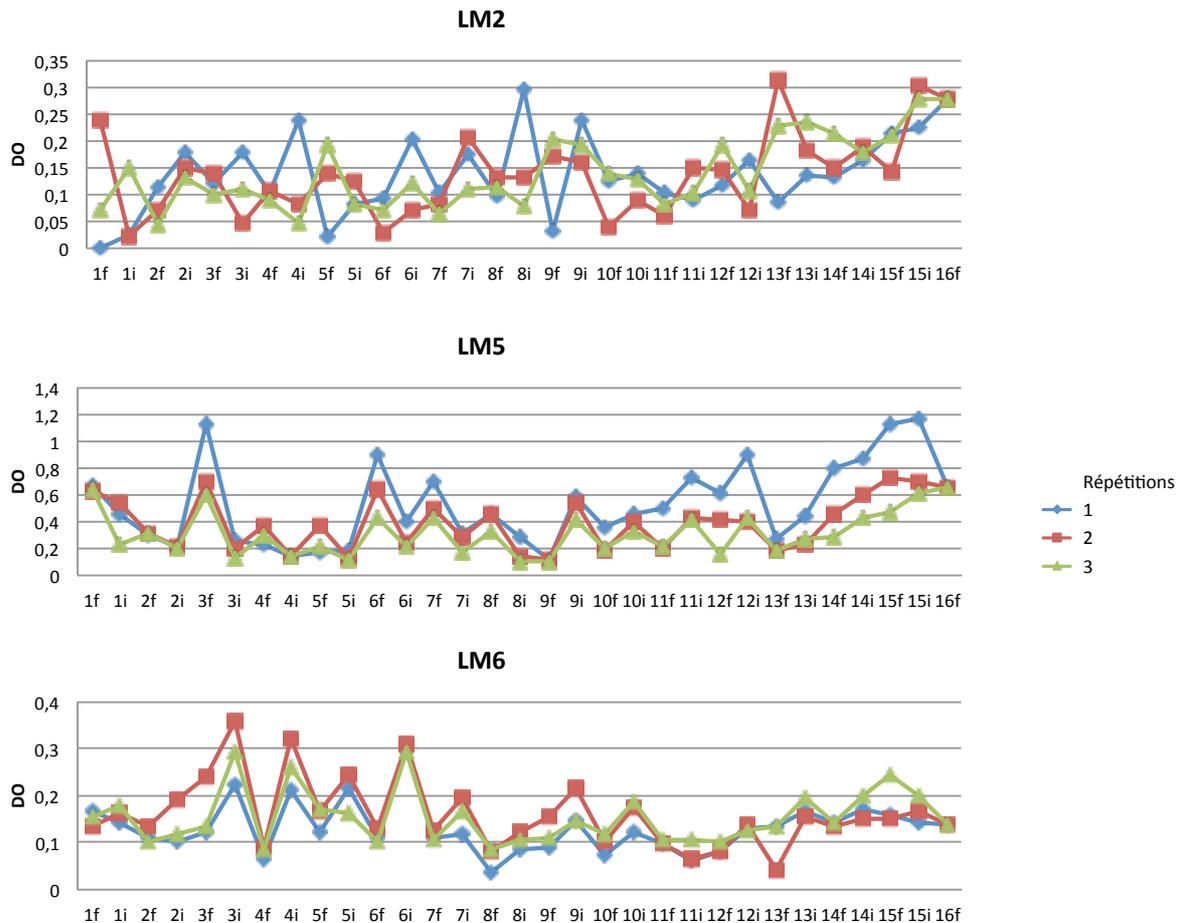
Les tendances de marquages observées pour les RG I (Figure 47) sont presque identiques pour les trois répétitions dans le cas de l'anticorps CCRC-M14. Des variations apparaissent pour l'une des répétitions dans le cas de CCRC-M35, mais les tendances restent similaires. Des proportions plus fortes de RG I sont remarquées dans le bois initial.



**Figure 48 : Intensité du marquage (DO) pour les xyloglucanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cerne d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

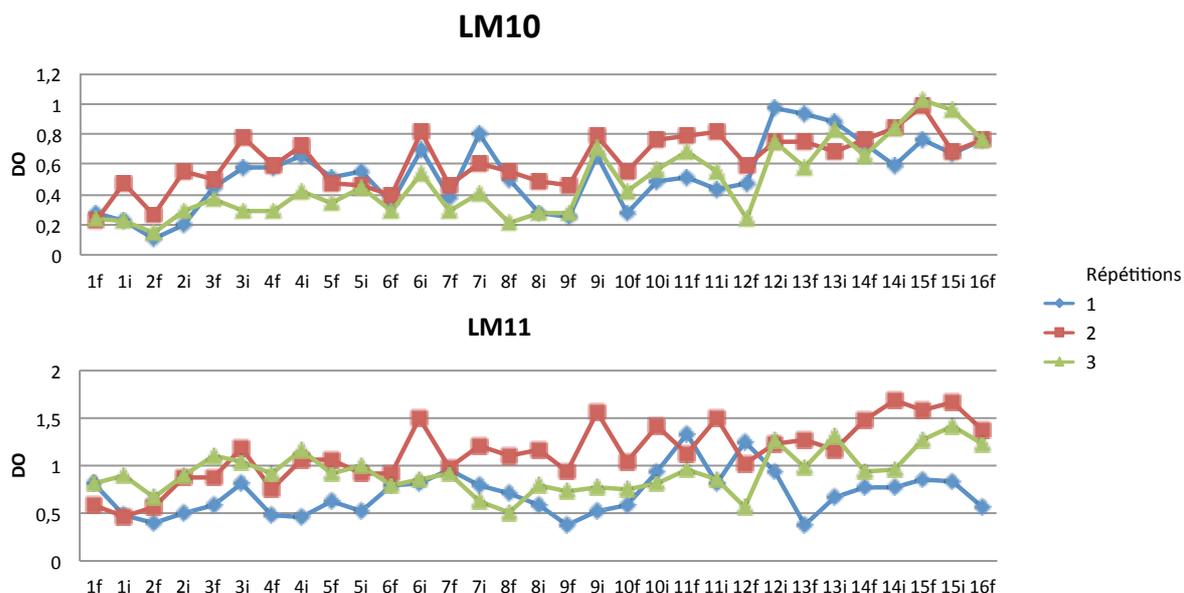
Concernant les xyloglucanes, la technique est reproductible pour l'anticorps LM25. En revanche quelques variations de marquages sont observées entre les répétitions dans le cas des xyloglucanes fucosylés (CCRC-M1) et la technique n'est pas reproductible avec l'anticorps LM15 (Figure 48). Ceci peut s'expliquer par une limite de sensibilité de la méthode du fait de faibles proportions d'épitopes de xyloglucanes reconnus par CCRC-M1 et LM15 dans le bois (les intensités de DO ne dépassent pas 0,3 pour une quantité déposée de 20 µg de « bois dissout ») ou par un manque d'homogénéité de la solubilisation dans le LI des XGs à motif XLFG, XFFG, XXFG et XXXG ou encore par un manque d'affinité de ces polymères pour le polycarbonate des plaques ELISA.

Les résultats obtenus avec l'anticorps LM25 permettent de voir que la proportion de xyloglucanes est plus importante dans le bois initial que dans le bois final.



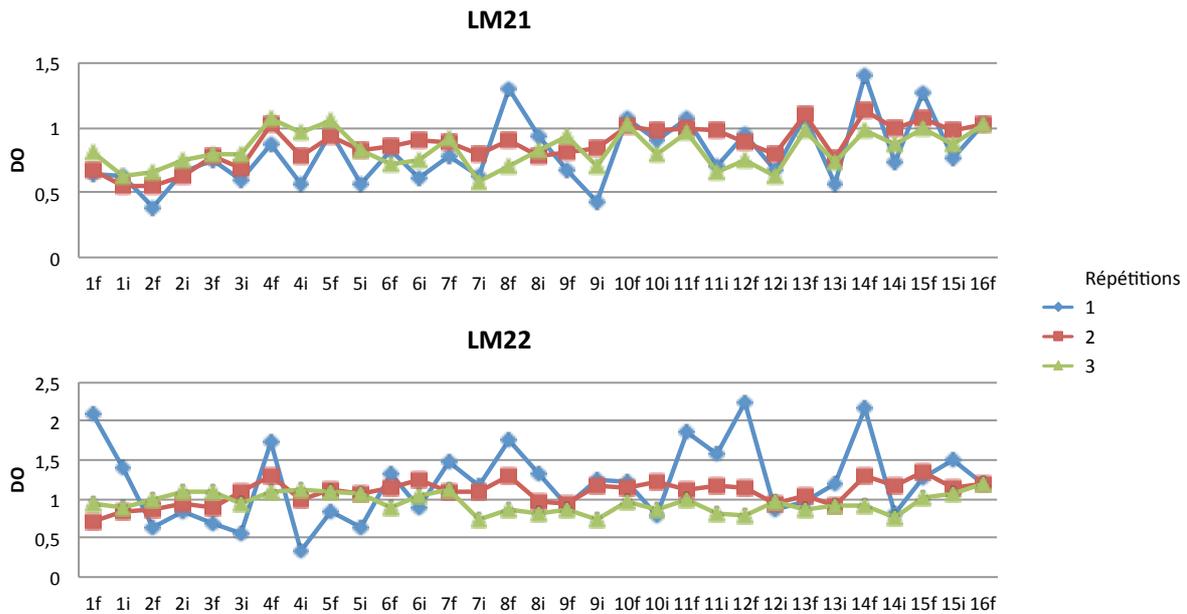
**Figure 49 : Intensité du marquage (DO) pour les AGPs (LM2), les galactanes (LM5) et les arabinanes (LM6) pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cerne d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

Dans le cas des AGPs (LM2, Figure 49), des variations sont observées entre les marquages des trois répétitions, la technique n'est donc pas reproductible pour ces polymères. Les mêmes raisons que celles précédemment invoquées pour les XGs peuvent expliquer ce manque de reproductibilité. Même si des variations de marquage sont constatées pour certains échantillons pour les galactanes et les arabinanes, globalement, les marquages suivent des évolutions similaires (LM5 et LM6, Figure 49). Concernant les galactanes, des proportions plus importantes sont observées dans le bois final de l'aubier alors que pour le duramen, cette tendance s'inverse. Dans le cas des arabinanes, le marquage est nettement plus intense dans le bois initial de l'aubier que dans son bois final, en revanche les tendances sont moins tranchées dans le duramen.



**Figure 50 : Intensité du marquage (DO) pour les xylanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cernes d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

Les intensités de marquage pour les xylanes (LM10 et LM11, Figure 50) présentent des variations entre les répétitions pour un même cerne. Ces variations sont d'autant plus marquées dans le cas de LM11. Un manque d'homogénéité dans la dissolution du bois par le LI, notamment dans la solubilisation de ce polymère, peut donc intervenir. Quoiqu'il en soit, des tendances des marquages restent visibles avec l'anticorps LM10. De plus, ces résultats tendraient à montrer que les xylanes sont en plus grande proportion dans le bois initial, notamment au niveau de l'aubier (les tendances sont moins nettes pour les cernes les plus au centre du duramen).



**Figure 51 : Intensité du marquage (DO) pour les mannanes pour le bois initial (i) et le bois final (f) de chacun des cerne d'une rondelle de bois de douglas de l'aubier externe (cerne 1) jusqu'à la moelle (16). Dissolution en triplicata dans l'[Emim]Br 4 jours à 80°C.**

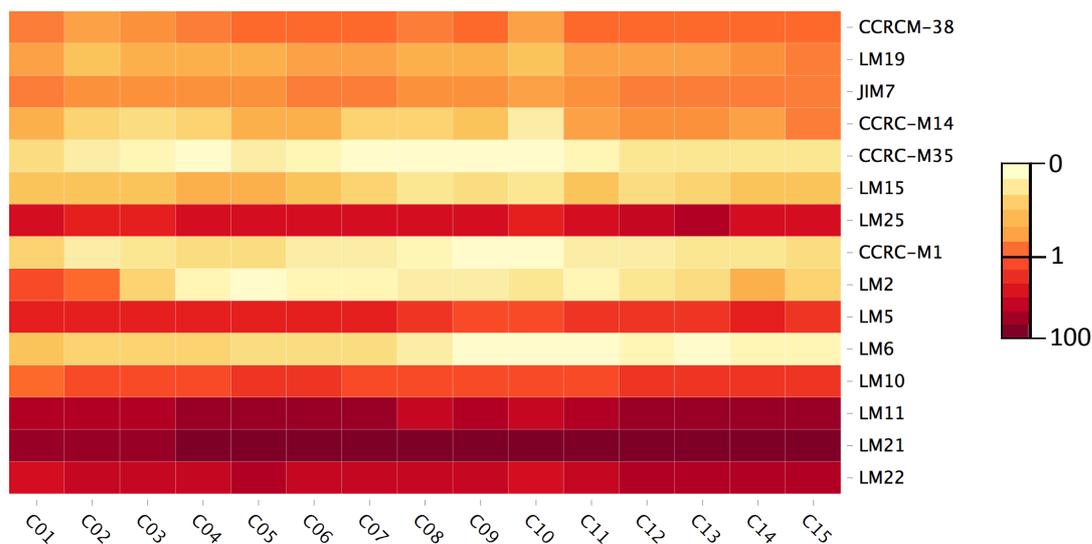
Dans le cas des mannanes (anticorps LM21 et LM22, Figure 51), la première répétition donne des résultats différents pour de nombreux cerne par rapport aux données collectées pour les répétitions 2 et 3, notamment pour l'anticorps LM22. En revanche, les tendances en terme d'intensité de marquage observées pour les répétitions 2 et 3 sont similaires, malgré quelques écarts de valeurs. La solubilisation des mannanes dans l'[Emim]Br ne paraît donc pas toujours homogène. Les intensités de marquage avec LM21 montrent que les mannanes sont en proportion plus importante dans le bois final que dans le bois initial.

De tous ces résultats d'analyses ELISA, il a été constaté au niveau des trois répétitions, des différences de marquage avec la majorité des anticorps pour un même échantillon. Malgré ces différences, les tendances de marquage restent visibles pour tous les polymères excepté pour les AGPs (LM2), certains xyloglucanes (LM15 et CCRC-M1) et xylanes (LM11). Nous pouvons conclure que la méthode permet d'observer les tendances globales en terme de proportion de polymères d'un échantillon à l'autre mais sa sensibilité n'est pas suffisante pour évaluer précisément les différences dans le cas où les proportions sont relativement proches. La composition des carottes de bois de douglas prélevées à Saint-Gence a donc été étudiée cerne par cerne à l'aide de cette méthode d'analyse.

### 3.3.1.5 Application à l'étude de la composition de carottes de bois

Les tendances observées en terme d'évolution du marquage pour chaque anticorps sont présentées en rassemblant les résultats de toutes les carottes (Figures 53 à 58). La figure 52 compare, dans un premier temps, les marquages obtenus pour une seule carotte de bois avec chacun des anticorps pour une même quantité de « bois dissout » analysée, afin d'observer les proportions relatives de chacun des polymères pariétaux dans le bois de douglas. Les colonnes de la heatmap correspondent au numéro des cernes à partir du cambium (C01 étant le cerne le plus à la périphérie du tronc et C15, le plus proche de la moelle) et les lignes correspondent aux anticorps utilisés. L'anticorps présentant le marquage le plus intense, quel que soit le cerne de la carotte, est le LM21. Cet anticorps est dirigé contre des épitopes de mannanes, glucomannanes et galactomannanes. Dans la mesure où LM22, qui reconnaît uniquement des épitopes de mannanes et glucomannanes, montre un marquage moins intense qu'avec LM21, le bois de douglas contient une proportion importante de galactomannanes. Quoi qu'il en soit, les mannanes substitués ou non sont, parmi les polymères analysés, les plus représentés dans le bois de douglas. Un marquage très intense est également observé pour LM11, anticorps reconnaissant, tout comme LM10, les xylanes peu ou pas substitués mais aussi les arabinoxylanes. Le marquage avec LM11 est plus important qu'avec LM10, ce qui montre que les arabinoxylanes sont les xylanes les plus abondants dans le bois de douglas. Le marquage le plus fort observé est ensuite obtenu avec LM25, anticorps reconnaissant les épitopes de xyloglucanes à motifs XLLG, XXLG et XXXG. Un marquage bien moins intense étant observé avec LM15 qui reconnaît les épitopes de xyloglucanes à motif XXXG, les xyloglucanes du bois de douglas semblent majoritairement être à motif XLLG et/ou XXLG, c'est à dire avec des résidus galactose dans les chaînes latérales. L'intensité des marquages obtenue avec LM5 (anticorps dirigés contre des épitopes de galactanes) vient après celle obtenue avec LM25. Les marquages sont beaucoup plus faibles dans le cas des pectines (HGs et RGI), des arabinanes et des AGPs. Pour ces dernières, un marquage plus fort est observé avec LM2 pour les deux premiers cernes côté cambium. Concernant les pectines, le marquage est plus important avec CCRC-M38 que LM19 alors que ces anticorps reconnaissent tous les deux des épitopes d'HGs non-estérifiés. JIM7, reconnaissant les HGs partiellement méthylestérifiés, présente un marquage intermédiaire entre CCRC-M38 et LM19. Aucun marquage n'est observé avec LM20 qui reconnaît des épitopes d'HGs méthylestérifiés. Il a cependant été constaté dans l'[Emim]Br une perte de marquage avec cet anticorps (Figure 44). Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'importance des HGs non méthylestérifiés

par rapport à ceux qui le sont avec cette technique d'analyse du fait d'une perte des épitopes reconnus par LM20 suite au traitement par le LI. Les marquages obtenus avec CCRC-M14, et dans une plus grande mesure avec CCRC-M35, sont plus faibles que ceux obtenus pour les HGs. Les RG I, polymères reconnus par ces anticorps, sont donc en plus faible proportion que les HGs dans le bois de douglas. CCRC-M1 qui reconnaît des épitopes de RG I et de xyloglucanes fucosylés présente, avec LM6 (anticorps dirigés contre les arabinanes), le plus faible marquage. Ces résultats sont identiques pour toutes les carottes de bois analysées.



**Figure 52 : Intensité des marquages pour chaque cerne de la carotte de bois de douglas T2 2 en fonction de l'anticorps pour 20 µg de « bois dissout ». Les valeurs de DO, comprises entre 0 et 100, ont été ramenées en échelle logarithmique (les valeurs de DO sont données en annexe 2).**

Les proportions en polymères pariétaux de l'aubier externe jusqu'au cœur du duramen ont été analysées cerne par cerne pour chaque anticorps et pour toutes les carottes de bois prélevées périodiquement à Saint-Gence. Les résultats sont présentés sous forme de heatmap où les lignes correspondent au numéro des cernes à partir du cambium et les colonnes correspondent aux numéros des carottes qui sont regroupées par arbres en fonction de la date de prélèvement (pour exemple, les 4 premières colonnes de gauche correspondent aux carottes prélevées sur l'arbre 1 aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>6</sub> et T<sub>11</sub> (cf Matériel et méthodes, Chapitre 1). Pour chaque carotte, la limite duramen/TZ est spécifiée par un trait horizontal bleu. Les valeurs de DO ont été ramenées entre 0 et 1 pour chaque carotte. La distribution des polymères pariétaux étudiés s'organise suivant 3 groupes distincts : les polymères indifféremment distribués le long de la carotte, les polymères présents principalement dans l'aubier et ceux essentiellement retrouvé

dans le duramen. Cette distribution est dans certains cas identique pour une famille de polymère alors que pour d'autre, la distribution dépend de l'épitope reconnu.

Parmi les polymères indifféremment distribués, se trouvent les AGPs (Figure 55), les xyloglucanes de type XXXG et fucosylés (Figure 56), et les mannanes, glucommananes et galactommananes (Figure 28). Pour ces polymères, il a précédemment été constaté un manque de reproductibilité de la méthode (Figures 48, 49 et 51) qui pourrait expliquer les variations de marquage observées, notamment celles pour un même cerne entre carottes d'un même arbre. Dans le cas où la méthode n'est pas remise en question, ces variations pourraient résulter de différences de composition biochimique ou de proportion entre bois initial et bois final au sein d'un même cerne en fonction de la zone de carottage. En effet, les carottes n'ont pas toujours été prélevées dans le même axe par rapport au tronc et parfois avec des variations de hauteur allant jusqu'à 30 cm.

Concernant les polymères ayant une proportion prédominante dans l'aubier, se trouvent les arabinanes (Figure 56, LM6). En effet, les marquages avec LM6 tendent à diminuer au niveau du 10<sup>ème</sup> cerne à partir du cambium qui correspond plus ou moins à la limite aubier/duramen. Cependant, les 4 profils obtenus pour l'arbre 8 (arbre mort avant le début des prélèvements de carottes) ne suivent pas cette tendance et des proportions plus élevées sont observées dans le duramen.

Les polymères retrouvés en proportions majoritaires dans le duramen sont les pectines (HG et RGI, Figures 53 et 54), les xyloglucanes à motif XXLG et/ou XLLG (Figure 55, LM25), les xylanes (Figure 57) et, pour la plupart des carottes les galactanes (Figure 56, LM5). Concernant ces derniers, certains cernes de l'aubier montrent des teneurs plus élevées en galactanes que ceux du duramen pour certaines carottes des arbres 2 et 7, tandis que l'inverse est observé pour la plupart des autres carottes. Des variations de proportion de ce polymère sont nettement visibles pour un même cerne entre les carottes d'un même arbre. Pour ce qui est des HGs non méthylestérifiés (Figure 53, CCRC-M38 et LM19) et partiellement méthylestérifiés (Figure 53, JIM7), leurs proportions sont élevées dans le ou les premiers cernes d'aubier externe puis diminuent jusqu'au duramen où elles augmentent de nouveau à partir du 10-11<sup>ème</sup> cerne à partir du cambium. L'anticorps LM20 reconnaissant les HGs méthylestérifiés ne présentait aucun marquage pour tous les cernes de toutes les carottes analysées, signe d'une absence de ces polymères ou d'une dégradation suite au traitement dans le LI (comme cela a été constaté avec l'[Emim]Br Figure 44). Les proportions en RG I suivent la même tendance générale que celle des HGs, même si certains cernes de l'aubier

interne présentent des teneurs élevées en RG I (Figure 54, CCRC-M14). Les données n'ont pas été collectées pour l'anticorps CCRC-M35. Les taux de marquage obtenus pour les xylanes (Figure 57) sont également plus importants dans le duramen. Cependant, certains cernes appartenant à des carottes différentes mais prélevées sur un même arbre montrent d'importantes variations d'intensité. Ce constat a été réalisé pour tous les polymères, de manière plus ou moins importante en fonction des anticorps.

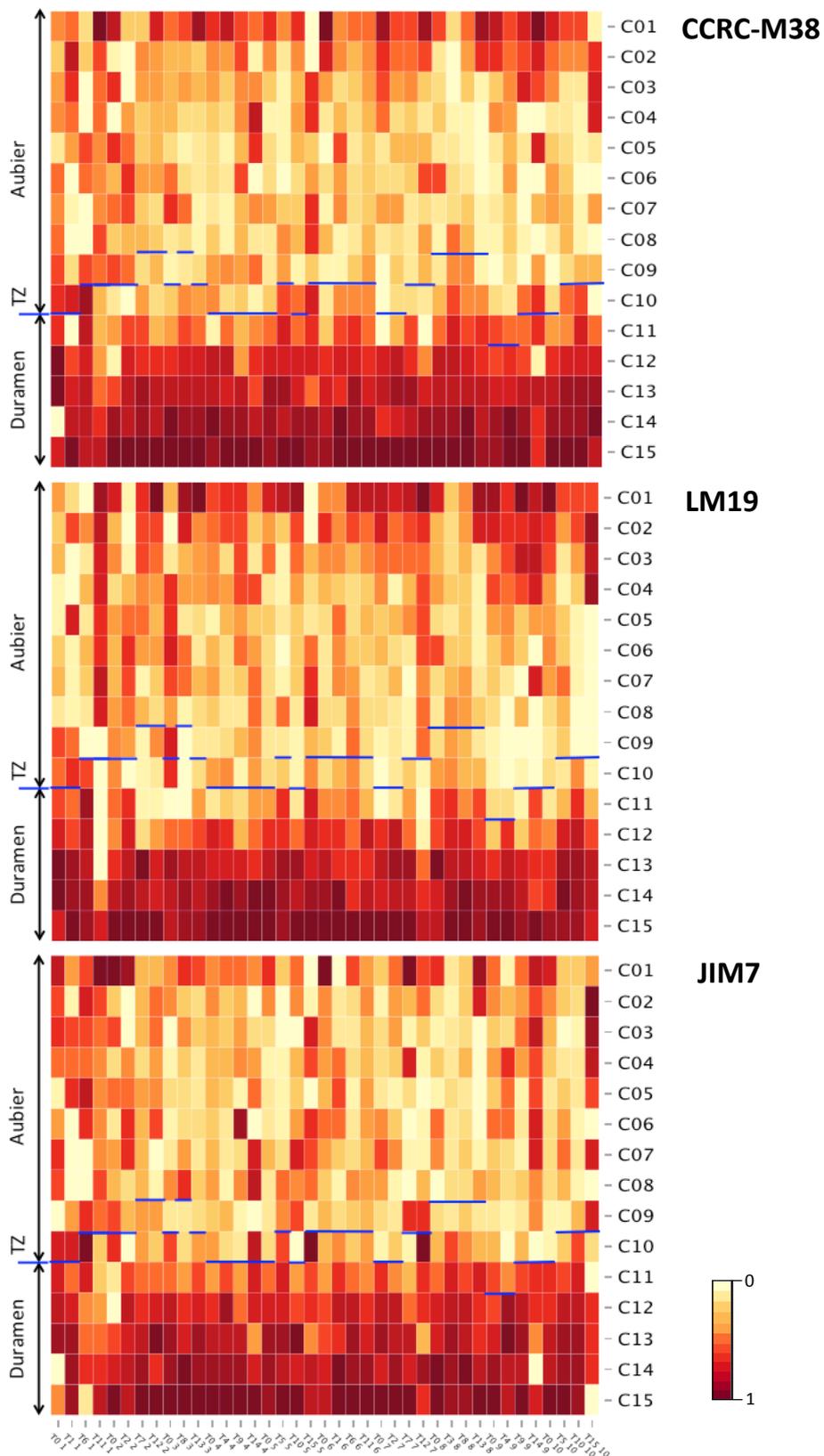
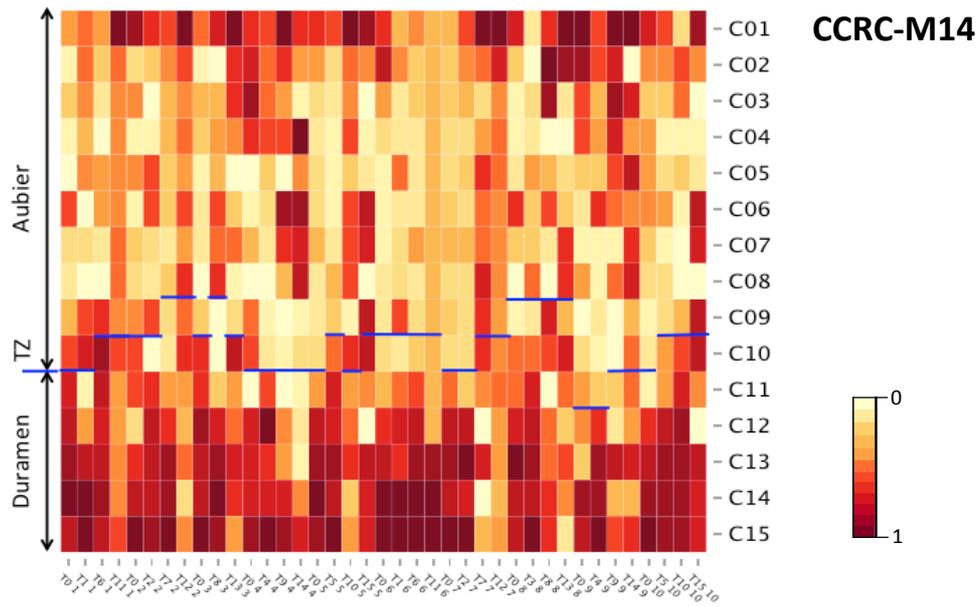


Figure 53 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les HGs (CCRC-M38, LM19 et JIM7).



**Figure 54 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les RG I (CCRC-M14).**

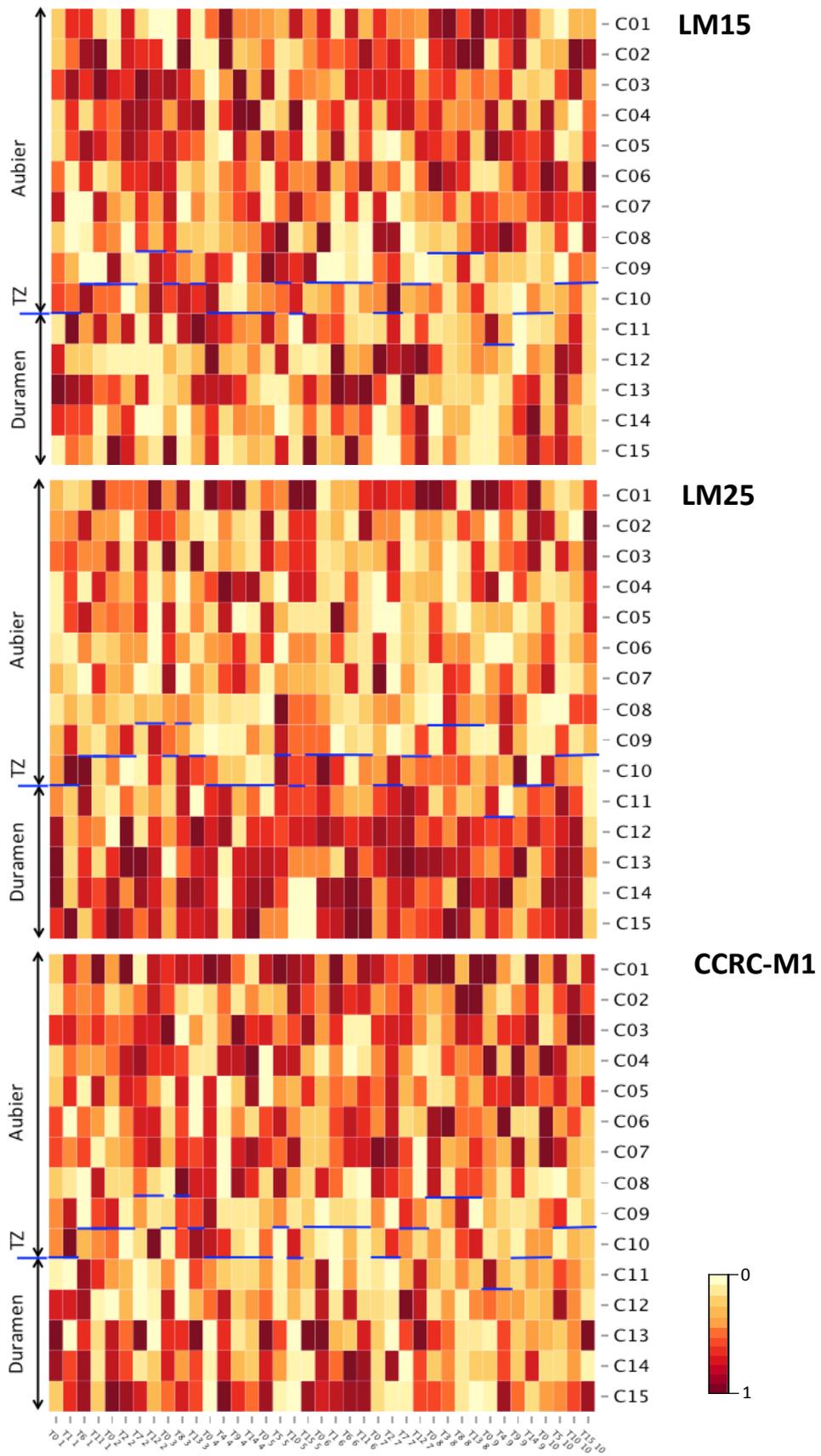
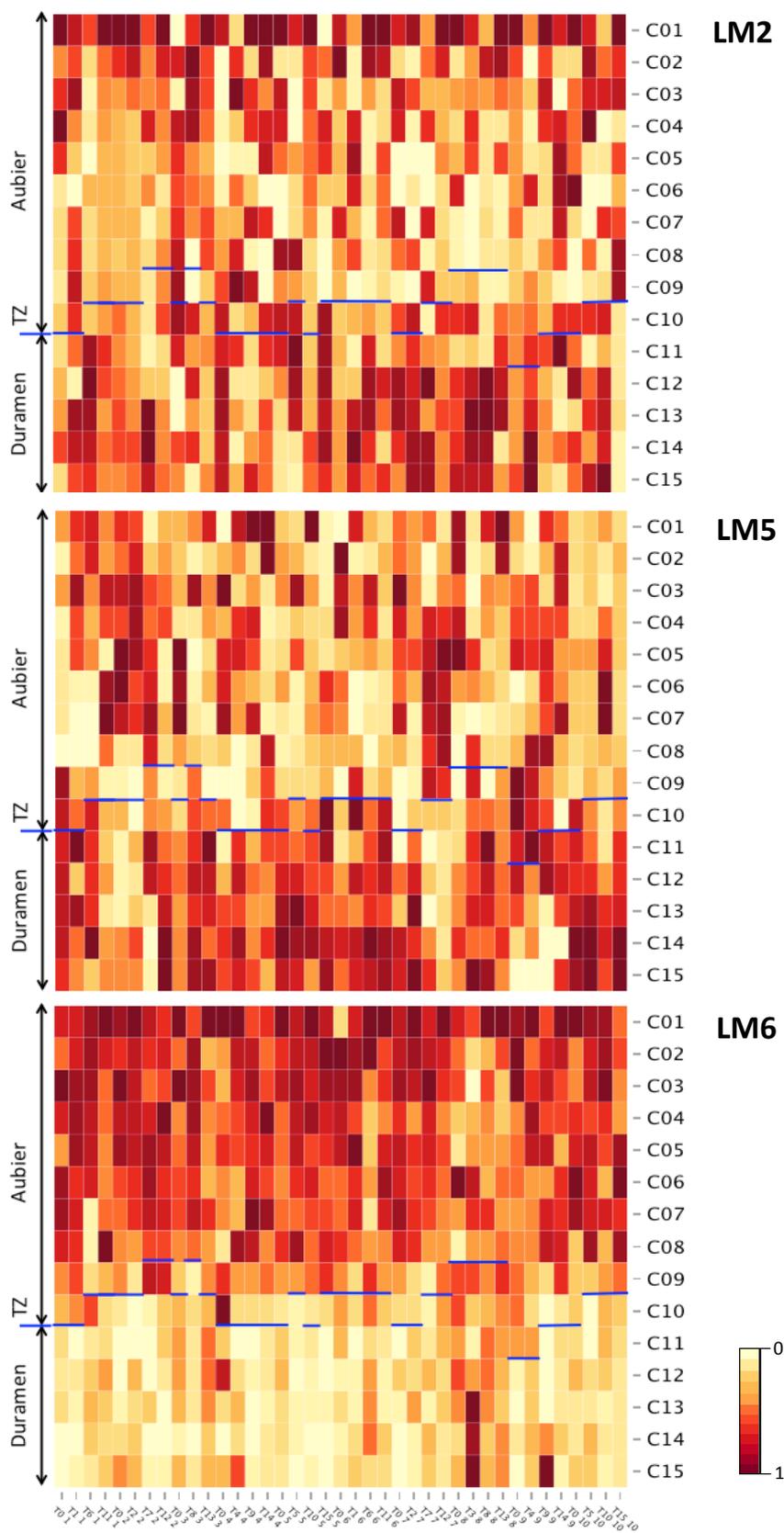
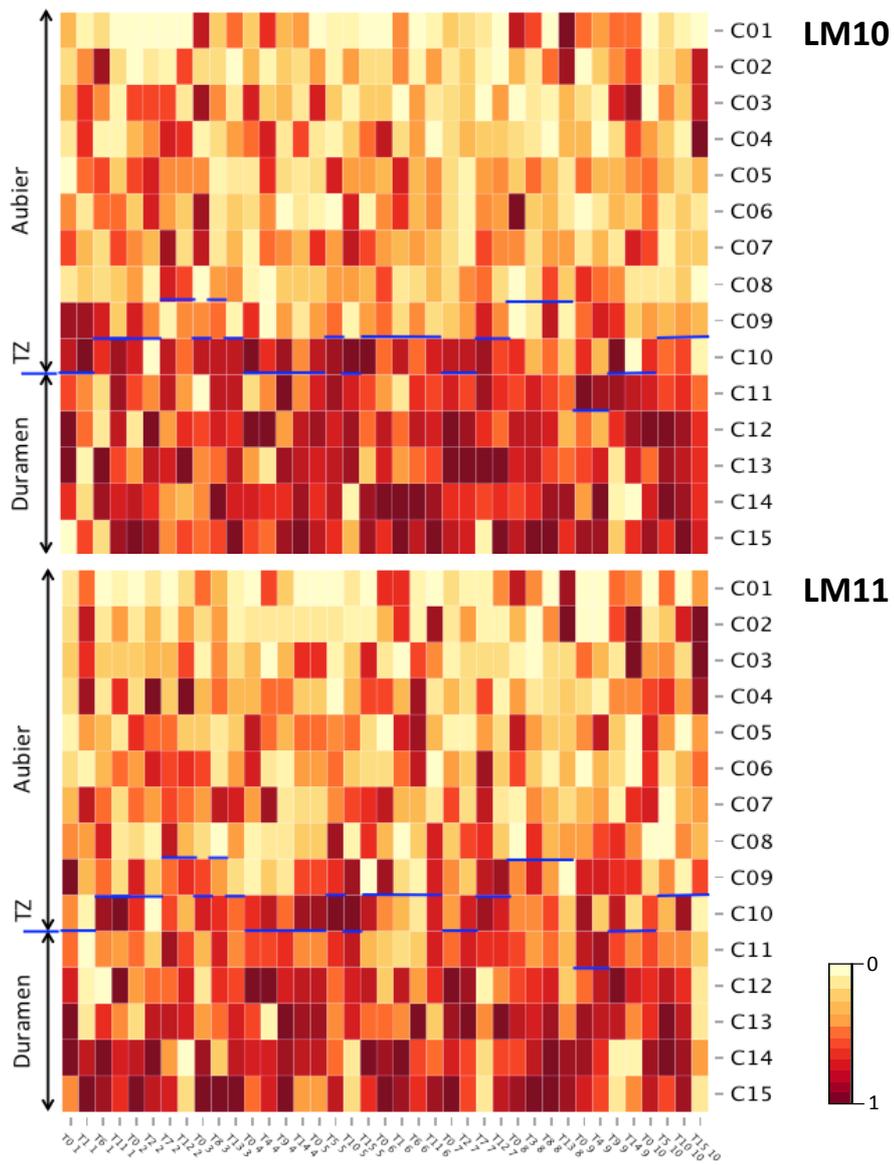


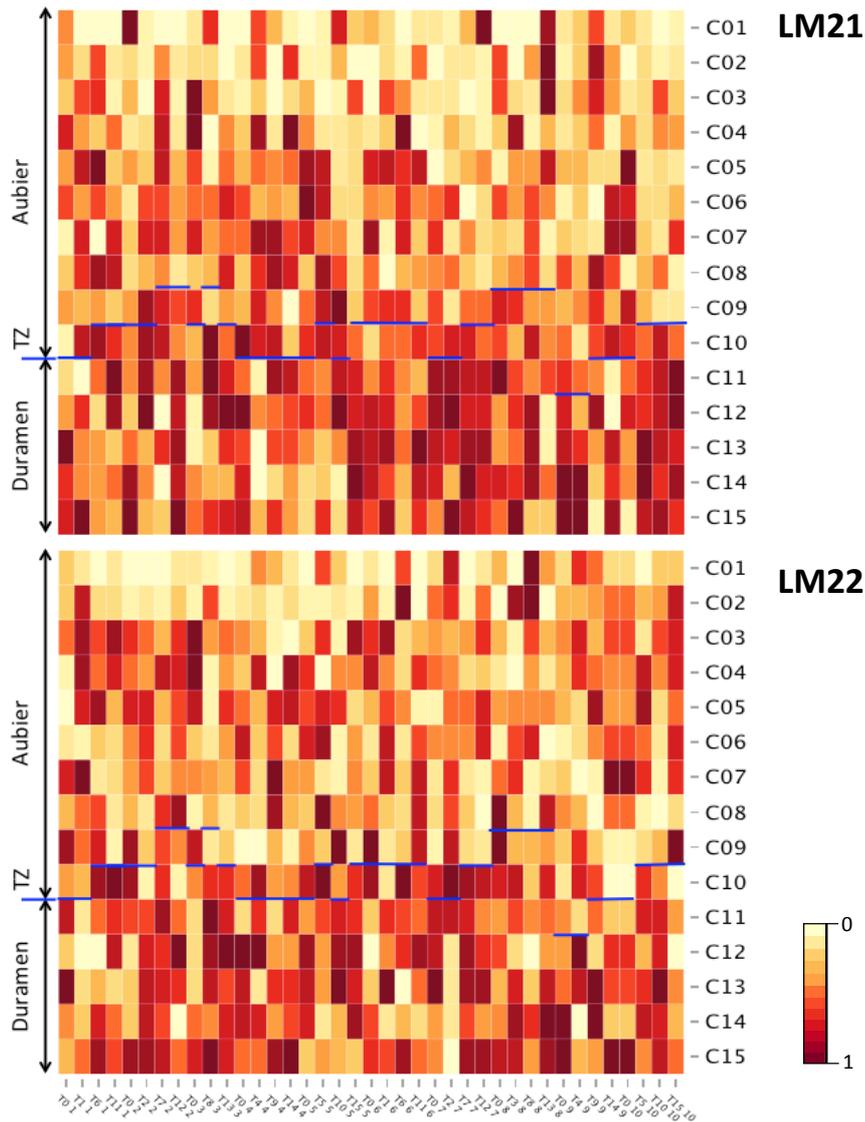
Figure 55 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de douglas pour les xyloglucanes (CCRC-M1, LM15 et LM25)



**Figure 56 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les AGPs (LM2), les galactanes (LM5) et les arabinanes (LM6).**



**Figure 57 :** Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les xylanes (LM10 et LM11).



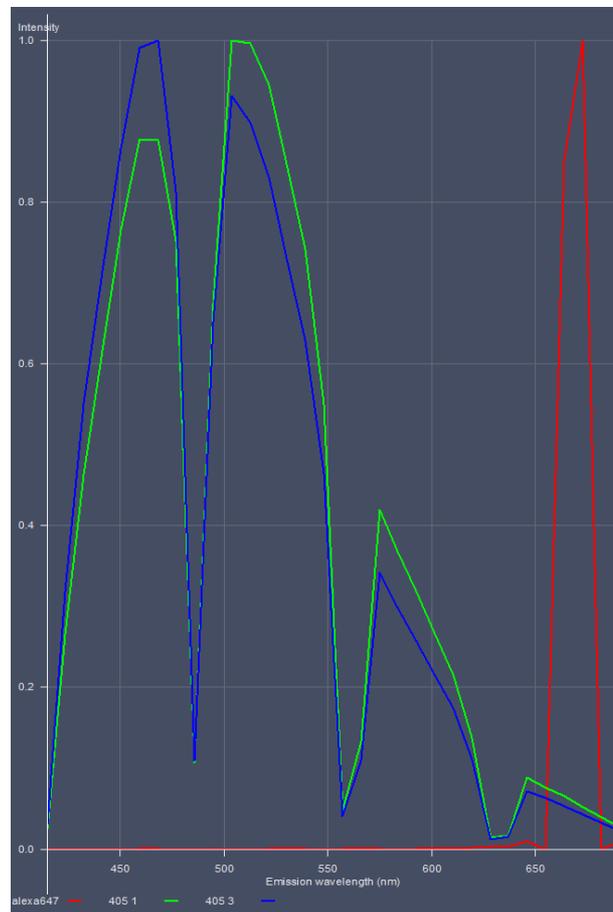
**Figure 58 : Intensités des marquages obtenues pour chaque cerne de chacune des carottes de bois de douglas pour les mannanes (LM21 et LM22).**

Avec la méthode LI/ELISA, nous n'avons pas observé de variations saisonnières dans la composition pariétale de la TZ de bois de douglas. Ceci peut résulter d'une absence réelle de l'implication du paramètre saison sur le changement de la composition pariétale, ou bien du manque de reproductibilité/sensibilité de la méthode utilisée. C'est pourquoi, afin d'affiner les résultats obtenus *in-vitro*, nous avons cherché à immunolocaliser les polymères pariétaux précédemment étudiés au niveau de la TZ à l'aide de la microscopie confocale à fluorescence. Grâce à cette technique, nous avons également caractérisé la répartition de la lignine au sein de la paroi des cellules de la TZ. Dans l'optique d'analyser plus finement la composition du bois, des essais ont également été menés au niveau de la TZ à l'aide de la microspectroscopie IR.

### 3.3.2 Analyses en microscopie du bois de douglas

#### 3.3.2.1 Composition en lignine

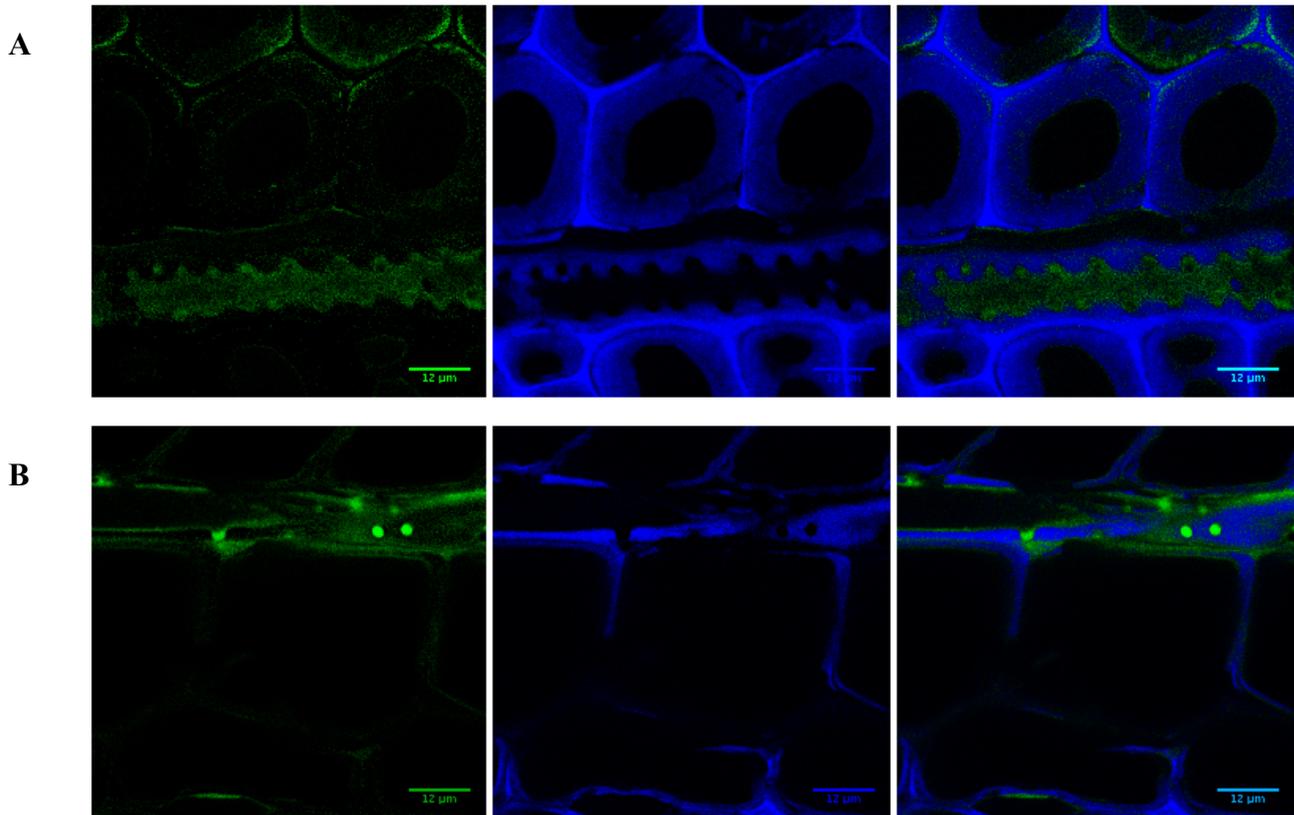
La microscopie confocale à fluorescence a été utilisée en mode spectral afin de caractériser la structure et la composition de la TZ chez le douglas avec ou sans immunomarquage. L'imagerie spectrale combinée au démixage linéaire permet de séparer les informations spectrales recueillies sur un échantillon biologique en images individuelles pour chaque fluorophore (même dans le cas de chevauchement de spectres de fluorescence). Grâce à cette technique, nous avons pu isoler deux spectres caractéristiques de l'autofluorescence de la lignine (et des métabolites spécialisés) : un dont le  $\lambda_{\text{max}}$  se situe aux alentours de 475 nm, l'autre aux alentours de 500 nm (Figure 59).



**Figure 59 : Spectres d'émission de la lignine (en vert et bleu) après excitation à 405 nm et spectre d'émission de l'Alexa 647 (en rouge) après excitation à 633 nm.**

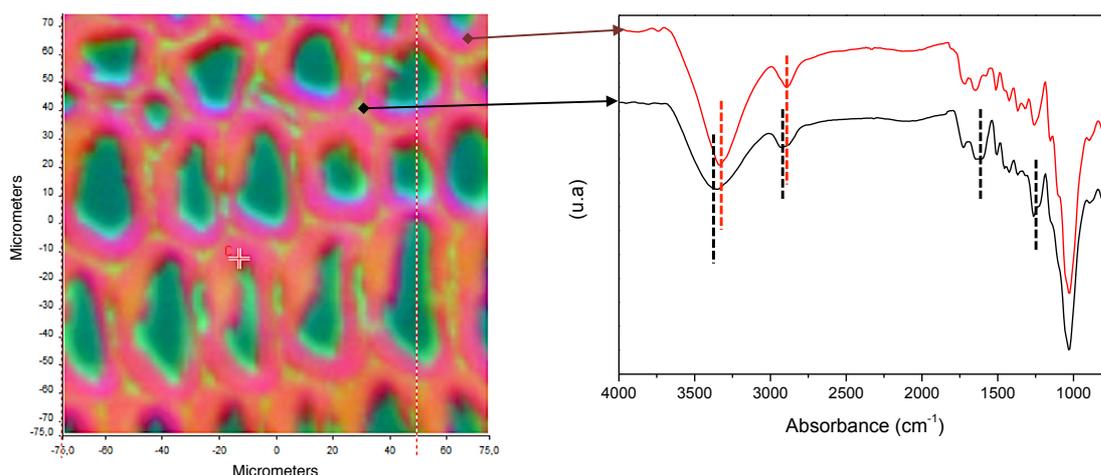
Les images de la répartition de la lignine au sein du bois de douglas ont été reconstruites en utilisant les deux spectres caractéristiques de l'autofluorescence de la lignine isolés précédemment (Figure 60). Les molécules de lignines caractérisées par le spectre dont le  $\lambda_{\text{max}}$

se situe à 475 nm (spectre bleu) sont réparties au niveau de la lamelle moyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire des trachéides et au niveau de la paroi des cellules parenchymateuses. Tandis que celles caractérisées par le spectre dont le  $\lambda_{\text{max}}$  se situe à 500 nm (spectre vert) se trouvent au niveau de la paroi secondaire des trachéides, sur la face interne de la paroi des cellules parenchymateuses et au niveau des ponctuations.



**Figure 60 : Observation en microscopie confocale de l'autofluorescence de la lignine du bois après excitation à 405 nm (A : bois final, zone de transition ; B : bois initial, zone de transition).**

Afin d'identifier la structure chimique des polymères responsables de cette modification des propriétés de fluorescence du bois, des analyses en microspectroscopie IR ont été réalisées (Figure 61). Tout comme la microscopie à fluorescence, la cartographie IR montre des variations au niveau de la composition chimique du bois entre la lamelle moyenne et la paroi secondaire des trachéides. Les deux spectres isolés de ces deux zones différentes de la paroi présentent une allure générale similaire (Figure 61). Cependant quelques différences d'intensité et de décalage de bandes d'absorption sont observées entre les deux (lignes pointillées).

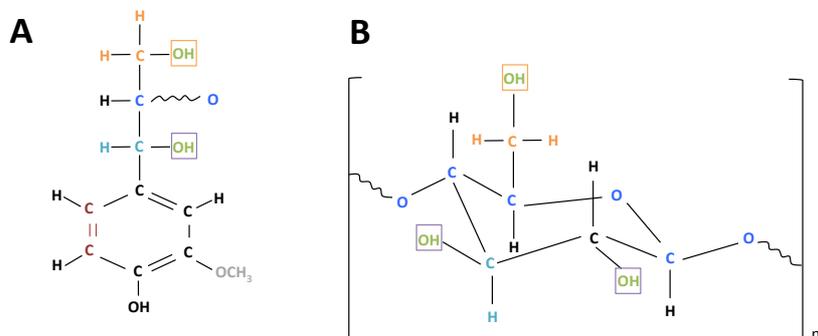


**Figure 61 : Cartographie ATR/FT-IR à partir d'une coupe de bois de douglas (zone de transition) et extraction de deux spectres IR dans des zones de couleurs différentes.**

L'attribution des fonctions chimiques des différentes bandes d'absorption a été réalisée en comparaison avec les données de la littérature disponibles sur la lignine, la cellulose et le bois (Tableau 20). Malgré l'identification des fonctions chimiques du bois grâce à la spectroscopie IR, il n'est pas toujours évident d'attribuer ses fonctions à des polymères particuliers du fait de nombreuses fonctions communes entre les polysaccharides et la lignine (Figure 62). Dans le spectre correspondant à la lamelle moyenne, la bande située à  $3335\text{ cm}^{-1}$  à une intensité plus importante que la bande correspondante dans le spectre de la paroi secondaire. Plus de fonctions alcools sont donc présentes au niveau de la lamelle moyenne que dans la paroi secondaire. De plus, dans le cas de la lamelle moyenne, cette bande d'absorption est plus large que dans le spectre de la paroi secondaire, ce qui signifie qu'une plus grande proportion de OH sont liés, c'est à dire qu'il y a plus de liaisons hydrogènes inter ou intra-molécules. La seconde différence entre les deux spectres est observée au niveau des bandes à  $2925\text{ cm}^{-1}$  (spectre lamelle moyenne) et  $2895\text{ cm}^{-1}$  (spectre paroi secondaire). D'après les tables, plus de fonctions  $\text{CH}_2$  aliphatiques sont retrouvées au niveau de la lamelle moyenne, tandis que plus de CH aliphatiques sont identifiés dans la paroi secondaire. Les OH, les  $\text{CH}_2$  et CH aliphatiques sont retrouvés aussi bien dans les lignines que les polysaccharides, il n'est donc pas possible d'attribuer les variations observées à des variations de teneurs en ces différents polymères. En revanche, le spectre correspondant à la lamelle moyenne présente une plus grande intensité des bandes à  $1616$  et  $1262\text{ cm}^{-1}$ , qui ont été attribuées au cycle aromatique et au C-O de l'unité guaiacycle de la lignine (Labbe et al., 2005 ; Pandey, 1999). Les teneurs en lignine sont donc plus importantes dans la lamelle moyenne que dans la paroi secondaire.

**Tableau 20 : Attribution des fonctions chimiques des différentes bandes d'absorption identifiées dans les spectres de la lamelle moyenne et de la paroi secondaire du bois (Chen et al., 2010 ; El Hage et al., 2009 ; Faix, 1991 ; Labbe et al., 2005 ; Pandey, 1999). En bleu : bandes retrouvées dans les deux spectres, en noir : bandes spécifiques au spectre de la lamelle moyenne, en rouge : bandes spécifiques au spectre de la paroi secondaire.**

Position de la bande (cm <sup>-1</sup> )	Attribution
3350 / 3335	Élongation OH alcools (composés phénoliques et polysaccharides)
2925 / 2895	Élongation des C-H aliphatiques (composés phénoliques et polysaccharides)
1725 / 1715	Élongation C=O non conjuguées esters, aldéhydes ou cétones (pectines et hémicelluloses)
1645	Élongation C=C
1616	Élongation C=C cycles aromatiques, C=O conjuguées (composés phénoliques et polysaccharides)
1507	Élongation C=C cycles aromatiques
1459	Déformation asymétrique C-H (composés phénoliques et polysaccharides) et C=C des cycles aromatiques
1369	Déformation symétrique C-H (composés phénoliques et polysaccharides)
1262 ; 1231	Élongation C-O (composés phénoliques et hémicelluloses)
1151	Élongation asymétrique C-O-C (polysaccharides)
1101 ; 1020	Élongation C-O (composés phénoliques et polysaccharides)



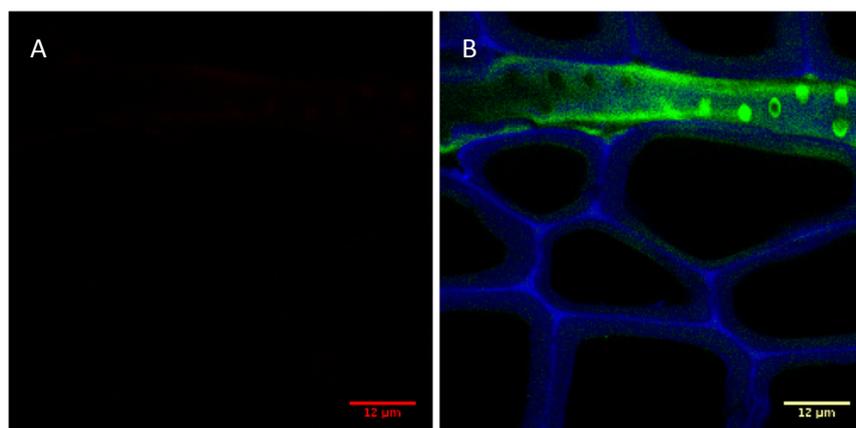
**Figure 62 : Structures chimiques d'une unité G incorporée dans la lignine (A) et de la cellulose (B).**

La microspectroscopie IR permet d'obtenir rapidement des informations spatiales sur les quantités relatives des différentes fonctions chimiques des molécules constitutives du bois et sur leurs interactions. Cependant, cette technique manque de précision pour déterminer les différences de composition au sein des lignines qui pourraient expliquer les différentes propriétés de fluorescence observées précédemment (Figure 60).

Après avoir caractérisés un peu plus finement les spectres de fluorescence obtenus, nous nous sommes focalisés sur la composition biochimique de la TZ.

### 3.3.2.2 Répartition des polymères pariétaux dans le bois

L'analyse de la répartition des polymères pariétaux au sein de la TZ du bois de douglas a été étudiée par microscopie confocale à fluorescence couplée à des immunomarquages. Le même set d'anticorps que précédemment a été utilisé. Le témoin (absence d'anticorps primaire, Figure 63) montre qu'il n'y a pas d'autofluorescence du bois à 633 nm, ce qui permet d'utiliser l'Alexa Fluor 647 comme fluorophore couplé à l'anticorps secondaire.

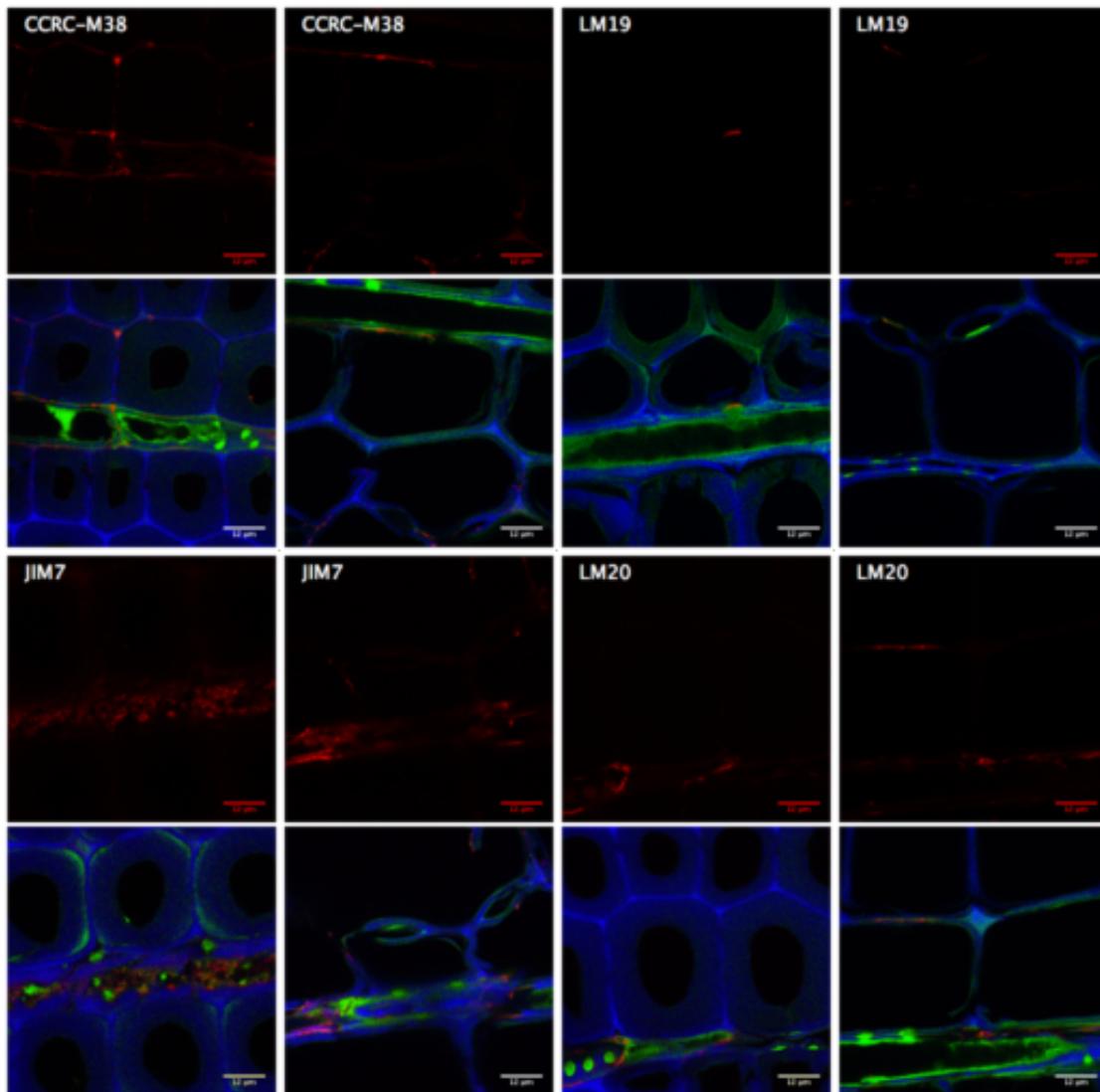


**Figure 63 : Observation en microscopie confocale à fluorescence d'une coupe de bois de zone de transition de douglas sans immunomarquage (absence d'anticorps primaire mais pas secondaire). A : Excitation à 633 nm ; B : Excitations à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12 µm.**

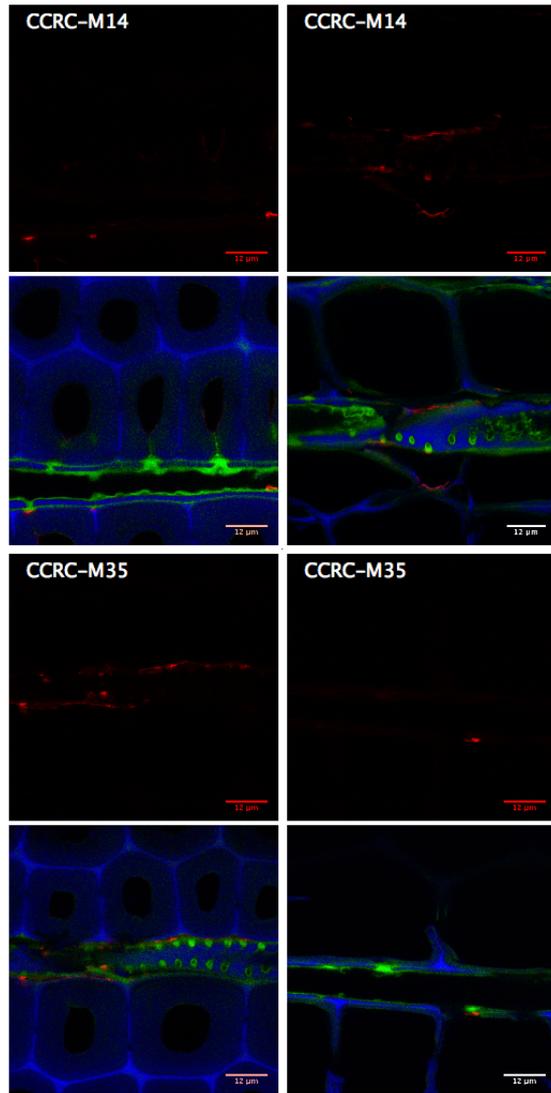
Quatre anticorps différents reconnaissant des épitopes d'HGs ont été utilisés pour les immunomarquages : LM19 et CCRC-M38 qui reconnaissent les HGs non méthylestérifiés, JIM7 qui reconnaît les HGs partiellement méthylestérifiés et LM20 spécifique aux HGs méthylestérifiés. Avec les anticorps CCRC-M38, JIM7 et LM20, un marquage est observé dans la paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides, dans la paroi des cellules des rayons et au niveau de leurs ponctuations (Figure 64). Tandis que le marquage avec l'anticorps LM19 est uniquement observé au niveau des ponctuations des cellules parenchymateuses et du torus (Figure 64). Ces observations sont valables aussi bien dans le bois initial que dans le bois final. Concernant les RG I, leur présence est remarquée au niveau des parois des rayons (CCRC-M35 et CCRC-M14) ainsi qu'au niveau de la couche S3 (CCRC-M14) dans le bois initial et le bois final (Figure 65). L'anticorps CCRC-M1 reconnaît les RG I mais également les xyloglucanes, notamment ceux fucosylés. Son marquage est visualisé dans la paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides et dans la paroi des cellules parenchymateuses du bois initial et du bois final (Figure 66). Ces marquages sont également observés avec LM15 et LM25 qui eux sont spécifiques des xyloglucanes (Figure 66). Des galactanes (LM5), des

arabinanes (LM6) et des AGPs (LM2) sont également identifiés dans la paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides et dans les parois des rayons (Figure 67). Le marquage de l'anticorps LM10 (dirigé contre des épitopes de xylanes pas ou peu substitués) est présent au niveau de la paroi des rayons, de la paroi primaire/lamelle moyenne et de la couche S3 des trachéides (Figure 68). En plus d'identifier ces différentes zones pariétales, l'anticorps LM11 (qui reconnaît en plus des xylanes pas ou peu substitués, les arbinoxylanes) présente un marquage de toutes les couches de la paroi secondaire des trachéides du bois initial et du bois final, avec une intensité plus grande pour les couches S1 et S3 (Figure 68). Les anticorps LM21 et LM22 reconnaissent fortement la paroi secondaire des trachéides et plus légèrement la paroi des rayons (Figure 69). Le marquage observé pour les coupes de TZ est plus intense avec LM21 qu'avec LM22, signe probable de la présence de galactomannanes dans le bois de douglas. Le marquage obtenu avec LM21 est plus important dans la couche S3 et celui de LM22, au niveau des couches S1 et S3 (Figure 69).

Toutes les TZ des carottes observées montrent la même répartition des polymères au sein du compartiment pariétal et aucune différence d'intensité de marquage n'a été observée entre les échantillons. Cette technique n'est pas assez précise pour observer d'éventuelles différences saisonnières en terme de proportion de polymères pariétaux. Elle a cependant permis de montrer la localisation des polymères étudiés au sein des parois des différents types cellulaires du bois et confirmer leur présence qui, excepté pour les HGs méthylestérifiés, avait déjà été démontrée avec la méthode LI/ELISA.



**Figure 64 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final (gauche) et initial (droite) de TZ de douglas avec immunomarquage des HGs. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12  $\mu$ m.**



**Figure 65 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des RG I. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12 μm.**

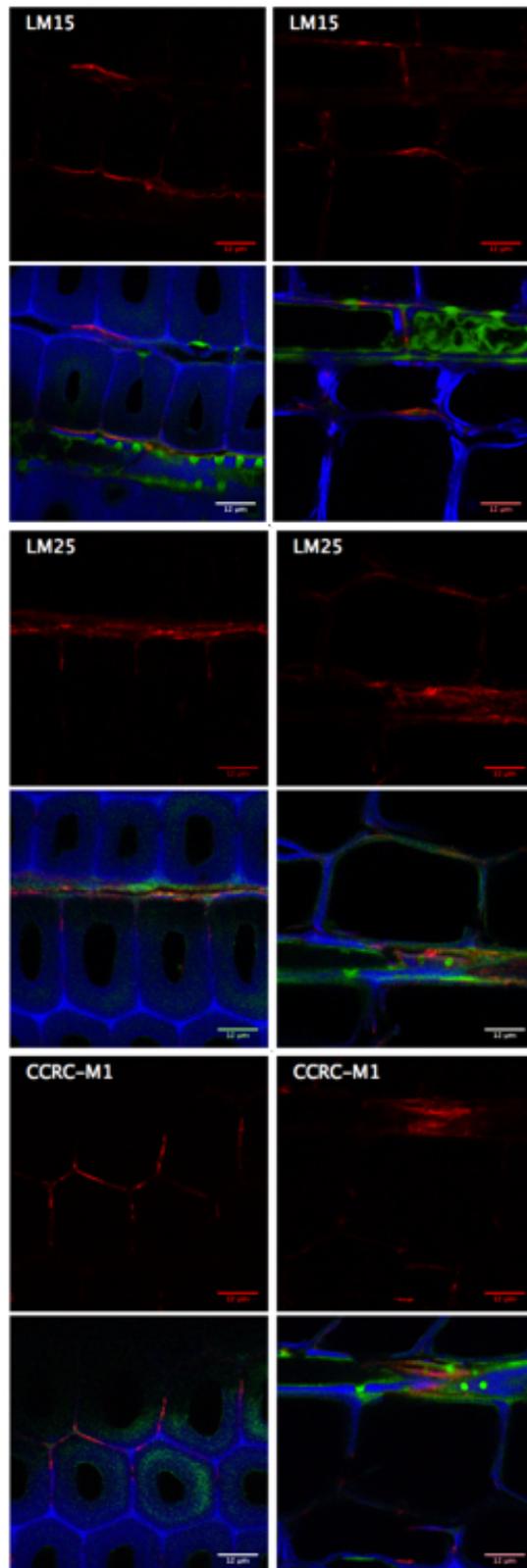
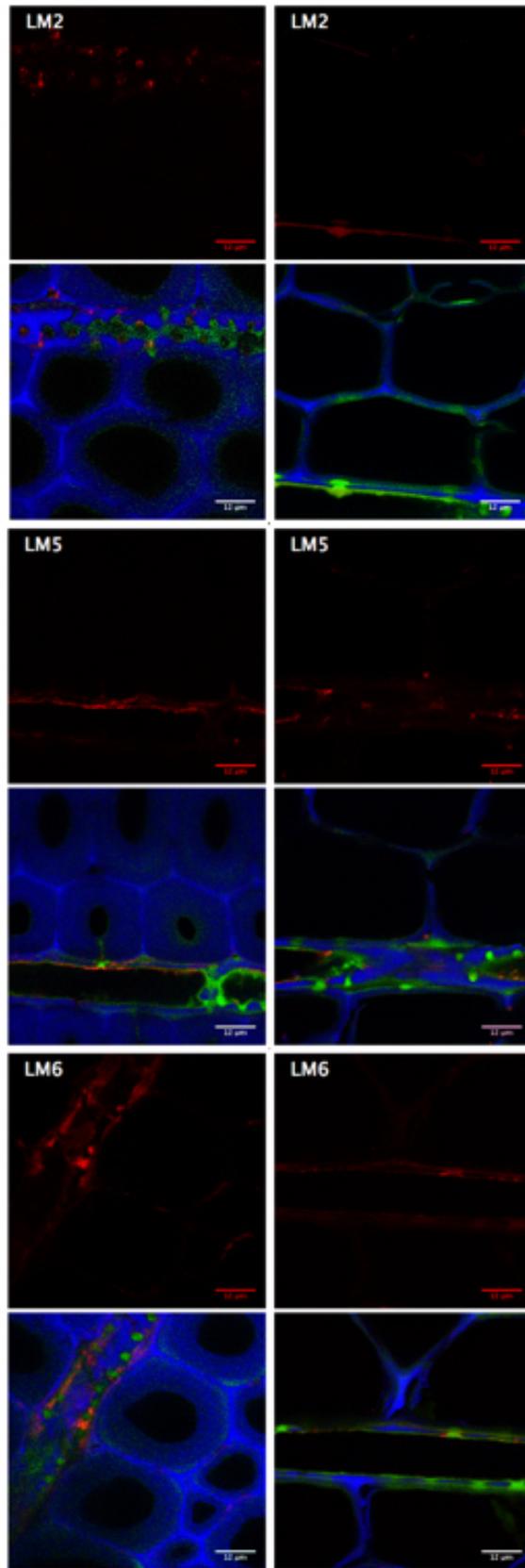
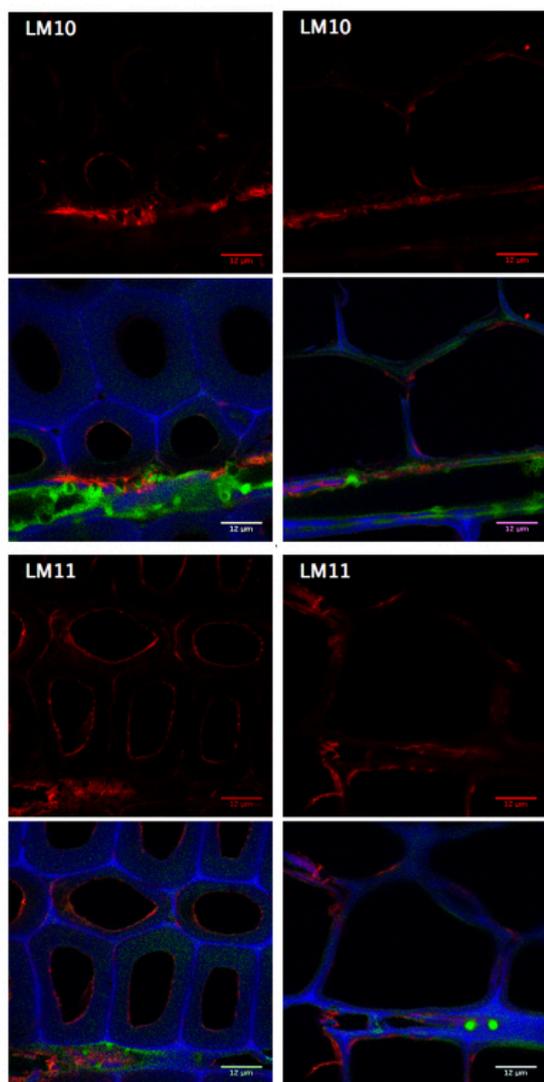


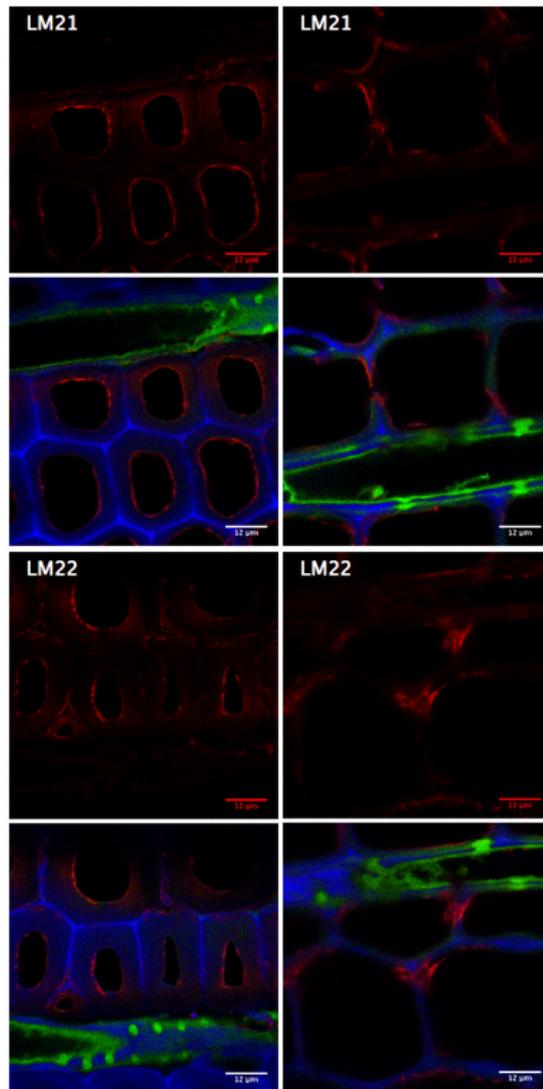
Figure 66 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des xyloglucanes. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12  $\mu\text{m}$ .



**Figure 67 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des AGPs, des galactanes et des arabinanes. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12 µm.**



**Figure 68 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des xylanes. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12  $\mu$ m.**



**Figure 69 : Observation en microscopie confocale à fluorescence de coupes de bois final et initial de TZ de douglas avec immunomarquage des mannanes. Pour chaque anticorps, excitation à 633 nm puis excitation couplée à 405 et 633 nm. Barre d'échelle : 12 µm.**

### **3.4 Discussion**

#### **3.4.1 Mise au point de la méthode d'analyse de la composition du bois**

Dans le but d'étudier la composition biochimique du bois et plus particulièrement la composition biochimique de la TZ, la purification des polymères pariétaux n'est pas chose aisée. En effet, la lignine est liée de manière covalente aux polysaccharides pariétaux formant un réseau tridimensionnel très résistant à la dissolution par des solvants classiques. C'est pourquoi, différentes méthodes de prétraitement de la biomasse ont été développées pour ouvrir cette structure compacte et permettre la solubilisation des polymères. Ces méthodes

peuvent être de nature chimique, physique et/ou biologique. Ces méthodes impliquent très souvent des conditions extrêmes telles que des bases ou des acides forts, des températures élevées ou encore des hautes pressions (Costa and Plazanet, 2016). Ces traitements ne sont pas sans conséquence sur l'intégrité des polymères isolés. Afin de limiter la dégradation et les modifications chimiques des polymères pariétaux lors de leur solubilisation, nous avons opté pour l'utilisation des LIs pour dissoudre le bois avant d'en étudier sa composition à l'aide de techniques immunologiques.

### 3.4.1.1 Synthèse des liquides ioniques

Les LIs sont composés de deux entités, un cation et un anion. La structure du cation et de l'anion peut être facilement modifiée conduisant à un nombre possible de combinaisons potentielles anion/cation de  $10^{12}$  (Forsyth et al., 2004).

Les cations sont en général synthétisés par alkylation d'un atome portant un doublet non liant (azote, phosphore ou soufre). Bien que le cœur du cation soit souvent le même, la diversité réside dans la longueur des chaînes alkyles qui peuvent lui être accrochées (Poux et al., 2010). Suivant cette méthode, six LIs purs ont été synthétisés dans le cadre de cette étude : [Bmim]Cl, [Emim]Br, [Amim]Br, [Amim]Cl, DBUC<sub>4</sub>Br et DBUC<sub>4</sub>Cl. La modification de l'anion intervient en général en dernière étape par échange entre celui-ci et un sel d'ion alcalin ou alcalino-terreux. C'est de cette manière qu'a été obtenu l'[Emim]Ac, par échange entre l'anion bromure de l'[Emim]Br et l'anion acétate de l'acétate de potassium suivant le protocole de Zhang et al. (2008) modifié par Wang et al. (2012). Avec ce protocole, nous ne sommes parvenus qu'à obtenir ce LI avec une pureté de 85 %. L'augmentation de la température de réaction (60°C au lieu de 40°C) n'a pas amélioré la pureté du LI, de même que l'utilisation de l'éthanol à 96 % à la place de l'éthanol pur. En revanche, l'augmentation du temps de réaction (24 h au lieu de 6 h) a permis une légère augmentation de la pureté (89 %). Quoiqu'il en soit, le protocole d'échange d'anion avec l'acétate de potassium n'a pas permis d'obtenir le LI pur. Selon le protocole de Ding et al. (2012), il est possible de synthétiser l'[Emim]Ac à partir de l'[Emim]Br par échange d'anion avec le diacétate de plomb dans l'eau-méthanol. Cependant, l'[Emim]Ac résultant est contaminé par le plomb. Fukumoto et al. (2005) ont, quant à eux, utilisé une colonne échangeuse d'anion pour synthétiser l'[Emim]Ac. L'[Emim]Br est passé au travers d'une colonne échangeuse d'hydroxyles. L'[Emim]OH obtenu étant peu stable, la solution est immédiatement ajoutée à de l'acide acétique en solution aqueuse. En évaluant le temps et le coût de ce protocole de synthèse,

nous avons décidé de travailler avec l'[Emim]Ac synthétisé avec le protocole de Zhang et al. (2008) modifié et pur seulement à 89 %.

### **3.4.1.2 Dissolution des polymères pariétaux par les liquides ioniques**

#### **3.4.1.2.1 Dissolution de la cellulose**

La cellulose est le composant majoritaire de la biomasse lignocellulosique (35 à 50 %). Ce polymère est soluble dans de nombreux LIs, notamment dans ceux ayant un cation 1,3-dialkylimidazolium (Fukaya et al., 2008; Köhler et al., 2007; Pinkert et al., 2009; Swatloski et al., 2002; Wang et al., 2012a). La solubilité de la cellulose microcristalline Avicel (cellulose « modèle ») est par exemple de 25,5 g.mol<sup>-1</sup> et 13,6 g.mol<sup>-1</sup> dans l'[Emim]Ac à respectivement 110 et 100°C. A 100°C, cette solubilité est de 14,7 g.mol<sup>-1</sup> dans l'[Emim]Cl et de 1,9-3,8 g.mol<sup>-1</sup> dans l'[Emim]Br (Wang et al., 2012a). Il a ainsi été observé que l'anion du LI jouait un rôle important dans la capacité d'un LI à dissoudre la cellulose, c'est à dire à perturber les liaisons hydrogènes intra et interchaînes. Dans ce but, les LIs efficaces comprennent des anions capables de former de fortes liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles de la cellulose, tels que les anions chlorures et carboxylates (acétate, lactate, propionate). Le cation du LI peut également affecter la dissolution de la cellulose. Dans la plupart des cas, l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle du cation réduit par exemple progressivement la solubilité de la cellulose. La cellulose dissoute dans un LI peut être modifiée en solution ou régénérée (reprécipitée) par ajout d'eau seule ou avec des co-solvants (comme l'acétone) ou avec des solvants organiques protiques comme l'éthanol (Brandt et al., 2013). Après la cellulose, le second composant majoritaire de cette biomasse lignocellulosique est la lignine.

#### **3.4.1.2.2 Dissolution de la lignine**

Comparativement à la cellulose, peu d'études ont visé à déterminer la solubilité de la lignine dans des LIs. Généralement, les essais de dissolution de la lignine ont été réalisés à partir de lignines qui ont été extraites avec des méthodes conventionnelles (lignines Kraft, alcalines ou encore Organosolv) et qui diffèrent donc de la lignine dans son état natif. Les solubilités de différentes préparations à base de lignines ont été déterminées pour certains LIs dialkylimidazoles. Pour exemple, dans l'[Emim]Ac, la solubilité de la lignine kraft est de 30 % à 90°C (dans ce même LI, la solubilité de la cellulose Avicel est de 8 % (m/m) à 100°C). Comme pour la cellulose, l'anion influence grandement la solubilité de la lignine. Dans le cas

de LIs à cation dialkylimidazole, la lignine présente une bonne solubilité avec les anions ayant une capacité à établir des liaisons hydrogène modérée à importante (méthyl sulfate ( $\text{MeSO}_4^-$ ), chlorure, bromure, acétate). La lignine est aussi soluble dans des LIs possédant le cation 1-8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU) comme l'ont montré Diop et al. (2013). Ces auteurs ont déterminé les temps de dissolution de la lignine dans du  $\text{DBUC}_4\text{Cl}$ , du  $\text{DBUC}_6\text{Cl}$  et du  $\text{DBUC}_8\text{Cl}$ . L'échantillon de lignine utilisé est issu d'une précipitation au  $\text{CO}_2$  à partir d'un extrait de liqueur noire (liqueur de cuisson issue de la fabrication du papier kraft). A  $105^\circ\text{C}$ , cette lignine (20 % (m/m)) est totalement dissoute dans le  $\text{DBUC}_4\text{Cl}$  après 29 h. Pour un même pourcentage de lignine, le temps de dissolution augmente avec la longueur de la chaîne alkyle du DBU.

#### 3.4.1.2.3 Dissolution du bois

La biomasse lignocellulosique, comme le bois, est composée d'un réseau tridimensionnel de lignine et de polysaccharides, qui interagissent les uns avec les autres *via* de multiples liaisons. Bien qu'il soit très difficile de dissoudre le bois, certains LIs ont cette capacité. Fort et al. (2007) ont été les premiers à dissoudre de la poudre de bois dans un LI : le  $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ . Peu de temps après, Kilpeläinen et al. (2007) ont montré que l' $[\text{Amim}]\text{Cl}$  était plus efficace que le  $[\text{Bmim}]\text{Cl}$  pour solubiliser de la sciure de bois d'épicéa. En 2009, Sun et al. (2009) ont mis en évidence que l' $[\text{Emim}]\text{Ac}$  permettait une dissolution complète des particules de bois de pin (bois tendre) et de chêne rouge (bois dur) et que là encore, ce LI était plus efficace que le  $[\text{Bmim}]\text{Cl}$ . Ces auteurs ont montré que l'activation micro-onde permettait d'accélérer la vitesse de dissolution du bois. Basé sur cette étude, nous avons réalisé des premiers essais de dissolution à partir de la poudre de bois de noyer (5 % m/v) dans l' $[\text{Emim}]\text{Ac}$  (commercial). Un prétraitement micro-onde de 2 min 40 (entrecoupées) suivi d'un chauffage pendant 6 h à  $120^\circ\text{C}$  puis 12 h à  $105^\circ\text{C}$  a permis de dissoudre totalement la poudre de bois de noyer (Plazanet et al., 2015). En utilisant uniquement l'activation micro-onde, des essais ont été menés pour solubiliser la poudre de bois de douglas dans l' $[\text{Emim}]\text{Ac}$ , le  $[\text{Bmim}]\text{Ac}$ , le  $[\text{Bmim}]\text{Cl}$  et le  $[\text{Bmim}]\text{BF}_4$ . Une dissolution totale du bois de douglas dans l' $[\text{Emim}]\text{Ac}$  a été obtenue après 6 min d'activation à 200 W. A l'issue de ce traitement, des particules de bois étaient encore présentes dans les 3 autres LIs. L' $[\text{Emim}]\text{Ac}$  étant plus efficace que le  $[\text{Bmim}]\text{Ac}$ , il semble que pour la biomasse lignocellulosique, tout comme pour la cellulose (Brandt et al., 2013), l'efficacité du LI décroît avec l'augmentation de la taille de la chaîne alkyle du cation. Lors de cette étude de dissolution du bois de douglas, l'efficacité liée à l'anion suivait l'ordre suivant : acétate > chlorure > tétrafluoroborate.

L'interaction des solvants avec des solutés peut être décrite par des échelles empiriques de polarité. L'une d'entre elles a été divisée par Kamlet et Taft en trois paramètres où  $\pi^*$  exprime les effets de polarité/polarisabilité du solvant, et les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  reflètent respectivement les caractères donneur et accepteur de liaisons hydrogène. La capacité des LIs à interagir avec des solutés peut donc être étudiée à l'aide de ces paramètres. Pour tous les LIs,  $\pi^*$  est élevé, en revanche la composition du LI influe sur les paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  (Crowhurst et al., 2003). La valeur d' $\alpha$  est largement déterminée par la nature du cation (Crowhurst et al., 2003), et dans le cas des LIs à cations 1,3-dialkylimidazolium, elle repose majoritairement sur l'acidité du proton relié au carbone du cycle entre les deux atomes d'azote (Brandt et al., 2010). L'anion est le déterminant le plus important qui influe sur le  $\beta$  (Crowhurst et al., 2003). En général, les LIs ayant une capacité à accepter les liaisons hydrogène élevée ont une bonne aptitude à dissoudre la cellulose (Muhammad et al., 2012). Le [Bmim]Ac a un  $\beta$  de 1,09 (Ohno and Fukaya, 2009), il est de 0,84 pour le [Bmim]Cl (Fukaya et al., 2006) et de 0,376 pour le [Bmim]BF<sub>4</sub><sup>-</sup> (Muldoon et al., 2001). Ceci explique les différences d'efficacité de ces 3 LIs à dissoudre le bois de douglas.

Bien que le [Bmim]BF<sub>4</sub> soit le LI le moins efficace, une solubilisation des particules de bois a tout de même été observée dans ce LI alors qu'il a été montré que le [Bmim]BF<sub>4</sub> n'était pas capable de solubiliser la cellulose et que l'anion BF<sub>4</sub><sup>-</sup> solubilisait peu ou pas la lignine Kraft (Mora-Pale et al., 2011). La légère dissolution du bois de douglas observée dans le [Bmim]BF<sub>4</sub> peut donc résulter du traitement micro-onde. Bien que le traitement micro-onde permette également une dissolution totale et rapide du bois de douglas dans l'[Emim]Ac, il est contraignant à appliquer à un grand nombre d'échantillons. En effet, un fort effet exothermique est observé lorsque le LI est soumis aux micro-ondes ce qui nécessite d'entrecouper les phases d'irradiation pour permettre de faire redescendre la température de la solution. Il n'est, de plus, pas possible d'irradier plus d'un échantillon à la fois (ballon hermétique à l'intérieur du micro-onde relié à une colonne à reflux). Pour ces deux raisons, il a été envisagé de réaliser l'étape de dissolution du bois par chauffage classique, même si celle-ci est plus longue. De plus, bien que les prétraitements aux micro-ondes ou aux ultrasons permettent d'accélérer le processus de dissolution (Sun et al., 2009), ils peuvent entraîner une dégradation partielle des composants pariétaux (Bagherian et al., 2011; Li et al., 2004).

Nous avons ainsi testé l'efficacité à dissoudre le bois de douglas par chauffage de 6 LIs à cation imidazolium ([Emim]Br, [Emim]Ac, [Amim]Cl et [Amim]Br) ou DBU (DBUC<sub>4</sub>Br et DBUC<sub>4</sub>Cl). A 80°C, les LIs les plus performants sont l'[Emim]Ac (non pur) et l'[Amim]Cl

(dissolution totale après 54 h), viennent ensuite l'[Amim]Br et le DBUC<sub>4</sub>Cl (96 h), les moins efficaces étant l'[Emim]Br et le DBUC<sub>4</sub>Br (6 jours). En augmentant la température de dissolution à 100°C, les temps nécessaires pour obtenir une dissolution complète du bois de douglas diminuent quel que soit le LI en suivant la même hiérarchie d'efficacité que celle mesurée à 80°C.

Concernant l'[Emim]Ac (non pur), une dissolution complète des particules de bois de douglas a été obtenue en 54 h à 80°C et en 28 h à 100°C. Avec de l'[Emim]Ac commercial, Sun et al. (2009) sont parvenus à solubiliser totalement de la poudre (125-250 µm) de bois de chêne rouge en 25 h et de pin en 46 h à 110°C. Malgré le manque de pureté de l'[Emim]Ac dans notre étude, celui-ci reste tout de même très efficace pour dissoudre du bois de résineux.

Pour ce qui est de l'[Amim]Cl, il a été montré que ce LI pouvait totalement dissoudre de la poudre de pin (8 % m/m ; taille des particules : 0,1-2 mm) en 8 h à 80°C (Kilpeläinen et al., 2007). A cette même température, 54 h ont été nécessaires pour dissoudre la poudre de bois de douglas, pourtant de granulométrie beaucoup plus fine (< 250 µm). Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par la présence d'eau dans ce LI. En effet, Kilpeläinen et al. (2007) ont travaillé sous atmosphère inerte à partir de bois lyophilisé et de LI avec une teneur minimale en eau (< 1 %). Dans notre cas, le bois a été lyophilisé mais nous n'avons pas cherché à maintenir le LI avant et pendant la dissolution à sa teneur minimum en eau, ceci dans le but de simplifier, par la suite, l'étape de dissolution d'un grand nombre d'échantillons.

Au cours de notre étude, deux LIs à cation DBU, le DBUC<sub>4</sub>Br et le DBUC<sub>4</sub>Cl ont été testés quant à leur efficacité à dissoudre du bois de douglas. Ces LIs se sont révélés être parmi les moins efficaces. La capacité de ces deux LIs à solubiliser le bois n'avait jamais été testée. En revanche, des LIs dits à polarité commutable (LIPC) ont été développés à partir du DBU dans le but de prétraiter la biomasse ligneuse. Ces LIs présentent l'avantage de passer d'une forme neutre à une forme ionique et polaire sous l'effet d'un changement de conditions (pH, température, CO<sub>2</sub>) (Jessop et al., 2010). Cette propriété permet une récupération et une séparation plus aisées des polymères dissouts et du LI. A partir de CO<sub>2</sub>, de glycérol et de DBU, Anugwom et al. (2012) ont synthétisé un LIPC dans le but de prétraiter du bois de bouleau. Après 5 jours de traitement à 100°C de pièces de bois de 2,5/3/0,25 cm<sup>3</sup> (5 % (m/m), 57 % des hémicelluloses et 50 % des lignines sont dissoutes. Ces données sont difficilement comparables à nos résultats du fait d'une trop grande disparité sur la taille des particules traitées.

En comparant l'efficacité du cation (pour [Amim]Br, [Emim]Br et DBUC<sub>4</sub>Br), nous avons pu conclure de notre étude que le cation [Amim] était plus efficace pour dissoudre le bois de douglas que l'[Emim] et le DBUC<sub>4</sub>, ces deux derniers présentent une efficacité similaire. Il a été montré que le cation jouait un rôle dans le processus de dissolution. Le cation pourrait interagir avec la cellulose au niveau des atomes d'oxygène des hydroxyles (Dadi et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2005). Des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre le cation et les cycles aromatiques des lignines pourraient également se produire. Contrairement aux cations DBU et [Emim], le cation [Amim] est le seul à présenter un déplacement d'électrons non seulement sur le cycle imidazole mais aussi sur la chaîne latérale, ce qui pourrait expliquer son efficacité supérieure pour dissoudre le bois (Zavrel et al., 2009).

#### 3.4.1.2.4 Paramètres influençant la vitesse de dissolution

##### *L'eau*

La plupart des LIs hydrophiles peuvent absorber jusqu'à 10 % de leur masse en eau s'ils sont exposés à l'atmosphère à température ambiante plus de 4 h (Weingärtner, 2008; Welton, 1999). Une étude a montré que la présence de 3 à 5 % d'eau inhibait totalement la solubilisation de *Miscanthus* dans l'[Emim]Ac et l'[Emim]Cl (Padmanabhan et al., 2011). Dans le cas de la cellulose, Swatloski et al. (2002) ont observé une diminution de la solubilité de ce polymère en présence d'eau dans les LIs, ceci étant dû à la compétition entre la cellulose et l'eau pour former des liaisons hydrogène avec l'anion du LI. Cependant, une autre étude a montré qu'en condition totalement anhydre, la dissolution de bois de pin était inhibée dans le [Bmim]Cl (traitement de 15 h à 120°C) alors que ceci n'affectait pas le processus de dissolution avec le [Bmim]Ac (Brandt et al., 2010). Les auteurs ont conclu qu'une certaine quantité d'eau était nécessaire pour initier la solubilisation de la lignine dans le [Bmim]Cl. La teneur en eau de l'échantillon et/ou du LI peut donc influencer sur le processus de dissolution en le stimulant ou en l'inhibant suivant le LI.

##### *La température*

La température de dissolution influe aussi sur le processus et la vitesse de dissolution. Nous avons en effet observé que quel que soit le LI, la dissolution était plus rapide à 100°C qu'à 80°C. La température affecte dans un premier temps la viscosité du LI : plus la température augmente, plus la viscosité diminue (Weingärtner, 2008). La diminution de la viscosité permet ainsi une meilleure agitation. De plus, des températures élevées entraînent une

déstabilisation des liaisons hydrogène de la cellulose. Ce qui explique que plus la température est importante, plus la dissolution du bois est rapide (Zavrel et al., 2009).

#### *La taille des particules et le ratio massique bois/LI*

D'autres paramètres influent également sur la vitesse de dissolution du bois tels que la taille des particules et le pourcentage de bois par rapport au LI. Kilpeläinen et al. (2007) et Sun et al. (2009) ont montré que plus les particules de bois étaient fines, plus la dissolution dans un LI était rapide. Ceci est dû à une augmentation de la surface de contact avec le LI qui facilite la diffusion de ce dernier dans le bois. De plus, un broyage plus long pour obtenir de plus fines particules permet de casser de manière plus importante les structures pariétales. Sun et al. (2009) ont également observé que plus la proportion de poudre de bois était faible, meilleure était la capacité de dissolution du LI. Par exemple, dans l'[Emim]Ac, après 16 h à 110°C, le taux de dissolution du bois de pin est de 99,5 % pour 4 % (m/m) de poudre de bois par rapport au LI et de 40 % pour 10 % de bois (Sun et al., 2009). Basé sur cette étude et en tenant compte des quantités de poudre de bois de douglas dont nous disposons pour chacun de nos échantillons, nous avons choisi d'effectuer la dissolution avec 1 % de poudre de bois dans les différents LIs.

### **3.4.1.3 Identification des polymères pariétaux**

Une fois solubilisés dans les LIs, les polymères pariétaux du bois ont été analysés à l'aide de techniques immunologiques utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes de ces composés. Dans le cadre de cette étude, 16 anticorps capables de reconnaître les principales hémicelluloses et pectines de la paroi, ainsi que des protéines pariétales, les AGPs, ont été choisis.

La purification ou la solubilisation des polymères pariétaux avant les analyses ELISA (ou dot-blot) présentent l'avantage de rendre en théorie tous les polymères, et ainsi leurs épitopes, libres d'accès pour les anticorps (Marcus et al., 2008). Cependant les solvants utilisés pour purifier ou solubiliser les polymères pariétaux peuvent entraîner des dégradations ou des modifications de la structure chimique des épitopes reconnus par les anticorps (Pattathil et al., 2012). Nous avons ainsi observé, après dissolution du bois de douglas dans différents LIs à différentes températures, des intensités variables de marquages suite aux analyses ELISA pour un même anticorps. Avant d'analyser par ELISA le bois de douglas dissout dans les différents LIs, des gammes de polymères témoins ont été réalisées afin d'observer la proportionnalité du marquage en fonction de la quantité de polymère déposée, comme dans le

cas du dot-blot (Plazanet et al., 2015). Les résultats ont montré que les 6 LIs utilisés ([Emim]Br, [Emim]Ac, [Amim]Br, [Amim]Cl, DBUC<sub>4</sub>Br et DBUC<sub>4</sub>Cl) n'interfèrent pas avec la reconnaissance des polymères par les anticorps et le marquage est proportionnel à la quantité de polymère déposée sur plaque ELISA, malgré quelques différences au niveau du seuil de détection en fonction des LIs. Pour deux anticorps, CCRC-M1 et LM22, les gammes de polymères témoins n'ont pas pu être réalisées. Dans le cas du premier, aucun polymère de xyloglucane fucosylé n'est commercialement disponible et aucun marquage n'a pu être obtenu avec la gomme karaya (polymères composés de rhamnose, acide glucuronique et galactose supposés partiellement acétylés, Sigma-Aldrich). Concernant LM22, des essais ont été menés avec la gomme de guar et avec des  $\beta$ -(1-4)-mannopentaoses. Cet anticorps ne reconnaît pas les galactomannanes, ce qui peut expliquer l'absence de marquage pour la gomme de guar (principalement composée de galactomannanes). En revanche, Marcus et al. (2010) ont montré que LM22 se liait de manière efficace aux  $\beta$ -(1-4)-mannopentaoses. Dans les différentes études utilisant les oligosaccharides en tests ELISA ou dot-blot, les oligosaccharides sont toujours couplés à d'autres polymères tels que des protéines (notamment la BSA) avant leur immobilisation sur membranes ou sur plaques ELISA (Pedersen et al., 2012). Dans notre cas, il est possible que les interactions entre les  $\beta$ -(1-4)-mannopentaoses seuls et le polycarbonate de la plaque ELISA ne soient pas suffisantes pour immobiliser ses oligosaccharides, ce qui explique l'absence de marquage avec l'anticorps LM22.

Les échantillons de bois totalement dissout dans chacun des LIs ont ensuite été analysés avec le set des 16 anticorps. Dans le cas du DBUC<sub>4</sub>Br, des marquages de faible intensité ont été observés pour tous les polymères. De plus, certains marquages de pectines et de xyloglucanes disparaissent suite à une dissolution à température plus élevée (100°C contre 80°C). Le DBUC<sub>4</sub>Cl est un des LIs étudié qui présente les meilleurs taux de marquage pour tous les polymères, notamment pour les pectines. Malgré ces résultats, le DBUC<sub>4</sub>Cl ainsi que le DBUC<sub>4</sub>Br n'ont pas été sélectionnés pour notre étude car la solution de bois dissout obtenue présentait, dans les deux cas, une trop forte viscosité. Cette viscosité rendant compliqué le prélèvement d'un volume précis (une vingtaine de  $\mu$ l) de solution. Des marquages faibles, voire inexistantes, ont été observés pour les pectines après dissolution du bois dans l'[Amim]Cl et l'[Emim]Ac à 80 et 100°C. Les solutions de bois dissout dans l'[Emim]Br et l'[Amim]Br à 80°C présentent des niveaux de marquage intéressants pour tous les polymères. A une température de dissolution de 100°C, certains marquages de pectines disparaissent dans le cas

de l'[Emim]Br. D'une manière générale, pour tous ces LIs, les marquages obtenus pour les xylanes et les mannanes sont plus élevés lorsque le bois est dissout à 100°C qu'à 80°C. Ceci montre que, dans les solutions obtenues après dissolution à 80°C, certains épitopes des mannanes et xylanes restent inaccessibles aux anticorps. Un chauffage à température plus élevée permettrait donc de mieux dissocier ces hémicelluloses des autres constituants pariétaux. Au sein du bois des conifères, les (galacto)glucomannanes sont orientés de manière parallèle aux microfibrilles de cellulose avec lesquels ils présentent des interactions très fortes (Åkerholm, 2003; Salmén and Olsson, 1998). Les (arabino)glucuronoxylanes et (glucurono)arabinoxylanes sont, quant à eux, liés *via* des liaisons esters au niveau des acides uroniques de leurs chaînes latérales avec les lignines (Ebringerova et al., 2005; Kačuráková et al., 1998). Des températures de dissolution élevées permettraient donc de mieux dissocier les mannanes et xylanes de la cellulose et des lignines. Cependant, il a été constaté que les marquages des pectines diminuaient, voire disparaissaient, en augmentant la température de 80 à 100°C. Un traitement à température trop élevée peut entraîner des dégradations de certains polymères ou bien des modifications chimiques des épitopes reconnus par les anticorps. Un traitement micro-onde peut également conduire au même résultat. Nous avons en effet remarqué, lors de l'analyse par dot-blot du bois de noyer dissout dans l'[Emim]Ac, une diminution du marquage des HGs suite à un traitement micro-onde après un chauffage classique (Plazanet et al., 2015). Sosha et al. (2014) ont étudié les profils d'immunomarquage d'une céréale, *Panicum virgatum*, après une extraction séquentielle des polymères pariétaux avec ou sans prétraitement avec l'[Emim]Ac (3 h à 160°C). Ils ont constaté qu'avec le prétraitement au LI, le marquage des HGs (CCRC-M38, JIM5 et JIM7 entre autres) disparaissait, ainsi que celui des RG I et d'une partie des arabinogalactanes. En revanche, suite au prétraitement par l'[Emim]Ac, des marquages des galactomannanes sont observés et les marquages des xylanes et des xyloglucanes sont plus intenses. En solubilisant du bois de pin, de chêne, ou de la cellulose microcristalline dans l'[Emim]Ac, Sun et al. (2009) ont constaté des dégradations mineures des polymères après 16 h à 110°C (présence d'oligosaccharides). Il a également été montré que l'anion acétate du LI pouvait facilement être protoné par les acides organiques naturellement présents dans le bois, pour former de l'acide acétique (Li et al., 2010a). Des conditions acides peuvent être à l'origine de la dégradation partielle des hémicelluloses, de la cellulose et de la lignine (Li et al., 2010b), ainsi que des HGs (Krall and McFeeters, 1998). L'acétate du LI [Emim]Ac peut aussi acétyler les polysaccharides et donc masquer certains épitopes de polymères. Ceci a été montré pour la cellulose : après 20 min à 150°C, la cellulose a un degré de substitution par des acétyls de

0,017 (Karatzos et al., 2012). Les modifications des polymères pariétaux après dissolution dans les LIs ont été peu étudiées à l'exception du LI [Emim]Ac comme nous venons de le voir. Une étude a cependant été menée sur les conséquences d'une solubilisation totale de la poudre de bambou dans l'[Amim]Cl après 12 h à 100°C (Yang et al., 2013). Ces auteurs ont observé une dégradation partielle des hémicelluloses et de la lignine. De plus, ils ont également montré un clivage possible des ramifications d'acide glucuronique des 4-O-méthylarabinoglucuronoxylanes, principales hémicelluloses retrouvées chez le bambou. Malgré les possibles dégradations partielles de polymères dans l'[Emim]Br, nous avons choisi ce LI pour solubiliser le bois de douglas avant d'en étudier sa composition à l'aide de la technique ELISA.

Six jours à 80°C dans l'[Emim]Br avaient été nécessaires pour dissoudre complètement la poudre de bois d'aubier externe broyé au Danguomeau. En revanche, seuls 3 jours dans ce LI ont suffi pour dissoudre totalement la poudre de bois d'aubier ou de duramen broyée dans l'azote liquide au broyeur à bille Retsch, du fait d'une plus grande finesse de la poudre. En comparant les immunomarquages obtenus suite à une dissolution de poudre de bois initial et de bois final pendant 3 ou 4 jours à 80°C, suivi ou non de 2 h à 100°C, nous avons constaté peu de différences avec un nombre limité d'anticorps (6 anticorps). L'augmentation du temps de traitement entraîne une diminution de l'intensité du marquage pour les galactanes et une augmentation pour les xylanes et mannanes. Les différences de marquage entre les traitements sont néanmoins faibles, signe que ces différences de temps de dissolution et de température n'impactent que très peu la solubilisation et/ou la dégradation des polymères. L'augmentation du temps de dissolution permet, comme nous l'avons vu avec l'augmentation des températures de dissolution, une meilleure solubilisation des mannanes et xylanes. L'ajout d'une étape de dissolution de 2 h à 100°C suite au traitement à 80°C n'a aucun impact sur les résultats d'immunomarquage. Basé sur ces résultats, un traitement de 4 jours à 80°C a été entrepris pour la dissolution de tous les cernes des carottes de bois prélevées mensuellement.

Avant l'application de la méthode LI/ELISA aux carottes de douglas, la reproductibilité de la méthode a été évaluée à partir du bois initial et final de tous les cernes d'une rondelle de bois de douglas. La dissolution d'un même échantillon a été réalisée en triplicata. La vitesse de dissolution est identique pour le bois initial et le bois final d'aubier ou de duramen. La méthode est reproductible pour les HGs et les RG I. En revanche, cette reproductibilité n'est pas parfaite dans le cas des polymères fortement liés à la paroi. La dissolution du bois n'est peut-être, par conséquent, pas toujours homogène. La dissolution a été réalisée en tubes à

essai en verre de 8 ml, posés sur un portoir dans un bain d'huile (18 tubes maximum par portoir, avec dans chaque tube un barreau magnétique). Cependant, il n'était pas possible de régler précisément l'intensité de l'agitation, de légères variations ont donc pu se produire entre lots de 18 tubes. De plus, suivant la position du tube sur la plaque chauffante magnétique, de légères différences de vitesse d'agitation pouvaient s'observer entre deux barreaux magnétiques. Ces légères variations d'intensité d'agitation entre les échantillons peuvent peut-être expliquer le manque de reproductibilité de la dissolution dans le LI. La méthode n'est pas reproductible dans le cas des AGPs, des xyloglucanes de type XXXG et fucosylés. Les marquages obtenus avec les anticorps reconnaissant des épitopes de ces polymères sont de très faibles intensités. La présence en faibles proportions de ces polymères, leur dégradation partielle lors du traitement dans le LI ou encore le manque de reproductibilité de l'étape de dissolution pourraient expliquer les différences de marquage observées entre les répétitions d'un même échantillon. Par conséquent, nous avons choisi d'analyser de nombreuses carottes de bois de douglas (40 au total) afin d'identifier les tendances générales des proportions des différents polymères pariétaux de l'aubier externe au cœur du duramen, sans quantification. La quantification n'est en effet pas possible du fait d'une réactivité des anticorps variable entre les polysaccharides témoins provenant de diverses espèces végétales et les polysaccharides du bois de douglas. Dans le cas de notre étude, nous avons par exemple constaté une intensité de marquage des mannanes de douglas supérieure à celle des galactomannanes de gomme guar.

### **3.4.2 Composition biochimique du bois**

La composition en polymères pariétaux du bois de douglas a été caractérisée à l'aide de la technique LI/ELISA développée dans le cadre de ce travail de recherche et également *in-situ* à l'aide de techniques de microscopie (microscopie confocale couplée à des immunomarquages et microspectroscopie IR). Afin d'étudier les structures complexes et diverses de la paroi végétale, il est possible d'utiliser les anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de polymères pariétaux pour des détections *in-vitro* après solubilisation des parois ou bien pour des visualisations *in-situ* par microscopie au sein de la paroi. Lors d'analyses *in-vitro*, certains épitopes peuvent être perdus ou modifiés au cours de l'étape de purification ou de solubilisation des polymères, comme nous avons pu le voir précédemment. Il est donc judicieux de coupler les analyses *in-vitro* aux analyses *in-situ* afin de fiabiliser les informations obtenues quant à la composition et la structure de la paroi à l'aide des anticorps.

C'est dans cette optique que les deux méthodes ont été choisies pour analyser la composition du bois de douglas.

#### **3.4.2.1 Proportions générales des polymères pariétaux dans le bois**

Grâce à la technique LI/ELISA, nous avons, dans un premier temps, observé les proportions relatives de chacun des polymères pariétaux dans le bois de douglas. Les intensités de marquages par les anticorps pour les polymères analysés montrent que les galactomannanes, mannanes et glucomannanes sont les hémicelluloses majoritaires du bois de douglas. En terme de proportion, viennent ensuite les arabinoxylyanes, puis en moindre mesure les xyloglucanes glycosylés, les galactanes et les xylanes peu ou pas substitués. Des proportions plus faibles sont observées pour les pectines (HG et RG I), les AGPs, les xyloglucanes de types XXXG et fucosylés et les arabinanes.

Dans le bois de douglas, Alvarez-Vasco et Zhang (2013) ont estimé la proportion de galactoglucomannanes à 20,1 %, celle des arabinoxylyanes à 3,2 % et celle de cellulose à 44%. Les résultats obtenus par ces auteurs sont en accord avec ceux retrouvés chez d'autres essences résineuses. En effet, chez plusieurs essences (épinette blanche, sapin et pin), la cellulose représente 41-42 % de la masse sèche du bois, la lignine 27-29 %, les galactoglucomannanes 18 %, les arabinoxylyanes 9-13 % et les autres polymères (pectines, amidon...) 1-3 % (Hon and Shiraishi, 2000).

Deux types de galactoglucomannanes sont retrouvés chez les conifères : le premier est riche en galactose (avec un ratio galactose:glucose:mannose d'environ 1:1:3 et solubles dans l'eau), le second est pauvre en galactose (ratio d'environ 0,1:1:3, solubles en solutions alcalines) (Timell, 1967). Chez le douglas, un marquage beaucoup plus intense (entre 2 et 5 fois plus suivant les cernes) a été observé avec l'anticorps LM21, capable de reconnaître des épitopes de mannanes, glucomannanes et galactomannanes, qu'avec LM22 qui ne reconnaît que les deux premiers types de polymères (Marcus et al., 2010). Ces résultats montrent qu'une proportion importante des galactoglucomannanes du bois de douglas est riche en galactose. Chez les résineux, des précédentes études ont montré que les galactoglucomannanes riches en galactose représentaient 5 à 10 % de la masse sèche du bois tandis que les pauvres en galactose 10 à 15 % (Timell, 1967). Il semblerait que chez le douglas, les galactoglucomannanes riches en galactose soient majoritaires.

Les analyses ELISA ont montré que les xylanes retrouvés dans le bois étaient majoritairement des arabinoxyanes (forte intensité du marquage avec LM11 par rapport à LM10), ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Alvarez-Vasco et Zhang (2013) et Timell (1967).

Le marquage le plus intense observé pour le bois de douglas, après celui des arabinoxyanes, est le marquage obtenu avec LM25, anticorps dirigés contre les xyloglucanes galactosylés. Cependant, dans toutes les analyses *ex-situ* portant sur les hémicelluloses de bois de résineux, les xyloglucanes ne sont pas détectés (Alvarez-Vasco and Zhang, 2013; Hon and Shiraishi, 2000; Timell, 1967). Bien que LM25 reconnaisse plus fortement les oligomères de xyloglucanes galactosylés, il reconnaît également les  $\beta$ -glucanes non-substitués (Pedersen et al., 2012). Le fort marquage observé par LM25 lors des analyses ELISA pourrait résulter de sa reconnaissance des molécules de cellulose dissociées lors du traitement par le LI. Pour confirmer cette hypothèse, de la cellulose microcristalline a été dissoute dans l'[Emin]Br et nous avons en effet constaté un marquage avec l'anticorps LM25 de la solution obtenue. *In-situ*, les immunomarquages de la TZ de bois de douglas ont révélé que cet anticorps se liait à la paroi primaire des trachéides et à la paroi des cellules parenchymateuses et que son marquage n'était guère plus intense que celui observé avec l'anticorps LM15. *In-vivo*, la structure microfibrillaire de la cellulose pourrait ainsi empêcher sa reconnaissance par LM25.

Lors de l'analyse du bois de douglas par la méthode LI/ELISA, le marquage le plus intense après celui obtenu avec LM25 a été celui avec LM5. Cet anticorps reconnaît des épitopes de (1-4)- $\beta$ -galactanes (Jones et al., 1997). Dans le bois normal de résineux, les (1-4)- $\beta$ -galactanes sont présents en très faibles proportions en revanche, le bois de compression peut en contenir jusqu'à 10 % de sa masse sèche (Timell, 1967). Chez le douglas, deux études ont montré que ces polymères représentaient environ 2 % de la masse sèche du bois normal (Alvarez-Vasco and Zhang, 2013; Zhang et al., 2014). Ces proportions sont en accord avec l'intensité du marquage observé dans notre étude.

Tous les autres polymères pariétaux (pectines, xyloglucanes, arabinanes) représentent moins de 2 % du bois de résineux et ont révélé de très faibles marquages comparés aux polymères que nous venons de décrire. L'intensité des marquages obtenus décroît dans l'ordre suivant : HGs, RG I, xyloglucanes de types XXXG, arabinanes, xyloglucanes fucosylés/RG I et pour finir l'intensité de marquage la plus faible est relevée pour les AGPs (excepté pour les deux premiers cernes d'aubier externe où le marquage est plus intense). Concernant les HGs, la méthode LI/ELISA n'est pas adaptée pour déterminer la proportion de ces polymères

méthylestérifiés. En effet, le traitement avec l'[Emim]Br altère les épitopes reconnus par LM20, anticorps dirigés contre les HGs méthylestérifiés (Verhertbruggen et al., 2009). Ceci a été confirmé par les immunomarquages *in-situ* qui révèlent la présence de ces polymères au sein de la paroi primaire des trachéides et de la paroi des cellules des rayons. Suite à une extraction séquentielle des polymères pariétaux de bois de douglas, Pattathil et al. (2015) ont constaté des marquages plus intenses pour différentes fractions extraites (extractions à l'oxalate, au carbonate et au KOH 1 M) avec les anticorps CCRC-M38 et JIM5 qu'avec l'anticorps JIM7 (JIM5 reconnaissant des épitopes d'HGs non estérifiées ou présentant un degré de méthylestérification inférieur à 50 %, JIM7 les homogalactronanes ayant un degré de méthylestérification de 35 à 90 % (Hafren et al., 2000; Knox et al., 1990; Willats et al., 2000), et CCRC-M38 les HGs non estérifiés (Pattathil et al., 2010)). Il semblerait donc d'après ces résultats, que le bois de douglas contienne une part plus importante d'HGs pas ou peu méthylestérifiés. Lors de leur étude, Pattathil et al. (2015) ont également observé des marquages pour les xyloglucanes non-fucosylés et fucosylés (notamment avec l'anticorps CCRC-M1), les  $\beta$ -glucanes, les RG I et les arabinogalactanes.

#### **3.4.2.2 Evolution de la composition du bois de l'aubier externe au cœur du duramen**

La technique LI/ELISA a aussi permis d'observer l'évolution de la composition pariétale du bois de douglas, cerne par cerne, de la périphérie du tronc jusqu'à son cœur. Aucune analyse portant sur la caractérisation de la composition du bois n'avait jusqu'à maintenant été réalisée de manière aussi fine. Certains polymères pariétaux ne présentent pas de distribution particulière, tandis que d'autres sont en proportions plus importantes dans le duramen ou dans l'aubier. Parmi les polymères prédominants dans l'aubier, se trouvent les arabinanes. Les polymères retrouvés en proportions majoritaires dans le duramen sont les pectines (HG et RG I), les xyloglucanes à motif XXLG et/ou XLLG, les xylanes et pour la plupart des carottes les galactanes. Parmi les polymères indifféremment distribués se retrouvent les AGPs, les xyloglucanes de type XXXG et fucosylés, les mannanes, glucommananes et galactommananes. Pour ces polymères, de nettes différences de proportions sont parfois observées d'un cerne à l'autre, et aussi pour un même cerne de différentes carottes appartenant à un même arbre. La reproductibilité de la méthode LI/ELISA peut être remise en cause pour ces polymères, notamment au niveau de la phase de dissolution du bois.

A partir de bois d'épicéa, Bertaud et Holmbom (2004) ont comparé la composition monosaccharidique de bois d'aubier, de TZ et de duramen. Chez l'épicéa, les

galactoglucomannanes représentent 15 à 20 % de la masse sèche du bois et les arabinoglucuronoxylanes 5 à 10 % (Sjöström and Westermark, 1999). Bertaud et Holmbom (2004) ont constaté des proportions en galactoglucomannanes similaires entre les 3 zones et des proportions en pectines, arabinoxylanes et galactanes plus importantes dans le duramen que dans l'aubier. Les données obtenues sur le bois de douglas sont en accord avec ces résultats. En parallèle, Bertaud et Holmbom (2004) ont déterminé que le contenu en cellulose diminuait de l'aubier au duramen et que le contenu en lignine suivait une tendance inverse.

Dans le bois de douglas, nous avons observé que la majorité des changements de proportions des polymères pariétaux intervient au niveau des cernes aux alentours de la TZ (cernes 9 à 11 à partir du cambium). Ceci est observé pour les pectines, les xylanes, les xyloclucanes, les galactanes et les arabinanes. En revanche, nous n'avons pas remarqué de variations liées à la saison de prélèvement des carottes au niveau de la TZ. Des variations peuvent être constatées d'une saison à l'autre mais sans aucune logique entre les arbres. La TZ aubier/duramen correspond également à la zone de début d'évolution du bois juvénile en bois mature. En effet, chez le douglas, la transition entre bois juvénile et bois mature intervient en général progressivement entre 10 et 26 ans (Peterson et al., 2007). En comparant la composition monosaccharidique du bois juvénile et du bois mature de pin (*Pinus taeda*), peu de différences ont été observées (Yeh et al., 2006). Le bois juvénile à la même proportion de glucose, légèrement moins de mannose (19,5 vs 20,6 %) et légèrement plus de galactose (2,3 vs 2,1 %), d'arabinose (1,9 vs 1,7 %) et de xylose (10 vs 9,3 %). Ceci suggère donc moins de mannanes et plus de xylanes dans le bois juvénile normal. Comparé au bois mature, le bois juvénile contient plus de bois de compression (Timell, 1986; Zobel, 1981). Yeh et al. (2006) ont constaté des différences de composition chimique entre le bois normal et le bois de compression. Le bois de compression contient moins de glucose (59,7 vs 67 %), de mannose (10,6 vs 17,4 %) et plus de xylose (12,5 vs 10,7 %) et surtout de galactose (15,3 vs 2,0 %) que le bois opposé. Ces valeurs ont été relevées pour le bois juvénile mais des différences de même ordre sont retrouvées dans le cas du bois mature. La présence de bois de compression dans certaines zones des carottes de bois de douglas pourrait peut être expliquer les proportions élevées de galactanes observées au niveau de l'aubier de certains arbres (arbres 2 et 7). Les carottes prélevées étant trop fines, il n'était pas possible d'observer visuellement la présence de bois de compression. Afin de confirmer que les variations de proportions en polymères observées au niveau de la TZ ne proviennent pas de l'évolution du bois juvénile en bois mature, il serait intéressant de caractériser la composition biochimique de douglas plus

agés pour que la TZ aubier/duramen ne coïncide pas avec la zone d'évolution du bois juvénile en bois mature.

Pour les pectines (HG<sub>s</sub> et RG I), nous avons constaté des proportions plus importantes dans les tous premiers cernes d'aubier externe comparé au reste de l'aubier. En étudiant par des colorations et des immunomarquages du xylème de pin à différents stades de maturité, Putoczki et al. (2008) ont remarqué un gradient décroissant de marquage à partir de la zone cambiale lors de la maturation des trachéides. Ceci suggérerait pour ces auteurs que le dépôt des pectines, leur estérification et/ou dégradation pourraient être régulées suivant les stades de développement, durant lesquels les pectines y joueraient des rôles spécifiques. Chez les conifères, des analyses biochimiques ont révélé que les pectines représentaient 8-10 % de la masse sèche du cambium/phloème, 0,5 à 3,8 % étant retrouvés dans l'aubier et 0,12 à 1,5 % dans le duramen (Makarova et al., 2015).

### **3.4.2.3 Composition du bois initial et du bois final**

Avec la technique LI/ELISA, une analyse de la composition du bois initial et du bois final de l'aubier externe au cœur du duramen a également été menée, cerne par cerne, à partir d'une rondelle de bois de douglas. Les résultats ont montré des marquages plus intenses pour les pectines (HG<sub>s</sub> et RG I), les xyloglucanes, les xylanes et les arabinanes pour le bois initial de l'aubier et du duramen. Pour les arabinanes et les xylanes, les différences de proportions entre bois final et bois initial sont moins marquées pour les cernes les plus au centre du duramen. Des proportions plus élevées de galactoglucomannanes ont été observées dans le bois final. Dans le cas des galactanes, il est remarqué des proportions plus grandes dans le bois final que dans le bois initial de l'aubier et l'inverse pour le duramen. Les analyses de la composition monosaccharidique du bois de douglas menées par Zhang et al. (2014) sont en désaccord avec ces résultats puisqu'elles ont révélé des proportions plus importantes de galactanes dans le bois initial du duramen mais également de l'aubier (Tableau 21). Ces auteurs ont, tout comme nous, constaté dans l'aubier des proportions plus importantes d'arabinanes et de xylanes dans le bois initial et des proportions de mannanes plus élevées dans le bois final. Chez le pin sylvestre, le bois initial contient plus de galactanes et d'arabinoglucuronoxylanes et moins de glucomannanes et d'arabinanes que le bois final (Hon and Shiraishi, 2000). Concernant l'épicéa commun, Bertaud et Holmbom (2004) ont aussi observé une proportion plus importante de galactoglucomannanes dans le bois final. Ces polymères sont majoritairement retrouvés dans la couche S2 de la paroi secondaire (Timell, 1965) et celle-ci est beaucoup plus épaisse dans le cas du bois final, ces résultats sont donc cohérents. Ils n'ont, en revanche, pas

observé de différence quant aux proportions d'arabinoxylanes entre le bois initial et le bois final. Chez l'épicéa commun, les pectines (HG et RG I) sont également prédominantes dans le bois initial. Ceci s'explique par leur localisation au sein de la lamelle moyenne (Hafrén et al., 2000a; Timell, 1965), proportionnellement plus représentée dans les cellules à fine paroi secondaire du bois initial que dans celles à paroi secondaire épaisse du bois final.

**Tableau 21 : Composition biochimique de différents échantillons de bois de douglas (Zhang et al., 2014).**

	Lignine (%)	Arabinanes (%)	Galactanes (%)	Glucanes (%)	Xylanes (%)	Mannanes (%)
Duramen/bois final	27,5 ± 0,19	0,78 ± 0,17	1,91 ± 0,01	41,75 ± 2,79	3,63 ± 0,11	10,90 ± 0,24
Duramen/bois initial	32,9 ± 0,23	0,63 ± 0,60	3,27 ± 0,43	40,70 ± 2,82	3,81 ± 0,40	8,54 ± 0,61
Aubier/bois final	24,6 ± 0,17	0,84 ± 0,03	1,67 ± 0,05	48,10 ± 0,33	3,71 ± 0,55	12,36 ± 2,35
Aubier/bois initial	30,9 ± 0,21	1,08 ± 0,03	1,71 ± 0,05	43,87 ± 2,54	4,47 ± 0,52	9,34 ± 2,44

Les différences de proportions des polymères entre le bois initial et le bois final pourraient expliquer certaines différences de marquage observées entre certains cerne sur une même carotte et pour un même cerne sur des carottes appartenant à un même arbre. Concernant les arbres du génotype 3, une analyse microdensitométrique a permis de délimiter le bois initial et final de chaque cerne des arbres abattus à Gimel. Nous avons constaté des proportions plus importantes de bois initial au sein des premiers cerne d'aubier, puis la tendance générale montre une diminution jusqu'au cœur du duramen. Dans l'aubier, les proportions de bois initial pour le génotype 3 varient de 35 à 88 % et pour le duramen de 30 à 60 %. Pour deux cerne voisins d'aubier, la différence de proportion de bois initial peut atteindre 30 %. Tout comme cette différence peut être atteinte pour un même cerne en 2 positions diamétralement opposées. Ces différences de proportions entre bois initial et bois final peuvent par exemple expliquer le fait que dans les premiers cerne d'aubier qui contiennent plus de bois initial, on retrouve plus de pectines et de xyloglucanes et moins de mannanes.

Du fait de ces différences entre bois initial et bois final, il aurait été intéressant de réaliser la cinétique d'évolution de la composition du bois de douglas cerne par cerne à partir de toutes les carottes en séparant ces deux types de bois. Cependant, la quantité de matériel par cerne était malheureusement trop restreinte. Quoiqu'il en soit, grâce à la méthode LI/ELISA, nous avons réalisé la première étude aussi fine de la composition pariétale du bois de résineux.

### 3.4.2.4 Répartition des polymères pariétaux dans la zone de transition du bois de douglas

#### 3.4.2.4.1 La lignine

A l'heure actuelle, aucun anticorps reconnaissant la lignine n'est commercialement disponible. Il n'était donc pas possible d'utiliser la méthode précédemment développée pour caractériser sa composition et ses variations de proportion au sein du bois. Pour ce polymère, seules des analyses *in-situ* de la TZ utilisant différentes méthodes couplées à la microscopie ont par conséquent été employées. Les cellules du bois présentent une fluorescence naturelle due principalement à la présence de lignine (Olmstead and Gray, 1997). La lignine a un large spectre d'émission de fluorescence et elle peut être excitée dans l'UV ou le visible (Donaldson, 2013). Cette propriété d'autofluorescence de la lignine peut être mise à profit pour localiser la répartition de ce polymère, et évaluer sa proportion, au sein de la paroi. Donaldson et al. (2010) ont montré que le spectre d'émission de fluorescence du bois de pin pouvait se décomposer en cinq composants distincts suggérant la présence de cinq domaines conjugués indépendants qui émettent à différentes longueurs d'onde. Ces variations sont fonction tout à la fois de la taille et de la composition des oligomères de lignine, avec ici 2 familles possibles : des homo-oligomères d'alcools conyféryliques et des hétéro-oligomères d'unités G et H. Ainsi, dans le cas du bois de compression, pour lequel une plus grande proportion d'unités H est associée aux unités G, on observe une augmentation de la longueur d'onde de fluorescence (Donaldson et al., 2010). Lors de notre étude sur le bois de douglas, nous avons isolé seulement deux spectres d'émission de fluorescence distincts pour la lignine. Des différences de composition biochimiques sont ainsi mises en évidence entre plusieurs zones pariétales. La lamelle moyenne présente plutôt des fluorophores avec un spectre d'émission ayant un  $\lambda_{\max}$  à 475 nm, tandis que les parois des rayons ligneux et les torus plutôt des fluorophores avec un  $\lambda_{\max}$  à 500 nm. Les deux types de fluorophores sont retrouvés au sein de la paroi secondaire, l'intensité de chacun variant en fonction des réglages du focus au microscope. Afin d'identifier des différences de composition, des analyses *in-situ* en spectroscopie IR ont été réalisées. La cartographie IR obtenue montre des différences de composition entre la lamelle moyenne et la paroi secondaire des trachéides. Cependant, cette technique a seulement permis de mettre en évidence une proportion plus importante de lignine et plus d'interactions de type liaisons hydrogène entre les molécules dans la lamelle moyenne. La microspectroscopie IR n'est donc pas la technique la plus adaptée pour caractériser finement la structure des fluorophores du bois. Ce constat a également été fait par Djikanović et al. (2007) qui ont étudié les propriétés de fluorescence et les structures chimiques par

spectroscopie IR de lignines isolées d'épicéa et de peuplier ou synthétisées *de novo*. Ces auteurs ont montré de légères différences au niveau des fluorophores qui peuvent être dues à des différences au niveau des espèces moléculaires ou bien aux mêmes espèces moléculaires dans des environnements moléculaires différents entraînant de faibles déplacements de certaines bandes spectrales. L'influence de l'environnement moléculaire peut être multiple : liaisons hydrogènes, induction de dipôle ou encore encombrement stérique. Quoiqu'il en soit, ces auteurs n'ont pu caractériser les structures chimiques des fluorophores qu'ils ont isolés ou synthétisés à l'aide de la spectroscopie IR.

Bien que la microspectroscopie IR et la microscopie confocale à fluorescence ne permettent pas d'identifier la structure chimique des lignines du bois de douglas, ces techniques ont permis d'observer une proportion plus importante de lignine dans la lamelle moyenne. En effet, l'intensité de la fluorescence au niveau de la lamelle moyenne est beaucoup plus importante que dans le reste de la paroi des trachéides. Chez l'épicéa, il a été déterminé par microscopie UV que la concentration en lignine dans la lamelle moyenne était beaucoup plus élevée que dans la paroi secondaire des trachéides (Hon and Shiraishi, 2000). Cependant, comme la paroi secondaire représente une proportion plus importante du xylème, la majorité de la proportion de lignine totale du bois se trouve être dans la paroi secondaire. Chez cette essence, la lignine est uniformément répartie au sein de la paroi secondaire, tout comme nous avons pu l'observer chez le douglas. Il a été montré, chez le douglas, que la concentration en lignine était plus élevée dans la paroi secondaire des cellules des rayons parenchymateux que dans la paroi secondaire des trachéides, tout en étant cependant inférieure à la concentration en lignine de la lamelle moyenne (Hon and Shiraishi, 2000).

En utilisant la microscopie confocale à fluorescence pour étudier la répartition de la lignine, nous avons constaté que plus la longueur d'onde d'excitation de la lignine est élevée, plus son spectre d'émission est décalé dans le rouge lointain. Afin d'étudier à partir de mêmes coupes de bois la répartition de la lignine et également celle d'autres polymères pariétaux *via* des immunomarquages, il était donc nécessaire d'utiliser un fluorophore couplé à l'anticorps secondaire ayant une longueur d'onde d'excitation et un spectre d'émission décalés par rapport à ceux de l'autofluorescence de la lignine. Le fluorophore Alexa 647 a donc été choisi et l'excitation de la lignine a été réalisée à 405 nm afin que le spectre d'émission de la lignine chevauche le moins possible celui de l'Alexa 647, permettant ainsi d'identifier facilement la répartition des polymères immunomarqués.

#### 3.4.2.4.2 Les protéines et polysaccharides pariétaux

La répartition de ces polymères au sein de la TZ du bois de douglas a été analysée à l'aide du même set d'anticorps qu'utilisé pour la technique LI/ELISA à l'aide de la microscopie confocale à fluorescence. Des coupes de TZ de 15 µm d'épaisseur ont été réalisées au cryostat après imbibation d'eau sous vide de l'échantillon de bois. Avec cette technique, il n'a pas été possible de couper plus finement le bois sans déchirer les parois cellulaires. Ceci aurait pourtant permis de localiser plus précisément les marquages par les anticorps notamment au niveau de la zone lamelle moyenne/paroi primaire/couche S1 de la paroi secondaire. L'analyse de la répartition des polymères dans cette zone pariétale n'a pu être faite que de manière approximative. Pour résoudre ce problème, il aurait fallu inclure les échantillons dans des résines afin de réaliser des coupes plus fines et intègres. Donaldson et Knox (2012) sont ainsi parvenu à avoir des coupes de 700 nm d'épaisseur à partir de bois de pin inclu dans la résine LR. Afin de localiser plus finement les polymères étudiés, nous aurions également pu réaliser des immunomarquages à l'or pour des observations en microscopie électronique, ce qui aurait permis une plus fine résolution que la microscopie confocale (cette technique nécessite également des coupes ultra-fines). A l'aide de la microscopie confocale à fluorescence couplée à des immunomarquages, nous avons cependant rapidement pu voir si les polymères détectés à l'aide de la technique LI/ELISA étaient retrouvés *in-vivo* et observer l'intensité du marquage ainsi que leur localisation approximative *in-situ*. Avec tous les anticorps, les mêmes zones de marquage ont été observées pour le bois initial et le bois final et les intensités des marquages n'ont pas montré de variations en fonction des individus ou de la période de prélèvement des carottes de bois.

##### *Les pectines*

Dans la TZ de douglas, un marquage avec les anticorps JIM7 et LM20 a été observé au niveau de la zone paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides, dans les parois des rayons ligneux et au niveau des ponctuations. Il avait déjà été montré que ces anticorps présentaient des propriétés de reconnaissance similaires (Verhertbruggen et al., 2009). CCRC-M38, anticorps dirigé contre les HGs non-estérifiés, présente un marquage au niveau de la paroi primaire/lamelle moyenne, de la paroi des rayons et des ponctuations. Le marquage avec LM19 est uniquement observé au niveau des ponctuations entre les trachéides et les cellules des rayons ligneux et des torus. Ceci explique qu'avec la technique LI/ELISA, nous avons obtenu un marquage plus faible avec l'anticorps LM19 qu'avec JIM7 et CCRC-M38. Afin d'étudier la composition polysaccharidique du torus chez *Pinus strobus*, Maschek et al.

(2013) ont réalisé des marquages à l'aide du CBM3a et de l'anticorps JIM5 (détection des pectines non estérifiées ou avec un degré de méthylestérification inférieur à 50 %, Hafrén et al., 2000; Knox et al., 1990; Willats et al., 2000). Les résultats ont montré que dans les tori, des pectines et de la cellulose entourent une matrice intérieure et les pectines se retrouvent à l'extérieur des microfibrilles de cellulose. Putoczki et al. (2008) ont, quant à eux, analysé la répartition des HGs au sein de la paroi des trachéides de *Pinus radiata* en microscopie électronique à transmission suite à des immunomarquages à l'or avec JIM5 et JIM7. Les marquages avec ces deux anticorps sont observés au niveau des ponctuations et des parois des cellules des rayons ligneux. Le marquage étant plus intense avec JIM7. Avec cet anticorps, un marquage faible est aussi observé dans la lamelle moyenne. Les auteurs ont constaté un gradient de marquage de la zone cambiale aux trachéides matures. En effet, au niveau du cambium et des trachéides en développement, les marquages avec JIM7 et JIM5 sont très intenses dans la lamelle moyenne, la paroi des rayons et les ponctuations. Ce résultat a également été obtenu avec le pin sylvestre pour lequel il a été mis en évidence que les pectines méthylées étaient majoritaires dans les tissus lignifiés alors qu'au niveau de la zone cambiale les pectines acides et méthylés sont en proportion similaire (Hafrén et al., 2000).

Concernant les RG I, leur présence dans la TZ est remarquée au niveau des parois des rayons (CCRC-M35 et CCRC-M14) ainsi que très légèrement au niveau de la couche S3 (CCRC-M14) dans le bois de douglas. A notre connaissance, aucun immunomarquage n'a été réalisé sur du bois à l'aide de ces deux anticorps.

#### *Les xyloglucanes*

Au niveau de la TZ de douglas, nous avons observé la présence de xyloglucanes (anticorps LM15, LM25 et CCRC-M1) dans la paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides et dans la paroi des cellules parenchymateuses. Dans le bois de *Pinus radiata*, LM15 présente un marquage similaire (Donaldson and Knox, 2012).

#### *Les galactanes, arabinanes et AGPs*

Dans le bois normal de *Pinus radiata*, un marquage avec LM5 est observé dans la paroi primaire des trachéides. Tandis que dans le bois de compression, le marquage avec cet anticorps est également abondant dans la partie externe de la couche S2 et plus faiblement dans la couche S1 des parois secondaires des trachéides. Au niveau des jonctions tricellulaires de la lamelle moyenne, Altaner et al. (2010) ont constaté un fort marquage avec l'anticorps LM5, qu'ils attribuaient à la présence de  $\beta$ -(1-4)-galactanes comme chaînes latérales des RG

I. Dans le cas du douglas, nous avons observé un marquage avec l'anticorps LM5 au niveau de la paroi primaire/lamelle moyenne et dans la paroi des cellules des rayons. Un marquage identique a été observé avec l'anticorps LM6 dirigé contre les arabinanes. Des résultats similaires ont été obtenus dans le bois de compression d'épicéa de Sitka (Altaner et al., 2007). Altaner et al. (2010) ont observé un marquage des AGPs (anticorps MAC207 reconnaissant un épitope saccharidique des AGPs) dans les couches S1 et de manière plus intense dans la couche S3 des trachéides. En utilisant l'anticorps LM2 dirigé contre un épitope saccharidique contenant des acides glucuronique liés en  $\beta$  (Smallwood et al., 1995; Yates et al., 1996), un marquage de la TZ de bois de douglas est visible au niveau de la paroi primaire/lamelle moyenne des trachéides et de la paroi des cellules des rayons. L'absence de marquage au niveau de la couche S3 peut s'expliquer par une absence de l'épitope de LM2 ou bien par un masquage de ces épitopes par d'autres composés pariétaux tel que cela a déjà pu être observé dans d'autres études. En effet, chez *Pinus radiata*, Putoczki et al. (2007) n'ont observé un marquage au  $\beta$ -glucosyl-Yariv (composé capable d'interagir avec les AGPs), qu'au niveau de la paroi primaire. Ces auteurs ont suggéré que les lignines de la paroi secondaire devaient empêcher l'accès du Yariv aux AGPs.

#### *Les xylandes*

Altaner et al. (2010) ont montré par immunolocalisation en microscopie électronique que chez *Pinus radiata*, les xylandes non-substitués (LM10) se retrouvaient dans les couches S1 et S3 tandis que les xylandes substitués (LM11) dans toutes les couches de la paroi secondaire. Donaldson et Knox (2012) ont quant à eux observé un marquage par LM10 principalement au niveau des couches S1 et S3, des parois des ponctuations, et souvent au niveau des jonctions tricellulaires de la lamelle moyenne. Ces auteurs ont aussi détecté l'épitope de LM11 dans toutes les couches de la paroi secondaire, avec une plus grande proportion dans les couches S1 et S3, et également dans la paroi primaire. Concernant le bois de douglas, un marquage avec LM10 est observé au niveau de la paroi des cellules des rayons, de la paroi primaire/lamelle moyenne et de la couche S3 des trachéides. En plus de marquer ces différentes zones pariétales, l'anticorps LM11 présente un marquage de toutes les couches de la paroi secondaire des trachéides, avec un marquage plus intense dans les couches S1 et S3.

#### *Les mannanes*

Chez le douglas, le marquage avec les anticorps LM21 et LM22 est très intense au niveau de la paroi secondaire des trachéides et il est plus léger au niveau de la paroi des rayons. Avec LM21, le marquage est plus intense au niveau de la couche S3 tandis qu'avec LM22 au niveau des couches S1 et S3. Globalement, l'intensité du marquage est plus élevée avec LM21 qu'avec LM22, signe de la présence de galactomannanes dans le bois de douglas. Dans le bois normal de *Pinus radiata*, l'épitope de LM21 est détecté dans les couches S1 et S2 des parois secondaires des trachéides, le marquage étant plus fort à la limite des couches S1 et S2. L'anticorps LM22 présente également un marquage des couches S1 et S2 (Donaldson and Knox, 2012). Des différences de distribution des mannanes sont ainsi constatées entre le bois de pin et de douglas.

Des différences aux niveaux des compositions pariétales entre les cellules des rayons ligneux et des trachéides ont donc été visualisées chez le douglas. Chez le pin, des analyses de la composition de ces deux types cellulaires ont révélé que les cellules des rayons contenaient plus de lignine (40 vs 28 %), moins de cellulose (35 vs 42 %), moins de galactomannanes (9 vs 20 %), légèrement plus d'arabinoglucuronoxylanes (11 vs 8 %) et plus de pectines (2 vs 1 %) que les trachéides (Hon and Shiraishi, 2000).

### 3.5 Bilan

Dans l'optique d'analyser rapidement et à partir de petites quantités de poudre la composition en polymères pariétaux du bois de douglas, une nouvelle technique a été développée dans le cadre de ce travail de recherche. Cette technique met en jeu la dissolution de la biomasse dans des liquides ioniques (LIs), suivie d'une analyse des solutions obtenues par des techniques immunologiques (dot-blot et ELISA).

Différents LIs commerciaux ou synthétisés au laboratoire ont ainsi été testés quant à leur efficacité à dissoudre la poudre de bois de douglas par chauffage ou activation micro-onde. Bien que la dissolution du bois soit beaucoup plus rapide par traitement micro-onde, la dissolution par chauffage classique a été retenue du fait de sa rapidité et de sa simplicité à mettre en œuvre pour un grand nombre d'échantillons. Les différentes solutions obtenues après dissolution du bois ont été analysées à l'aide d'un set d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de polymères pariétaux. Des marquages variables ont été obtenus pour le bois de douglas en fonction du LI, signe que les épitopes des polymères ne sont pas totalement accessibles aux anticorps ou bien que des dégradations ou modifications chimiques des polymères interviennent suite au traitement dans les LIs. L'[Emim]Br étant l'un des LIs

paraissant le moins dégrader/modifier les polymères pariétaux, nous l'avons choisi pour solubiliser le bois de douglas à une température de 80°C, avant les analyses ELISA.

L'application de la technique LI/ELISA nous a ensuite permis de caractériser la composition du bois de douglas, cerne par cerne, de l'aubier externe au cœur du duramen, à partir de carottes de bois de douglas prélevées mensuellement. Globalement, l'étude des marquages obtenus avec les anticorps a montré que les épitopes de galactomannanes, glucomannanes et mannanes étaient les épitopes d'hémicelluloses les plus représentés dans le bois de douglas. Viennent ensuite ceux des arabinoxylanes, des galactanes et en bien moindre mesure, ceux des pectines (HG et RGI), des xyloglucanes, des arabinanes et des AGPs. Concernant les tendances en termes de proportion de ces polymères au sein du bois de douglas, nous avons constaté que les pectines (HG et RGI) étaient en proportions plus importantes dans le/les cernes les plus récemment formés de l'aubier, et dans le duramen. Les arabinanes sont quant à eux en proportion plus importantes dans l'aubier, leur proportion décroît à partir des 9-11<sup>èmes</sup> cernes à partir du cambium. Les galactanes semblent être en proportion plus élevée dans le duramen, même si les tendances sont variables entre les arbres étudiés. Les épitopes de xylanes sont également plus représentés au sein du duramen. Concernant les xyloglucanes, les AGPs et les galactomannanes, glucomannanes et mannanes, aucune tendance de proportion de l'aubier externe au cœur du duramen n'a été visualisée avec cette méthode (dont la reproductibilité peut être remise en cause pour ces polymères). Quels que soient les polymères pariétaux étudiés, la méthode LI/ELISA ne s'est pas avérée suffisamment sensible pour observer d'éventuelles variations de composition au niveau de la TZ en fonction de la saison de prélèvement des carottes de bois.

C'est pourquoi, dans l'optique d'affiner les résultats des analyses immunologiques *in-vitro* obtenus au niveau de la TZ, des immunomarquages *in-situ* ont été réalisés à l'aide du même panel d'anticorps à partir de carottes prélevées à différentes saisons. Quel que soit l'anticorps, aucune différence d'intensité de marquage entre les saisons n'a pu être observée avec cette technique. Les immunomarquages couplés à la microscopie confocale à fluorescence nous ont cependant permis d'observer la répartition des polymères au sein de la paroi. Des marquages assez intenses pour les épitopes de xyloglucanes (glycosylés, fucosylés ou à motif XXXG), de pectines (HG méthylestérifiés ou non, RG I), de galactanes, d'arabinanes et de xylanes peu substitués et d'arabinoxylanes sont observés au niveau de la paroi des rayons (marquage faible pour les mannanes, glucomannanes et galactomannanes). Des épitopes d'HG, de xyloglucanes, de galactanes, d'arabinanes, d'AGPs et de xylanes peu substitués sont

remarqués au niveau de la zone lamelle moyenne/paroi primaire. Concernant la paroi secondaire, un marquage important des épitopes de mannanes, glucomannanes et galactomannanes ainsi que des épitopes d'arabinoxylanes est constaté dans toutes les couches. Les marquages des épitopes d'arabinoxylanes étant plus intenses dans les couches S1 et S3 et ceux des galactomannanes dans la couche S3. Au niveau de cette dernière couche, des épitopes de RG I et de xylanes peu substitués sont également observés.



# *Chapitre 3 : Transcriptome et formation du duramen*

## **4.1 Introduction**

### **4.1.1 Etude bibliographique**

Le phénotype d'un individu est le résultat de l'expression différenciée de ses gènes. La connaissance du transcriptome est donc essentielle pour comprendre les processus physiologiques qui interviennent au cours du développement ou en réponse à des conditions environnementales variables. Le transcriptome correspond à l'ensemble des gènes qui sont exprimés (transcrits) au sein d'une cellule, d'un tissu ou encore d'un organe pour un stade de développement ou une condition physiologique définis. Les données issues de la transcriptomique peuvent être utilisées pour caractériser la structure transcriptionnelle des gènes, identifier des sites d'épissage alternatif ou autres modifications post-transcriptionnelles, détecter du polymorphisme génétique, ou encore quantifier les changements de niveaux d'expression de chaque transcrit pendant le développement ou sous différentes conditions environnementales (Strickler et al., 2012; Wang et al., 2009).

L'étude du transcriptome passe tout d'abord par l'extraction des ARN. De nombreuses méthodes ont été développées pour isoler des ARN de qualité à partir de tissus végétaux. Nous reviendrons sur ces méthodes dans la première partie de cette introduction bibliographique, avant de nous intéresser à la purification des transcrits et à la fabrication de banques d'ADNc qui sont les étapes préliminaires à l'étude du transcriptome. Différentes approches existent pour étudier le transcriptome, parmi lesquelles les méthodes d'hybridation et celles de séquençage. Le principe des approches d'hybridation est d'incuber les ADNc greffés à des molécules fluorescentes sur des sondes ADN liées à un support physique comme des membranes et/ou des lames de verre (macroarrays et microarrays). Ces techniques, relativement peu coûteuses, permettent d'obtenir rapidement d'importantes quantités de données. Cependant, elles présentent certaines limites : la liste des transcrits est limitative et fermée pour un état de connaissances donné, l'hybridation sur puce est destructive pour l'échantillon et les données ne peuvent être obtenues qu'une seule fois par lame, la technique présente une faible sensibilité de détection des transcrits rares, une saturation d'hybridation des transcrits très abondants et un important bruit de fond du fait d'hybridations croisées (Royce et al., 2007). Contrairement aux techniques d'hybridation, les approches par séquençage déterminent directement la séquence des ADNc. Ces approches ne ferment pas la liste des transcrits et sont ainsi ouvertes sur la découverte de nouveaux transcrits. De plus, les données expérimentales acquises ne sont pas perdues et peuvent être ré-exploitées

ultérieurement avec l'évolution des données de référence. La première technique utilisée était le séquençage par la méthode Sanger (Sanger et al., 1977) d'ADNc (Joosen et al., 2006) ou de banques d'EST (étiquette de séquence exprimée) (Richmond and Somerville, 2000). La méthode Sanger a été, durant une trentaine d'années, automatisée et perfectionnée afin d'en améliorer le débit de séquençage et a ainsi permis de séquencer le premier génome humain en 2004 (Consortium and others, 2004). L'objectif de réduire le coût de séquençage du génome humain pour moins de 1000 \$ (Schloss, 2008) a stimulé le développement et la commercialisation de séquenceurs de seconde génération (NGS : Next Generation Sequencing), la technologie Sanger étant considérée de première génération. Comparées à la méthode Sanger, les technologies NGS présentent diverses améliorations : la préparation des banques d'ADNc ne nécessite pas de clonage des fragments d'ADN dans des plasmides bactériens ; au lieu de centaines, ce sont des milliers à plusieurs millions de réactions de séquençage qui se déroulent en parallèle ; et les séquences sont obtenues directement sans étape supplémentaire nécessitant, comme pour la méthode Sanger, une séparation des séquences par électrophorèse. L'essor de ces nouvelles plateformes de séquençage a permis le développement de la méthode de RNA-Seq (RNA-Sequencing) utilisée dans le cadre de notre étude. Pour finir cette introduction bibliographique, nous présenterons les outils bio-informatiques nécessaires au traitement des données issues de RNA-Seq.

#### **4.1.1.1 Extraction des ARN**

Certaines propriétés des cellules végétales peuvent présenter des obstacles à la purification d'ARN. Ces obstacles potentiels incluent la présence d'une paroi cellulaire plus ou moins épaisse, l'abondance de polysaccharides et/ou de composés phénoliques, tannins et autres métabolites spécialisés ainsi que pour certains tissus de faibles quantités d'ARN. Suivant l'espèce végétale, le tissu ou encore le stade de développement, ces paramètres vont interférer avec les procédures d'extraction (Krieg, 1996). C'est pourquoi de nombreux protocoles d'extraction ont été développés et adaptés pour purifier les ARN à partir de tissus végétaux et plus particulièrement à partir du bois.

La première étape pour isoler des ARN passe par l'éclatement de la paroi afin d'en libérer le contenu cellulaire. La technique la plus efficace et la plus classiquement utilisée est la congélation du tissu suivie de sa réduction en fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon ou d'un broyeur. Il est important que l'échantillon reste congelé durant le broyage afin de limiter l'activité des ribonucléases (Krieg, 1996).

Certains tissus végétaux contiennent de grandes quantités de polysaccharides. Ces polymères ont des propriétés similaires aux acides nucléiques et peuvent co-précipiter avec les ARN. La contamination des ARN par ces polymères entraîne de nombreux problèmes : difficultés à suspendre le culot d'ARN, interférence avec les méthodes de quantification, gêne pour les migrations électrophorétiques ou la purification des polyA (Krieg, 1996). Deux approches peuvent être envisagées pour purifier les ARN des polysaccharides : précipiter les polysaccharides dans des conditions qui ne précipitent pas les ARN ou inversement, précipiter les ARN tout en maintenant les polysaccharides en solution. Dans le cas de la première approche, les polysaccharides peuvent être précipités par l'éthanol à 20 % avec 0,5 M d'acétate de potassium (Lopez-Gomez and Gomez-Lim, 1992), par l'éthanol à 70 % supplémenté par 2 M de chlorure de sodium (Fang et al., 1992) ou encore éliminés par une extraction au chloroforme dans 2 M de chlorure de sodium (Chang et al., 1993). Les ARN peuvent être sélectivement précipités dans du chlorure de lithium à 2 M (Su and Gibor, 1988) ou dans l'acétate de sodium à 3 M (Logemann et al., 1987). Les polysaccharides peuvent aussi être éliminés de l'extrait par centrifugation sur coussins de chlorure de césium (Logemann et al., 1987; Lopez-Gomez and Gomez-Lim, 1992).

Certains tissus végétaux sont également riches en substances phénoliques et autres métabolites spécialisés, qui peuvent être libérés de leur compartiment de stockage comme la vacuole, lors de l'éclatement des cellules. Ces composés sont alors susceptibles de co-précipiter avec les ARN, d'interférer avec les méthodes de quantification et d'inhiber certaines réactions ultérieures sur les ARN (réverse-transcription, purification des polyA...) (Krieg, 1996). De plus, les composés phénoliques ont la capacité à se lier de manière irréversible aux acides nucléiques en conditions oxydantes (Loomis, 1974). Ceci peut entraîner un changement des propriétés chimiques des ARN sur lesquelles sont basées les méthodes de purification. Différents composés sont utilisés pour capturer les substances phénoliques et empêcher leur interaction avec les ARN. Le polyvinylpyrrolidone (PVP) précipite ces substances en les piégeant *via* des liaisons hydrogènes (Chang et al., 1993; Loomis, 1974; Salzman et al., 1999; Wan and Wilkins, 1994; Woodhead et al., 1997). Dans le cas d'une extraction d'ARN à partir de plantes succulentes, Gehrig et al. (2000) ont montré que le polyéthylène glycol de haut poids moléculaire ( $>15\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) était plus efficace pour éliminer les substances phénoliques que le PVP. Ajouté au tampon d'extraction, le borate peut non seulement agir de la même façon que le PVP mais aussi inhiber les enzymes responsables de l'oxydation des composés phénoliques (Loomis, 1974). L'ajout d'agents

réducteurs, comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le dithiothreitol, empêche l'oxydation des composés phénoliques et donc leur liaison aux acides nucléiques (Su and Gibor, 1988). Il est aussi possible d'ajouter au tampon d'extraction de la protéinase K qui va dégrader les enzymes responsables de l'oxydation de ces composés (Wan and Wilkins, 1994). L'utilisation de spermidine dans le tampon d'extraction est également rapportée comme évitant la co-précipitation des acides nucléiques avec les composés phénoliques et les polysaccharides (Chang et al., 1993; Wan and Wilkins, 1994).

Un autre problème rencontré lors des procédures de purification d'ARN est la libération de ribonucléases endogènes et l'apport de ribonucléases exogènes. Des stratégies pour inactiver ou détruire ces enzymes doivent donc obligatoirement être mises en place. L'ajout d'agents réducteurs puissants ( $\beta$ -mercaptoéthanol (1-4 %), dithiothreitol (10-20 mM)...) au tampon d'extraction permet d'inactiver les ribonucléases en coupant leurs ponts disulfures (Chirgwin et al., 1979), tandis que l'ajout de protéinase K permet leur dégradation (Hall et al., 1978). Les ribonucléases peuvent aussi être dénaturées et inactivées rapidement par la présence en fortes concentrations de chaotropes (4-8 M) tels que les sels de guanidine, l'isothiocyanate de guanidine ou l'hydrochlorure de guanidine (moins efficace) (Cathala et al., 1983; Chirgwin et al., 1979; Chomczynski, 1993; Chomczynski and Sacchi, 2006). Le sodium dodécyl sulfate (SDS), utilisé pour lyser les cellules, est également un agent dénaturant des protéines. La majorité des protocoles d'extraction d'ARN utilisent du phénol qui permet de séparer les protéines des acides nucléiques et donc les ribonucléases de leur substrat. Additionné au phénol, le chloroforme permet une meilleure purification des acides nucléiques du fait de ses capacités à dénaturer les protéines et par conséquent à les séparer des ARN (Wallace, 1987). Le chloroforme peut également être utilisé sans phénol pour éliminer les protéines, diminuant ainsi la toxicité des manipulations (Chang et al., 1993). Les ribonucléases requièrent souvent des cations divalents comme cofacteurs, l'utilisation de chélateurs comme l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) ou l'EGTA (acide éthylène-glycol-tétraacétique), peut alors permettre d'inhiber leur activité (Jackson and Larkins, 1976). Des inhibiteurs spécifiques des ribonucléases, tels que l'acide aurintricarboxilique peuvent aussi être employés (Krieg, 1996; Wallace, 1987).

Le choix de la méthode de purification des ARN dépend non seulement de l'espèce végétale ou du tissu étudié mais également de l'utilisation ultérieure des ARN (taux de contamination des ARN par l'ADN, les polysaccharides ou les composés phénoliques ; incompatibilité de certains produits avec des techniques de biologie moléculaire...).

Les méthodes les plus largement utilisées sont celles utilisant le phénol (Wallace, 1987). La plupart des kits commerciaux sont basés sur l'utilisation d'un tampon d'extraction acide à base de thiocyanate de guanidine-phénol-chloroforme (Chomczynski, 1993; Chomczynski and Sacchi, 2006) ou sur l'utilisation d'un tampon au thiocyanate de guanidine couplée à une ultrafiltration des ARN sur membrane de silice (méthode RNeasy, Quiagen). Ces méthodes sont adéquates pour un grand nombre de tissus végétaux. Cependant, pour certains d'entre eux ou pour des organes particuliers tels que les fruits ou les tissus ligneux, riches en polysaccharides et/ou en composés phénoliques, ces méthodes ne sont pas toujours efficaces. Des méthodes alternatives ont donc été développées telles que la méthode au borate chaud (Hall et al., 1978) ou celle au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) (Chang et al., 1993). Dans le cas de la première méthode, l'extraction se fait dans un tampon contenant du borate et de la protéinase K, à chaud (37-42°C). Les ARN sont ensuite précipités avec du chlorure de lithium. Cette méthode a, par exemple, été utilisée pour purifier de l'ARN à partir de coton (Wan and Wilkins, 1994) et de banane (Lassois et al., 2009). La méthode au CTAB est, quant à elle, particulièrement bien adaptée pour extraire les ARN à partir de tissus très lignifiés et pauvre en ARN comme le bois (Chang et al., 1993; Gambino et al., 2008; Liao et al., 2004; Le Provost et al., 2007). Avec cette méthode, le CTAB agit comme un détergent fort en dissociant les parois cellulaires et en aidant à séparer les acides nucléiques des polysaccharides. Les étapes de lavages au chloroforme/alcool isoamylique permettent d'éliminer les protéines, l'ADN génomique et les composés phénoliques. Le chlorure de lithium est ensuite utilisé pour précipiter les ARN indépendamment des autres composés cytoplasmiques (Chang et al., 1993).

#### **4.1.1.2 Purification des transcrits**

La majorité des ARN contenus dans une cellule (80 à 90 %) sont des ARN ribosomiques (ARNr) (Grotewold et al., 2015). Par conséquent, l'analyse du transcriptome par la technique RNA-Seq, nécessite une étape de purification afin de retirer ces ARNr avant le séquençage. Dans cette optique, deux techniques ont été développées : la sélection des ARN polyadénylés (polyA) et la déplétion sélective des ARNr (ribo-déplétion) (Costa et al., 2010). Les transcrits polyA comprennent les ARNmessagers (ARNm, représentent 1 à 5 % des ARN<sub>totaux</sub> (Grotewold et al., 2015)), les précurseurs des micro ARN (miARN) et des petits ARN nucléolaires (snoARN). Ces ARN sont synthétisés par l'ARN-polymérase II (Kornberg, 1999). Du fait de la présence d'une queue polyA, il est possible d'isoler ces ARN par hybridation à l'aide de sondes nucléotidiques oligo-dT. Ces oligo-dT peuvent par exemple

être attachés de manière covalente à des billes magnétiques, les ARN polyA sont ainsi purifiés grâce à des aimants (kit Dynabeads de ThermoFisher). Dans le cas de la ribo-déplétion, différentes méthodes existent. La principale repose sur l'hybridation des ARNr avec des sondes nucléotidiques composées d'une séquence spécifique à la partie 5' de ce type d'ARN et marquées à la biotine. Les complexes formés par l'ARNr et la sonde biotinylée sont retirés à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles est fixée la streptavidine (kits RiboMinus de Thermo Fisher Scientific et Ribo-Zero d'Illumina). La ribo-déplétion peut également être réalisée à l'aide d'exonucléases spécifiques. En effet, les ARNr contrairement aux ARNm qui présentent une coiffe en 5', sont caractérisés par la présence d'un phosphate en 5'. Des exonucléases dégradant spécifiquement les molécules d'ARN portant un phosphate en 5' peuvent donc être utilisées pour éliminer les ARNr (kit mRNA-Only, Epicentre).

La sélection des transcrits polyA est une méthode qui fonctionne de manière universelle chez tous les eucaryotes du fait qu'ils présentent tous des ARNm possédant une queue polyA (Dreyfus and Régnier, 2002). Cependant, des études chez les mammifères suggèrent également que certains ARN codant des protéines n'ont pas de queue polyA (Katayama et al., 2005) et ne sont donc pas retenus et séquencés. Comparée à la sélection des ARN polyA, la ribo-déplétion présente ainsi l'avantage de conserver dans le pool d'ARN séquencés des ARNm non-polyA mais également des ARN de transfert (ARNt, 15 à 20 % des ARN<sub>totaux</sub>, Grotewold et al., 2015) ou encore des ARN non codants tels que les micro ARN, les ARN interférents et les petits ARN nucléaires (Abernathy and Overturf, 2016; Adiconis et al., 2013; Costa et al., 2010; Cui et al., 2010; Sultan et al., 2014; Zhao et al., 2014). Les micro ARN et les ARN interférents sont des molécules jouant un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (de Alba et al., 2013). De plus, la ribo-déplétion par sonde nucléotidique spécifique est plus adaptée dans le cas d'échantillons d'ARN<sub>totaux</sub> de faible qualité car la sélection avec les oligo-dT n'est en mesure d'isoler que la partie 3' des transcrits polyA si ceux-ci sont fractionnés (Adiconis et al., 2013) et l'utilisation d'exonucléases éliminerait également ces fragments d'ARNm qui ne serait plus protégés par la queue polyA (van Dijk et al., 2014).

#### **4.1.1.3 Préparation des bibliothèques d'ADNc**

Une fois les ARN à séquencer sélectionnés, une étape clé de tout protocole de NGS est leur conversion en une banque d'ADNc. Un grand nombre de protocoles existent en fonction de la plateforme de séquençage utilisée, mais ils ont tous en commun certaines étapes. La première est une fragmentation des séquences nucléiques (50-500 nucléotides en fonction du

séquenceur). Cette fragmentation peut être réalisée de deux manières : directement à partir des ARN ou bien à partir des ADNc double-brins (db) issus de la rétrotranscription des ARN.

Dans ce dernier cas, les ARN sont tout d'abord rétrotranscrits. Les ADNc produits sont fragmentés puis liés à des adaptateurs avant les étapes ultérieures d'amplification et de séquençage. Afin de conserver l'information du sens de transcription, de nombreuses approches ont été développées : prétraitement de l'ARN avec du bisulfite de sodium pour convertir les cytidines en uridines (He et al., 2008), liaison directe des adaptateurs dans une orientation connue sur les ARN avant ou pendant la réverse transcription (Cloonan et al., 2008) ou encore incorporation de dUTP lors de la synthèse du brin complémentaire puis digestion par une enzyme uracil-*N*-glycosylase (Parkhomchuk et al., 2009). Les ARN sont ensuite convertis par une réverse transcriptase en ADNc (sb) en utilisant comme amorce soit des séquences nucléotidiques composées d'héxamères aléatoires soit des oligo-dT. L'avantage d'utiliser les oligo-dT réside dans le fait que la majorité des ADNc seront polyadénylés et donc résultant de séquences informatives (non ribosomique). Cependant, cette méthode présente un désavantage majeur. En effet, pour les transcrits longs entre autre, la réverse transcriptase peut se détacher du brin d'ARN avant la fin de sa rétrotranscription, créant une sous-représentation (voire une absence) des parties 5' des transcrits dans le jeu de données. L'utilisation d'amorces aléatoires doit donc être privilégiée (Costa et al., 2010). Une fois les ADNc générés, leur fragmentation peut être effectuée par sonication, nébulisation ou par traitement enzymatique avec une DNase (Wang et al., 2009).

Comparée à la méthode de fragmentation des ADNs, celle de fragmentation des ARN présente l'avantage de réduire les possibles structures secondaires (particulièrement pour les ARNt et les miARN), et donc de couvrir plus largement le transcriptome. Les ARN sont dans un premier temps fragmentés, puis liés à des adaptateurs et rétrotranscrits (Costa et al., 2010). De nombreuses méthodes de fragmentation des ARN ont été décrites parmi lesquelles la digestion par la RNase III et l'hydrolyse chimique induite par le zinc (van Dijk et al., 2014). Les protocoles Illumina utilisent cette technique d'hydrolyse chimique tandis que les autres, comme le "Total RNA Seq kit" de Life Technologies, utilisent la RNase III. Cette enzyme est connue pour cliver les ARNdb au niveau de séquences spécifiques (MacRae and Doudna, 2007) alors que l'hydrolyse chimique clive de manière totalement aléatoire l'ARN. Une étude comparant les deux méthodes a montré que le clivage par la RNase III était moins homogène et conduisait entre autre à un nombre de transcrits assemblés moins important qu'avec la méthode d'hydrolyse chimique (Wery et al., 2013). Après la fragmentation, différentes

méthodes peuvent être mises en œuvre pour lier les adaptateurs. La méthode la plus courante est la liaison des adaptateurs sur les ARN fragmentés par une ARN-ligase T4, la reverse transcription peut ensuite soit se faire grâce à des amorces portées par les adaptateurs (Costa et al., 2010) soit par des amorces aléatoires préalablement liés aux fragments avant l'ajout des adaptateurs (van Dijk et al., 2014). Ces deux méthodes apportent un biais à la construction des banques d'ADNc. En effet, il a été montré que les ARN-ligases ont une préférence de substrat et que l'hybridation des amorces aléatoires montre également une préférence pour des séquences nucléotidiques spécifiques et ne se fait donc pas de manière aléatoire. Ces biais conduisent à une diminution de la couverture du transcriptome (van Dijk et al., 2014).

Une fois ces étapes effectuées, les fragments d'ADNc sont en général amplifiés par PCR. Cette technologie est connue pour introduire des biais dans la composition de l'échantillon de départ du fait que tous les fragments ne sont pas amplifiés avec la même efficacité. Les fragments neutres en GC sont amplifiés plus efficacement que les fragments riches en GC ou en AT. Ces derniers sont donc sous représentés ou dans le pire des cas, sont totalement perdus lors de la préparation de la banque d'ADNc (Day et al., 1996). De nombreuses améliorations ont été réalisées pour accroître la fidélité de l'amplification par PCR : choix de la polymérase, ajout d'additifs de PCR (van Dijk et al., 2014)... Des méthodes de préparation de banques sans étape de PCR ont également été développées, telles que le FRT-Seq avec le séquenceur Illumina (Mamanova and Turner, 2011; Mamanova et al., 2010), ou encore certains protocoles de préparation pour un séquençage avec le séquenceur Hélicos ou avec des séquenceurs de troisième génération tels que le PacBio (Pacific Biosciences) (McGettigan, 2013).

#### **4.1.1.4 Séquençage**

De nombreuses technologies NGS ont été développées au cours de ces 10 dernières années et elles ne cessent d'évoluer. Les principales technologies NGS sont le 454 (Roche), l'Ion Torrent (Personal Genome Machine (PGM) et Proton, Life Technologies), le SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection, Applied Biosystems), l'Illumina/Solexa et le PacBio (Pacific Biosciences).

L'étape préliminaire au séquençage est la préparation des banques d'ADNc précédemment obtenues. Dans le cas du 454, de l'Ion Torrent et du SOLiD, les banques d'ADNc sont tout d'abord capturées sur des billes (1 fragment par bille). Chaque fragment lié est amplifié individuellement dans une gouttelette grâce à une PCR en émulsion. L'ADN est ensuite

dénaturé et les billes sont distribuées à l'intérieur de puits (une bille par puits) sur des lames en contact avec des fibres optiques (454 et Ion Torrent) ou accrochées sur des lames de verre après modification en 3' pour permettre une fixation covalente (SOLiD). Dans le cas de la technologie développée par Illumina, les banques d'ADNc sont dénaturées et liées par une des extrémités à une surface solide recouverte d'adaptateurs oligonucléotidiques. L'extrémité libre se recourbe et vient s'hybrider à l'adaptateur complémentaire sur la surface solide, puis la synthèse du brin complémentaire est initiée. De nombreux cycles de cette amplification en phase solide suivie de dénaturation entraînent la synthèse de milliers de copies d'une molécule d'ADN, appelées clusters.

Concernant le séquençage à proprement parlé, le 454 utilise la méthode du pyroséquençage. Dans les puits contenant une bille avec un fragment d'ADN amplifié, sont ajoutées des amorces et des enzymes de séquençage, puis chaque nucléotide est ajouté indépendamment pour permettre la synthèse du brin complémentaire. Lorsqu'un nucléotide est incorporé, un pyrophosphate est libéré conduisant à une émission lumineuse qui est captée en temps réel (Figure 71).

La technologie Ion Torrent (séquençage semi-conducteur) est similaire au 454 mis à part que la détection se fait grâce à des capteurs d'ions suite à la libération d'un proton lors de l'incorporation d'un nucléotide (Figure 71).

Dans le cadre de la technologie développée par Illumina, le milieu de synthèse contient les amorces, l'ADN polymérase et 4 terminateurs réversibles (nucléotides) marqués par fluorescence (une couleur par base). Après incorporation d'un nucléotide, identifié par sa couleur, le groupement « terminateur » et le fluorophore sont clivés et un nouveau cycle peut commencer. La lecture est ainsi effectuée à chaque position sur toutes les séquences en parallèle (Figure 71).

La technologie SOLiD met en jeu du séquençage par ligation (Figure 71). Des amorces viennent tout d'abord s'hybrider à l'adaptateur sur la matrice. Quatre sondes de 2 bases fluorescentes sont ajoutées. La spécificité de ces sondes s'effectue avec la première et la seconde base de chaque réaction de ligation. Plusieurs cycles de ligation-détection-clivage sont effectués (Figure 70). Les produits d'extension sont ensuite retirés et une nouvelle amorce complémentaire de la position n-1 est utilisée pour un second tour de ligation. Cinq tours de remise à zéro sont ainsi effectués avec à chaque fois une amorce n-1 par rapport à la précédente. Chaque base est ainsi interrogée dans 2 réactions de ligation indépendantes (grâce à 2 amorces différentes) (Figure 70). Ce système de lecture sur 2 bases permet une très grande

fidélité et permet donc de faire la différence entre les erreurs de séquençage et les variants réels.

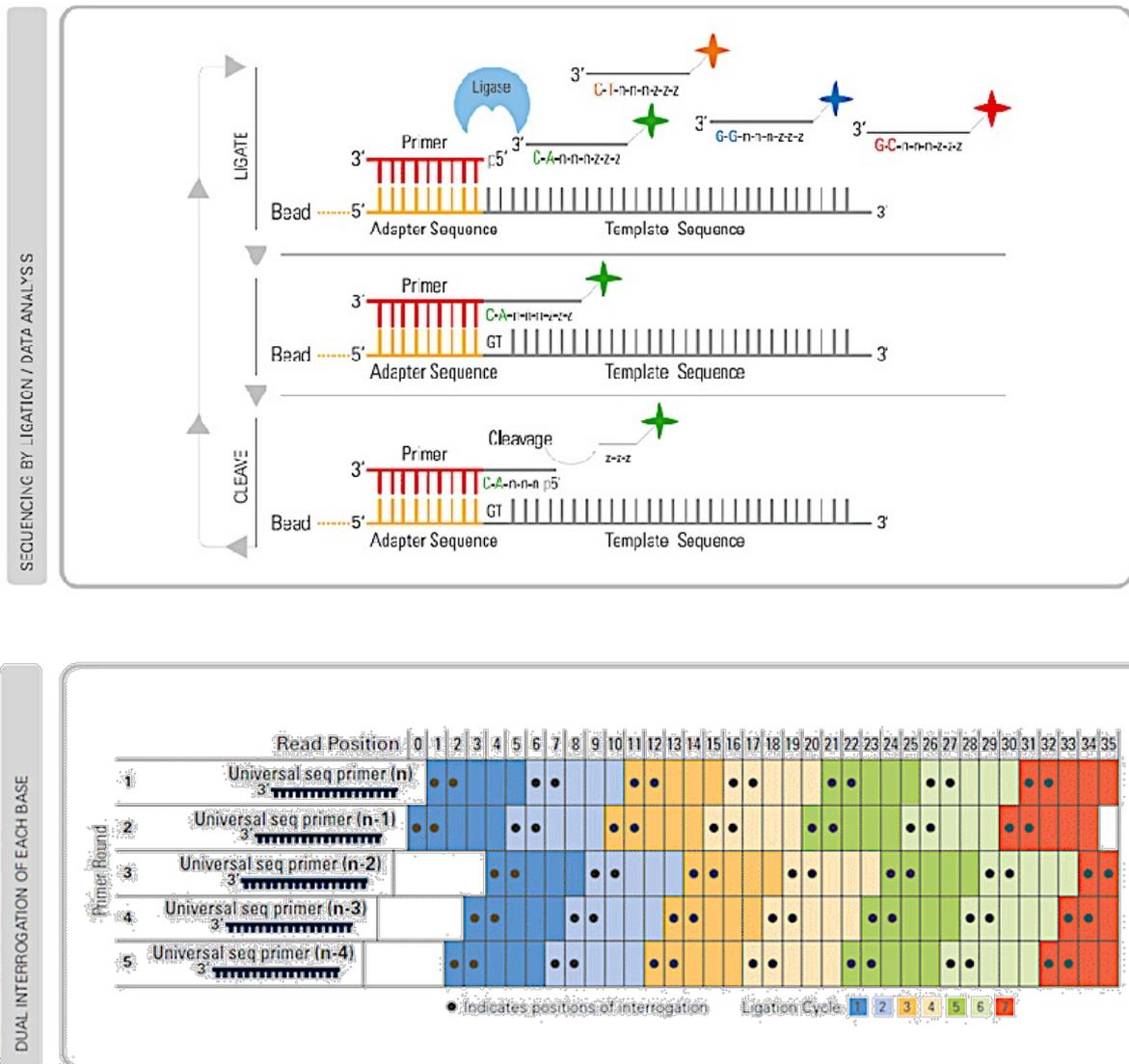
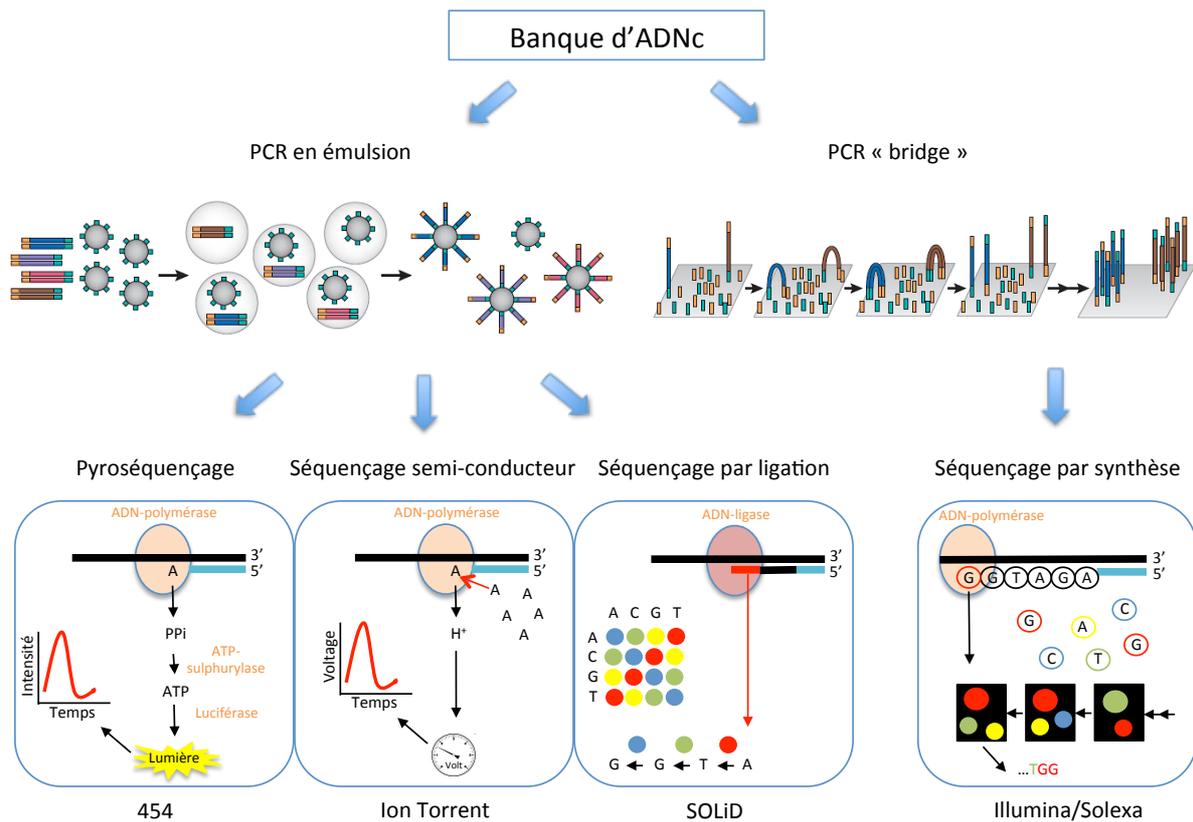


Figure 70 : Principe du système de séquençage SOLiD (<http://www.appliedbiosystems.com>).



**Figure 71 : Principes des méthodes de séquençage 454, Ion Torrent, SOLiD et Illumina.**

La technologie PacBio (Pacific Biosciences) est la première technologie NGS de troisième génération développée. Les fragments d'ADN séquencés sont de plus longue taille que dans le cas des technologies de seconde génération et elle ne nécessite pas de préparation de banques d'ADNc (système de séquençage SMRT : Single Molecule Real Time). Dans un nano-puit, se trouve une seule polymérase, une seule molécule d'ADN à séquencer et les 4 nucléotides marqués avec différents fluorochromes. Lors de l'incorporation d'un nucléotide par la polymérase, un détecteur lit et traduit le signal fluorescent (McCarthy, 2010). Bien que cette méthode présente de nombreux avantages comparée aux plateformes de séquençage de seconde génération, son utilisation est limitée du fait d'un taux d'erreur très important lors du séquençage (environ 13 %). Des améliorations technologiques du PacBio sont donc nécessaires afin de pouvoir utiliser cette plateforme sans complément d'autres technologies de seconde génération.

Toutes ces plateformes de séquençage sont comparées dans le tableau 22 en terme de méthode de séquençage, de temps de séquençage, de longueur des fragments séquencés, de taux d'erreur ou encore de quantité de données générées. Ces différents paramètres sont très variables d'une plateforme à l'autre, tout comme le coût de séquençage. Actuellement, la

technologie Illumina offre le meilleur débit et le coût le plus faible par base. Le choix de la technologie de séquençage va dépendre des objectifs de l'étude. En absence, par exemple, de génome ou transcriptome de référence, il est préférable d'utiliser des méthodes permettant d'obtenir des séquences plus longues offrant une meilleure couverture du transcriptome (pourcentage de transcrits totaux) (Glenn, 2011). Une meilleure couverture nécessite une profondeur de séquençage plus importante (plus de séquences par fragment d'ADN), afin de détecter les transcrits ou variants rares. D'autant plus que, plus le génome est grand (18,7 Gb pour le douglas, soit un génome 100 fois plus grand que celui d'*Arabidopsis*, Müller et al., 2012) plus le transcriptome est complexe. Il est assez difficile d'estimer la couverture du transcriptome. Le nombre réel et le niveau d'expression des différentes isoformes des transcrits sont rarement connus et le taux de transcription peut varier grandement en fonction du génome (Wang et al., 2009). Pour réduire les coûts de séquençage, il est possible de faire du multiplexage, c'est à dire séquençer une banque d'ADNc contenant plusieurs échantillons identifiés chacun par un code barre différent. Cependant, plus l'on combine d'échantillons, plus la profondeur de séquençage diminue. Le taux de couverture du transcriptome peut également varier en fonction du type de séquençage. Le type de séquençage le plus simple est du séquençage « single-end » : c'est à dire à partir d'une seule extrémité de la molécule d'ADN. Des méthodes plus complexes permettent de séquençer la molécule par les 2 extrémités, parmi lesquelles le « paired-end » : les 2 extrémités de la molécule d'ADN sont séquencées l'une après l'autre. Un séquençage de type « paired-end » permet un meilleur assemblage des séquences et est donc plus adapté dans le cas d'assemblage de transcriptome *de novo*. Ce type de séquençage est en général plus coûteux que du « single-end » (t Hoen et al., 2012).

D'une manière générale, l'assemblage de transcriptomes grands et complexes nécessite un séquençage intensif, souvent réalisé sur des plateformes Illumina ou SOLiD. Pour des petits transcriptomes, la technologie 454 qui permet d'obtenir des lectures plus longues et souvent utilisée seule. L'utilisation de ces 3 plateformes de séquençage peut aussi être combinée : les lectures plus courtes séquencées avec une meilleure profondeur sont assemblées en contigs et les longues lectures sont ensuite utilisées pour assembler les contigs et identifier les variants (Martin and Wang, 2011).

**Tableau 22 : Comparaison des principales plateformes de séquençage (Buermans and den Dunnen, 2014 ; Escalante et al., 2014).**

Séquenceur		Séquençage par	Détection	Type de séquençage	Temps de séquençage	Longueur des fragments (pb)	Nombre de séquences	Quantité de données	Taux d'erreur (%)
Roche	GS FLX Titanium XL+	Synthèse	Pyroséquençage	Single-end	23 h	700	1 million	700 Mb	1
	GS Junior System	Synthèse	Pyroséquençage	Single-end	10 h	400	0,1 million	40 Mb	1
Life Technologies	Ion Torrent PGM	Synthèse	Libération proton	Single-end	4 h	200-400	4 millions	1,5-2 Gb	1,7
	Proton	Synthèse	Libération proton	Single-end	4 h	125	60-80 millions	8-10 Gb	1
	Abi/SOLiD	Ligation	Détection fluorescence de sondes dibases	Single et paired-end	10 jours	75 + 35	2,7 millions	300 Gb	0,01
Illumina/Solexa	HiSeq 2000/2500	Synthèse	Fluorescence ; Termineur réversible	Single et paired-end	12 jours	2x100	3 billions	600 Gb	0,26
	MiSeq	Synthèse	Fluorescence ; Termineur réversible	Single et paired-end	65 h	2 x 300	25 millions	15 Gb	0,8
Pacific Biosciences	RSII	Synthèse d'une seule molécule	Fluorescence	Single-end	2 jours	50% > 10Kb	0,8 million	5 Gb	12,86

#### 4.1.1.5 Analyses des données

L'essor des technologies NGS a été accompagné par un développement considérable des outils bio-informatiques pour l'analyse des grandes quantités de données générées.

La première étape pour l'analyse des données brutes est de déterminer la qualité du séquençage et le taux de contamination. Une fois les séquences nettoyées et filtrées, elles sont ensuite assemblées, soit par une méthode *de novo*, soit par des alignements sur des séquences de référence. La précision de l'assemblage est ensuite évaluée.

##### 4.1.1.5.1 Prétraitement des données NGS

Des biais dans la composition des données peuvent être déterminée en examinant les k-mers où tous les motifs de longueur k d'une séquence (Schröder et al., 2010). La qualité générale du séquençage peut aussi être estimée par la longueur des séquences, le niveau de duplication, le taux de séquences sur-représentées le pourcentage de GC... Des outils tels que FastQC permettent d'effectuer rapidement ces contrôles de qualité (Andrews, 2010).

Les séquences brutes contiennent des séquences d'adaptateur ou de liaison rajoutée au préalable du séquençage. Différents outils bio-informatiques permettent de retirer ces séquences tels que Cutadapt (Martin, 2011), AdapterRemoval (Lindgreen, 2012) ou Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Les codes barres doivent également être retirés après identification des différents échantillons, grâce à des outils comme TagCleaner (Schmieder et

al., 2010) ou NovoBarCode (Novocraft, Selangor, Malaysia). Lors du prétraitement des données brutes, il est nécessaire d'éliminer les séquences trop peu complexes, trop courtes, contenant des bases anonymes (N) ainsi que d'éliminer les motifs polyA ou polyT (Trimmomatic, Cutadapt ou FASTX-Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)) peuvent être utilisés pour ceci).

Les données brutes doivent également être débarrassées de toute source de contaminations présentes dans l'échantillon végétal analysé et pouvant provenir des chloroplastes, des mitochondries, de l'humain, des bactéries, des virus, des champignons, ou encore des phages. Deconseq permet par exemple de supprimer les séquences contaminantes (Schmieder and Edwards, 2011).

Des erreurs interviennent lors du processus de séquençage. Des outils bio-informatiques permettent de corriger ces erreurs et ainsi améliorer l'assemblage ultérieur du transcriptome (MacManes and Eisen, 2013). Citons REPTILE (Yang et al., 2010), SGA (Simpson and Durbin, 2010) ou encore SEECER, ce dernier ayant été développé spécifiquement pour le RNA-Seq (Le et al., 2013).

#### **4.1.1.5.2 Assemblage du transcriptome**

De nombreux outils d'assemblage ont été développés. Afin d'opter pour l'outil d'assemblage adéquat, il est essentiel de prendre en considération la plateforme de séquençage. Pour l'assemblage du transcriptome, deux types d'approches peuvent être employées : la méthode d'assemblage *de novo*, ou la méthode d'alignement sur des séquences de références.

S'il n'y a pas de séquences de référence, comme c'est souvent le cas dans l'étude d'organismes non modèles, un assemblage *de novo* s'impose. Dans ce cas, les séquences sont assemblées en contigs (séquence consensus obtenue par assemblage de fragments se chevauchant) sans référence. Cette méthode permet de découvrir des transcrits non présents dans le génome à cause d'épissage alternatif ou d'une mauvaise annotation. Deux types de méthodes sont principalement décrites : la méthode de chevauchement et la méthode du graphe de Bruijn. L'outil d'assemblage le plus utilisé en transcriptomique est gsAssembler (également appelé Newbler, Margulies et al., 2005) qui utilise la méthode du chevauchement. D'autres outils tels que CAP3 (Contig Assembly Program Version 3) (Huang and Madan, 1999), Mira (Chevreux et al., 2004) ou encore TGICL (Pertea et al., 2003) utilisent également cette méthode. Cependant pour des larges volumes de données associés à des courtes séquences, la méthode du graphe de Bruijn (graphe des k-mers) est une approche plus

appropriée. Velvet (Zerbino and Birney, 2008), Oases (Schulz et al., 2012), ABySS (Simpson et al., 2009), SOAPdenovo (Xie et al., 2014) ou Trinity (Grabherr et al., 2011) utilisent cette approche. La stratégie la plus efficace consiste à combiner les deux approches : un assemblage grossier est tout d'abord réalisé par la méthode de Bruijn afin de maximiser la profondeur, puis un assemblage fin des précontigs est réalisé par la méthode de chevauchement dans le but de diminuer le nombre de contigs finaux et maximiser la couverture.

Lorsque des séquences de référence sont disponibles, l'alignement des séquences obtenues peut se faire avec des outils comme Bowtie (Langmead, 2010; Langmead and Salzberg, 2012), BWA et BWA-SW (Li and Durbin, 2009).

#### **4.1.1.5.3 Qualité de l'assemblage**

Aucun critère standard n'est communément admis pour évaluer la fiabilité et l'efficacité d'un assemblage (Strickler et al., 2012). Il a été proposé de comparer l'assemblage à un sous-ensemble de transcrits de taille et d'abondance connues pour évaluer la présence de chimère, de variants d'épissage ou encore le contigage (Martin and Wang, 2011). Les contigs peuvent aussi être alignés contre des bases de données de gènes ou des génomes/transcriptomes afin d'estimer la proportion de transcrits séquencés et tester la précision de l'assemblage. GsMapper (454 Life Sciences), Bowtie (Langmead, 2010) ou Mosaik (Smith et al., 2008) peuvent alors être utilisés.

#### **4.1.1.5.4 Applications de la technique RNA-Seq**

La première application du RNA-Seq est la caractérisation et l'annotation du transcriptome. Ceci permet d'obtenir une représentation des gènes de l'espèce d'intérêt, particulièrement dans le cas d'espèces non modèles où le répertoire de gènes n'est pas encore connu. Une fois les gènes caractérisés, ceux-ci sont annotés, généralement par l'utilisation de tBLASTx qui permet de comparer les séquences à des gènes déjà annotés. Dans le cas d'espèces végétales peu étudiées, les annotations doivent souvent être effectuées en comparaison avec *Arabidopsis* (Strickler et al., 2012).

La technique RNA-Seq permet également, lorsqu'un génome de référence est disponible, de comparer les niveaux d'expression des gènes en fonction des tissus, du temps ou encore des conditions environnementales. Le taux d'expression peut être quantifié à partir du comptage des séquences issus de l'alignement sur les séquences de référence avec des outils tels que BWA (Li and Durbin, 2009). Pour cartographier les séquences au niveau des jonctions

d'épissage, un outil comme TopHat (Trapnell et al., 2009) peut être utilisé. L'assemblage en gènes modèles et leur taux d'expression est ensuite réalisé grâce par exemple à Cufflinks (Trapnell et al., 2010). L'expression de variants issus d'épissage alternatif peut aussi être détectée avec le RNA-Seq avec des outils tels que MISO (Katz et al., 2010), Cufflinks (Trapnell et al., 2010), et SpliceMap (Au et al., 2010).

Une autre application du RNA-Seq est la détection de SNPs. SAMtools (Li et al., 2009) et GATK (DePristo et al., 2011) permettent par exemple de détecter les SNP.

#### 4.1.1.5.5 Les « workflows » pour RNA-Seq

Au regard de la richesse des outils utilisables pour analyser, organiser et quantifier les séquences générées, il est généralement convenu de concevoir un « workflow » d'analyse où se succèdent les différentes étapes de l'analyse que nous venons de voir, et les logiciels utilisés (Figure 72).

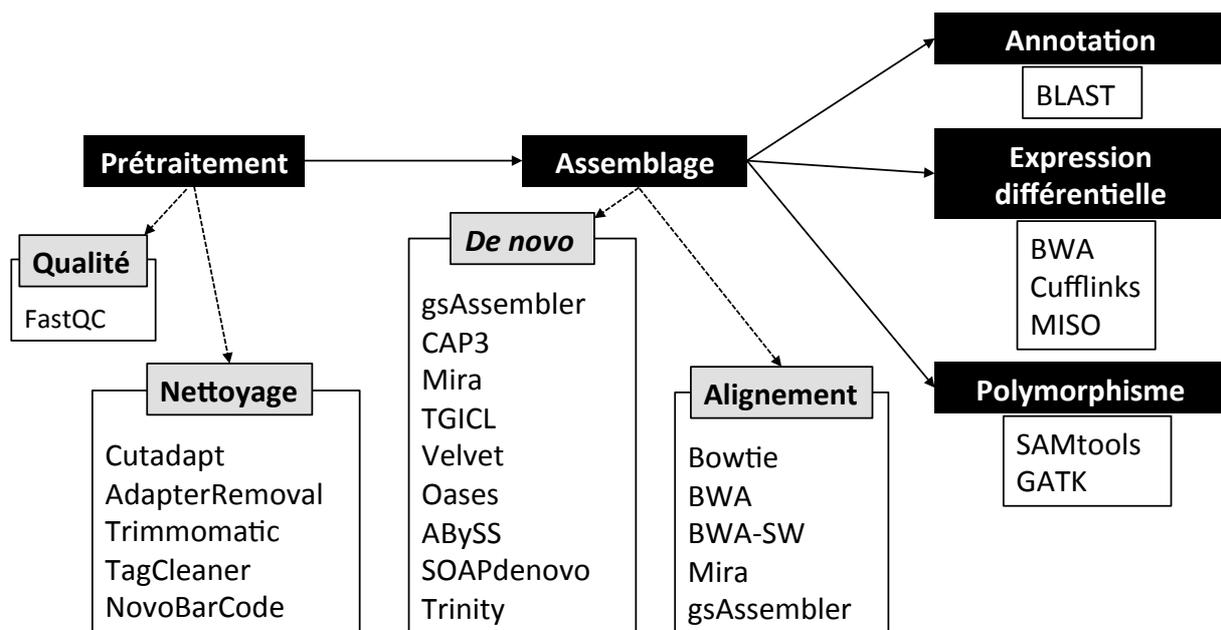


Figure 72 : Workflow du traitement des données de RNA-Seq.

### 4.1.2 Objectif

Dans le cadre de cette étude, nous avons cherché à caractériser les gènes impliqués dans la formation du duramen chez le douglas. Les analyses transcriptomiques ont été réalisées par la technique RNA-Seq à partir d'échantillons provenant de douglas d'une vingtaine d'années, prélevés à chaque saison et appartenant à un seul génotype. Afin d'observer les gènes préférentiellement exprimés au niveau de la TZ, nous avons caractérisé les profils

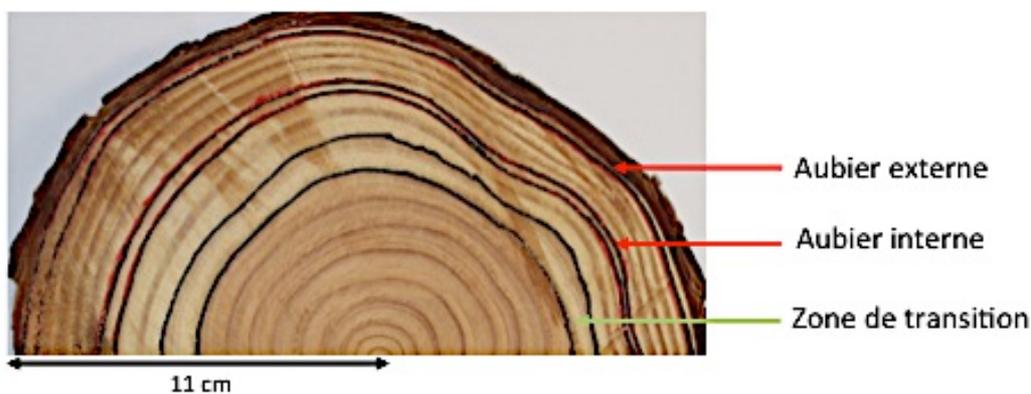
d'expression de trois zones du xylème : la zone correspondant au cerne de bois le plus périphérique (que nous appellerons « aubier externe »), le cerne de TZ et la zone correspondant au cerne médian entre le cerne de TZ et le cerne « d'aubier externe » (zone appelée « aubier interne »).

Nous avons, dans un premier temps, extrait les ARN<sub>totaux</sub> du bois à l'aide du protocole modifié de Chang et al. (1993). Les transcrits polyA ont ensuite été purifiés, et les banques d'ADNc ont été réalisées à partir des échantillons obtenus avant leur séquençage à l'aide de l'Illumina HiSeq 2500. Après nettoyage et analyse des données, les transcrits surexprimés ou sous-exprimés dans la TZ par rapport à l'aubier interne ou à l'aubier externe ont été étudiés pour une seule saison, l'hiver.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Matériel végétal**

Comme décrit précédemment (cf Chapitre 1, Matériel et méthodes), les douglas utilisés dans le cadre des analyses transcriptomiques proviennent de 4 génotypes (1039, 80145, 80189 et 80315 simplifiés par la suite par 1, 2, 3 et 4 respectivement). Un arbre par génotype a été abattu à chaque saison, excepté pour le génotype 3 (80189) pour lequel 3 arbres ont été abattus en hiver et en été. Une fois l'arbre abattu, 4 rondelles de 1 à 2 cm d'épaisseur ont été prélevées à la base du tronc et 4 autres à 1,3 m du collet (répétition interne). Sur le terrain, les rondelles ont été rapidement congelées par immersion dans l'azote liquide avant d'être transportées dans la carboglace puis stockées à -80°C jusqu'à utilisation. Avant extraction des ARN<sub>totaux</sub>, les rondelles congelées ont été lyophilisées. Afin de suivre l'évolution de l'expression des gènes de l'aubier externe à la TZ et d'identifier les gènes préférentiellement exprimés dans cette dernière, nous avons choisi d'étudier les profils d'expression génique de trois zones correspondant pour chacune à un cerne complet. Ces cernes d'intérêt sont identifiés sur la figure 73. Les cernes correspondants à la TZ, à ce que nous avons appelé « aubier externe » (cerne d'aubier le plus externe) et « aubier interne » (cerne médian entre le cerne d'aubier externe et celui de la TZ) ont ensuite été découpés minutieusement au ciseau à bois.



**Figure 73 : Demi-rondelle de douglas présentant un marquage des cernes dont le profil d'expression des gènes est étudié.**

Les cernes sont ensuite individuellement découpés en allumettes à l'aide d'un massicot puis réduits avec un broyeur à couteau de paille (4 x 5 s entrecoupées d'une pause de 30 s) avant d'être broyés en poudre de granulométrie d'environ 200  $\mu\text{m}$  par un automate de broyage à billes (Labman Automation LTD, UK ; Broyeur de la plateforme Génobois, INRA d'Orléans) suivant une séquence de broyage constituée de 6 phases de broyage de 30 s entrecoupées de 50 s de pause. La poudre obtenue est ensuite utilisée pour l'extraction des ARN.

## 4.2.2 Extraction des ARN<sub>total</sub> du bois

### 4.2.2.1 Protocole initial d'extraction

L'extraction des ARN<sub>total</sub> a dans un premier temps été réalisée suivant le protocole décrit par Chang *et al.* (1993) légèrement modifié par Beritognolo (2002). La poudre de bois (0,5 g d'aubier externe ou interne et 0,75 g de TZ) est incubée à 65 °C pendant 10 min dans des tubes Falcon avec 20 ml de tampon d'extraction (CTAB 2 %, NaCl 2 M, Tris 110 mM, EDTA 25 mM, PVP 2 %, spermidine 3,4 mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 %). Tout au long de cette incubation, les tubes sont agités et soumis 3 fois à un traitement de 7 s aux ultrasons. Les acides nucléiques sont purifiés par 2 extractions successives avec une solution de chloroforme/alcool isoamylique (AI) (24:1, v/v) chacune suivie d'une centrifugation de 10 min à 3000 g (Centrifugeuse Sigma swing rotor). Les ARN<sub>total</sub> sont ensuite précipités par du chlorure de lithium (1 volume de LiCl 10 M pour 4 volumes de surnageant). Après 2 jours à 4°C, les ARN sont sédimentés par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min (Centrifugeuse Eppendorf). Le surnageant est éliminé. Le culot d'ARN<sub>total</sub> est ensuite dissout dans 750  $\mu\text{l}$  de tampon SSTE (NaCl 5 M, SDS 0,5 %, Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Les acides nucléiques

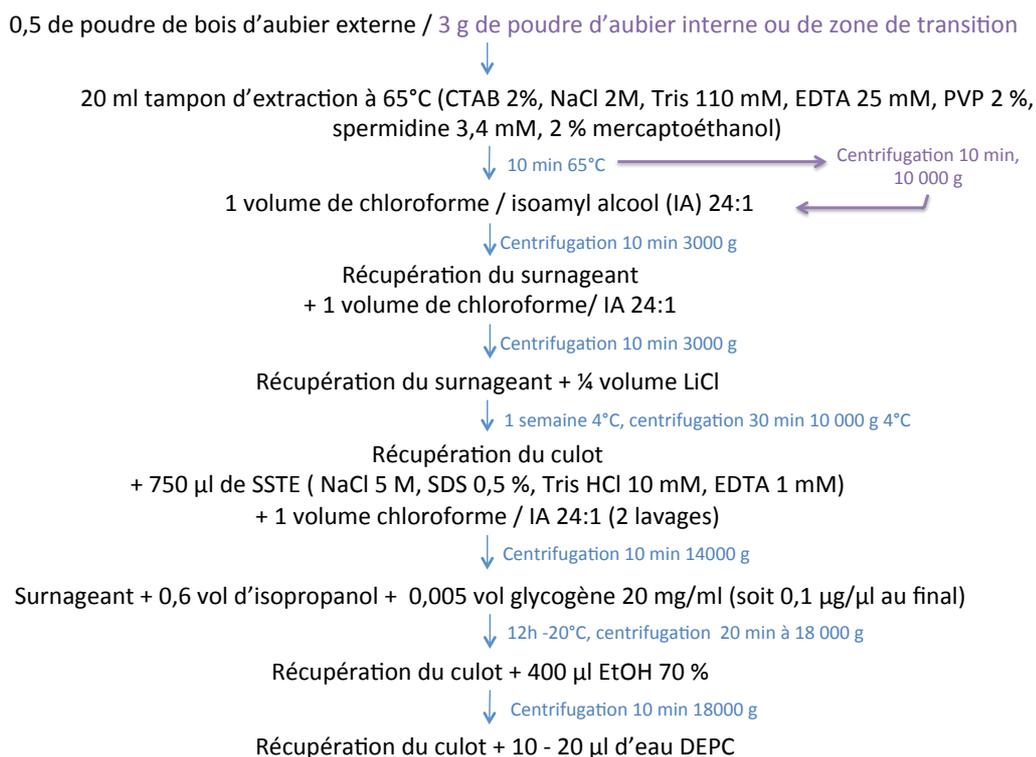
solubilisés dans le tampon SSTE sont purifiés par 2 lavages successifs au chloroforme/AI (24 :1, v/v). Les ARN<sub>total</sub> sont par la suite précipités par 0,6 volume d'isopropanol glacial. Après 12 h d'incubation à -20°C, les tubes sont centrifugés pendant 10 min, à 18 000 g et à 4°C. Le culot est repris dans 400 µl d'éthanol à 70 % puis centrifugé (10 min, 18 000 g, 4°C, centrifugeuse Eppendorf). Le culot est séché à température ambiante afin d'éliminer l'éthanol puis remis en suspension dans 10 à 20 µl d'eau traitée au DEPC sur de la glace. Les ARN<sub>total</sub> sont quantifiés et leur qualité vérifiée par électrophorèse. Suite aux premiers résultats obtenus avec ce protocole, il nous a fallu optimiser ce protocole d'extraction pour obtenir des quantités plus importantes d'ARN<sub>total</sub> de qualité suffisante pour le séquençage notamment pour les échantillons d'aubier interne et de TZ.

#### 4.2.2.2 Optimisations du protocole d'extraction

Différents paramètres ont été testés :

1. Ajout de 0,005 volume de glycogène à 20 mM lors de la précipitation à l'isopropanol (meilleure précipitation de l'ARN et meilleure visualisation du culot)
2. Utilisation du tube Nalgène (fond rond, pas de cassure) à la place des tubes Falcon (fond conique, cassure au niveau de l'endroit où se dépose le culot d'ARN)
3. Quantités différentes de poudre de bois (1, 2, 3 ou 4 g)
4. Différents temps de précipitation dans le chlorure de lithium (2 ou 7 jours)
5. Ajout d'une centrifugation (10 min, 10 000 g, centrifugeuse Eppendorf) avant le premier lavage chloroforme/AI

Suite à ces différents tests, les protocoles suivants ont été adoptés. Pour les échantillons d'aubier externe (AubierExt), le protocole adopté reste presque identique au protocole initial, la seule modification apportée est l'ajout de glycogène au moment de la précipitation à l'isopropanol. Concernant les échantillons de poudre d'aubier interne (AubierInt) et de TZ, les modifications suivantes ont été apportées : les extractions d'ARN se font à partir de 3 g de poudre et non 0,75 g, une première centrifugation de 10 min à 10 000 g est consécutive à la phase d'incubation de la poudre de bois dans le tampon d'extraction. Cette étape supplémentaire permet de retirer un maximum de débris ce qui va augmenter l'efficacité de l'extraction des acides nucléiques au chloroforme/AI. Enfin, un ajout de 0,005 volume de glycogène à 20 mM est également réalisé au moment de la précipitation à l'isopropanol. Le protocole d'extraction employé est résumé en figure 74.



**Figure 74 : Protocole d'extraction des ARN<sub>totaux</sub> à partir de poudre de bois de douglas suivant le protocole de Chang et al. (1993) modifié.**

Les extractions d'ARN<sub>totaux</sub> ont été réalisées uniquement à partir de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ des arbres du génotype 3. Les extractions ont été effectuées pour un même arbre à partir de rondelles prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet (répétition biologique au sein d'un même arbre). Des répétitions biologiques inter-individus ont été réalisées à partir des rondelles de la base du tronc prélevées sur 3 arbres différents abattus en hiver et 3 en été. L'extraction des ARN<sub>totaux</sub> a été effectuée en triplicata à partir de tous les échantillons d'aubier externe (répétitions techniques). La quantité de poudre de bois disponible pour l'aubier interne et la TZ n'a pas permis ces répétitions techniques.

#### 4.2.2.3 Aspects quantitatif et qualitatif des ARN<sub>totaux</sub>

La pureté et la quantité des ARN ont été déterminées à l'aide d'un microspectrophotomètre (Nanodrop, ND-1000, ThermoScientific). L'utilisation du Nanodrop permet l'acquisition d'un spectre d'absorption entre 220 et 300 nm. La concentration est calculée par la formule suivante :  $C \text{ (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorbance}_{260\text{nm}} \times R \times \text{facteur de dilution}$  ( $R=50$  pour l'ADN et  $40$  pour l'ARN). La pureté de l'échantillon est estimée en calculant des rapports de densité optique (DO). Le premier rapport,  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ , doit être d'environ 1,8 pour pouvoir qualifier l'échantillon d'ADN comme « pur » et d'environ 2 pour l'ARN. Si cette valeur est plus faible,

ceci indique que l'échantillon est contaminé par des protéines, du phénol ou d'autres contaminants absorbants à 280 nm. Pour le second ratio,  $DO_{260}/DO_{230}$ , les valeurs attendues sont comprises entre 2 et 2,2. En cas de valeur plus faible, l'échantillon peut être contaminé par des polysaccharides ou autres contaminants absorbants à 230 nm.

La qualité des ARN<sub>totaux</sub> extraits a quant à elle été vérifiée par électrophorèse à l'aide du Bioanalyseur 2100 d'Agilent Technologies (RNA 6000 Nano Kit), de l'Experion de Bio-Rad et du Fragment Analyser d'Advanced Analytical Technologies. La qualité est donnée par le RQI (RNA Quality Index) pour l'Experion et par le RIN (RNA Integrity number) pour les deux autres. Le RIN et le RQI sont calculés à partir du profil électrophorétique de l'échantillon. Même si les algorithmes de calcul pour ces 2 index sont différents, dans les deux cas, deux facteurs rentrent en compte dans le calcul : le rapport entre les deux bandes 18S et 28S des ARNr, ainsi que la présence ou non de produits de dégradations. Les valeurs de RIN et de RQI s'étendent de 0 (dégradation total de l'ARN) à 10 (ARN de très bonne qualité).

### **4.2.3 Séquençage**

La purification des transcrits (sélection polyA), la construction des banques d'ADNc et le séquençage ont été réalisés par GATC Biotech (Allemagne). Les échantillons ont été séquençés en « paired-end » sur l'Illumina HiSeq 2500.

### **4.2.4 Analyses bioinformatiques**

Les analyses des données issus du séquençage Illumina ont été réalisées à l'aide de RNAseqTools (Philippe Label, PIAF, INRA Clermont-Ferrand) permettant le nettoyage et l'alignement de courtes séquences « paired-end » sur des séquences de référence afin de quantifier l'expression des gènes. La qualité des données brutes ainsi que celle des séquences obtenues après nettoyage est déterminée par FastQC. Le nettoyage des données brutes implique les étapes suivantes : nettoyage des extrémités des séquences (retrait des adaptateurs/amorces), élimination des Ns, des extrémités polyA ou T, élimination des séquences trop courtes, filtrage de la complexité et décontamination. Le nettoyage des extrémités des séquences est réalisé à l'aide de TagCleaner (Schmieder et al., 2010). L'élimination des Ns permet de conserver les séquences sans base anonyme. Le nettoyage des polyA et T permet l'élimination en début ou en fin de séquence des As ou Ts ayant une répétition minimale d'au moins 6 nucléotides. Le filtre de longueur de séquence permet de

retirer les séquences avec une longueur en pb inférieure à la limite fixée (60 pb). Le filtrage de la faible complexité utilise comme seuil le ratio de compression LZW (Welch, 1984). La valeur du filtre de complexité est exprimée en pourcentage de compressibilité et fixée à 30 %. La décontamination est réalisée à l'aide de BWA (Li and Durbin, 2009) par alignement sur un set de séquences de référence (bactéries, virus, phages, champignons, humain, ribosome, mitochondrie, chloroplaste...).

Les séquences nettoyées sont ensuite alignées sur le transcriptome de référence du douglas version 1.0 (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>) à l'aide de BWA. Ce transcriptome est basé sur les modèles de gènes du génome assemblé et totalise 54830 transcrits de trois classes différentes (des transcrits entiers de bonne qualité, des transcrit partiels de bonne qualité et des transcrits de faible qualité).

Les transcrits sont filtrés suite au résultat d'alignement puis les données de comptage des transcrits alignés sont normalisées pour réaliser un clustering et une analyse en composante principale (ACP) des échantillons. La transformation des données a été testée à l'aide de 3 méthodes mathématiques (la transformation log +1, la transformation logarithmique (RLD) et la transformation stabilisatrice de variance (VST)).

L'analyse différentielle des transcrits a ensuite été réalisée à l'aide de DESeq2 à partir des données filtrées.

Dans le cadre de cette thèse, la qualité des données a été déterminée pour 21 échantillons issus de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ (Tableau 23). L'analyse de l'expression différentielle des gènes a quant à elle été réalisée uniquement sur ces 3 tissus à partir des rondelles de bois prélevées sur les 3 arbres abattus en hiver (32C, 33C, 39C, 33B, 39B, 32A3, 39A1, 39A2 et 39A3, cf Tableau 26 pour les correspondances).

**Tableau 23 : Echantillons séquencés dont les données ont été nettoyées. Cases rouges : échantillons dont les résultats d’expression ont été analysés.**

AubierExt	AubierInt	TZ
23A2		
25A1	25B	25C
25A2		
25A3		
28A2	28B	28C
32A3		32C
36A1		
36A2		
39A1	39B	39C
39A2		
39A3		
	33B	33C
	34B	

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Mises au point technique

#### 4.3.1.1 Extraction des ARN<sub>total</sub> du bois

##### 4.3.1.1.1 Mise au point du protocole d’extraction

L’analyse des gènes exprimés dans un tissu par RNA-Seq passe tout d’abord par l’extraction des ARN<sub>total</sub>. Ces derniers doivent être en quantité suffisante et de très bonne qualité pour générer les banques d’ADNc qui seront séquencées. Le bois étant un tissu particulier, riche en polysaccharides et polyphénols et très pauvre en ARN, le protocole d’extraction choisi a été celui mis au point par Chang *et al.* (1993) sur des aiguilles et des racines de pin et adapté par Beritognolo (2002) sur du bois de noyer. Les résultats d’extractions d’ARN en terme de teneur et de qualité sont présentés dans le tableau 24.

**Tableau 24 : Teneurs et qualités des ARN<sub>total</sub> obtenus suite à une extraction avec le protocole de Chang *et al.* (1993) modifié par Beritognolo (2002) à partir de bois d'automne de douglas. AubierExt : aubier externe ; AubierInt : aubier interne ; TZ : zone de transition ; Nd : non déterminé.**

Géotype	Rondelle de bois	Zone	Teneurs (µg/g MS)	RQI
1	Base	AubierExt	1,98	5,2
		AubierInt	0,44	6,5
		TZ	0,2	5
	1,3 m	AubierExt	13,4	4,2
		AubierInt	9,23	6,3
		TZ	0,42	2,55
2	Base	AubierExt	0,07	Nd
		AubierInt	0,88	Nd
		TZ	0,22	4,5
	1,3 m	AubierExt	19,69	7,9
		AubierInt	0,58	Nd
		TZ	0,04	3,4
3	Base	AubierExt	62,2	8,3
		AubierInt	0,32	Nd
		TZ	0,59	6,5
	1,3 m	AubierExt	Nd	Nd
		AubierInt	Nd	Nd
		TZ	0,44	6,7

Ces résultats (Tableau 24) montrent des teneurs en ARN<sub>total</sub> relativement variables d'un individu et d'un tissu à un autre. D'une manière générale, les taux sont meilleurs pour l'aubier externe que pour l'aubier interne et la TZ. Concernant la qualité des ARN, il est important de noter que pour de faibles teneurs, le RQI est faible, signe d'une mauvaise qualité des ARN (produits de dégradation). Des RQI supérieurs à 5,5 sont requis pour générer des données de séquençage correctes et la plupart des ARN extraits avec ce protocole ont un RQI bien inférieur. Suite à ce constat, des essais pour améliorer à la fois les rendements et la qualité des ARN extraits ont donc été entrepris. Les premières modifications du protocole initial ont consisté en l'ajout de glycogène au moment de la précipitation à l'isopropanol (afin de permettre une meilleure précipitation des ARN ainsi qu'une meilleure visualisation du culot après sédimentation) et à l'essai de tubes Nalgène (fond rond, absence de cassure au niveau

du culot d'ARN) à la place des tubes Falcon (fond conique, présence de cassure). Les résultats d'extraction obtenus suite à ces modifications sont présentés dans le tableau 25.

**Tableau 25 : Teneurs et qualités des ARN<sub>totaux</sub> obtenus suite à une extraction avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié, à partir de bois prélevé en d'automne (génotype 1). AubierExt : aubier externe ; AubierInt : aubier interne.**

	Tube	Glycogène	Teneur (µg/g MS)
<b>AubierExt</b>	Nalgène	+	5,1
	Nalgène	-	4,7
	Falcon	+	8,34
	Falcon	-	8,07
<b>AubierInt</b>	Nalgène	+	0,31
	Nalgène	-	0,15
	Falcon	+	0,33
	Falcon	-	0,14

Tout d'abord, comparés aux résultats précédents, ces résultats montrent une diminution des teneurs quelles que soient les conditions expérimentales (tableau 25). Ceci peut s'expliquer par le fait que la poudre utilisée pour ces essais a été broyée 3 semaines avant l'extraction d'où une dégradation progressive des ARN au cours du temps, malgré la congélation et la lyophilisation des échantillons.

Quoi qu'il en soit, l'ajout de glycogène permet une légère amélioration des taux d'extraction pour l'échantillon de l'aubier externe alors que dans le cas de l'aubier interne, ceux-ci sont doublés. L'utilisation de tubes Nalgène n'améliore pas l'extraction des ARN pour l'aubier interne.

Les taux d'extraction étant toujours trop faibles pour l'aubier interne, d'autres essais de modifications du protocole de Chang *et al.* (1993) ont été envisagés. Ces essais ont été réalisés sur de la poudre issue des cernes compris entre l'aubier interne et la TZ d'une rondelle de bois prélevée à 1,3 m du collet sur un arbre du génotype 1. Des quantités de poudres différentes ont été testées, les débris cellulaires ont été éliminés soit par une centrifugation après le premier lavage au chloroforme/alcool isoamylique (comme dans le protocole de Chang *et al.*, 1993) soit avant. Pour finir, différents temps de précipitation dans le chlorure de lithium ont été essayés. Les résultats de ces modifications sur les teneurs et la qualité des ARN extraits sont présentés dans le tableau 26.

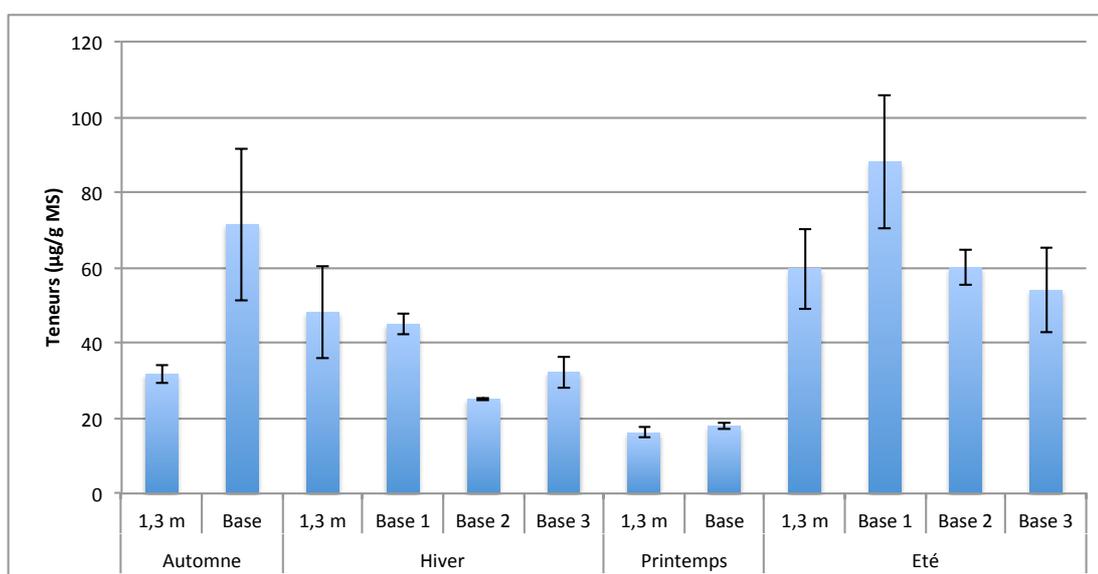
**Tableau 26 : Teneurs et qualités des ARN<sub>totaux</sub> obtenues suite à une extraction des ARN avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié, à partir de bois prélevé en automne (génotype 1, région de l'aubier interne à la zone de transition). Nd : non déterminé.**

Nom de la modalité	1	2	3	4	5	6	7	8
Quantité de bois	3 g	2 g	1 g	1 g	3 g	2 g	1 g	1 g
Première centrifugation	Avant lavage	Avant lavage	Avant lavage	Après lavage	Avant lavage	Avant lavage	Avant lavage	Après lavage
Durée dans le LiCl (jours)	7	7	7	7	2	2	2	2
Glycogène	+	+	+	+	+	+	+	+
Teneur ( $\mu\text{g}$ d'ARN/g MS)	1,04	1,49	1,40	0,43	1,30	1,37	0,52	0,29
RIN	Nd	Nd	Nd	3,8	Nd	Nd	4,2	2,4
RQI	8,2	3,1	2,76	Nd	Nd	Nd	Nd	3,86

Ces résultats (Tableau 26) montrent tout d'abord qu'une centrifugation pour retirer les débris cellulaires du bois avant le premier lavage au chloroforme/alcool isoamylique multiplie par plus de trois les taux d'extraction en ARN (1,40  $\mu\text{g/g}$  MS pour la modalité 3 avec centrifugation avant, et 0,43  $\mu\text{g/g}$  MS pour la modalité 4 avec centrifugation après). Dans le cas d'une précipitation au LiCl de 2 jours, l'augmentation de la quantité de poudre de bois de 1 à 2 g permet de plus que doubler les taux en ARN. Pour des quantités de poudre de bois initiales de 2 et 3 g, l'augmentation de la durée d'incubation dans le LiCl n'améliore pas les rendements. La qualité des ARN<sub>totaux</sub> a été estimée pour chaque modalité à l'Experion (Bio-Rad) et au Bioanalyser (Agilent). Ces deux systèmes utilisent des algorithmes différents de calculs et peuvent donc s'avérer complémentaires dans le cas d'échantillons de faibles qualités. Les valeurs de RIN ou de RQI obtenues mettent en évidence que pour les modalités 2, 3, 4, 7 et 8, la qualité des ARN extraits est relativement faible (valeurs inférieures à 4,2). La qualité des ARN extraits suivant les modalités 5 et 6 n'a pu être déterminée aussi bien au Bio-Rad qu'à l'Agilent. L'échantillon d'ARN obtenu suite à l'extraction avec la modalité 1 (extraction à partir de 3 g de poudre de bois) montre le meilleur RQI (8,2), signe que les ARN sont de bonne qualité. L'augmentation de la quantité de poudre de bois initiale et l'augmentation du temps de précipitation dans le LiCl permet donc d'améliorer la qualité des ARN extraits. C'est pourquoi les modifications apportées par la modalité 1 au protocole de Chang *et al.* (1993) ont été choisies pour l'extraction des échantillons issus de la TZ et de l'aubier interne dans le but d'augmenter la qualité et la quantité des ARN extraits.

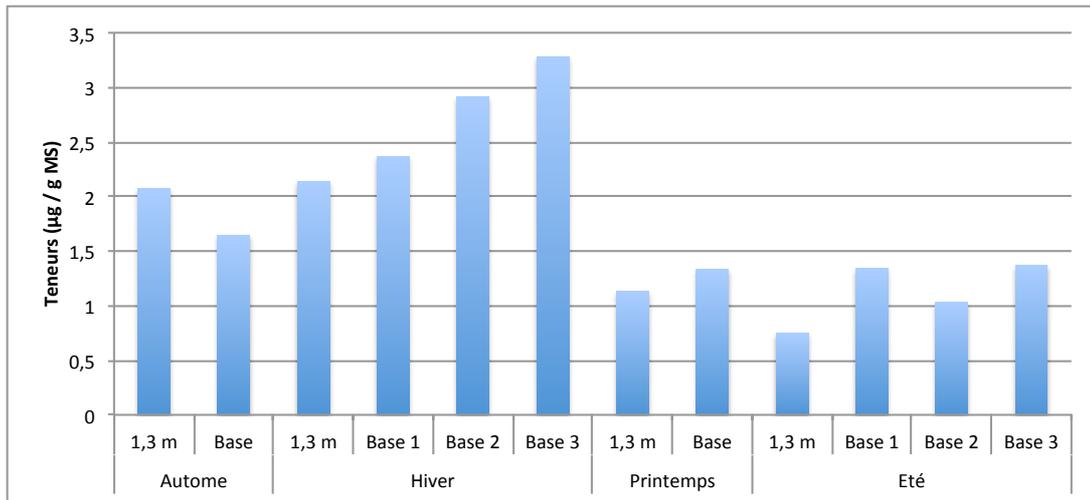
#### 4.3.1.1.2 Application

Nous avons ensuite appliqué le protocole de Chang *et al.* (1993) modifié à l'extraction des ARN<sub>total</sub> du bois de douglas des échantillons que nous souhaitons séquencer. Dans le cadre de ce travail de thèse, un seul génotype, le 3 (80189), a été étudié. Nous avons extrait les ARN<sub>total</sub> à partir de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet (répétition biologique interne) de tous les arbres du génotype 3 à chaque saison. Les extractions à partir de l'aubier externe ont été réalisées en triplicata (répétitions techniques) pour chaque échantillon. Des répétitions biologiques inter-individus ont été réalisées sur des rondelles de bois de la base du tronc pour les prélèvements d'hiver et d'été pour lesquels 3 arbres avaient été abattus à chacune de ces deux saisons. Les taux d'ARN<sub>total</sub> extraits à partir de l'aubier externe en fonction de la saison de prélèvement sont présentés dans la figure 76.



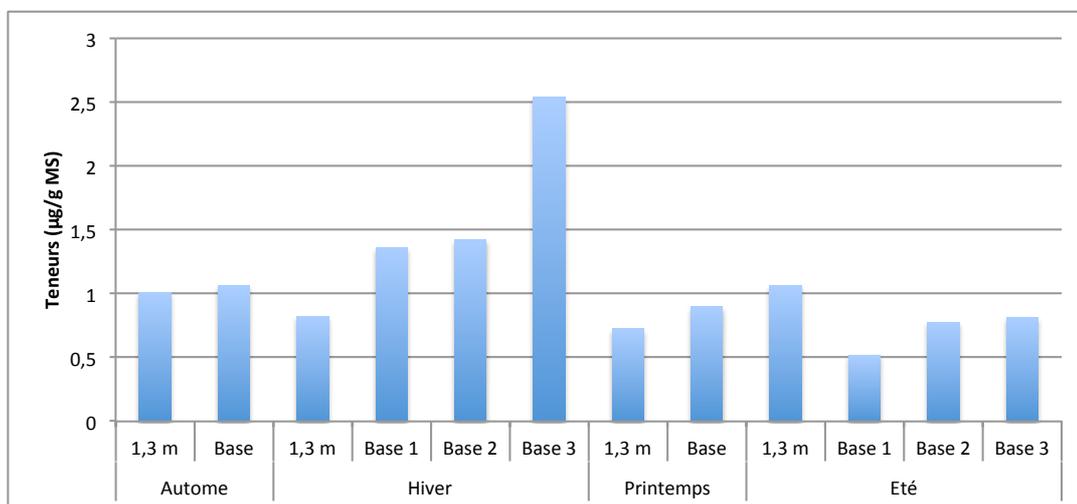
**Figure 75 : Teneurs en ARN<sub>total</sub> de l'aubier externe obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison. Pour chaque échantillon : extraction réalisées en triplicata. Base 1, Base 2 et Base 3 : extraction d'ARN à partir de rondelles de la base du tronc prélevées sur 3 arbres différents.**

Pour l'aubier externe, les teneurs en ARN<sub>total</sub> varient entre 12 et 90 µg/g MS en moyenne suivant la saison de prélèvement du bois (Figure 76). Les teneurs moyennes les plus faibles sont obtenues pour les extractions à partir de bois prélevé au printemps aussi bien pour les rondelles récoltées à la base qu'à 1,3 m du collet. Les teneurs moyennes en ARN les plus élevées sont obtenues pour les extractions à partir du bois prélevé en été.



**Figure 76 : Teneurs en  $ARN_{\text{total}}$  de l'aubier interne obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison. Pour chaque échantillon : une seule extraction. Base 1, Base 2 et Base 3 : extraction d'ARN à partir de rondelles de la base du tronc prélevées sur 3 arbres différents.**

Concernant les teneurs en ARN obtenus pour l'aubier interne (Figure77), ceux-ci sont globalement dix fois moins importants que ceux obtenus pour l'aubier externe et varient de 0,75 à 3,25 µg/g MS. Les taux les plus élevés sont observés pour les prélèvements d'automne et d'hiver, tandis que les plus faibles pour les prélèvements de printemps et d'été.



**Figure 77 : Teneurs en  $ARN_{\text{total}}$  de la zone de transition obtenues après extraction à partir de rondelles de bois prélevées à la base du tronc et à 1,3 m du collet sur des arbres du génotype 3 en fonction de la saison. Pour chaque échantillon : une seule extraction. Base 1, Base 2 et Base 3 : extraction d'ARN à partir de rondelles de la base du tronc prélevées sur 3 arbres différents.**

Les teneurs en ARN de la TZ sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour l'aubier interne et varient en moyenne entre 0,5 et 1,5 µg/g MS (Figure 78). Une teneur plus élevée de 2,5 µg/g MS a été obtenue à partir d'une rondelle de bois récoltée en hiver à la base du tronc.

Avant le séquençage des échantillons d'ARN, nous avons déterminé leur qualité grâce à des analyses au Nanodrop, au Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) et au Fragment Analyser (Advanced Analytical Technologies) (Tableau 27).

**Tableau 27 : Caractéristiques qualitatives des échantillons d'ARN extraits du bois de douglas. Les ratios 260/280 et 260/230 ont été déterminés au Nanodrop et les RIN grâce à l'Experion (Bio-Rad) pour les échantillons 9A1 et 9A2, au Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) pour les échantillons 16A et 9A (A) ou au Fragment Analyser (Advanced Analytical Technologies) pour tous les échantillons (FA ou aucune précision). AubierExt : aubier externe ; AubierInt : aubier interne ; TZ : zone de transition.**

Saison (hauteur)	Zone	Nom échantillon	ratio 260/280	ratio 260/230	RIN/RQI
Automne (1,3 m)	AubierExt	16A1	2,19	2,35	5,3 (A) / 5,2 (FA)
	AubierExt	16A2	2,19	2,33	5,2 (A) / 4,7 (FA)
	AubierExt	16A3	2,17	2,32	5,1 (A) / 4,9 (FA)
	AubierInt	16B	2,12	1,92	1,9
	TZ	16C	2,08	1,44	4,7
Automne (Base)	AubierExt	25A1	2,15	2,31	6,5
	AubierExt	25A2	2,15	2,35	5,8
	AubierExt	25A3	2,15	2,33	5,7
	AubierInt	25B	2,03	1,58	5,1
	TZ	25C	2,08	1,75	4,3
Hiver (1,3 m)	AubierExt	9A1	2,16	2,41	7,9 (E) / 5,8 (A) / 3,4 (FA)
	AubierExt	9A2	2,17	2,29	7,8 (E) / 5,8 (A) / 4,6 (FA)
	AubierExt	9A3	2,15	2,33	5,5 (A) / 4,8 (FA)
	AubierInt	9B	1,97	1,84	4,5
	TZ	9C	2,11	1,72	4,9
Hiver (Base) 1	AubierExt	32A1	2,09	2,32	5,5
	AubierExt	32A2	2,15	2,24	5,1
	AubierExt	32A3	2,07	2,32	5,8
	AubierInt	32B	1,76	1,62	5,6
	TZ	32C	2,08	1,69	4,9
Hiver (Base) 2	AubierExt	33A1	1,47	1,46	4,8
	AubierExt	33A2	1,79	1,77	5,3
	AubierExt	33A3	1,64	1,62	5,4
	AubierInt	33B	2,05	1,68	5,7
	TZ	33C	2	1,88	5

Hiver (Base) 3	AubierExt	39A1	2,24	2,27	5,6
	AubierExt	39A2	2,21	2,32	5,6
	AubierExt	39A3	2,21	2,31	5,6
	AubierInt	39B	1,6	1,44	6,3
	TZ	39C	2,12	1,83	6,1
Printemps (1,3 m)	AubierExt	21A1	2,12	2,11	4,6
	AubierExt	21A2	2,08	2,23	4,9
	AubierExt	21A3	2,11	2,22	5,2
	AubierInt	21B	1,92	1,17	4,8
	TZ	21C	1,95	1,03	5,2
Printemps (Base)	AubierExt	26A1	2,12	2,11	4,9
	AubierExt	26A2	2,14	2,3	5,5
	AubierExt	26A3	2,12	2,3	5,1
	AubierInt	26B	2,04	1,55	3,3
	TZ	26C	2,09	1,07	5,5
Eté (1,3 m)	AubierExt	23A1	2,16	2,38	4,9
	AubierExt	23A2	2,13	2,41	5,6
	AubierExt	23A3	2,16	2,37	4,9
	AubierInt	23B	1,95	1,43	4,6
	TZ	23C	1,99	1,32	4,8
Eté (Base) 1	AubierExt	28A1	2,15	2,29	5,2
	AubierExt	28A2	2,16	2,34	5,6
	AubierExt	28A3	2,15	2,29	5,4
	AubierInt	28B	2	1,48	5,1
	TZ	28C	1,99	1,13	5
Eté (Base) 2	AubierExt	34A1	2,2	2,3	5,2
	AubierExt	34A2	2,19	2,31	5,2
	AubierExt	34A3	2,23	2,32	4,9
	AubierInt	34B	2,16	1,96	5
	TZ	34C	2,1	1,55	4,8
Eté (Base) 3	AubierExt	36A1	2,19	2,32	5,8
	AubierExt	36A2	2,2	2,34	5,7
	AubierExt	36A3	2,22	2,31	5,7
	AubierInt	36B	2,12	1,77	3,8
	TZ	36C	2,16	1,68	5

Les données obtenues avec le Nanodrop ont permis d'estimer la contamination des extraits d'ARN par des protéines, des composés phénoliques et des polysaccharides entre autres. Seuls quelques échantillons présentent une contamination avec des protéines ou des composés phénoliques. Ces échantillons sont aussi bien des extraits d'aubier externe (33A1, 33A2 et 33A3) que des extraits d'aubier interne ou de TZ (21B, 21C, 23B, 32B, 39B). En revanche tous les extraits d'aubier interne et de TZ présentent une contamination aux polysaccharides (ratio 260/230 toujours inférieur à 2), tout comme les extraits d'aubier externe 33A. Les échantillons 33A sont les seuls extraits d'aubier externe à présenter une contamination par des protéines, des composés phénoliques et des polysaccharides. Il se peut qu'il y ait donc eu un problème lors des extractions de la rondelle de bois 33 (prélèvement d'hiver à la base du tronc).

Pour certains extraits, nous avons utilisé 3 types d'instruments d'analyse pour déterminer la qualité des ARN : l'Experion (Bio-Rad), le Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) et le Fragment Analyser (Advanced Analytical Technologies). Pour l'échantillon 9A2, par exemple, nous avons obtenu un RQI de 7,8 avec l'Experion, et des RIN de 5,8 avec le Bioanalyser et de 4,6 avec le Fragment Analyser. Ces résultats montrent bien que les algorithmes de calcul sont différents entre ces trois instruments. Les deux facteurs qui rentrent en compte dans le calcul du RQI ou du RIN sont la présence ou non de produits de dégradations et le rapport entre les deux bandes 18S et 25/28S des ARNr. Les valeurs de RIN obtenues avec le Bioanalyser sont toujours supérieures à celles obtenues avec le Fragment Analyser (des différences de 0,2 à 2,4 sont constatées suivant les échantillons). Quoi qu'il en soit, de nombreux échantillons extraits à partir des trois zones du bois (aubier externe, aubier interne et TZ) ont un RIN inférieur à 5,5 (Fragment Analyser), qui est la valeur minimale de RIN fixée par GATC pour réaliser le séquençage.

## **4.3.2 Premiers résultats d'expression**

### **4.3.2.1 Nettoyage des données de séquençage**

Le nettoyage des données a été réalisé sur les 21 échantillons séquencés jusqu'à maintenant. Ces 21 échantillons représentent 1953405328 séquences. Parmi ces environ 2 Gseq, 0,55 % (soit environ 10,8 Mseq) ont été retirées suite à l'étape de nettoyage (élimination des adaptateurs, des Ns, des queues polyA ou T, des séquences trop courtes, filtrage de la complexité et décontamination). La qualité des séquences produites est donc très bonne dans la mesure où la très grande majorité des séquences est conservée après ce nettoyage.

#### 4.3.2.2 Filtrage des transcrits non alignés

Les séquences des 21 échantillons ont été alignées sur le transcriptome v1.0 du douglas. Ce transcriptome de référence comporte 54830 transcrits. Au sein des transcrits de nos échantillons, certains vont être plus ou moins exprimés, tandis que d'autres ne seront pas exprimés (mais seront présents dans le transcriptome de référence). Seront également présents dans ce transcriptome de référence des transcrits sans réalité biologique. Ces transcrits théoriques, validés par les calculs choisis pour l'assemblage du transcriptome de référence, seront par la suite nommés « pseudo-transcrits ». Les transcrits réellement exprimés se divisent en 2 catégories : celle des transcrits fortement exprimés et celle des transcrits faiblement exprimés. Cette dernière catégorie peut se confondre à celle des transcrits non-exprimés (la limite entre les 2 dépend du seuil défini). La catégorie des transcrits faiblement ou non exprimés peut être fortement contaminée par les « pseudo-transcrits ». La normalité de la distribution statistique des résultats biologiques en est alors affectée augmentant le risque d'absence d'alignement qui n'ont pas de réalité biologique. C'est pourquoi, ces « pseudo-transcrits » doivent être éliminés.

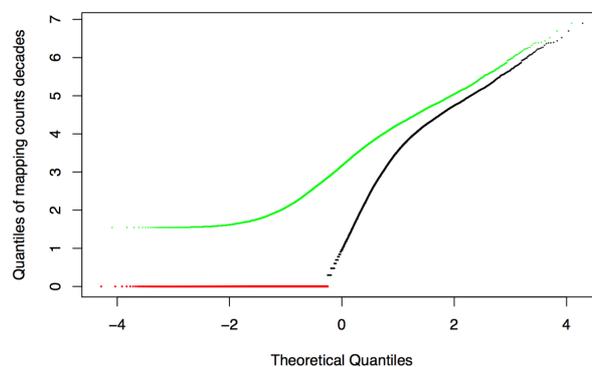
De plus, il faut également tenir compte du taux d'erreur lors du séquençage chez l'Illumina. Pour des séquences courtes de 126 pb, ce taux d'erreur est de 1 %, 1 à 2 erreurs de séquençage peuvent donc se produire par lecture. Ces erreurs aléatoires lors du séquençage peuvent être à l'origine d'alignement non-spécifique.

L'absence d'alignement d'une de nos lectures sur un des transcrits du transcriptome de référence peut être due à une réelle absence d'expression du transcrit dans l'échantillon (absence de l'ADNc ou profondeur de séquençage insuffisante pour le détecter) ou au fait que le transcrit du transcriptome de référence soit un « pseudo-transcrit ». Quoi qu'il en soit, cette proportion sur-représentée de 0 biaise fortement la distribution naturelle des résultats d'alignement (Figure 78, ligne rouge).

La figure 78 a été construite en comparant les quantiles de la distribution binomiale négative (axe des X) aux quantiles obtenus à partir de nos données expérimentales (axe des Y). Normalement, si les 2 distributions étaient les mêmes, une diagonale simple devrait traverser la figure. Cependant, la catégorie « 0 alignement » (ligne rouge) est trop représentée, ce qui fait que la « diagonale » en noir est considérablement biaisée vers le bas. Ce biais est dû à la l'absence d'alignement issue de l'insuffisance de profondeur de séquençage ou des « pseudo-transcrits » que nous ne pouvons distinguer de l'absence d'alignement due à une réelle absence d'expression du transcrit. Pour contourner ce problème de classe de transcrits « 0

alignement » sur-représentés dans la distribution, une heuristique basée sur les recommandations de Love et al. (2014) a été mise en œuvre. Elle consiste à retirer les transcrits ayant une somme cumulée d'alignement par expérience (CSM) inférieure à un seuil fixé. Elle produit alors une distribution plus régulière (courbe verte, Figure 1), bien qu'imparfaite. Une sur-représentation des comptages « 0 alignement » existe toujours mais pour éviter le risque d'éliminer des transcrits faiblement exprimés, ces données seront utilisées pour les analyses qui suivent.

Le seuil fixé pour le CSM est égal au nombre d'échantillons multiplié par le nombre d'erreurs possibles par séquence. Dans le cadre de cette analyse, le CSM est donc de 26 (21 x 1,26).



**Figure 78 : Distribution des comptages d'alignement filtrés sur le transcriptome de référence. La distribution des comptages d'alignement (courbes rouge et noire) est comparée à celle des comptages filtrés (courbe verte).**

#### 4.3.2.3 Comparaison d'expression entre aubier externe, aubier interne et TZ en hiver

Au vu des échantillons séquencés disponibles, nous avons choisi d'étudier l'expression différentielle des transcrits entre l'aubier externe (AubierExt), l'aubier interne (AubierInt) et la TZ à partir des arbres prélevés en hiver. Neuf échantillons séquencés correspondent à cette saison : 4 échantillons correspondent à l'aubier externe (dont 3 sont issus de répétitions techniques, nous disposons par conséquent de 2 répétitions biologiques pour ce tissu), 2 correspondent à l'aubier interne (répétitions biologiques) et 3 à la TZ (répétitions biologiques) (Tableau 28).

**Tableau 28 : Nombre d'échantillons séquencés par tissu pour chacun des 3 arbres du prélèvement d'hiver.**

Arbre	Tissu	Nb d'échantillons
1	AubierExt	1
2	AubierExt	0
3	AubierExt	3
1	AubierInt	0
2	AubierInt	1
3	AubierInt	1
1	TZ	1
2	TZ	1
3	TZ	1

Avec un CSM de 26, la quantité de transcrits retirés du transcriptome de référence par rapport à l'analyse de nos 9 échantillons est de 30821 (21961 transcrits n'ont aucun alignement et 8860 transcrits présentent une CSM strictement supérieure à 0 et inférieure à 26). Seuls 24009 transcrits ont donc été sélectionnés, soit 44 % du transcriptome de référence. L'alignement global des transcrits restants varie de 0 à 1475665.

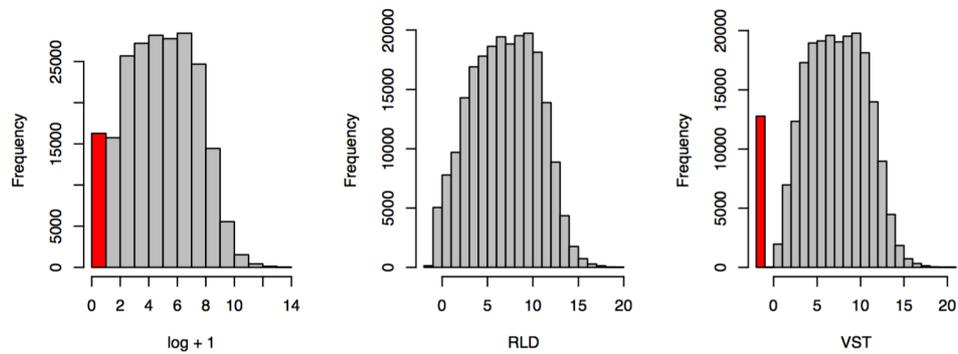
#### 4.3.2.3.1 Normalisation d'alignement des transcrits filtrés

La distribution des résultats d'alignement suit une binomiale négative plus régulière suite au filtrage des transcrits non alignés. Cependant, des analyses statistiques en amont de l'analyse différentielle des transcrits sont nécessaires et ne peuvent utiliser des distributions binomiales négatives, et requièrent des distributions « Normales ». C'est le cas de l'analyse en composante principale (ACP) et des méthodes de clustering hiérarchique.

Différentes méthodes mathématiques peuvent transformer des distributions binomiales négatives en distribution « Normale ». Nous avons ainsi testé la qualité des données obtenues suite à l'application de 3 d'entre-elles : la transformation log +1, la transformation RLD et la transformation VST.

Bien que filtrée dans l'étape précédente, la classe de comptage « 0 alignement » est toujours présente dans les données (Figure 79, barre rouge). Avec les méthodes log +1 et VST, la présence de cette classe anormalement représentée entraîne un bruit de fond important (barre rouge). Ce bruit de fond pose problème pour l'utilisation de ces données pour le clustering et l'ACP. En revanche, avec la transformation RLD (Love et al., 2014), cette classe est à peine détectable (Figure 79 au centre, la barre rouge est à peine visible). Par conséquent, la

transformation RLD paraît être la meilleure transformation pour obtenir une distribution « Normale » des données.



**Figure 79 : Distribution des comptages selon le mode de transformation des données. A gauche : transformation simple en log + 1 ; Au centre : Transformation RLD ; A droite : Transformation VST. Barre rouge : classe des transcrits « 0 alignement ».**

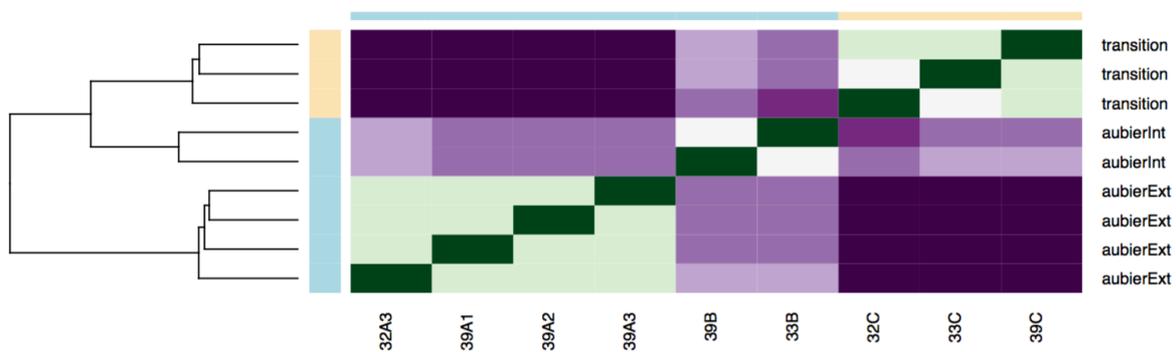
#### 4.3.2.3.2 Clustering et analyse en composante principale (ACP) des échantillons

Afin d’analyser les similarités entre les échantillons, un clustering et une ACP ont été effectués.

L’ACP est une procédure statistique qui utilise des combinaisons linéaires des données originales (valeurs d’expression des gènes par exemple) pour définir un nouveau jeu de variables décorrélatées (composantes principales). Ces nouvelles variables sont orthogonales les unes aux autres afin d’éviter la redondance de l’information. L’ACP peut donc être utilisée pour réduire les dimensions d’un jeu de données, permettant la description des jeux de données et leur variance avec un nombre réduit de variables. L’ACP peut être utilisée pour visualiser les similarités entre les échantillons et ainsi identifier des sous-groupes ou des échantillons aux données aberrantes. Généralement, la variance dans les données RNA-Seq augmente avec la moyenne d’expression des gènes. L’application de l’ACP sur la matrice du comptage des séquences entraîne souvent une dominance des composantes principales par les variances des gènes fortement exprimés. Une transformation des données est donc nécessaire. Comme vu précédemment, la transformation RLD a été appliquée pour transformer la matrice de données des comptages de transcrits en échelle logarithmique. Ces données transformées ont été utilisées pour réaliser le clustering et l’ACP.

Les distances euclidiennes entre les échantillons ont été calculées à partir des transcrits filtrés de chaque échantillon et ont permis d’obtenir la figure 80. Cette figure montre que le transcriptome des échantillons d’aubier interne est plus proche de celui de la TZ que de celui

de l'aubier externe. Les deux types de tissus de l'aubier ont donc des transcriptomes différents.

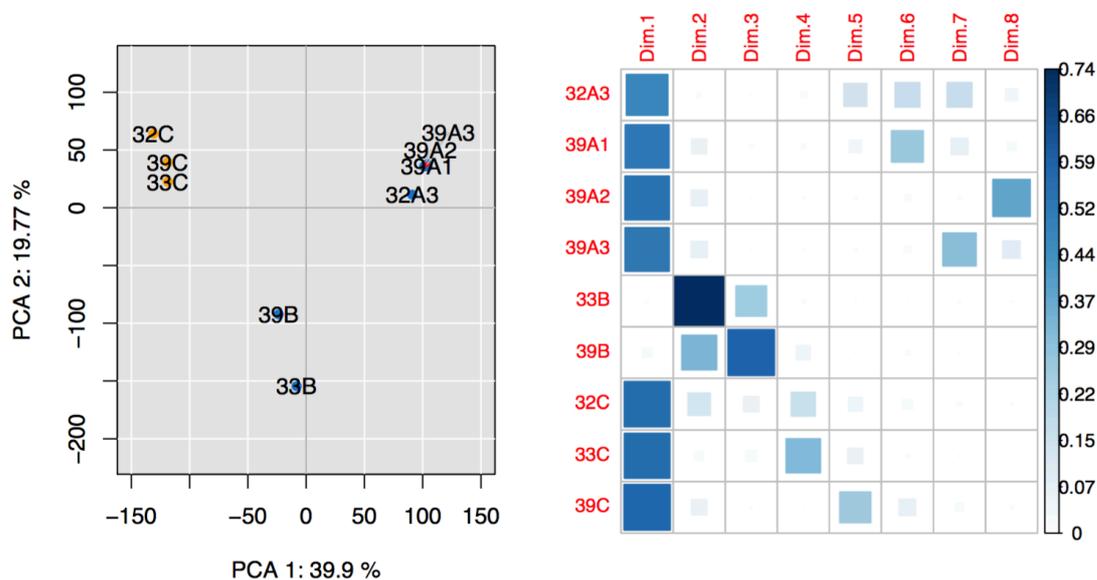


**Figure 80 : Clustering des échantillons basé sur le profil d'expression global à partir des transcrits. Les noms d'échantillons sont spécifiés au niveau des colonnes, les types de tissus au niveau des lignes et le bleu correspond à l'aubier (aubier externe et aubier interne) et le jaune à la zone de transition.**

L'ACP calcule les différences entre les échantillons basées sur les profils transcriptomiques et projette cette distance dans un plan qui maximise ces différences. Les échantillons étroitement liés dans le plan principal de l'ACP ont des profils transcriptomiques proches, tandis que ceux qui sont distants sont dans une autre dimension. D'après la figure 81A, nous pouvons voir que les échantillons 39A sont très proches. Ces échantillons sont issus de répétitions techniques d'extraction d'ARN à partir du même tissu et du même arbre. Il est donc logique que ces échantillons aient des profils transcriptomiques très similaires. Cette figure montre également que les échantillons appartenant aux 3 tissus ont différents profils transcriptomiques et que les échantillons issus d'un même tissu (répétitions biologiques) ont des profils transcriptomiques proches.

La figure 81B montre dans quelle mesure chaque échantillon contribue à la définition de chaque dimension de l'ACP. C'est une manière d'interpréter quels échantillons sont prédominants pour la construction de l'axe 1 et de l'axe 2 (appelés plan principal) de l'ACP. Plus le carré bleu est foncé, plus la contribution est importante. Les résultats montrent que les échantillons d'aubier interne ne sont pas dans la même dimension que ceux des 2 autres tissus. Les dimensions 1 et 2 représentent presque 60 % de la variance globale (Figure 81A). La majorité de la variance provient donc de la comparaison entre tissus. Cependant, la dimension 3 présente également une part importante de la variance, ce qui nous montre que d'autres facteurs, inconnus, interagissent dans le profil d'expression du transcriptome de

l'aubier interne. Ceci suggère que l'aubier interne pourrait être une interface physiologique entre l'aubier externe et la zone de transition.



**Figure 81 : A : Projection des échantillons dans le plan principal de l'ACP ; B : Contribution de chaque échantillon dans les dimensions de l'ACP.**

#### 4.3.2.3.3 Contrôle du taux de faux-positifs (FDR)

La sélection d'un grand nombre de transcrits basés sur leur différence d'alignement entre le traitement et le contrôle introduit le risque de sélectionner des transcrits faux-positifs. Ce phénomène peut être contourné en appliquant une correction des  $p$ -values associées aux transcrits testés (Benjamini and Hochberg 1995). Afin de limiter le risque de mauvaise interprétation biologique, la quantité de transcrits faux-positifs est limitée à un dans chaque jeu de transcrits différentiels, soit surexprimés ou sous-exprimés suite au traitement. Un premier essai d'analyse différentielle a été réalisé sur notre jeu de données sans contrôle FDR. Le nombre de transcrits différentiellement exprimés a été au maximum légèrement inférieur à 4000. Basé sur ce résultat, le FDR a été fixé à 0,00025 pour qu'il n'y ait pas plus d'un transcrit faux-positif par jeu de transcrits différentiels (1/4000).

#### 4.3.2.3.4 Analyse de l'expression différentielle avec DESeq2

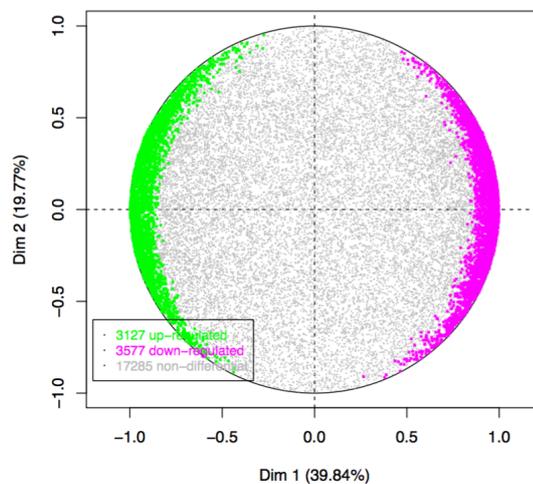
Les données utilisées pour cette analyse sont obtenues suite au comptage des alignements des courtes séquences sur les transcrits de référence après filtrage des transcrits non alignés. Ces comptages d'alignement suivent une distribution binomiale négative mais sont directement utilisables avec DESeq2. Les transcrits différentiels sont détectés sur la base de la moyenne des comptages d'alignement des répétitions avec un contrôle FDR.

Les figures 82 et 83 présentent l'expression différentielle des transcrits lorsque ceux-ci sont projetés dans le plan principal de l'ACP qui représente presque 60 % de la variance globale.

#### *Zone de transition vs aubier externe*

Parmi les 24 009 transcrits alignés et avec un contrôle FDR de 0,00025, 3127 transcrits sont surexprimés dans la zone de transition par rapport à l'aubier externe, 3577 sont sous-exprimés et 17285 n'ont pas d'expression différentielle entre ces deux tissus (Figure 82).

Avec cette valeur de contrôle FDR, moins d'un transcrit surexprimé (0,78) et moins d'un transcrit sous-exprimé (0,89) sont des faux-positifs.

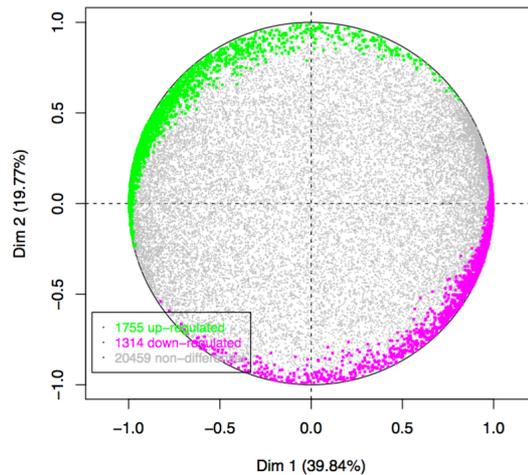


**Figure 82 : Projection dans les axes principaux de l'ACP des transcrits différentiels entre la zone de transition et l'aubier externe. En vert : les transcrits surexprimés dans la TZ, en violet : transcrits sous-exprimés dans la TZ, en gris : transcrits non différenciellement exprimés.**

#### *Zone de transition vs aubier interne*

Parmi les 24009 transcrits alignés et avec un contrôle FDR de 0,00025, 1755 transcrits sont surexprimés dans la zone de transition par rapport à l'aubier interne, 1314 sont sous-exprimés et 20459 n'ont pas d'expression différentielle entre ces deux tissus (Figure 83).

Avec cette valeur de contrôle FDR, moins d'un transcrit surexprimé (0,44) et moins d'un transcrit sous-exprimé (0,33) sont des faux-positifs.



**Figure 83 : Projection dans les axes principaux de l'ACP des transcrits différentiels entre la zone de transition et l'aubier interne. En vert : les transcrits surexprimés dans la TZ, en violet : transcrits sous-exprimés dans la TZ, en gris : transcrits non différenciellement exprimés.**

#### 4.3.2.3.5 Etude de quelques transcrits différenciellement exprimés

Une partie des transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe en hiver a été analysée. L'annotation de ces transcrits, ainsi que leur ratio de surexpression, sont présentés dans le tableau 29. Nous avons, dans un premier temps, observé la surexpression de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse des hormones ou impliquées dans la réponse à des hormones (Tableau 29).

Parmi ces enzymes, certaines de la voie de biosynthèse des gibbérélines (GA) ont des transcrits très surexprimés : la copalyl diphosphate synthase (EC 5.5.1.12) et la kaurène synthase (EC 4.2.3.19), surexprimés respectivement 953 et 1950 fois. Ces enzymes catalysent les 2 premières étapes de la synthèse des GA dans les plastes. Chez *Arabidopsis*, la surexpression de ces 2 enzymes permet d'augmenter significativement les niveaux d'*ent*-kaurène, précurseur des GA, sans pour autant augmenter les niveaux de GA bioactives. Les enzymes suivantes de la voie de biosynthèse des GA ne présentent pas de surexpression de leurs transcrits dans la TZ, excepté la GA-20 oxydase qui permet la décarboxylation de plusieurs types de GA non actives, entraînant la formation d'une fonction lactone nécessaire à la production de formes bioactives par la GA-3 oxydase (Regnault, 2014).

Concernant le jasmonate, cette phytohormone est synthétisée à partir de l'acide  $\alpha$ -linoléique issu des galactolipides de la membrane des chloroplastes. La première étape de sa biosynthèse est une oxygénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique par une lipoxygénase. Les transcrits codant cette

enzyme ne sont pas surexprimés dans la TZ. La seconde enzyme, l'allène oxyde synthase (EC 4.2.1.92), présente une surexpression transcriptionnelle dans la TZ (8 fois plus que l'aubier), tandis que les transcrits codant l'enzyme suivante, l'allène oxyde cyclase (EC 5.3.99.6), ne sont pas surexprimés. Une 12-oxophytodienoate réductase, enzyme intervenant après l'allène oxyde cyclase, présente quant à elle une forte surexpression de ses transcrits (1760 fois). Les transcrits codant les deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse du jasmonate ne sont pas surexprimés (Wasternack and Hause, 2013).

Pour l'acide abscissique (ABA), seul un gène pouvant coder la première enzyme de sa voie de biosynthèse, la zéaxanthine époxydase, est surexprimé. En revanche, un gène codant une protéine de réponse à l'ABA, l'ABA stress-ripening-like (ASR), est surexprimé plus de 3700 fois. Cette protéine peut avoir une fonction de chaperone ou de facteur de transcription (González and Iusem, 2014).

L'acide salicylique est une phytohormone supposée dérivée de la phénylalanine et dont la biosynthèse ferait intervenir la PAL pour laquelle les transcrits sont exprimés 5 fois plus dans la TZ que dans l'aubier. Les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de cette hormone ne sont pas clairement identifiées (Tounekti et al., 2013). Cependant, un gène codant la salicylate carboxyméthyltransférase est surexprimé 3060 fois dans la TZ. Deux autres transcrits codant des enzymes impliquées dans la méthylation d'hormones, les GA et le jasmonate, sont également surexprimés dans la TZ, respectivement de 1200 et 1100 fois.

Concernant l'éthylène, celui-ci est issu de la S-adenosyl-méthionine (SAM). La méthionine est convertie en SAM par la SAM synthase (EC 2.5.1.6). La SAM est le donneur majeur de groupements méthyles chez les plantes. La SAM est ensuite convertie en acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) par l'ACC synthase (ACS, EC 4.4.14). L'ACC est ensuite oxydé par l'ACC oxydase (ACS, EC 1.14.17.4) pour former l'éthylène (Wang et al., 2002). Les transcrits codant la SAM synthase, l'ACC et l'ACO sont surexprimés respectivement 11, 6 et 75 fois dans la TZ par rapport à l'aubier.

Nous n'avons pas observé de surexpression des transcrits codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des auxines, en revanche, des transcrits codant des transporteurs et des protéines de réponse de l'auxine sont surexprimés de 5 à 16 fois dans la TZ. Un gène codant une enzyme d'inactivation des auxines, l'acide indole 3-acétique acide-amido synthase (EC : 6.3.2.-) (Böttcher et al., 2012), est également surexprimé plus de 600 fois.

Plusieurs gènes codant des facteurs de transcription sont surexprimés dans la TZ de douglas comparé à l'aubier (Tableau 29). Des transcrits codant des facteurs de transcription de réponse à l'éthylène ou aux auxines sont surexprimés respectivement 800 et 6-7 fois. Des gènes codant des facteurs de transcription MYB sont surexprimés de 80 à 500 fois, pour les facteurs de transcription NAC, ces ratios de surexpression sont de 25 à 50, et pour les facteurs WRKY de 5 à 50.

La voie du shikimate assure la connection entre le métabolisme primaire (biosynthèse des acides aminés) et la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes *via* la phénylalanine. Tous les gènes codant des enzymes impliquées dans cette voie, du gène de la phospho-2-déhydro-3-déoxyheptonate aldolase à ceux des aminotransférases, sont surexprimés dans la TZ, excepté celui codant la chorismate synthase (Tableau 29). Une très importante surexpression des transcrits codant une phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.49) est également observée. Cette enzyme convertit l'oxaloacétate en phosphoenolpyruvate, qui peut ensuite rejoindre la voie du shikimate (Leegood and Walker, 2003)

Tous les gènes d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont également surexprimés dans la TZ (Tableau 29). Un transcrit codant la PAL est exprimé 5 fois plus, un codant la C4H 3 fois, ceux codant la 4CL de 6 à 1240 fois. Ces gènes sont impliqués dans la voie de biosynthèse des lignines et des extractibles (flavonols, anthocyanines, flavanols...). La synthèse des extractibles fait ensuite intervenir la CHS (surexpression d'un transcrit de 4 fois), la CHI (surexpression des transcrits de 3 à 17 fois), la F3H (7 à 157), la DFR (450 à 1500) et la F3'H (2) (cf Figure 21 p.42). Les autres enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des unités H et G de la lignine présentent également une surexpression transcriptionnelle (la HCT, la C3H, la CCoAOMT, la CCR et la CAD) de 2,5 à 247 fois suivant les gènes (cf Figure 20 p.37).

De nombreux gènes codant des enzymes impliquées dans la modification des polysaccharides paritéaux sont surexprimés dans la TZ. Les transcrits les plus exprimés sont ceux codant une xyloglucanes endotransglycosylase et une polygalacturonase, respectivement 3000 et 1900 fois plus exprimés dans la TZ. Des enzymes agissant sur les mannanes et les xylanes présentent également une transcription plus importante dans la TZ, tout comme des pectines (acétyl)estérases et des glycosylases.

Des gènes impliqués dans les processus de mort cellulaire programmée, de dessiccation et de défense sont surexprimés dans la TZ comparé à l'aubier. Parmi ces gènes, des gènes codant un facteur induit par l'apoptose, une nucléase et une métacaspase 1 dont les expressions sont

augmentées respectivement de 7, 1,3 et 1,7 fois. Un gène codant une protéine de réponse à la dessiccation présente une surexpression de 40 fois et plusieurs gènes codant des aquaporines de 2,6 à 12 fois ainsi qu'un gène codant une protéine relative à la pathogénéicité qui est 39 fois plus exprimé.

**Tableau 29 : Transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe.**

Gi	Annotation	E-value	Ratio TZ/AubierExt
<b>Hormones</b>			
<i>Gibbéréllines</i>			
720059786	copalyl diphosphate synthase	3.2e-134	953,89
720048119	kaurene synthase	1.7e-135	1940,79
449436255	gibberellin 20-oxidase, putative	5.4e-45	3,07
659122891	PREDICTED: gibberellic acid methyltransferase 2-like	4.9e-74	1216,62
<i>Jasmonate</i>			
15239032	Allene oxide synthase	2E-127	8,00
586684878	PREDICTED: 12-oxophytodienoate reductase 2-like	4.3e-155	1760,96
743811918	PREDICTED: jasmonate O-methyltransferase isoform X1	2E-80	1103,01
586648103	PREDICTED: jasmonate O-methyltransferase-like	1.6e-80	158,19
<i>Acide abscissique</i>			
590629309	PREDICTED: zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like isoform X1	8.1e-84	18,03
658009763	PREDICTED: abscisic stress-ripening protein 1-like	1.6e-32	3727,22
<i>Acide salicylique</i>			
1063467927	PREDICTED: salicylate carboxymethyltransferase	6.7e-84	3063,75
<i>Ethylène</i>			
590631045	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase 2	3.1e-217	11,07
702308498	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase 5	3.5e-216	5,36
645274629	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7	5.3e-152	6,32
769817932	PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	6.5e-89	75,18
<i>Auxines</i>			
659120964	PREDICTED: indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.17-like	2.2e-249	631,66
719977853	PREDICTED: auxin transporter-like protein 2	5.3e-241	16,08
743886945	PREDICTED: auxin-responsive protein IAA26-like	1.4e-46	11,03
590642849	PREDICTED: auxin transporter-like protein 2	4.5e-113	5,33

**Facteurs de transcription**

672173489	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ABR1-like	6.2e-36	829,33
702481288	PREDICTED: auxin response factor 18-like	5.9e-179	6,72
802543883	PREDICTED: auxin response factor 18-like isoform X2	1.6e-64	6,21
685359597	PREDICTED: auxin response factor 18	2.1e-33	5,63
769824323	MybPA2, putative	2.7e-51	494,92
695057050	PREDICTED: transcription factor MYB39	6E-58	474,77
769820422	Myb transcription factor	1.3e-58	256,62
802578126	PREDICTED: transcription factor MYB86	1.6e-67	251,81
802551260	PREDICTED: transcription factor MYB86-like	2.9e-10	244,63
719988832	PREDICTED: transcription factor MYB108-like	1.9e-47	82,32
727633533	PREDICTED: NAC transcription factor 25	1.3e-62	53,68
802636094	PREDICTED: NAC transcription factor 25-like	3.9e-97	35,35
115466226	PREDICTED: NAC transcription factor NAM-B2-like	2.3e-90	24,42
760448755	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 31	1.4e-43	52,59
743761041	WRKY transcription factor, putative	3.8e-21	49,75
823152433	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 28-like	1.5e-23	29,48
727426826	WRKY family transcription factor	6.1e-66	26,54
586730341	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 14 isoform X1	1.8e-43	22,24
672126968	WRKY transcription factor, putative	5.4e-43	8,02
586703802	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 21 isoform X1	3.1e-78	5,03

**Voie du shikimate**

658064893	PREDICTED: phosphoenolpyruvate carboxylase kinase 1-like	3.5e-85	4858,35
743764470	PREDICTED: phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2, chloroplastic	2.1e-245	8,08
695052834	PREDICTED: 3-dehydroquinate synthase, chloroplastic-like	2.2e-16	1,34
658006394	PREDICTED: bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase, chloroplastic isoform X1	7.6e-211	6,18
226507374	PREDICTED: shikimate kinase 3, chloroplastic	5.5e-79	4,67
586649486	PREDICTED: 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2	2E-54	2,89

702313475	PREDICTED: chorismate mutase 1, chloroplastic	5.5e-111	6,31
743885404	PREDICTED: arogenate dehydratase/prephenate dehydratase 6, chloroplastic	1.6e-145	108,15
225438331	PREDICTED: bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase-like	3.9e-132	2,03

### Phénylpropanoïdes

12025512	PREDICTED: phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	2.2e-285	4,69
357487063	PREDICTED: cinnamate 4-hydroxylase (C4H)	4.9e-245	3,06
75295475	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase-like 5 (4CL)	2.8e-163	1245,06
356508983	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase-like 7 (4CL)	1.5e-191	383,12
702290560	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase-like 10 (4CL)	6.4e-197	8,51
697184021	PREDICTED: 4-coumarate--CoA ligase 2 (4CL)	6.5e-216	6,42
720088334	PREDICTED: chalcone synthase 1 (CHS)	2.1e-21	4,20
731337113	PREDICTED: chalcone--flavonone isomerase (CHI)	1.2e-36	17,23
586776614	PREDICTED: chalcone--flavonone isomerase-like isoform X4 (CHI)	7.3e-44	8,25
225451024	PREDICTED: chalcone--flavonone isomerase isoform X1 (CHI)	1.8e-136	6,00
590700682	PREDICTED: probable chalcone--flavonone isomerase 3 (CHI)	5.1e-75	3,67
586715892	PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase (F3H)	1.3e-117	157,42
743838422	PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase-like (F3H)	2.2e-29	7,36
658309886	PREDICTED: bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase (DFR)	2E-71	1508,70
694429310	PREDICTED: dihydroflavonol-4-reductase-like (DFR)	9.6e-72	452,69
727634344	Flavonoid 3'-hydroxylase isoform 2 (F3'H)	9.5e-174	2,26
694360660	PREDICTED: shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase (HCT)	2.8e-195	3,51
224089905	Cytochrome P450 98A3 family protein (C3H)	9E-241	3,41
702290939	PREDICTED: caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoOMT)	4.8e-121	2,48
719993514	PREDICTED: cinnamoyl-CoA reductase 1-like isoform X2 (CCR)	6.4e-36	247,50
224056481	cinnamyl alcohol dehydrogenase family protein (CAD)	7.7e-50	17,28

<b>Remodelage des polysaccharides pariétaux</b>			
769795305	PREDICTED: probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25 isoform X2	2.1e-85	3044,45
302798186	PREDICTED: xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 2-like	9.6e-80	133,31
1063466849	PREDICTED: polygalacturonase QRT3 isoform X1	3.9e-150	1912,70
731439463	PREDICTED: polygalacturonase-like	4.1e-103	77,48
1040974908	PREDICTED: pectinesterase-like	2.7e-93	76,01
590703361	PREDICTED: pectin acetylerase 8-like	5.9e-119	20,11
297607800	PREDICTED: pectin acetylerase 10 isoform X1	1.3e-102	3,35
743911002	PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 86A1-like	3E-100	113,59
698557198	glycosyltransferase, putative	3.5e-134	65,28
645229172	UDP-glycosyltransferase 86A1	6E-98	48,83
115472703	PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 91C1-like	6.2e-87	36,03
571489728	PREDICTED: mannan endo-1,4-beta-mannosidase 7-like	3.2e-151	11,89
514726262	PREDICTED: galactomannan galactosyltransferase 1	7.5e-149	5,28
657957551	PREDICTED: mannan endo-1,4-beta-mannosidase 6 isoform X2	1E-141	2,09
719970239	PREDICTED: probable glucuronoxylan glucuronosyltransferase IRX7 isoform X2	7.8e-154	3,67
<b>Mort cellulaire programmée</b>			
823217520	PREDICTED: apoptosis-inducing factor homolog B-like	6.2e-124	7,35
586647458	PREDICTED: apoptosis-enhancing nuclease-like	2.7e-88	1,36
922556095	PREDICTED: metacaspase-1	1.3e-46	1,67
<b>Dessiccation</b>			
590656928	Desiccation-related protein PCC13-62	4.7e-102	39,11
586673962	PREDICTED: aquaporin NIP2-1-like	2.1e-83	12,17
566146325	PREDICTED: aquaporin TIP1-1	2E-111	4,02
586716734	PREDICTED: aquaporin SIP1-2	6.9e-90	2,59
<b>Défense</b>			
743919723	PREDICTED: pathogenesis-related protein 5-like	6.5e-92	21,16

## 4.4 Discussion

Afin d'étudier les processus moléculaires mis en jeu lors de la formation du duramen chez le douglas, une analyse du transcriptome a été entreprise pour comparer les profils d'expression de différentes zones d'aubier et de la TZ. Les ARN<sub>totaux</sub> ont été extraits du bois avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié, les transcrits polyA ont été purifiés, rétrotranscrits et séquencés. Une comparaison globale des profils transcriptomique de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ a été réalisée avant une analyse plus fine de quelques gènes surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe en hiver.

### 4.4.1 Extraction des ARN du bois

Le bois est un tissu riche en polysaccharides et en composés phénoliques, composé principalement de cellules mortes. Ces différentes caractéristiques limitent l'application et l'efficacité des techniques classiques d'extraction des acides nucléiques et représentent donc un obstacle pour extraire de l'ARN en quantité et qualité suffisantes pour des analyses moléculaires à partir du bois. Malgré ces difficultés, Beritognolo (2001) a montré qu'une procédure d'extraction basée sur le CTAB permettait d'extraire des quantités suffisantes d'ARN de qualité à partir de TZ de bois de noyer. Chang et al. (1993) ont été les premiers à développer un protocole d'extraction d'ARN utilisant le CTAB pour une application sur des aiguilles de pin. Ces auteurs ont montré qu'un tel protocole permettait d'extraire les mêmes quantités d'ARN qu'un protocole basé sur l'isothiocyanate de guanidine, en revanche la qualité de l'ARN était nettement meilleure (absence de contamination par des polysaccharides, protéines ou composés phénoliques). Appliqué à la TZ de bois de noyer, le protocole de Chang et al. (1993) a permis à Bertignolo (2001) d'obtenir des ARN relativement purs avec un rendement de 0,54 µg/g MS. A partir du même échantillon, un meilleur rendement a été obtenu avec un protocole utilisant l'urée (0,84 µg/g MS) mais l'ARN étant contaminé par des protéines et des composés phénoliques. C'est pourquoi Beritognolo (2001) a choisi d'optimiser l'extraction avec le protocole au CTAB. L'augmentation de la durée de l'étape de lyse à 65°C à 10 min, l'augmentation de la durée de précipitation dans le chlorure de lithium d'une nuit à 2 jours et l'ajout de glycogène au moment de la précipitation à l'isopropanol ont ainsi permis d'augmenter les rendements de la TZ du bois de noyer à 1,8 µg/g MS. Appliqué aux autres zones du bois de noyer, les rendements ont été les suivants : 2267 µg/g MS pour le cambium, 29 pour l'aubier externe et

4,5 pour l'aubier interne. Basé sur ces résultats, nous avons donc appliqué le protocole de Chang et al. (1993) modifié par Beritognolo (2001) pour extraire les ARN de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ de bois de douglas. Les premiers essais ont été menés à partir de rondelles de bois de plusieurs génotypes et ont révélé des rendements très faibles pour la TZ et l'aubier interne ( $< 1 \mu\text{g/g MS}$  pour presque tous les échantillons, de nombreux étant même  $< 0,5 \mu\text{g/g MS}$ ) et des rendements très variables pour l'aubier externe (0,07 à  $62,2 \mu\text{g/g MS}$ ). De plus, plus la quantité d'ARN extraits était faible, moins bonne était la qualité. Ces résultats ont été obtenus sans ajout de glycogène au moment de la précipitation à l'isopropanol. Un deuxième essai d'extraction avec cette fois du glycogène a montré une amélioration du rendement d'extraction, qui n'était toute fois toujours pas suffisant pour la TZ et l'aubier interne. Nous avons donc tenté d'optimiser le protocole d'extraction en partant de quantités plus importantes de poudre de bois, en allongeant la durée de précipitation dans le chlorure de lithium ou encore en éliminant les débris cellulaires avant la première étape de lavage au chloroforme. De meilleurs rendements et qualités ont été obtenus à partir de 3 g de poudre de bois, en allongeant la durée de précipitation au chlorure de lithium à 7 jours et en centrifugeant avant la première étape de lavage. En appliquant ce protocole modifié à l'extraction de tous nos échantillons de bois, nous avons obtenu des rendements de 0,5 à  $3,25 \mu\text{g/g MS}$  pour l'aubier interne et 0,5 à  $2,5 \mu\text{g/g MS}$  pour la TZ. Concernant l'extraction à partir d'aubier externe, par rapport au protocole modifié par Beritognolo (2001) nous avons seulement prolongé la durée de précipitation dans le chlorure de lithium, de 2 jours à 7 jours. Les rendements ont varié en fonction des saisons de 12 à  $90 \mu\text{g/g MS}$ . Aucune valeur de référence n'est disponible pour le douglas dans la littérature. Cependant les résultats sont en accord avec ceux obtenus par Beritognolo (2001) à partir de noyer, bien que certains rendements obtenus pour l'aubier externe soient plutôt élevés (possibilité de contamination par du tissu cambial, notamment pour les extraits issus des prélèvements d'été). Quoi qu'il en soit, nous constatons une diminution des rendements et donc de la quantité d'ARN contenu dans les tissus de l'aubier externe à la TZ. Dans le bois, seules les cellules parenchymateuses sont vivantes et leur viabilité décroît en progressant vers la TZ, où toutes vont mourir lors de la transformation en duramen (Kampe and Magel, 2013).

Sur les 60 échantillons extraits, toutes zones confondues, 36 présentent un RIN supérieur ou égal à 5 dont 16 supérieurs à 5,5 (seuil fixé par GATC pour le séquençage). Les auteurs utilisant le protocole basé sur le CTAB étudient la qualité des échantillons extraits en se basant sur les résultats de contamination (ratios 260/280 et 260/230) et sur les profils de

migration sur gel d'agarose des ARNr 18 et 28S (il n'y a donc pas de valeur « chiffrée »). En appliquant le protocole de Chang et al. (1993), Gambino et al. (2008) ont extrait des ARN relativement purs à partir de bois de vigne avec un rendement de 12,25 µg/g MS. Tandis que l'utilisation du kit RNeasy et du protocole basé sur la guanidine ne leur ont pas permis d'obtenir des ARN purs, les rendements d'extraction étant respectivement de 0,27 µg/g MS et 9,77 µg/g MS. Ces auteurs ont également développé un protocole au CTAB « miniaturisé » réalisable en 3 h sur une journée (6 h sur 2 jours sont nécessaires pour le protocole original) à partir de 150 mg de matériel. Ce protocole au CTAB modifié a permis aux auteurs d'obtenir des rendements de 11,4 µg/g MS avec des ARN de bonne qualité (les ratios 260/280 et 260/230 montrent une absence de contamination et la migration des échantillons sur gel d'agarose montrent que les ARNr 28 et 18S sont relativement intacts). Un autre protocole de miniaturisation basé sur le CTAB a été développé par Le Provost et al. (2007). Ces auteurs ont appliqué ce nouveau protocole à l'extraction d'ARN à partir de nombreux tissus végétaux de chêne et de pins (dont du xylème). Un rendement moyen de 15 µg/g MS a été obtenu tout tissus confondus et les ARN étaient de bonne qualité. Au vu de nos très faibles rendements d'extraction avec le protocole de Chang et al. (1993) modifié par Beritognolo (2001) pour la TZ et l'aubier interne, il n'était pour nous pas judicieux d'opter pour un protocole au CTAB miniaturisé.

Un autre protocole mis au point par Kolosova et al. (2004) est largement employé pour l'extraction d'ARN à partir de xylème (Berta et al., 2010; Huang et al., 2010, 2013; Pallara et al., 2011). Ce protocole combine les principales caractéristiques du protocole de Wang et Hunter (Wang and Hunter, 2000) et de Chang et al. (1993). Le tampon d'extraction choisi est issu du protocole de Wang et al. (2000) car il inactive les composés phénoliques, contient des inhibiteurs de RNases et ne requiert pas d'incubation à température élevée avant l'élimination des RNases. Le protocole prévoit ensuite une étape de purification pour éliminer les polysaccharides grâce à l'application du protocole de Chang et al. (1993). L'ajout de cette étape de purification permet de doubler les rendements en ARN à partir de bois d'épicéa comparé à l'application du protocole de Wang et Hunter (2000) seul (200-350 µg/g MS contre 50-200 µg/g MS) et permet surtout d'éliminer la contamination polysaccharidique importante observée en absence de purification au CTAB. Bien que la migration de l'extrait d'ARN du bois d'épicéa présente des « smears » au niveau des ARNr 18 et 28S, les auteurs ont jugé leur qualité comme bonne. Ce protocole nous paraissait très laborieux pour une application sur un grand nombre d'échantillons, il n'a donc pas été choisi.

Comme expliqué précédemment, dans le bois, seules les cellules parenchymateuses sont vivantes et leur viabilité décroît en progressant vers la TZ (Kampe and Magel, 2013). La technique de microdissection assistée par laser qui permet l'isolation de cellules de leur contexte cellulaire pourrait être envisagée dans notre cas dans le but d'isoler uniquement les cellules parenchymateuses pour ensuite en extraire les ARN. L'utilisation de protocoles d'extraction miniaturisés prendrait alors tout son sens. La microdissection laser a déjà été employée pour isoler des cellules cambiales de jeunes épicéas afin de réaliser des analyses différentielles d'expression de gènes. En effet, l'ARN isolé de ces cellules présentait une très bonne qualité (RIN > 7) (Abbott et al., 2010). Cette technique a également été utilisée à partir de jeunes plantules de pins, l'ARN extrait à partir des cellules isolées a ensuite permis l'analyse de leur transcriptome (séquençage 454) (Cañas et al., 2014).

Une fois l'ARN isolé en quantité et qualité suffisantes à partir des différents tissus du bois de douglas, les transcrits polyA ont été purifiés puis rétrotranscrits avant le séquençage. Le séquençage de 21 échantillons, réalisé sur une plateforme Illumina, a permis d'obtenir 2 G de séquences de taille inférieure à 126 pb. Parmi ces séquences, 0,55 % ont été retirées suite à l'étape de nettoyage, signe d'une bonne qualité des séquences produites. Ces séquences ont ensuite été alignées sur le transcriptome de référence du douglas afin d'identifier les gènes exprimés et observer les profils d'expression entre les différents tissus étudiés, à savoir la TZ, l'aubier interne et l'aubier externe.

#### **4.4.2 Résultats préliminaires de l'expression des gènes au niveau de la TZ**

##### **4.4.2.1 Profils transcriptomiques de l'aubier externe, de l'aubier interne et de la TZ**

Afin d'étudier les gènes préférentiellement exprimés au niveau de la TZ du bois de douglas, des analyses d'expression différentielle ont été menées entre l'aubier externe, l'aubier interne et la TZ. Les résultats n'ont pour le moment été analysés qu'en partie. A partir de 21 échantillons (11 d'aubier externe, 5 d'aubier interne et 5 de TZ), nous avons constaté que les 3 tissus ont des transcriptomes distincts et que le transcriptome de l'aubier interne est plus proche de celui de la TZ que de celui de l'aubier externe. Les lectures issues du séquençage Illumina ont été alignées sur le transcriptome du douglas v 1.0 et un taux global d'alignement de 44 % a été obtenu. Le transcriptome de référence actuel du douglas est issu de tissus (aiguilles et tiges) de plantules de douglas d'un an et demi (cultivées en conditions normales

ou soumises à un stress hydrique) (Müller et al., 2012), d'où un manque de représentativité de l'intégralité des transcrits des différents tissus du bois dans ce transcriptome.

L'analyse des transcrits préférentiellement exprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe et l'aubier interne a été réalisée pour une seule saison, l'hiver. Les profils d'expression ont ainsi été étudiés pour ces 3 tissus à partir de 3 arbres abattus en hiver. Malgré le peu d'échantillons étudiés, l'analyse globale des profils transcriptomiques a révélé que l'aubier interne pourrait être une interface physiologique entre l'aubier externe et la zone de transition.

Parmi les 24 009 transcrits alignés sur le transcriptome de référence du douglas, 13 % sont surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe et 14,9 % sont sous-exprimés (FDR 0,00025). Dans le cas de la TZ comparée à l'aubier interne, ces chiffres s'élèvent respectivement à 7,3 et 5,5 % (FDR 0,00025). Seuls les transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe ont été analysés.

#### **4.4.2.2 Analyse des gènes surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe**

##### **4.4.2.2.1 Régulation hormonale**

De nombreux gènes codant des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse d'hormones montrent une surexpression dans la TZ par rapport à l'aubier externe. Parmi ces transcrits surexprimés, certains codent des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'éthylène (SAM synthase, ACC et ACO), des gibbérélines (copalyl diphosphate synthase, kaurène synthase, gibbéréline 20-oxydase) et du jasmonate (allene oxide synthase et 12-oxophytodienoate reductase). Des gènes codant des méthyltransférases du jasmonate, de GA et de l'acide salicylique sont fortement surexprimés dans la TZ. L'acide salicylique, le méthyl-salicylate, l'éthylène, le jasmonate et le méthyl-jasmonate sont impliqués dans la mise en place des processus de défense chez les plantes (Klessig and Malamy, 1994). Mais ces phytohormones sont aussi impliquées, tout comme les GA, dans le développement des plantes et la tolérance aux stress abiotiques (Kazan, 2015). Dans les processus de défense, le jasmonate et l'éthylène sont connus pour constituer une voie de signalisation indépendante de celle de l'acide salicylique (Dong, 1998).

Chez *Pinus radiata*, de l'éthylène est produit dans la TZ et ceci en plus grande quantité par rapport à l'aubier externe en hiver (Shain and Hillis, 1973). Une augmentation de la production d'éthylène a également été mise en évidence dans la TZ de *Juglans nigra* en automne (Hillis, 1975). Yoshida et al. (2012) ont montré une surexpression des gènes codant

la S-adénosylméthionine synthase dans la TZ du cèdre du Japon en novembre. Lim et al. (2016) ont quant à eux identifié une importante surexpression des transcrits de l'ACO et de la SAM synthase dans la TZ par rapport à l'aubier, mais une absence d'expression de transcrits de l'ACS. Du fait de variations d'expression des transcrits de l'ACO entre l'aubier externe et la TZ d'arbres différents, Lim et al. (2016) remettent en cause l'importance de l'éthylène dans la formation du duramen de *Pinus sylvestris*. Dans le cas du douglas, nous avons observé une surexpression de tous les transcrits de la voie de biosynthèse de l'éthylène, ainsi qu'une surexpression de transcrits de facteurs de transcription répondant à l'éthylène (ERF).

Concernant l'auxine, une surexpression des transcrits codant l'acide indole 3-acétique-amido synthase est observée dans la TZ par rapport à l'aubier externe. Cette enzyme permet de réguler les niveaux d'auxines en les inactivant par conjugaison à des acides aminés (Böttcher et al., 2012). Des transporteurs d'auxines et des facteurs de transcription de réponse à l'auxine voient également leurs transcrits surexprimés dans la TZ. Ceci est contradictoire avec les résultats obtenus pour le pin sylvestre, pour lequel plusieurs facteurs de transcription de réponse à l'auxine sont sous-exprimés dans la TZ par rapport à l'aubier, bien que les transcrits de la voie de biosynthèse et du transport des auxines ne soient pas différenciellement exprimés entre ces 2 tissus (Lim et al., 2016). Une diminution des concentrations en auxines a été observée dans la TZ d'épicéa et de pin sylvestre en automne-hiver (Beauchamp, 2011). De plus, Shain et Hillis (1973) ont suggéré le rôle important dans la formation du duramen d'une balance entre l'auxine et l'éthylène.

Pour les GA, plusieurs transcrits codant des enzymes de leur voie de biosynthèse, ainsi qu'un transcrit codant une méthyltransférase de l'acide gibbérélique (GA3) sont surexprimés dans la TZ chez le douglas. Dans les graines d'*Arabidopsis*, cette enzyme est supposée désactiver les GA et initier leur dégradation (Varbanova et al., 2007). Lim et al. (2016) ont identifié une surexpression dans la TZ des transcrits codant une GA 2-oxydase. Cette enzyme permet également la désactivation des GA (Yamaguchi, 2008).

Concernant l'acide abscissique (ABA), seuls des transcrits codant une seule enzyme de sa voie de biosynthèse et une protéine ABA stress-ripening (ASR) sont surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe. Les protéines codées par des gènes de la famille des ASR peuvent avoir des fonctions de chaperones ou de facteurs de transcription (González and Iusem, 2014). Une augmentation des concentrations en ABA a été observée dans la TZ d'épicéa et de pin sylvestre en automne-hiver (Beauchamp, 2011).

De ces résultats transcriptomiques, nous pouvons supposer que les phytohormones jouent un rôle important dans la formation du duramen chez le douglas. Des études complémentaires sur la période d'expression des gènes cités sont nécessaires pour comprendre plus précisément le rôle de ces différentes hormones dans l'induction de ce processus physiologique. Des dosages d'hormones pourraient également être envisagés au niveau de la TZ afin de confirmer la présence et les variations des concentrations de ces hormones.

#### **4.4.2.2.2 Contrôle transcriptionnel de la formation du duramen**

Comme vu précédemment, plusieurs transcrits codant des facteurs de transcription dont l'expression est induite par des hormones (éthylène et auxine) sont très fortement surexprimés dans la TZ de douglas par rapport à l'aubier externe en hiver. Les facteurs de transcription répondant à l'éthylène se lient à l'ADN au niveau de séquences appelées boîtes GCC présentes dans les promoteurs de nombreux gènes induits par l'éthylène, gènes impliqués dans des mécanismes de défense (Guo and Ecker, 2004). Les facteurs de réponse à l'auxine se lient au niveau des promoteurs des gènes de réponse à l'auxine. De nombreux gènes régulés par ces facteurs de transcription interviennent dans les processus de croissance et de développement (Guilfoyle and Hagen, 2007).

Des facteurs de transcription MYB, NAC et WRKY présentent également un important niveau de surexpression de leurs transcrits dans la TZ de douglas en hiver. Plusieurs facteurs de transcription de la famille MYB sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse des flavonoides (Dubos et al., 2010). Les facteurs de transcription WRKY sont des régulateurs clés de nombreux processus physiologiques chez les plantes et peuvent intervenir dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques, dans la sénescence ou encore dans la dormance et la germination des graines (Rushton et al., 2010). Quant aux facteurs de transcription à domaine NAC, ceux-ci sont impliqués aussi bien dans des processus développementaux tels que la biosynthèse de la paroi et la PCD que dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Bollhoner et al., 2012; Nakano et al., 2015). Lim et al. (2016) ont identifié une surexpression de transcrits codant des facteurs de transcription MYB-like et une protéine à domaine NAC dans la TZ de pin sylvestre (la surexpression de ces transcrits étant plus importante en automne et en hiver).

#### 1.3.1.1.1. Biosynthèse des extractibles

Lors de la formation du duramen, les réserves de l'aubier sont consommées pour produire des extractibles. Il a été montré que pour le douglas, les précurseurs phénoliques des extractibles étaient présents dans l'aubier âgé et que la majeure partie des extractibles était donc formée au niveau de la TZ par des réactions secondaires telles que l'hydrolyse des glucosides phénoliques, l'oxydation, l'inter-conversion et la polymérisation de phénols de faible poids moléculaire. Mais des quantités modérées de flavonols sont aussi nouvellement synthétisées *in-situ* par l'accélération de voies métaboliques suite à une hydrolyse des hydrates de carbone (Kampe and Magel, 2013). Nous avons en effet observé une surexpression de la grande majorité des transcrits des enzymes impliquées dans la voie du shikimate qui conduit à la formation de phénylalanine. La voie du shikimate connecte ainsi le métabolisme primaire (biosynthèse des acides aminés) à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Une très importante surexpression des transcrits codant une phosphoenolpyruvate carboxykinase a été observé dans la TZ de douglas par rapport à l'aubier. Ce constat avait également été fait par Lim et al. (2016) chez le pin sylvestre. Cette enzyme convertit l'oxaloacétate en phosphoenolpyruvate (qui peut rejoindre la voie du shikimate) (Leegood and Walker, 2003). L'oxalate est généré à partir du malate qui est issu de la dégradation des triglycérides. Des gouttelettes lipidiques ont déjà été observées dans les cellules de la TZ en relation avec la formation du duramen (Taylor et al., 2002). Bien que les transcrits codant la phosphoenolpyruvate carboxykinase soient très surexprimés dans la TZ (4860 fois plus que dans l'aubier), les transcrits de la voie du shikimate sont comparativement très peu surexprimés. Quoi qu'il en soit, ces résultats semblent confirmer qu'une partie de la biosynthèse des phénylpropanoïdes se déroule *in-situ* à partir des réserves carbonées.

Nous avons également constaté que tous les transcrits d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont surexprimés dans la TZ en hiver. Chez le noyer noir, de forts niveaux de transcription de plusieurs gènes codant ces enzymes sont observés en octobre et janvier (Beritognolo et al., 2002) tandis que chez le robinier, l'expression des gènes liés au métabolisme secondaire est plus élevée en été (Yang et al., 2004). Des comparaisons entre les profils transcriptomiques de la TZ à différentes saisons pourront permettre d'identifier, chez le douglas, la période de formation des extractibles.

#### 4.4.2.2.3 Remodelage de la paroi

Chez le douglas, de nombreux transcrits codant des enzymes impliquées dans le remodelage de la paroi sont surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe en hiver. Parmi ces transcrits, ceux codant une xyloglucane endotransglycosidase (XET) et une polygalacturonase sont très surexprimés (respectivement 3000 et 1900 fois plus). Les XETs peuvent agir sur la structure des xyloglucanes, mais sont aussi des hétérotransglycosidases qui peuvent lier de manière covalente différentes classes de polysaccharides pariétaux (Fincher, 2009). Une des fonctions identifiées des polygalacturonases, qui hydrolysent le squelette des HGs, est leur intervention dans des événements de séparation cellulaire (maturation des grains de pollen, abscission, maturation des fruits, élongation cellulaire, germination) (González-Carranza et al., 2007). Leur rôle dans la TZ n'est pas identifié. Dans une bien moindre mesure, des transcrits codant des mannosidases, des glucosidases, des glycosyltransférases et des pectines acétylestérases sont également surexprimés dans la TZ. Chez le pin sylvestre, les transcrits codant des enzymes de modification des polysaccharides pariétaux sont en moyenne 12 fois plus exprimés dans la TZ que dans l'aubier en juin. Yang et al. (2004) ont observé chez le robinier, que des transcrits de polygalacturonases et pectinestérases étaient au moins 2 fois plus exprimés dans la TZ en été qu'en automne.

Dans la TZ de douglas, les transcrits codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lignines sont également surexprimés. Il a été montré chez le pin sylvestre qu'une lignification des cellules parenchymateuses se produisait lors de la formation du duramen (Bergström, 2003). De plus, chez cette même essence, Lim et al. (2016) ont également observé une surexpression des transcrits codant des enzymes de la voie de biosynthèse des lignines.

Lors de la formation du duramen, la paroi des cellules parenchymateuses semble donc subir un remodelage des polysaccharides pariétaux et une lignification.

#### 1.3.1.1.2. Déshydratation, défense et mort cellulaire programmée

Chez les conifères, le duramen est généralement plus sec que l'aubier et très souvent la dessiccation de l'aubier est associée à la formation des extractibles (Taylor et al., 2002). Au niveau de la TZ de douglas en hiver, nous avons observé une surexpression de transcrits codant une protéine relative à la dessiccation. Il a été suggéré que ces protéines jouaient un rôle dans la tolérance à la dessiccation chez les plantes (Zha et al., 2013). Des gènes codant différentes classes d'aquaporines sont également surexprimés dans la TZ de douglas par rapport à l'aubier. Les aquaporines sont impliquées dans la régulation du transport de l'eau

entre les cellules et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Bienert and Chaumont, 2011). Dans la TZ de pin sylvestre en été, Lim et al. (2016) ont observé une sous-expression des transcrits d'un groupe d'aquaporine-like qu'ils ont associé à la dessiccation de la TZ.

Lors de la formation du duramen chez le pin sylvestre, le robinier et le cèdre du Japon, il a été constaté une forte surexpression des transcrits codant des protéines de défense (Lim et al., 2016 ; Yang et al., 2004 ; Yoshida et al., 2012). De tels transcrits sont également très surexprimés dans la TZ de douglas comparé à l'aubier externe. Ces protéines de défense sont généralement induites chez les plantes en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Van Loon, 1997).

Au niveau de la TZ de douglas, un transcrit codant un facteur de transcription induit par l'apoptose présente une surexpression par rapport à l'aubier externe. Chez les mammifères, ce facteur est un effecteur de la mort cellulaire indépendant de la voie des caspases, qui suite à une induction de l'apoptose migre de l'espace intermembranaire des mitochondries au noyau. Une fois dans le noyau, ce facteur entraîne une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN (Lorenzo et al., 1999). Chez le douglas en hiver, nous avons également observé une légère surexpression des transcrits codant la métacaspase 1 et une nucléase-like. Chez *Arabidopsis*, la métacaspase 1 est un régulateur positif de la mort cellulaire (Coll et al., 2011). Lim et al. (2016) ont constaté une très forte surexpression des transcrits codant une nucléase bifonctionnelle et une nucléase S1-like dans la TZ de pin sylvestre par rapport à l'aubier. Ces deux nucléases sont décrites comme étant impliquées dans la PCD (Bollhoner et al., 2012). Chez le pin sylvestre, ces transcrits ne sont pas exprimés dans l'aubier et sont très faiblement exprimés dans la TZ en hiver, suggérant que chez le pin sylvestre, la PCD se déroule en automne (Lim et al., 2016). Ce constat pourrait expliquer, chez le douglas, les faibles niveaux de surexpression relevés en hiver pour les différents transcrits impliqués dans la PCD précédemment cités.

## 4.5 Bilan

Afin d'identifier les processus moléculaires impliqués dans la formation du duramen chez le douglas, des analyses transcriptomiques ont été entreprises sur différentes zones de bois dont la TZ. Après modification du protocole de Chang et al. (1993) déjà modifié par Beritognolo (2001), nous sommes parvenu à extraire des ARN<sub>totaux</sub> de qualité en quantité suffisante à partir des différents tissus. A partir de ces échantillons, les transcrits polyA ont été purifiés, rétrotranscrits et séquencés sur une plateforme Illumina. Les données ont été nettoyées puis

alignées sur le transcriptome de référence du douglas v 1.0 (44 % d'alignement). Seuls les profils transcriptomiques obtenus à partir de la TZ, de l'aubier interne et de l'aubier externe d'arbres d'un seul génotype abattus en hiver ont, pour le moment, été exploités. Malgré le peu d'échantillons étudiés, l'analyse globale de ces profils a révélé que l'aubier interne pourrait être une interface physiologique entre l'aubier externe et la zone de transition. De nombreux transcrits sont différentiellement exprimés entre la TZ et l'aubier externe ou interne. Une petite partie des transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe a été analysée. De nombreux gènes codant des protéines impliquées dans la biosynthèse d'hormones (GA, éthylène et jasmonate) ou induites par des hormones sont surexprimés. Des gènes codant une métacaspase 1 et une endonucléase probablement impliquées dans la PCD ne sont que très peu surexprimés dans la TZ de douglas en hiver, suggérant que la PCD n'interviendrait pas à cette saison dans les cellules parenchymateuses de la TZ. Des gènes codant des facteurs de transcription, des protéines de défense, des enzymes de la voie du shikimate, des enzymes de la voie de biosynthèse des extractibles et des lignines ainsi que des enzymes impliquées dans le remodelage des polysaccharides pariétaux sont également beaucoup plus exprimés dans la TZ que dans l'aubier. Chez le douglas en hiver, des extractibles semblent donc synthétisés et la paroi des cellules parenchymateuses subit probablement des modifications chimiques (lignification et remodelage des polysaccharides). Ces données sont conformes à celles déjà décrites dans la littérature.



## *Conclusion et perspectives*

L'objectif de ce travail était de comprendre les mécanismes qui conduisent à la formation du duramen chez le douglas. Nous avons, dans un premier temps, étudié certains aspects de la qualité du bois en relation avec le duramen. A partir de 4 populations clonales de douglas âgés d'une vingtaine d'années, la proportion de duramen, la densité du bois et la proportion de bois final dans chacun des cernes ont été évaluées. Pour tous les arbres, la densité et la proportion de bois final augmentent du cœur du duramen jusqu'à l'aubier externe. Des variations entre arbres de différents génotypes ont été observées, suggérant que ces caractéristiques qualitatives du bois sont sous influence génétique. Le processus de formation du duramen n'impacte pas la densité du bois. La proportion de duramen paraît constante au sein d'arbres ayant le même patrimoine génétique, même lorsque ceux-ci ont été cultivés dans des environnements différents. Des variations ont cependant été constatées entre arbres de génotypes différents, ce qui suggère que la proportion de duramen est génétiquement contrôlée chez le douglas. Toutes ces analyses ont été réalisées sur un nombre restreint d'individus. Afin de confirmer les tendances observées, il est nécessaire de compléter ces données par l'étude d'un plus grand nombre d'individus (plus de génotypes et plus d'arbres par génotypes). A partir de 10 douglas carottés mensuellement, une analyse de la période de formation du duramen a été menée sur 15 mois. L'analyse de la couleur et de l'humidité apparente de la TZ a révélée que l'accumulation d'extractibles se déroulait plutôt en automne-hiver et que l'évolution de la TZ en duramen se terminait généralement au début du printemps. Les analyses du transcriptome semblent corroborer cette hypothèse pour les extractibles dans la mesure où tous les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe en hiver.

A partir de ces mêmes carottes de bois de douglas, nous avons caractérisé la composition polysaccharidique du bois, cerne par cerne, du cœur du duramen jusqu'à l'aubier externe grâce à la technique liquide ionique/ELISA. Les résultats ont montré que les pectines (HG et RG I), les xylanes et les galactanes sont plus représentés dans le duramen. Les arabinanes sont quant à eux plus abondants dans l'aubier. Concernant les xyloglucanes, les AGPs et les galactomannanes, glucomannanes et mannanes, aucune tendance n'est observable. Ces analyses sont à poursuivre sur le bois des douglas des 3 autres génotypes. Pour certains polymères pariétaux, les changements de composition sont observés au niveau de la TZ. Cependant, ceux-ci peuvent résulter du fait que la TZ aubier-duramen des arbres étudiés se trouve dans la zone d'évolution du bois juvénile en bois mature. Des analyses complémentaires à partir de douglas plus âgés sont donc nécessaires pour clarifier ces

résultats et identifier ainsi s'il s'agit d'une différence de composition entre le bois juvénile et le bois en cours de maturation, ou s'il y a un remodelage de la paroi lors de la formation du duramen. Au niveau de la TZ, les analyses transcriptomiques ont montré la surexpression par rapport à l'aubier de gènes codant des protéines impliquées dans la lignification et la modification des polysaccharides pariétaux. Il serait intéressant de déterminer si ces enzymes n'interviennent qu'au niveau de la paroi des cellules parenchymateuses ou s'il leur est possible d'agir aussi sur la paroi des trachéides et modifier ainsi leur composition lors de la formation du duramen. Des anticorps capables de reconnaître des épitopes de ces enzymes pourraient être générés pour observer leur distribution dans le bois. Un gène codant une polygalacturonase s'est révélé être surexprimé dans la TZ, alors que les analyses biochimiques ont montré des proportions d'HG plus importantes dans le duramen. Si cette enzyme est bien active, il est probable que lors de la xylogénèse, des proportions plus importantes de pectines soient déposées dans les parois des cellules formées par un cambium juvénile. Dans ce même ordre d'idée, on pourrait postuler l'hypothèse que l'expression de la polygalacturonase n'intervient que lors de la transition entre le bois juvénile et mature. Se pose alors la question de la fonction des pectines dans la constitution du bois mature et dans l'expression des propriétés mécaniques qui y sont associées. Des études complémentaires sur la distribution des pectines entre le duramen et l'aubier *via* des analyses par immunolocalisation devraient permettre de vérifier et/ou d'affiner ces hypothèses. Au niveau de la TZ, une très forte surexpression d'un gène codant une XET a également été constatée. Dans le bois de tension de peuplier, ces enzymes joueraient un rôle majeur dans la réparation des liaisons entre les XGs de la couche G et des couches S pour maintenir leur cohésion. Des transcrits codant des XETs et des XETs actives seraient encore présents plusieurs années après la mort des fibres G (Nishikubo et al., 2007). Au niveau de la TZ, des analyses complémentaires sont nécessaires pour comprendre leur fonction.

Dans le but de compléter ces données biochimiques, il est aussi envisagé d'utiliser la microspectroscopie Raman. Cette technique permet de quantifier la lignine, de déterminer l'évolution du ratio lignine/cellulose ou encore de caractériser la cristallinité de la cellulose (Agarwal, 2014). Une analyse plus fine des spectres Raman pourrait peut-être également apporter des informations supplémentaires sur la composition du bois (répartition de la taxifoline, des groupements acétyles des polysaccharides...). Des caractérisations de la longueur de trachéides et de l'angle des microfibrilles de cellulose peuvent aussi être envisagées. Toutes ces données pourraient ensuite permettre de mieux comprendre les

propriétés du bois et notamment ses propriétés mécaniques. En effet, une étude, actuellement en cours au GEMH (Groupe d'Etude des Matériaux Hétérologues, Université de Limoges) vise à comparer les propriétés du bois des 4 génotypes de douglas étudiés dans le cadre de cette thèse. Il serait donc intéressant de pouvoir mettre en relation les données biochimiques et structurales du bois de douglas avec ses propriétés mécaniques. Une autre étude complémentaire, également menée au LCSN, porte sur la caractérisation et la quantification des extractibles de l'aubier, de la TZ et du duramen des douglas des 4 génotypes que nous avons étudiés. Ces données seront bien évidemment à mettre en relation avec les résultats transcriptomiques obtenus dans le cadre de ce travail de thèse car la biosynthèse des extractibles est un paramètre important dans le processus de formation du duramen.

Les analyses du transcriptome ont révélé que les 3 tissus étudiés (TZ, aubier interne et aubier externe) ont des profils transcriptomiques distincts. Une analyse plus précise s'est ensuite portée sur quelques transcrits surexprimés dans la TZ par rapport à l'aubier externe en hiver. Des gènes codant des protéines potentiellement impliquées dans la PCD sont peu surexprimés dans la TZ, suggérant que ce processus n'interviendrait pas à cette saison dans les cellules parenchymateuses de la TZ. De nombreux gènes impliqués dans la régulation hormonale sont surexprimés, notamment des gènes relatifs à l'éthylène et au jasmonate. Les données transcriptomiques tendent à montrer qu'en hiver, des extractibles sont synthétisés et la paroi des cellules parenchymateuses de la TZ subit des modifications chimiques (lignification et remodelage des polysaccharides). Les profils transcriptomiques n'ont pour le moment été étudiés que pour un génotype et une saison. Il est nécessaire de finir les analyses pour le génotype 3 pour toutes les saisons et pour les 3 tissus afin d'identifier les gènes préférentiellement exprimés dans la TZ par rapport à l'aubier interne et l'aubier externe. Il faudra ensuite comparer les profils d'expression de la TZ en fonction de la saison afin d'identifier la chronologie des différents événements qui se produisent lors de la formation du duramen.

Une surexpression transcriptionnelle d'un gène n'entraîne pas toujours une surexpression de protéines actives codées par ce gène. En effet, la régulation de l'expression des gènes peut intervenir aux niveaux post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Les micro ARN permettent par exemple une régulation post-transcriptionnelle. Les micro ARN jouent des rôles importants dans le développement des plantes, leur croissance, les mécanismes de défense et de réponse aux stress. Ils sont également impliqués dans des mécanismes régulateurs de la croissance secondaire et de la formation du bois en ciblant des

phytohormones et des facteurs de transcription (Carvalho et al., 2013). Le transcriptome des arbres du génotype 3 a été étudié suite à une sélection des transcrits polyA. Il serait intéressant de privilégier, pour les 3 autres génotypes initialement prévus dans l'étude, une ribo-déplétion afin de conserver les micro ARN et étudier leur rôle potentiel dans la formation du duramen. Des dosages d'hormones ou d'extractibles pourraient être envisagés dans l'optique de confirmer les résultats de transcriptomique. Les transcrits obtenus à partir du bois des 4 génotypes de douglas pourront aussi servir à compléter le transcriptome de référence du douglas. Ces transcrits devront par la suite être annotés.

L'objectif de ce travail est ensuite d'identifier des listes de gènes impliqués dans la formation du duramen qui seraient potentiellement utilisables pour étendre les analyses d'expression à un plus grand nombre d'individus fortement contrastés sur leur phénotype duramen. Ceci permettrait par la suite de caractériser des marqueurs génétiques spécifiques à la formation du bois de cœur qui pourraient être employés en sélection précoce. Les arbres ayant des temps de génération très longs, la sélection sur des critères phénotypiques est par conséquent un processus lent. La sélection génomique offre ainsi un outil intéressant pour l'amélioration des arbres forestiers (Canales et al., 2014).



# *Annexes*

**Annexe 1 : Intensités des marquages (DO) obtenues pour l'aubier externe de douglas dissout dans les 6 LIs et analysé à l'aide d'un set de 16 anticorps. Les DO ont été calculées pour une quantité de « bois dissout » déposée de 20 µg à l'aide des équations des droites de régression linéaire obtenues pour chaque anticorps (5 quantités croissantes de « bois dissout » déposées par échantillon). A : Dissolution à 80°C ; B : Dissolution à 100°C.**

<b>A</b>	CCRC-M38	LM19	JIM7	LM20	CCRC-M14	CCRC-M35	LM15	LM25	CCRC-M1	LM2	LM5	LM6	LM10	LM11	LM21	LM22
[Emim]Br	0,211	0,314	2,464	0,000	0,003	0,028	0,355	3,266	0,297	0,563	2,162	2,298	0,818	13,009	17,954	13,126
[Emim]Ac	0,030	0,121	0,013	0,000	0,000	0,083	0,132	6,497	0,409	0,378	3,310	1,533	0,208	28,753	18,365	13,935
[Amim]Cl	0,085	0,284	0,682	0,000	0,000	0,000	0,703	8,064	0,190	0,248	0,355	1,366	0,108	10,053	5,185	7,109
[Amim]Br	1,379	1,272	7,419	0,261	0,073	0,166	0,057	2,855	0,048	1,257	7,055	0,060	0,677	19,374	15,024	6,627
DBUC <sub>4</sub> Cl	1,994	3,857	1,331	0,274	0,093	0,084	0,967	3,058	0,470	0,363	0,752	1,092	0,450	1,233	11,226	2,603
DBUC <sub>4</sub> Br	0,610	1,544	0,563	0,138	0,009	0,047	0,114	2,871	0,155	0,091	0,562	0,533	0,315	4,802	16,739	4,763

<b>B</b>	CCRC-M38	LM19	JIM7	LM20	CCRC-M14	CCRC-M35	LM15	LM25	CCRC-M1	LM2	LM5	LM6	LM10	LM11	LM21	LM22
[Emim]Br	0,237	0,652	0,000	0,000	0,000	0,161	0,503	9,451	0,000	0,247	1,088	1,371	0,802	9,504	110,160	22,713
[Emim]Ac	0,000	0,079	0,000	0,000	0,000	0,056	1,017	15,611	0,000	1,592	1,712	0,552	0,223	9,042	159,562	71,810
[Amim]Cl	0,308	1,865	0,000	0,000	0,000	0,000	0,156	4,302	0,472	0,131	0,937	0,190	0,228	8,231	66,024	19,861
[Amim]Br	0,921	2,200	1,963	0,169	0,287	0,517	0,366	0,520	0,404	0,580	1,393	0,632	0,312	1,392	6,075	1,127
DBUC <sub>4</sub> Cl	0,562	2,108	0,000	0,000	0,000	0,049	0,000	1,794	0,188	0,031	0,339	0,626	0,000	1,501	51,946	0,926
DBUC <sub>4</sub> Br	1,144	2,567	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	6,390	0,549	0,129	0,478	0,383	0,117	3,132	42,206	9,206

**Annexe 2 : Intensités des marquages (DO) obtenues pour les 15 cernes de bois de la carotte T0 2 avec le set de 15 anticorps. Les DO ont été calculées pour une quantité de « bois dissout » déposée de 20 µg à l'aide des équations des droites de régression linéaire obtenues pour chaque anticorps à partir d'un échantillon de « bois dissout » déposé en quantités croissantes sur plaque ELISA (5 points).**

Anticorps	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12	C13	C14	C15
CCRCM-38	0,436	0,343	0,384	0,453	0,510	0,633	0,523	0,450	0,484	0,290	0,540	0,740	0,820	0,827	1,029
LM19	0,302	0,250	0,250	0,267	0,278	0,301	0,284	0,281	0,269	0,240	0,297	0,317	0,334	0,363	0,411
JIM7	0,462	0,378	0,379	0,399	0,401	0,421	0,416	0,390	0,393	0,346	0,405	0,441	0,428	0,444	0,444
CCRC-M14	0,279	0,207	0,165	0,179	0,263	0,260	0,196	0,188	0,250	0,087	0,287	0,360	0,368	0,344	0,415
CCRC-M35	0,163	0,094	0,072	0,066	0,085	0,080	0,062	0,049	0,054	0,012	0,074	0,115	0,128	0,124	0,127
LM15	0,232	0,243	0,224	0,268	0,279	0,227	0,178	0,131	0,165	0,126	0,245	0,156	0,184	0,222	0,241
LM25	12,984	9,329	10,353	11,682	12,133	12,054	11,921	10,432	14,898	7,695	12,705	19,822	20,621	12,656	15,606
CCRC-M1	0,217	0,093	0,109	0,145	0,132	0,105	0,099	0,081	0,067	0,048	0,090	0,090	0,113	0,121	0,156
LM2	1,615	0,570	0,188	0,077	0,067	0,069	0,084	0,104	0,107	0,108	0,083	0,122	0,150	0,264	0,194
LM5	6,771	8,469	9,634	9,338	9,443	6,848	7,506	4,325	3,270	3,190	5,247	4,231	4,775	6,874	5,921
LM6	0,234	0,167	0,170	0,175	0,167	0,141	0,140	0,097	0,062	0,045	0,051	0,082	0,068	0,077	0,081
LM10	1,587	2,524	3,492	3,173	3,980	4,075	2,992	2,310	3,302	2,122	3,282	4,880	4,248	3,756	4,420
LM11	21,261	24,593	24,764	35,343	27,924	31,416	25,646	18,983	23,310	18,181	23,081	27,879	31,542	36,019	31,565
LM21	45,601	39,797	35,912	54,966	62,944	84,203	96,543	66,413	103,434	103,411	105,007	117,841	67,430	73,142	67,384
LM22	13,050	16,658	19,933	19,000	21,574	20,432	20,027	16,795	18,270	15,566	20,381	21,574	22,261	21,950	22,623



# *Bibliographie*

- Abbott, E., Hall, D., Hamberger, B., and Bohlmann, J. (2010). Laser microdissection of conifer stem tissues: isolation and analysis of high quality RNA, terpene synthase enzyme activity and terpenoid metabolites from resin ducts and cambial zone tissue of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biol.* *10*, 106.
- Abdel-Gadir, A.Y., and Krahmer, R.L. (1993). Genetic variation in the age of demarcation between juvenile and mature wood in Douglas-fir. *Wood Fiber Sci.* *25*, 384–394.
- Abe, H., Funada, R., Ohtani, J., and Fukazawa, K. (1997). Changes in the arrangement of cellulose microfibrils associated with the cessation of cell expansion in tracheids. *Trees* *11*, 328–332.
- Abernathy, J., and Overturf, K. (2016). Comparison of ribosomal RNA removal methods for transcriptome sequencing workflows in teleost fish. *Anim. Biotechnol.* *27*, 60–65.
- Adams, W.T. (1992). Gene dispersal within forest tree populations. In *Population Genetics of Forest Trees*, (Springer), pp. 217–240.
- Adiconis, X., Borges-Rivera, D., Satija, R., DeLuca, D.S., Busby, M.A., Berlin, A.M., Sivachenko, A., Thompson, D.A., Wysoker, A., Fennell, T., et al. (2013). Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat. Methods* *10*, 623–629.
- AFNOR (2011). FD P20-651- Durabilité des éléments et ouvrages en bois.
- AFNOR (2013). NF EN 335 - Durabilité du bois et des matériaux à base de bois - Classes d'emploi : définitions, application au bois massif et aux matériaux à base de bois.
- Agarwal, U.P. (2014). 1064 nm FT-Raman spectroscopy for investigations of plant cell walls and other biomass materials. *Front. Plant Sci.* *5*, 490.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* *27*, 617–631.
- Åkerholm, M. (2003). Ultrastructural Aspects of Pulp Fibers as Studied by Dynamic FT-IR Spectroscopy. Ph.D. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Akhter, S., and Hale, M.D. (2002a). Variation in natural durability of british grown Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) Part 1: Effect of density and growth rate. In IRG/WP 02-10445 Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the International Research Group on Wood Preservation (IRG), (Cardiff, Wales).
- Akhter, S., and Hale, M.D.C. (2002b). Variation in natural durability of British grown Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Part II. Effect of extractive contents and taxifolin. In IRG/WP 02-10446 Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the International Research Group on Wood Preservation (IRG), (Cardiff, Wales).
- De Alba, A.E.M., Parent, J.-S., and Vaucheret, H. (2013). Small RNA-mediated control of development in plants. In *Epigenetic Memory and Control in Plants*, (Springer), pp. 177–199.
- Albrecht, A., Kohnle, U., Hanewinkel, M., and Bauhus, J. (2013). Storm damage of Douglas-fir unexpectedly high compared to Norway spruce. *Ann. For. Sci.* *70*, 195–207.
- Alméras, T., Gril, J., Jullien, D., and Fournier, M. (2008). Les contraintes de croissance dans les tiges: modelisation de leur mise en place et de leur fonction biologique. *Rev. For. Francaise* *60*, 749–760.

- Altaner, C., Knox, J.P., and Jarvis, M.C. (2007). *In situ* detection of cell wall polysaccharides in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carriere) wood tissue. *BioResources* 2, 284–295.
- Altaner, C.M., Tokareva, E.N., Jarvis, M.C., and Harris, P.J. (2010). Distribution of (1→4)- $\beta$ -galactans, arabinogalactan proteins, xylans and (1→3)- $\beta$ -glucans in tracheid cell walls of softwoods. *Tree Physiol.* 30, 782–793.
- Alvarez-Vasco, C., and Zhang, X. (2013). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of softwood: hemicellulose degradation pathways. *Bioresour. Technol.* 150, 321–327.
- Amarasinghe, V., and Carlson, J.E. (2002). The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 32, 1904–1915.
- American Society for Testing and Materials (ASTM) (1985). Annual book of ASTM standards, part 22: wood; adhesives. (Philadelphia: American Society for Testing and Materials.), pp. 1204.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data (Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Ref. Source.
- Angelier, A. (2007). Guide des sylviculteurs : Douglasaies françaises (Paris: Office national des forêts), pp. 296.
- Angelier, A., Bailly, A., Romand, J.L., Courdier, J., Vautier, F., Jacquemin, B., Couty, A., and Gautry, J.Y. (2004). Mise au point de scénarios de régénération naturelle du douglas pour le Massif central. *Rendez-Vous Tech. L'ONF* 6, 64–68.
- Anugwom, I., Mäki-Arvela, P., Virtanen, P., Willför, S., Damlin, P., Hedenström, M., and Mikkola, J.-P. (2012). Treating birch wood with a switchable 1, 8-diazabicyclo-[5.4. 0]-undec-7-ene-glycerol carbonate ionic liquid. *Holzforschung* 66, 809–815.
- Arcikhovskiy, V.M. (1931). Suction of water by woody species under its artificial injection through holes in conducting tissues. *Trudy po lesnomu opytному delu, CLOS, XI*: 69–141 (Russian).
- Aspinall, G.O., Craig, J.W.T., and Whyte, J.L. (1968). Lemon-peel pectin: Part I. Fractionation and partial hydrolysis of water-soluble pectin. *Carbohydr. Res.* 7, 442–452.
- Au, K.F., Jiang, H., Lin, L., Xing, Y., and Wong, W.H. (2010). Detection of splice junctions from paired-end RNA-seq data by SpliceMap. *Nucleic Acids Res.* 38, 4570–4578.
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., and Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 50, 1237–1243.
- Bailey, I.W. (1913). The preservation treatment of wood. II. The structure of the pit membranes in the tracheids of conifers and their relation to the penetration of gases, liquids, and finely divided solids into green and seasoned wood. *For. Q.* 11, 12–20.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., and Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3, e3376.

- Bamber, R.K. (1976). Heartwood, its function and formation. *Wood Sci. Technol.* *10*, 1–8.
- Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A., and Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 745–755.
- Bastien, J.-C., Sanchez, L., and Michaud, D. (2013). Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). In *Forest Tree Breeding in Europe*, (Springer), pp. 325–369.
- Beauchamp, K. (2011). Biology of heartwood formation in Sitka spruce and Scots pine. Ph.D. University of Edinburgh.
- Begum, S., Nakaba, S., Yamagishi, Y., Oribe, Y., and Funada, R. (2013). Regulation of cambial activity in relation to environmental conditions: understanding the role of temperature in wood formation of trees. *Physiol. Plant.* *147*, 46–54.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 289–300.
- Bergander, A., and Salmén, L. (2000). Variations in transverse fibre wall properties: relations between elastic properties and structure. *Holzforschung* *54*, 654–660.
- Bergström, B. (2003). Chemical and structural changes during heartwood formation in *Pinus sylvestris*. *Forestry* *76*, 45–53.
- Beritognolo, I. (2001). Caractérisation moléculaire et biochimique de la formation du bois de coeur chez le noyer noir (*Juglans nigra* L.): accumulation des flavonoïdes et expression des gènes contrôlant leur biosynthèse. Ph.D. Université Henri Poincaré Nancy 1.
- Beritognolo, I., Magel, E., Abdel-Latif, A., Charpentier, J.-P., Jay-Allemand, C., and Breton, C. (2002). Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiol.* *22*, 291–300.
- Berta, M., Giovannelli, A., Sebastiani, F., Camussi, A., and Racchi, M.L. (2010). Transcriptome changes in the cambial region of poplar (*Populus alba* L.) in response to water deficit. *Plant Biol.* *12*, 341–354.
- Bertaud, F., and Holmbom, B. (2004). Chemical composition of earlywood and latewood in Norway spruce heartwood, sapwood and transition zone wood. *Wood Sci. Technol.* *38*, 245–256.
- Bever, D.N. (1954). Evaluation of factors affecting natural reproduction of forest trees in central western Oregon (Salem, Oregon: Oregon State Board of Forestry), pp. 49.
- Bhargava, A., Ahad, A., Wang, S., Mansfield, S.D., Haughn, G.W., Douglas, C.J., and Ellis, B.E. (2013). The interacting MYB75 and KNAT7 transcription factors modulate secondary cell wall deposition both in stems and seed coat in *Arabidopsis*. *Planta* *237*, 1199–1211.
- Bienert, G.P., and Chaumont, F. (2011). Plant aquaporins: roles in water homeostasis, nutrition, and signaling processes. In *Transporters and pumps in plant signaling*, M. Geisler, and K. Venema, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 3–36.
- Blanchette, R., and Biggs, A. (2013). Defense mechanisms of woody plants against fungi (Springer Science &

Business Media), pp. 478.

Blohm, J.H., Melcher, E., Lenz, M.T., Koch, G., and Schmitt, U. (2014). Natural durability of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) heartwood grown in southern Germany. *Wood Mater. Sci. Eng.* *9*, 186–191.

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

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* *btu170*, 1-7.

Bollhoner, B., Prestele, J., and Tuominen, H. (2012). Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *J. Exp. Bot.* *63*, 1081–1094.

Böttcher, C., Dennis, E.G., Booker, G.W., Polyak, S.W., Boss, P.K., and Davies, C. (2012). A novel tool for studying auxin-metabolism: the inhibition of grapevine indole-3-acetic acid-amido synthetases by a reaction intermediate analogue. *PLoS ONE* *7*, e37632.

Brandt, A., Hallett, J.P., Leak, D.J., Murphy, R.J., and Welton, T. (2010). The effect of the ionic liquid anion in the pretreatment of pine wood chips. *Green Chem.* *12*, 672.

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., and Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* *15*, 550–583.

Brett, C.T., and Hillman, J.R. (1985). *Biochemistry of plant cell walls* (CUP Archive), pp. 312.

Brix, H., and Mitchell, A.K. (1980). Effects of thinning and nitrogen fertilization on xylem development in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* *10*, 121–128.

Brix, H., and Mitchell, A.K. (1983). Thinning and nitrogen fertilization effects on sapwood development and relationships of foliage quantity to sapwood area and basal area in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* *13*, 384–389.

Buermans, H.P.J., and den Dunnen, J.T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1842*, 1932–1941.

Burdon, R.D., Kibblewhite, R.P., Walker, J.C.F., Megraw, R.A., Evans, R., and Cown, D.J. (2004). Juvenile versus mature wood: a new concept, orthogonal to corewood versus outerwood, with special reference to *Pinus radiata* and *P. taeda*. *For. Sci.* *50*, 399–415.

Burtin, P., Jay-Allemand, C., Charpentier, J.-P., and Janin, G. (1998). Natural wood colouring process in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* x *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. *Trees* *12*, 258–264.

Byg, I., Diaz, J., Øgendal, L.H., Harholt, J., Jørgensen, B., Rolin, C., Svava, R., and Ulvskov, P. (2012). Large-scale extraction of rhamnogalacturonan I from industrial potato waste. *Food Chem.* *131*, 1207–1216.

Caffall, K.H., and Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* *344*, 1879–1900.

Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2007). *Biologie*, 3 e édition. Éditions Renouv. Pédagogique, pp. 1334.

- Canales, J., Bautista, R., Label, P., Gómez-Maldonado, J., Lesur, I., Fernández-Pozo, N., Rueda-López, M., Guerrero-Fernández, D., Castro-Rodríguez, V., Benzekri, H., et al. (2014). *De novo* assembly of maritime pine transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* *12*, 286–299.
- Cañas, R.A., Canales, J., Gómez-Maldonado, J., Ávila, C., and Cánovas, F.M. (2014). Transcriptome analysis in maritime pine using laser capture microdissection and 454 pyrosequencing. *Tree Physiol.* *34*, 1278–1288.
- Carvalho, A., Paiva, J., Louzada, J., and Lima-Brito, J. (2013). The transcriptomics of secondary growth and wood formation in conifers. *Mol. Biol. Int.* *2013*, 1–12.
- Cassab, G.I. (1998). Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* *49*, 281–309.
- Cathala, G., Savouret, J.-F., Mendez, B., West, B.L., Karin, M., Martial, J.A., and Baxter, J.D. (1983). A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* *2*, 329–335.
- Čermák, J., Kučera, J., Bauerle, W.L., Phillips, N., and Hinckley, T.M. (2007). Tree water storage and its diurnal dynamics related to sap flow and changes in stem volume in old-growth Douglas-fir trees. *Tree Physiol.* *27*, 181–198.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Report.* *11*, 113–116.
- Chanliaud, E., Saulnier, L., and Thibault, J.-F. (1995). Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize bran. *J. Cereal Sci.* *21*, 195–203.
- Chanson, B. (1989). Quelques aspects de la croissance secondaire des végétaux ligneux. In Premier séminaire ASMA (Architecture, Structure et Mécanique de l'Arbre). In Université de Montpellier, pp. 29–50.
- Chantre, G., and Rozenberg, P. (1997). Can drill resistance profiles (Resistograph) lead to within-profile and within-ring density parameters in Douglas fir wood. In Timber Management toward Wood Quality and Endproduct Values. CTIA/IUFRO International Wood Quality Workshop, (Québec), pp. 41–47.
- Chatjigakis, A.K., Pappas, C., N.Proxenia, O.Kalantzi, P.Rodis, and Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydr. Polym.* *37*, 395–408.
- Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., and Bramanti, E. (2010). Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Carbohydr. Polym.* *82*, 772–778.
- Chevreux, B., Pfisterer, T., Drescher, B., Driesel, A.J., Müller, W.E., Wetter, T., and Suhai, S. (2004). Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res.* *14*, 1147–1159.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry (Mosc.)* *18*, 5294–5299.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* *15*, 532–534.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium

- thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* *1*, 581–585.
- Claire, R. (2010). *Le Douglas: un arbre exceptionnel* (Imprimerie Scheuer), pp. 367.
- Cloonan, N., Forrest, A.R., Kolle, G., Gardiner, B.B., Faulkner, G.J., Brown, M.K., Taylor, D.F., Steptoe, A.L., Wani, S., Bethel, G., et al. (2008). Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat. Methods* *5*, 613–619.
- Coll, N.S., Epple, P., and Dangl, J.L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* *18*, 1247–1256.
- Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 850–861.
- Cosgrove, D.J., and Jarvis, M.C. (2012). Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* *3*.
- Costa, G., and Plazanet, I. (2016). Plant cell wall, a challenge for its characterisation. *Adv. Biol. Chem.* *06*, 70–105.
- Costa, V., Angelini, C., De Feis, I., and Ciccodicola, A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 1–19.
- Côté, W.A., Day, A.C., and Timell, T.E. (1969). A contribution to the ultrastructure of tension wood fibers. *Wood Sci. Technol.* *3*, 257–271.
- Cown, D.J. (1978). Comparison of the pilodyn and torsionmeter methods for the rapid assessment of wood density in living trees. *N. Z. J. For. Sci.* *8*, 384–391.
- Cown, D.J., and Clement, B.C. (1983). A wood densitometer using direct scanning with X-rays. *Wood Sci. Technol.* *17*, 91–99.
- Crowhurst, L., Mawdsley, P.R., Perez-Arlandis, J.M., Salter, P.A., and Welton, T. (2003). Solvent–solute interactions in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *5*, 2790–2794.
- Cui, P., Lin, Q., Ding, F., Xin, C., Gong, W., Zhang, L., Geng, J., Zhang, B., Yu, X., Yang, J., et al. (2010). A comparison between ribo-minus RNA-sequencing and polyA-selected RNA-sequencing. *Genomics* *96*, 259–265.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., and Schall, C.A. (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol. Bioeng.* *95*, 904–910.
- Dadi, A.P., Schall, C.A., and Varanasi, S. (2007). Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment. In *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (Springer), pp. 407–421.
- Dambrine, E., Martin, F., Carisey, N., Granier, A., Hällgren, J.-E., and Bishop, K. (1995). Xylem sap composition: A tool for investigating mineral uptake and cycling in adult spruce. In *Nutrient Uptake and Cycling in Forest Ecosystems*, L.O. Nilsson, R.F. Hüttel, and U.T. Johansson, eds. (Springer Netherlands), pp. 233–241.
- Day, D.J., Speiser, P.W., Schulze, E., Bettendorf, M., Fitness, J., Barany, F., and White, P.C. (1996). Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 2039–2048.
- Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., and Leplé, J.-C. (2010). Wood formation in

Angiosperms. *C. R. Biol.* *333*, 325–334.

Dellus, V. (1995). Polyphénols et origine biochimique de la couleur du bois de coeur de sapin de Douglas, *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco. Ph.D. Université Paul Sabatier (Toulouse 3).

DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., Del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* *43*, 491–498.

Dick-Pérez, M., Zhang, Y., Hayes, J., Salazar, A., Zabolina, O.A., and Hong, M. (2011). Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 989–1000.

Van Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., and Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Exp. Cell Res.* *322*, 12–20.

Ding, Z.-D., Shi, J.-C., Xiao, J.-J., Gu, W.-X., Zheng, C.-G., and Wang, H.-J. (2012). Catalytic conversion of cellulose to 5-hydroxymethyl furfural using acidic ionic liquids and co-catalyst. *Carbohydr. Polym.* *90*, 792–798.

Diop, A., Bouazza, A.H., Daneault, C., and Montplaisir, D. (2013). New ionic liquid for the dissolution of lignin. *BioResources* *8*, 4270–4282.

Djikanović, D., Kalauzi, A., Radotić, K., Lapierre, C., and Jeremić, M. (2007). Deconvolution of lignin fluorescence spectra: A contribution to the comparative structural studies of lignins. *Russ. J. Phys. Chem. A* *81*, 1425–1428.

Doblin, M.S., Pettolino, F., and Bacic, A. (2010). Evans Review: Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Funct. Plant Biol.* *37*, 357–381.

Doerksen, A.H., and Ching, K.K. (1972). Karyotypes in the genus *Pseudotsuga*. *For. Sci.* *18*, 66–69.

Donaldson, L. (2013). Softwood and hardwood lignin fluorescence spectra of wood cell walls in different mounting media. *IAWA J* *34*, 3–19.

Donaldson, L.A., and Knox, J.P. (2012). Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant Physiol.* *158*, 642–653.

Donaldson, L., Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., and Jeremić, M. (2010). Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *J. Struct. Biol.* *169*, 106–115.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *1*, 316–323.

Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., and Mundy, J. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* *18*, 1241–1246.

Dreyfus, M., and Régnier, P. (2002). The poly (A) tail of mRNAs: bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell* *111*, 611–613.

Du, S., and Yamamoto, F. (2007). An overview of the biology of reaction wood formation. *J. Integr. Plant Biol.*

49, 131–143.

Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* *15*, 573–581.

Ebringerova, A., Hromadkova, Z., and Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In *Polysaccharides I*, (Springer), pp. 1–67.

Eckert, A.J., Bower, A.D., Wegrzyn, J.L., Pande, B., Jermstad, K.D., Krutovsky, K.V., Clair, J.B.S., and Neale, D.B. (2009a). Association genetics of coastal Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*, *Pinaceae*). I. Cold-hardiness related traits. *Genetics* *182*, 1289–1302.

Eckert, A.J., Wegrzyn, J.L., Pande, B., Jermstad, K.D., Lee, J.M., Liechty, J.D., Tearse, B.R., Krutovsky, K.V., and Neale, D.B. (2009b). Multilocus patterns of nucleotide diversity and divergence reveal positive selection at candidate genes related to cold hardiness in coastal Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Genetics* *183*, 289–298.

El Hage, R., Brosse, N., Chrusciel, L., Sanchez, C., Sannigrahi, P., and Ragauskas, A. (2009). Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polym. Degrad. Stab.* *94*, 1632–1638.

Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C.J., and Bacic, A. (2010). Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? *Plant Physiol.* *153*, 403–419.

Emmingham, W.H. (1977). Comparison of selected Douglas-fir seed sources for cambial and leader growth patterns in four western Oregon environments. *Can. J. For. Res.* *7*, 154–164.

Engelsen, S.B., and Nørgaard, L. (1996). Comparative vibrational spectroscopy for determination of quality parameters in amidated pectins as evaluated by chemometrics. *Carbohydr. Polym.* *30*, 9–24.

Ericson, B. (1966). Effect of thinning on the basic density and content of latewood and heartwood in Scots pine and Norway spruce. *Dep. For. Yield Res. R. Coll. For. Stockh. Res. Notes* 110.

Escalante, A.E., Jardón Barbolla, L., Ramírez-Barahona, S., and Eguiarte, L.E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Rev. Mex. Biodivers.* *85*, 1249–1264.

Fabris, S. (2000). Influence of cambial ageing, initial spacing, stem taper and growth rate on the wood quality of three coastal conifers. Ph.D. University of British Columbia.

Faix, O. (1991). Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* *45*, 21–28.

Fang, G., Hammar, S., and Grumet, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* *13*, 52–54.

Fengel, D., and Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter Gruyter *613*, 1960–1982.

Filippov, M.P. (1992). Practical infrared spectroscopy of pectic substances. *Food Hydrocoll.* *6*, 115–142.

Fincher, G.B. (2009). Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. *Plant Physiol.* *149*, 27–37.

Fisher, J.B., and Stevenson, J.W. (1981). Occurrence of reaction wood in branches of dicotyledons and its role in

tree architecture. *Bot. Gaz.* 82–95.

Forsyth, S.A., Pringle, J.M., and MacFarlane, D.R. (2004). Ionic liquids—an overview. *Aust. J. Chem.* 57, 113–119.

Fort, D.A., Remsing, R.C., Swatloski, R.P., Moyna, P., Moyna, G., and Rogers, R.D. (2007). Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.* 9, 63.

Fries, A., and Ericsson, T. (1998). Genetic parameters in diallel-crossed Scots pine favor heartwood formation breeding objectives. *Can. J. For. Res.* 28, 937–941.

Fry, S.C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40, 1–11.

Fry, S.C. (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol.* 161, 641–675.

Fry, S.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., Kato, Y., Lorences, E.P., Maclachlan, G.A., McNeil, M., et al. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol. Plant.* 89, 1–3.

Fujita, M., Saiki, H., and Harada, H. (1974). Electron microscopy of microtubules and cellulose microfibrils in secondary wall formation of poplar tension wood fibers. *J. Jpn. Wood Res. Soc.*

Fukaya, Y., Sugimoto, A., and Ohno, H. (2006). Superior solubility of polysaccharides in low viscosity, polar, and halogen-free 1,3-dialkylimidazolium formates. *Biomacromolecules* 7, 3295–3297.

Fukaya, Y., Hayashi, K., Wada, M., and Ohno, H. (2008). Cellulose dissolution with polar ionic liquids under mild conditions: required factors for anions. *Green Chem.* 10, 44–46.

Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Biol.* 47, 299–325.

Fukuda, H. (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44, 245–253.

Fukuda, H. (2004). Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 379–391.

Fukumoto, K., Yoshizawa, M., and Ohno, H. (2005). Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2398–2399.

Funada, R. (2000). Control of wood structure. In *Plant Microtubules*, (Springer), pp. 51–81.

Gambino, G., Perrone, I., and Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 19, 520–525.

Garna, H., Mabon, N., Robert, C., Cornet, C., Nott, K., Legros, H., Wathelet, B., and Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. *J. Food Sci.* 72, C001–C009.

Gartner, B.L. (1995). *Plant stems: physiology and functional morphology* (Academic Press), pp. 440.

Gartner, B.L., Morrell, J.J., Freitag, C.M., and Spicer, R. (1999). Heartwood decay resistance by vertical and

- radial position in Douglas-fir trees from a young stand. *Can. J. For. Res.* 29, 1993–1996.
- Gartner, B.L., North, E.M., Johnson, G.R., and Singleton, R. (2002). Effects of live crown on vertical patterns of wood density and growth in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 32, 439–447.
- Gehrig, H.H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A., and Taybi, T. (2000). An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Report.* 18, 369–376.
- Gierlinger, N., and Schwanninger, M. (2007). The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectrosc. Int. J.* 21, 69–89.
- Gierlinger, N., and Wimmer, R. (2004). Radial distribution of heartwood extractives and lignin in mature European larch. *Wood Fiber Sci.* 36, 387–394.
- Glenn, T.C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 759–769.
- González, R.M., and Iusem, N.D. (2014). Twenty years of research on Asr (ABA-stress-ripening) genes and proteins. *Planta* 239, 941–949.
- González-Carranza, Z.H., Elliott, K.A., and Roberts, J.A. (2007). Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 58, 3719–3730.
- Goswami, L., Dunlop, J.W., Jungnikl, K., Eder, M., Gierlinger, N., Coutand, C., Jeronimidis, G., Fratzl, P., and Burgert, I. (2008). Stress generation in the tension wood of poplar is based on the lateral swelling power of the G-layer. *Plant J.* 56, 531–538.
- Gou, J.-Y., Park, S., Yu, X.-H., Miller, L.M., and Liu, C.-J. (2008). Compositional characterization and imaging of “wall-bound” acylesters of *Populus trichocarpa* reveal differential accumulation of acyl molecules in normal and reactive woods. *Planta* 229, 15–24.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., et al. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644.
- Groombridge, B., and Jenkins, M. (2002). *World atlas of biodiversity: earth’s living resources in the 21st century* (Univ of California Press), pp. 340.
- Groover, A., and Jones, A.M. (1999). Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119, 375–384.
- Grotewold, E., Chappell, J., and Kellogg, E.A. (2015). Rna. In *Plant Genes, Genomes and Genetics*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 99–110.
- Grotta, A.T., Gartner, B.L., Radosevich, S.R., and Huso, M. (2005). Influence of red alder competition on cambial phenology and latewood formation in Douglas-Fir. *IAWA J.* 26, 309–324.
- Grzeskowiak, V., Sassus, F., and Fournier, M. (1996). Coloration macroscopique, retraits longitudinaux de maturation et de séchage du bois de tension du peuplier (*Populus euramericana* cv I. 214). In *Annales Des Sciences Forestières*, (EDP Sciences), pp. 1083–1097.
- Guay, R., Gagnon, R., and Morin, H. (1992). A new automatic and interactive tree ring measurement system

- based on a line scan camera. *For. Chron.* *68*, 138–141.
- Guilfoyle, T.J., and Hagen, G. (2007). Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 453–460.
- Guo, H., and Ecker, J.R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 40–49.
- Guo, X., Han, D., Xi, H., Rao, L., Liao, X., Hu, X., and Wu, J. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: a comparison. *Carbohydr. Polym.* *88*, 441–448.
- Guy, C.L., Huber, J.L., and Huber, S.C. (1992). Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol.* *100*, 502–508.
- Hafrén, J., Daniel, G., and Westermarck, U. (2000). The distribution of acidic and esterified pectin in cambium, developing xylem and mature xylem of *Pinus sylvestris*. *Iawa J.* *21*, 157–168.
- Hägglund, E., Lindberg, B., and McPherson, J. (1956). Dimethylsulphoxide, a solvent for hemicelluloses. *Acta Chem Scand* *10*, 1160–1164.
- Hall, T.C., Ma, Y., Buchbinder, B.U., Pyne, J.W., Sun, S.M., and Bliss, F.A. (1978). Messenger RNA for G1 protein of French bean seeds: cell-free translation and product characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *75*, 3196–3200.
- Hamant, O., and Traas, J. (2010). The mechanics behind plant development. *New Phytol.* *185*, 369–385.
- Harris, J.M. (1978). Intrinsic wood properties of Douglas-fir and how they can be modified. *N. Z. For. Serv. For. Res. Inst. F R Symp.* 235–239.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., and Kinzler, K.W. (2008). The antisense transcriptomes of human cells. *Science* *322*, 1855–1857.
- Heidingsfelder, A., and Knoke, T. (2004). *Douglasie versus Fichte: ein betriebswirtschaftlicher Leistungsvergleich auf der Grundlage des Provenienzversuches Kaiserslautern* (B. Bergen and H.D. Brabander. J.D. Sauer-lander's Verlag, FrankfurtIM. 26).
- Hermann, R.K., and Lavender, D.P. (1999). Douglas-fir planted forests. *New For.* *17*, 53–70.
- Higuchi, T. (2012). *Biochemistry and molecular biology of wood* (Springer Science & Business Media), pp. 362.
- Hillis, W.E. (2014). *Wood extractives and their significance to the pulp and paper industries* (Academic Press), pp. 532.
- 't Hoen, P.A., Hestand, M.S., Boer, J.M., Lai, Y., van Iterson, M., van Galen, M., Buermans, H.P., and den Dunnen, J.T. (2012). Experimental design and quality control of next-generation sequencing experiments. In *Tag-Based Next Generation Sequencing*, (Weinheim, Germany: M. Harbers and G. Kahl), pp. 417–433.
- Holbrook, N.M. (1995). Stem water storage. In *Plant Stems: Physiology and Functional Morphology*, (San Diego: Academic Press), pp. 151–174.
- Höll, W. (1997). Storage and mobilization of carbohydrates and lipids. In *Trees—contributions to Modern Tree Physiology*, (Leiden, The Netherlands: H. Rennenberg, W. Eschrich and H. Ziegler), pp. 197–211.

- Höll, W. (2000). Distribution, fluctuation and metabolism of food reserves in the wood of trees. In *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*, (Oxford, U.K.: R.A. Savidge, J.R. Barnett and R. Napier), pp. 347–362.
- Hon, D.N.-S., and Shiraishi, N. (2000). *Wood and cellulosic chemistry, revised, and expanded* (New York: CRC Press), pp. 928.
- Höster, H.-R. (1970). Gelatinöse tracheiden im sekundären xylem von *Larix leptolepis* Gord. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 24, 4–6.
- Höster, H.-R., and Liese, W. (1966). Über das vorkommen von reaktionsgewebe in wurzeln und ästen der dikotyledonen. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 20, 80–90.
- Howe, G.T., Jayawickrama, K., Cherry, M., Johnson, G.R., and Wheeler, N.C. (2006). Breeding Douglas-fir. *Plant Breed. Rev.* 27, 245.
- Howe, G.T., Yu, J., Knaus, B., Cronn, R., Kolpak, S., Dolan, P., Lorenz, W.W., and Dean, J.F. (2013). A SNP resource for Douglas-fir: de novo transcriptome assembly and SNP detection and validation. *BMC Genomics* 14, 137.
- Huang, X., and Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877.
- Huang, Z., Meilan, R., and Woeste, K. (2009). A KNAT3-like homeobox gene from *Juglans nigra* L., JnKNAT3-like, highly expressed during heartwood formation. *Plant Cell Rep.* 28, 1717–1724.
- Huang, Z., Tsai, C.-J., Harding, S.A., Meilan, R., and Woeste, K. (2010). A cross-species transcriptional profile analysis of heartwood formation in black walnut. *Plant Mol. Biol. Report.* 28, 222–230.
- Huang, Z., Surana, P., Kihara, D., Meilan, R., and Woeste, K. (2011). JnCML-like, an EF-hand motif-containing gene seasonally upregulated in the transition zone of black walnut (*Juglans nigra* L.). *Am. J. Mol. Biol.* 1, 140.
- Huang, Z., Zhao, P., Medina, J., Meilan, R., and Woeste, K. (2013). Roles of JnRAP2.6-like from the transition zone of black walnut in hormone signaling. *PLoS ONE* 8, e75857.
- Hudgins, J.W., Ralph, S.G., Franceschi, V.R., and Bohlmann, J. (2006). Ethylene in induced conifer defense: cDNA cloning, protein expression, and cellular and subcellular localization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in resin duct and phenolic parenchyma cells. *Planta* 224, 865–877.
- IFN (2010). *La forêt française*.
- IGN (2014). *Le mémento - Inventaire forestier - La forêt en chiffres et en cartes*.
- Imagawa, H. (1984). Study on the ray formation in Japanese larch. *Res Bull Coll Exp For. Hokkaido Univ* 42, 133–148.
- International Association of Wood Anatomists, and Committee on Nomenclature (1964). *Multilingual glossary of terms used in wood anatomy*. (Winterhur: Verlaganstadt Buchdruckerei Konkordia).
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945.
- Isik, F., and Li, B. (2003). Rapid assessment of wood density of live trees using the Resistograph for selection in tree improvement programs. *Can. J. For. Res.* 33, 2426–2435.

- Jackson, M. (1997). Hormones from roots as signals for the shoots of stressed plants. *Trends Plant Sci.* 2, 22–28.
- Jackson, A.O., and Larkins, B.A. (1976). Influence of ionic strength, pH, and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves. *Plant Physiol.* 57, 5–10.
- Jacquot, C. (1955). Atlas d'anatomie des bois des Conifères. Paris Cent. Tech Bois 64, 133.
- Janin, G. (1994). Colorimétrie: principe de la mesure de la couleur. Application au bois. In *Le Bois Matériau d'Ingénierie*. ARBOLOR, Nancy, pp. 380–399.
- Jessop, P.G., Phan, L., Carrier, A., Robinson, S., Dürr, C.J., and Harjani, J.R. (2010). A solvent having switchable hydrophilicity. *Green Chem.* 12, 809–814.
- Jiang, G.-L. (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant Breed. Lab. Fields* 45–83.
- Johnson, G.R., and Gartner, B.L. (2006). Genetic variation in basic density and modulus of elasticity of coastal Douglas-fir. *Tree Genet. Genomes* 3, 25–33.
- Jones, L., Seymour, G.B., and Knox, J.P. (1997). Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1→4)-[beta]-D-galactan. *Plant Physiol.* 113, 1405–1412.
- Joosen, R.V., Lammers, M., Balk, P.A., Brønnum, P., Konings, M.C., Perks, M., Stattin, E., Van Wordragen, M.F., and van der Geest, A.L.H. (2006). Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiol.* 26, 1297–1313.
- Jourez, B. (1997). Le bois de tension. 1. Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1, 100–112.
- Jozsa, L.A., and Middleton, G.R. (1994). A discussion of wood quality attributes and their practical implications. Forintek Canada Corp. Spec Public No SP-34, pp. 42.
- Jozsa, L.A., Richards, J., and Johnson, S.G. (1989). Relative density. In *Second Growth Douglas-Fir: Its Management and Conversion for Value: A Report of the Douglas-Fir Task Force*, (Vancouver, BC: RM Kellogg), pp. 5–22.
- Kačuráková, M., Belton, P.S., Wilson, R.H., Hirsch, J., and Ebringerová, A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 77, 38–44.
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., and Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43, 195–203.
- Kampe, A., and Magel, E. (2013). New insights into heartwood and heartwood formation. In *Cellular Aspects of Wood Formation*, (Springer), pp. 71–95.
- Karatzos, S.K., Edey, L.A., and Wellard, R.M. (2012). The undesirable acetylation of cellulose by the acetate ion of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Cellulose* 19, 307–312.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., et al. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564–1566.

- Katz, Y., Wang, E.T., Airoidi, E.M., and Burge, C.B. (2010). Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nat. Methods* 7, 1009–1015.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 20, 219–229.
- Kilpeläinen, I., Xie, H., King, A., Granstrom, M., Heikkinen, S., and Argyropoulos, D.S. (2007). Dissolution of wood in ionic liquids. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9142–9148.
- Klessig, D.F., and Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, (Springer), pp. 203–222.
- Knox, J.P. (2008). Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 308–313.
- Knox, J.P., Linstead, P.J., King, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181, 512–521.
- Köhler, S., Liebert, T., Schöbitz, M., Schaller, J., Meister, F., Günther, W., and Heinze, T. (2007). Interactions of ionic liquids with polysaccharides 1. unexpected acetylation of cellulose with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Macromol. Rapid Commun.* 28, 2311–2317.
- Kohnle, U., Hein, S., Sorensen, F.C., and Weiskittel, A.R. (2012). Effects of seed source origin on bark thickness of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) growing in southwestern Germany. *Can. J. For. Res.* 42, 382–399.
- Kolosova, N., Miller, B., Ralph, S., Ellis, B.E., Douglas, C., Ritland, K., and Bohlmann, J. (2004). Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *Nat Rev Genet* 2, 353–359.
- Komalavilas, P., and Mort, A.J. (1989). The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydr. Res.* 189, 261–272.
- Kornberg, R.D. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends Biochem. Sci.* 24, M46–M49.
- Kozlowski, T.T. (1992). Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *Bot. Rev.* 58, 107–222.
- Kozlowski, T.T., and Pallardy, S.G. (1997). *Growth control in woody plants* (Elsevier), pp. 641.
- Kozlowski, T.T., and Peterson, T.A. (1962). Seasonal growth of dominant, intermediate, and suppressed red pine trees. *Bot. Gaz.* 146–154.
- Kozlowski, T.T., and Winget, C.H. (1963). Patterns of water movement in forest trees. *Bot. Gaz.* 301–311.
- Krall, S.M., and McFeeters, R.F. (1998). Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH, and calcium on hydrolysis rates. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1311–1315.
- Kramer, P.J. (1964). The role of water in wood formation. In *The Formation of Wood in Forest Trees*, (Academic Press.), pp. 519–532.
- Krieg, P.A. (1996). *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis* (New York: John Wiley & Sons), pp. 445.

- Krumm, N., Sudmant, P.H., Ko, A., O’Roak, B.J., Malig, M., Coe, B.P., Project, N.E.S., Quinlan, A.R., Nickerson, D.A., and Eichler, E.E. (2012). Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Res.* 22, 1525–1532.
- Krutovsky, K.V., Clair, J.B.S., Saich, R., Hipkins, V.D., and Neale, D.B. (2009). Estimation of population structure in coastal Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco var. *menziesii*] using allozyme and microsatellite markers. *Tree Genet. Genomes* 5, 641–658.
- Labbe, N., Rials, T.G., Kelley, S.S., Cheng, Z.-M., Kim, J.-Y., and Li, Y. (2005). FT-IR imaging and pyrolysis-molecular beam mass spectrometry: new tools to investigate wood tissues. *Wood Sci. Technol.* 39, 61–76.
- Lachaud, S., Catesson, A.-M., and Bonnemain, J.-L. (1999). Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie* 322, 633–650.
- Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 11–17.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Langström, B., and Hellqvist, C. (1991). Effects of different pruning regimes on growth and sapwood area of Scots pine. *For. Ecol. Manag.* 44, 239–254.
- Larson, P.R. (1962). Auxin gradients and the regulation of cambial activity. *Tree Growth* 97–117.
- Larson, P.R. (1994). *The vascular cambium: development and structure.* (Springer-Verlag, New York), pp. 725.
- Larson, P.R., Kretschmann, D.E., Clark, A., and Isebrands, J.G. (2001). Formation and properties of juvenile wood in Southern Pines a synopsis. Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-129. Madison, WI: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. pp. 42.
- Lassois, L., de Lapeyre de Bellaire, L., and Jjakli, H. (2009). Combining an original method for preserving RNA expression *in situ* with an effective RNA extraction method makes it possible to study gene expression in any banana fruit tissue. *Fruits* 64, 127–137.
- Lau, M.W., Gunawan, C., and Dale, B.E. (2009). The impacts of pretreatment on the fermentability of pretreated lignocellulosic biomass: a comparative evaluation between ammonia fiber expansion and dilute acid pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 2, 1.
- Lausberg, M.F.J., Cown, D.J., McConchie, D.L., and Skipwith, J. (1995). Variation in some wood properties of *Pseudotsuga menziesii* provenances grown in New Zealand. *N. Z. J. For. Sci.* 25, 133–146.
- Lawther, J.M., Sun, R., and Banks, W.B. (1996). Effects of extraction conditions and alkali type on yield and composition of wheat straw hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 60, 1827–1837.
- Le, H.-S., Schulz, M.H., McCauley, B.M., Hinman, V.F., and Bar-Joseph, Z. (2013). Probabilistic error correction for RNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 41, e109–e109.
- Lee, S.H., and Lee, S.B. (2005). The Hildebrand solubility parameters, cohesive energy densities and internal energies of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based room temperature ionic liquids. *Chem. Commun.* 3469–3471.
- Leegood, R.C., and Walker, R.P. (2003). Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants.

Arch. Biochem. Biophys. *414*, 204–210.

Lerouge, P., O'Neill, M.A., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1993). Structural characterization of endoglycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. Carbohydr. Res. *243*, 359–371.

Lewis, N.G., and Yamamoto, E. (1990). Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. *41*, 455–496.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics *25*, 1754–1760.

Li, P., and Adams, W.T. (1994). Genetic variation in cambial phenology of coastal Douglas-fir. Can. J. For. Res. *24*, 1864–1870.

Li, B., Asikkala, J., Filpponen, I., and Argyropoulos, D.S. (2010a). Factors affecting wood dissolution and regeneration of ionic liquids. Ind. Eng. Chem. Res. *49*, 2477–2484.

Li, B., Filpponen, I., and Argyropoulos, D.S. (2010b). Acidolysis of Wood in Ionic Liquids. Ind. Eng. Chem. Res. *49*, 3126–3136.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and others (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics *25*, 2078–2079.

Li, X., Simonsen, J., and Li, K.C. (2004). Wood dissolution and the regeneration of its components using ionic liquids. In Abstracts of Papers of the American Chemical Society, (Amer Chemical Soc 1155 16th st, NY, Washington, DC 20036 USA), pp. U310–U311.

Liao, Z., Chen, M., Guo, L., Gong, Y., Tang, F., Sun, X., and Tang, K. (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from Taxus and Ginkgo. Prep. Biochem. Biotechnol. *34*, 209–214.

Lim, K.-J., Paasela, T., Harju, A., Ven, M., Paulin, L., Auvinen, P., Katri, K., Teeri, T.H., and others (2016). Developmental changes in Scots pine transcriptome during heartwood formation. Plant Physiol. pp – 01082.

Lindgreen, S. (2012). AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads. BMC Res. Notes *5*, 337.

Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 545–550.

Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. Anal. Biochem. *163*, 16–20.

Loomis, W.D. (1974). Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods Enzymol. *31*, 528–544.

Van Loon, L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. *103*, 753–765.

Lopez-Gomez, R., and Gomez-Lim, M.A. (1992). A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. HortScience *27*, 440–442.

- Lord, C.E.N., and Gunawardena, A.H.L.A.N. (2012). Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. *Eur. J. Cell Biol.* *91*, 603–613.
- Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* *6*, 516–524.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 1.
- Lunsford, K.A., Peter, G.F., and Yost, R.A. (2011). Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of cellulose and hemicellulose in populus tissue. *Anal. Chem.* *83*, 6722–6730.
- MacFarlane, D.R., Forsyth, S.A., Golding, J., and Deacon, G.B. (2002). Ionic liquids based on imidazolium, ammonium and pyrrolidinium salts of the dicyanamide anion. *Green Chem.* *4*, 444–448.
- MacManes, M.D., and Eisen, M.B. (2013). Improving transcriptome assembly through error correction of high-throughput sequence reads. *PeerJ* *1*, e113.
- MacRae, I.J., and Doudna, J.A. (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *17*, 138–145.
- Magel, E. (2001). Physiology of cambial growth, storage of reserves and heartwood formation. In *Trends in European Forest Tree Physiology Research*, (Springer), pp. 19–32.
- Magel, E., and Hübner, B. (1997). Distribution of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase within trunks of *Robinia pseudoacacia* L. *Bot. Acta* *110*, 314–322.
- Magnussen, S., and Keith, C.T. (1990). Genetic improvement of volume and wood properties of jack pine: selection strategies. *For. Chron.* *66*, 281–286.
- Makarova, E.N., Shakhmatov, E.G., Udoratina, E.V., and Kutchin, A.V. (2015). Structural and chemical characteristics of pectins, arabinogalactans, and arabinogalactan proteins from conifers. *Russ. Chem. Bull.* *64*, 1302–1318.
- Mamanova, L., and Turner, D.J. (2011). Low-bias, strand-specific transcriptome Illumina sequencing by on-flowcell reverse transcription (FRT-seq). *Nat. Protoc.* *6*, 1736–1747.
- Mamanova, L., Andrews, R.M., James, K.D., Sheridan, E.M., Ellis, P.D., Langford, C.F., Ost, T.W., Collins, J.E., and Turner, D.J. (2010). FRT-seq: Amplification-free, strand-specific, transcriptome sequencing. *Nat. Methods* *7*, 130.
- Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G., and Knox, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.* *8*, 60.
- Marcus, S.E., Blake, A.W., Benians, T.A.S., Lee, K.J.D., Poyser, C., Donaldson, L., Leroux, O., Rogowski, A., Petersen, H.L., Boraston, A., et al. (2010). Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls: Masking of mannan polysaccharides. *Plant J.* *64*, 191–203.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S.,

- Chen, Y.-J., Chen, Z., et al. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* *437*, 376–380.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* *17*, 1–10.
- Martin, J.A., and Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 671–682.
- Martinez, M., and Diaz, I. (2008). The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol. Biol.* *8*, 198.
- Maschek, D., Goodell, B., Jellison, J., Lessard, M., and Militz, H. (2013). A new approach for the study of the chemical composition of bordered pit membranes: 4Pi and confocal laser scanning microscopy. *Am. J. Bot.* *100*, 1751–1756.
- McCarthy, A. (2010). Third generation DNA Ssequencing: Pacific Biosciences' Single Molecule Real Time Technology. *Chem. Biol.* *17*, 675–676.
- McCartney, L., Marcus, S.E., and Knox, J.P. (2005). Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J. Histochem. Cytochem.* *53*, 543–546.
- McGettigan, P.A. (2013). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *17*, 4–11.
- McMurrough, I., and Baert, T. (1994). Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. *J. Inst. Brew.* *100*, 409–416.
- Mellerowicz, E.J., and Sundberg, B. (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 293–300.
- Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A., and Johnson, E.A. (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res.* *17*, 240–248.
- Millier, F., Verger, M., and Rozenberg, P. (2006). Microdensitométrie sur arbres forestiers. *Méthodes Outils Pour L'observation L'évaluation Milieux For. Prairiaux Aquat. Cah. Tech. L'Inra* 87–91.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 266–277.
- Mohnen, D., Bar-Peled, M., and Somerville, C. (2008). Cell wall polysaccharide synthesis. *Biomass Recalcitrance Deconstructing Plant Cell Wall Bioenergy Blackwell Publ. Singap.* 94–159.
- Morais, M.C., and Pereira, H. (2012). Variation of extractives content in heartwood and sapwood of *Eucalyptus globulus* trees. *Wood Sci. Technol.* *46*, 709–719.
- Mora-Pale, M., Meli, L., Doherty, T.V., Linhardt, R.J., and Dordick, J.S. (2011). Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 1229–1245.
- Moschou, P.N., and Roubelakis-Angelakis, K.A. (2014). Polyamines and programmed cell death. *J. Exp. Bot.* *65*, 1285–1296.
- Moulia, B., and Fournier, M. (2009). The power and control of gravitropic movements in plants: a biomechanical and systems biology view. *J. Exp. Bot.* *60*, 461–486.

- Muhammad, N., Man, Z., and Bustam Khalil, M.A. (2012). Ionic liquid—a future solvent for the enhanced uses of wood biomass. *Eur. J. Wood Wood Prod.* 70, 125–133.
- Muldoon, M.J., Gordon, C.M., and Dunkin, I.R. (2001). Investigations of solvent–solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 433–435.
- Müller, T. (2015). Identification and analysis of a transcriptome of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and population structure inference using different next-generation sequencing techniques. Ph.D. Universität Hohenheim.
- Müller, T., Ensminger, I., and Schmid, K.J. (2012). A catalogue of putative unique transcripts from Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) based on 454 transcriptome sequencing of genetically diverse, drought stressed seedlings. *BMC Genomics* 13, 673.
- Mutwil, M., Debolt, S., and Persson, S. (2008). Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 252–257.
- Nakaba, S., Sano, Y., Kubo, T., and Funada, R. (2006). The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Rep.* 25, 1143–1148.
- Nakaba, S., Kubo, T., and Funada, R. (2008). Differences in patterns of cell death between ray parenchyma cells and ray tracheids in the conifers *Pinus densiflora* and *Pinus rigida*. *Trees* 22, 623–630.
- Nakada, R., and Fukatsu, E. (2012). Seasonal variation of heartwood formation in *Larix kaempferi*. *Tree Physiol.* 32, 1497–1508.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N.A., and Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* 6, 288.
- Navi, P., and Heger, F. (2005). Comportement thermo-hydrromécanique du bois: applications technologiques et dans les structures (PPUR presses polytechniques et universitaires romandes), pp. 312.
- Neophytou, C., Weisser, A.-M., Landwehr, D., Šeho, M., Kohnle, U., Ensminger, I., and Wildhagen, H. (2016). Assessing the relationship between height growth and molecular genetic variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) provenances. *Eur. J. For. Res.* 135, 465–481.
- Nicholls, J.W.P., and Brown, A.G. (1974). Inheritance of heartwood formation in *Pinus radiata* D. Don. *Silvae Genet.* 23, 138–141.
- Nishikubo, N., Awano, T., Banasiak, A., Bourquin, V., Ibatullin, F., Funada, R., Brumer, H., Teeri, T.T., Hayashi, T., Sundberg, B., et al. (2007). Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in Poplar—A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant Cell Physiol.* 48, 843–855.
- Nobuchi, T., and Harada, H. (1983). Physiological features of the 'white zone' of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don)-cytological structure and moisture content. *J Jap Wood Res Soc* 29, 824–832.
- Nobuchi, T., Sato, T., Iwata, R., and Harada, H. (1984). Season of heartwood formation and the related cytological structure of ray parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* L. *J Jap Wood Res Soc* 30, 628–636.
- Norberg, P.H., and Meier, H. (1966). Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood

- fibres of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 20, 174–178.
- Obel, N., Erben, V., and Pauly, M. (2006). Functional wall glycomics through oligosaccharide mass profiling. In *The Science and Lore of the Plant Cell Wall*. Brown Walker Press, Boca Raton, FL, (Universal-Publishers), pp. 258–266.
- Ohno, H., and Fukaya, Y. (2009). Task specific ionic liquids for cellulose technology. *Chem. Lett.* 38, 2–7.
- Ojansuu, R., and Maltamo, M. (1995). Sapwood and heartwood taper in Scots pine stems. *Can. J. For. Res.* 25, 1928–1943.
- Olmstead, J.A., and Gray, D.G. (1997). Fluorescence spectroscopy of cellulose, lignin and mechanical pulps: a review. *J. Pulp Pap. Sci.* 23, J571–J581.
- O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A. (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods Plant Biochem.* 2, 415–441.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol* 55, 109–139.
- Owston, P.W., and Stein, W.I. (1974). *Pseudotsuga* Carr.–Douglas-fir. In *Seeds of Woody Plants in the United States*. Agric Handb US Dep Agric, (Washington, D.C.: Schopmeyer, C.S.), pp. 674–683.
- Pabst, M., Fischl, R.M., Brecker, L., Morelle, W., Fauland, A., Köfeler, H., Altmann, F., and Léonard, R. (2013). Rhamnogalacturonan II structure shows variation in the side chains monosaccharide composition and methylation status within and across different plant species. *Plant J.* 76, 61–72.
- Padmanabhan, S., Kim, M., Blanch, H.W., and Prausnitz, J.M. (2011). Solubility and rate of dissolution for *Miscanthus* in hydrophilic ionic liquids. *Fluid Phase Equilibria* 309, 89–96.
- Palanti, S., and Feci, E. (2013). A wood preservative based on commercial silica nanodispersions and boric acid against fungal decay through laboratory and field tests. *Open J. For.* 3, 57.
- Pallara, G., Giovannelli, A., Traversi, M.L., Camussi, A., and Racchi, M.L. (2011). Effect of water deficit on expression of stress-related genes in the cambial region of two contrasting poplar clones. *J. Plant Growth Regul.* 31, 102–112.
- Pallardy, S.G. (2010). *Physiology of woody plants* (Academic Press), pp. 464.
- Palm, M., and Zacchi, G. (2003). Extraction of hemicellulosic oligosaccharides from spruce using microwave oven or steam treatment. *Biomacromolecules* 4, 617–623.
- Pandey, K.K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.* 71, 1969–1975.
- Pâques, L.E. (2001). Genetic control of heartwood content in larch. *Silvae Genet.* 50, 69–74.
- Pâques, L.E., and Charpentier, J.-P. (2015). Perspectives for genetic improvement in heartwood size and extractive content in relation to natural durability and aesthetics in interspecific hybrid larch (*Larix eurolepis*). *Eur. J. For. Res.* 134, 857–868.
- Parkhomchuk, D., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Banaru, M., Hallen, L., Krobitch, S., Lehrach, H., and

- Soldatov, A. (2009). Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res.* 37, e123–e123.
- Patel, D.D., and Lee, J.-M. (2012). Applications of ionic liquids. *Chem. Rev.* 12, 329–355.
- Pattathil, S., Avci, U., Baldwin, D., Swennes, A.G., McGill, J.A., Popper, Z., Bootten, T., Albert, A., Davis, R.H., Chennareddy, C., et al. (2010). A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* 153, 514–525.
- Pattathil, S., Avci, U., Miller, J.S., and Hahn, M.G. (2012). Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: glycome profiling. *Biomass Convers. Methods Protoc.* 61–72.
- Pattathil, S., Hahn, M.G., Dale, B.E., and Chundawat, S.P. (2015). Insights into plant cell wall structure, architecture, and integrity using glycome profiling of native and AFEX™-pre-treated biomass. *J. Exp. Bot.* 66, 4279–4294.
- Paulus, W. (2005). *Directory of microbicides for the protection of materials: A Handbook* (Springer Science & Business Media), pp. 787.
- Pauly, M., Qin, Q., Greene, H., Albersheim, P., Darvill, A., and York, W.S. (2001). Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta* 212, 842–850.
- Pedersen, H.L., Fangel, J.U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M.G., Ralet, M.-C., Farkas, V., von Schantz, L., Marcus, S.E., Andersen, M.C., et al. (2012). Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research. *J. Biol. Chem.* 287, 39429–39438.
- Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., and Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85, 109–121.
- Pertea, G., Huang, X., Liang, F., Antonescu, V., Sultana, R., Karamycheva, S., Lee, Y., White, J., Cheung, F., Parvizi, B., et al. (2003). TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19, 651–652.
- Peterson, M.G., Dietterich, H.R., and Lachenbruch, B. (2007). Do Douglas-fir branches and roots have juvenile wood? *Wood Fiber Sci. Wood Fiber Sci. J. Soc. Wood Sci. Technol.* 39.
- Philippe, G., Matz, S., Bastien, J.-C., Archevêque, G., Girard, S., and Musch, B. (2011). Un réseau national de plantations comparatives pour évaluer les vergers à graines français de Douglas. *Sci. Eaux Territ.* 12–18.
- Pinkert, A., Marsh, K.N., Pang, S., and Staiger, M.P. (2009). Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chem. Rev.* 109, 6712–6728.
- Plaschkies, K., Jacobs, K., Scheiding, W., and Melcher, E. (2014). Investigations on natural durability of important European wood species against wood decay fungi. Part 1: Laboratory tests. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 90, 52–56.
- Plavcová, L., and Jansen, S. (2015). The role of xylem parenchyma in the storage and utilization of nonstructural carbohydrates. In *Functional and Ecological Xylem Anatomy*, U. Hacke, ed. (Springer International Publishing), pp. 209–234.

- Plazanet, I., Zerrouki, R., Lhernould, S., Breton, C., and Costa, G. (2015). Direct immunological detection of wood cell wall polysaccharides after microwave-assisted ionic liquid disruption. *J Glycobiol* 4, 2.
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* 127, 1513–1523.
- Polge, H. (1964). Délimitation de l'aubier et du bois de coeur par analyse densitométrique de clichés radiographiques. In *Annales Des Sciences Forestieres*, (EDP Sciences), pp. 605–623.
- Polge, H. (1966). Établissement des courbes de variation de la densité du bois par exploration densitométrique de radiographies d'échantillons prélevés à la tarière sur des arbres vivants: applications dans les domaines Technologique et Physiologique. In *Annales Des Sciences Forestières*, (EDP Sciences), pp. 206.
- Pollet, C., Henin, J.-M., Hebert, J., and Jourez, B. (2013). Effect of growth rate on the natural durability of Douglas-fir in western Europe. *Can. J. For. Res.* 43, 891–896.
- Poux, M., Cognet, P., and Gourdon, C. (2010). Génie des procédés durables: Du concept à la concrétisation industrielle (Paris: Dunod), pp. 416.
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y., and Vandepoele, K. (2009). PLAZA: a comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *Plant Cell* 21, 3718–3731.
- Le Provost, G., Herrera, R., Paiva, J.A., Chaumeil, P., Salin, F., and Plomion, C. (2007). A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biol. Res.* 40, 291–297.
- Putoczki, T.L., Pettolino, F., Griffin, M.D., Möller, R., Gerrard, J.A., Bacic, A., and Jackson, S.L. (2007). Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins. *Planta* 226, 1131–1142.
- Putoczki, T.L., Gerrard, J.A., Butterfield, B.G., and Jackson, S.L. (2008). The distribution of un-esterified and methyl-esterified pectic polysaccharides in *Pinus radiata*. *IAWA J.* 29, 115–127.
- Raberg, U., Edlund, M.-L., Terziev, N., and Land, C.J. (2005). Testing and evaluation of natural durability of wood in above ground conditions in Europe—an overview. *J. Wood Sci.* 51, 429–440.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., and Evrardt, C. (2007). *Biologie végétale* (De Boeck), pp. 733.
- Regnault, T. (2014). Biosynthèse et transport des gibbérellines chez *Arabidopsis thaliana*. Ph.D. Université de Strasbourg.
- Ren, Q., Wu, J., Zhang, J., He, J., and Guo, M. (2003). Synthesis of 1-allyl, 3-methylimidazolium-based room-temperature ionic liquid and preliminary study of its dissolving cellulose. *Acta Polym. Sin.* 448–451.
- Rennie, E.A., and Scheller, H.V. (2014). Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 100–107.
- Reyer, C., Lasch, P., Mohren, G.M., and Sterck, F.J. (2010). Inter-specific competition in mixed forests of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and common beech (*Fagus sylvatica*) under climate change—a model-based analysis. *Ann. For. Sci.* 67, 805.
- Richard, I., and Beckmann, J.S. (1995). How neutral are synonymous codon mutations? *Nat. Genet.* 10, 259–259.

- Richard, D., Chevalet, P., Fournel, S., Giraud, N., Gros, F., Laurenti, P., Pradere, F., and Soubaya, T. (2015). *Biologie -Tout le cours en fiches: 300 fiches de cours, 270 QCM et bonus web* (Dunod) pp. 352.
- Richmond, T., and Somerville, S. (2000). Chasing the dream: plant EST microarrays. *Curr. Opin. Plant Biol.* *3*, 108–116.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* *57*, 929–967.
- Rowell, R.M. (2005). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites* (New York: CRC Press), pp. 703.
- Rowell, R.M., Pettersen, R., Han, J.S., Rowell, J.S., and Tshabalala, M.A. (2005). Cell wall chemistry. *Handb. Wood Chem. Wood Compos.* 35–76.
- Royce, T.E., Rozowsky, J.S., and Gerstein, M.B. (2007). Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic Acids Res.* *35*, e99.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., and Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* *15*, 247–258.
- Salmén, L., and Olsson, A.-M. (1998). Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose: structure-property relationships. *J. Pulp Pap. Sci.* *24*, 99–103.
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Report.* *17*, 11–17.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *74*, 5463–5467.
- Sauter, A., Davies, W.J., and Hartung, W. (2001). The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. *J. Exp. Bot.* *52*, 1991–1997.
- Scheller, H.V., and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 263–289.
- Schloss, J.A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1113–1115.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* *109*, 365–371.
- Schlötterer, C., and Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* *20*, 211–215.
- Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Fast identification and removal of sequence contamination from genomic and metagenomic datasets. *PLOS ONE* *6*, e17288.
- Schmieder, R., Lim, Y.W., Rohwer, F., and Edwards, R. (2010). TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics* *11*, 1.
- Schröder, J., Bailey, J., Conway, T., and Zobel, J. (2010). Reference-free validation of short read data. *PLoS ONE* *5*, e12681.
- Schulz, M.H., Zerbino, D.R., Vingron, M., and Birney, E. (2012). Oases: robust de novo RNA-seq assembly

across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28, 1086–1092.

Schweingruber, F.H. (2007). *Wood structure and environment* (Springer Science & Business Media), pp. 279.

Schweingruber, F.H., Börner, A., and Schulze, E.-D. (2007). *Atlas of woody plant stems: evolution, structure, and environmental modifications* (Springer Science & Business Media), pp. 229.

Seddon, K.R. (1997). Ionic liquids for clean technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 351–356.

Selkoe, K.A., and Toonen, R.J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629.

Selvendran, R.R., Stevens, B.J.H., and O’Neill, M.A. (1985). Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. In *Biochemistry of Plant Cell Walls*, (CUP Archive), pp. 39–79.

Shain, L., and Hillis, W.E. (1973). Ethylene production in xylem of *Pinus radiata* in relation to heartwood formation. *Can. J. Bot.* 51, 1331–1335.

Simpson, J.T., and Durbin, R. (2010). Efficient construction of an assembly string graph using the FM-index. *Bioinformatics* 26, i367–i373.

Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J., and Birol, I. (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Res.* 19, 1117–1123.

Sjostrom, E. (2013). *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications* (Elsevier), pp. 293.

Sjöström, E., and Alén, R. (1998). *Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking* (Springer), pp. 318.

Sjöström, E., and Westermark, U. (1999). Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*, (Springer), pp. 1–19.

Slavov, G.T., Howe, G.T., Yakovlev, I., Edwards, K.J., Krutovskii, K.V., Tuskan, G.A., Carlson, J.E., Strauss, S.H., and Adams, W.T. (2004). Highly variable SSR markers in Douglas-fir: Mendelian inheritance and map locations. *Theor. Appl. Genet.* 108, 873–880.

Smallwood, M., Martin, H., and Knox, J.P. (1995). An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* 196, 510–522.

Smith, L.G. (2001). Plant cell division: building walls in the right places. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 33–39.

Smith, D.R., Quinlan, A.R., Peckham, H.E., Makowsky, K., Tao, W., Woolf, B., Shen, L., Donahue, W.F., Tusneem, N., Stromberg, M.P., et al. (2008). Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies. *Genome Res.* 18, 1638–1642.

Sobrino, B., Brión, M., and Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci. Int.* 154, 181–194.

Socha, A.M., Parthasarathi, R., Shi, J., Pattathil, S., Whyte, D., Bergeron, M., George, A., Tran, K., Stavila, V., Venkatachalam, S., et al. (2014). Efficient biomass pretreatment using ionic liquids derived from lignin and hemicellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3587–E3595.

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., et al. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306, 2206–2211.
- Sorensen, F.C. (1999). Relationship between self-fertility, allocation of growth, and inbreeding depression in three coniferous species. *Evolution* 417–425.
- Spicer, R. (2005). Senescence in secondary xylem: heartwood formation as an active developmental program. *Vasc. Transp. Plants* 457–475.
- Stewart, D., and Morrison, I.M. (1992). Ft-ir spectroscopy as a tool for the study of biological and chemical treatments of barley straw. *J. Sci. Food Agric.* 60, 431–436.
- Strickler, S.R., Bombarely, A., and Mueller, L.A. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species. *Am. J. Bot.* 99, 257–266.
- Su, X., and Gibor, A. (1988). A method for RNA isolation from marine macro-algae. *Anal. Biochem.* 174, 650–657.
- Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T., Schuette, M., Dökel, S., Ralser, M., Balzereit, D., Lehrach, H., and Yaspo, M.-L. (2014). Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics* 15, 1.
- Sun, R.C., and Hughes, S. (1999). Fractional isolation and physico-chemical characterization of alkali-soluble polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydr. Polym.* 38, 273–281.
- Sun, R.C., and Tomkinson, J. (2002). Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 50, 263–271.
- Sun, N., Rahman, M., Qin, Y., Maxim, M.L., Rodríguez, H., and Rogers, R.D. (2009). Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.* 11, 646.
- Sunyaev, S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J., and Bork, P. (1999). Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *J. Mol. Med.* 77, 754–760.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., and Rogers, R.D. (2002). Dissolution of Cellulose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4974–4975.
- Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P., and Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr. Polym.* 54, 97–106.
- Tan, S.S.Y., and MacFarlane, D.R. (2009). Ionic liquids in biomass processing. In *Ionic Liquids*, B. Kirchner, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 311–339.
- Tautz, D., and Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4127–4138.
- Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Morrell, J.J. (2002). Heartwood formation and natural durability-a review. *Wood Fiber Sci.* 34, 587–611.
- Taylor, A.M., Gartner, B.L., and Morrell, J.J. (2003). Co-incident variations in growth rate and heartwood

- extractive concentration in Douglas-fir. *For. Ecol. Manag.* *186*, 257–260.
- Taylor, A.M., Brooks, J.R., Lachenbruch, B., and Morrell, J.J. (2007). Radial patterns of carbon isotopes in the xylem extractives and cellulose of Douglas-fir. *Tree Physiol.* *27*, 921–927.
- Thibaut, B., Gril, J., and Fournier, M. (2001). Mechanics of wood and trees: some new highlights for an old story. *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. IIB-Mech.* *329*, 701–716.
- Timell, T.E. (1965). Wood and bark polysaccharides. In *Cellular Ultrastructure of Woody Plants*, (Syracuse, NY), pp. 127–156.
- Timell, T.E. (1967). Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* *1*, 45–70.
- Timell, T.E. (1986). *Compression wood in gymnosperms* (Berlin, New York: Springer-Verlag), pp. 2150.
- Tóth, G., Gáspári, Z., and Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* *10*, 967–981.
- Tounekti, T., Hernández, I., and Munné-Bosch, S. (2013). Salicylic acid biosynthesis and role in modulating terpenoid and flavonoid metabolism in plant responses to abiotic stress. In *Salicylic Acid*, (Springer), pp. 141–162.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* *25*, 1105–1111.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* *28*, 511–515.
- Treutter, D. (1989). Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr. A* *467*, 185–193.
- Trouy, M.-C. (2015). *Anatomie du bois: Formation, fonctions et identification* (Editions Quae), pp. 184.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* *153*, 895–905.
- Vanzin, G.F., Madson, M., Carpita, N.C., Raikhel, N.V., Keegstra, K., and Reiter, W.-D. (2002). The mur2 mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 3340–3345.
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., et al. (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* *19*, 32–45.
- Vargas-Hernandez, J., and Adams, W.T. (1992). Age-age correlations and early selection for wood density in young coastal Douglas-fir. *For. Sci.* *38*, 467–478.
- Verherbruggen, Y., Marcus, S.E., Haeger, A., Ordaz-Ortiz, J.J., and Knox, J.P. (2009). An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydr. Res.* *344*, 1858–1862.
- Vikram, V. (2008). *Stiffness of Douglas-fir Lumber: Effects of Wood Properties and Genetics*. Ph.D. Oregon

State University.

Vincken, J.-P., Beldman, G., and Voragen, A.G. (1997). Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? *Carbohydr. Res.* *298*, 299–310.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* *23*, 4407–4414.

Wallace, D.M. (1987). Large-and small-scale phenol extractions. *Methods Enzymol.* *152*, 33–41.

Wan, C.-Y., and Wilkins, T.A. (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.* *223*, 7–12.

Wang, S.X., and Hunter, W. (2000). Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce. *Biotechniques* *28*, 292–296.

Wang, H., Gurau, G., and Rogers, R.D. (2012a). Ionic liquid processing of cellulose. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 1519–1537.

Wang, K.L.-C., Li, H., and Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell Online* *14*, S131–S151.

Wang, N., Jian, Y., Liu, S., Liu, Y., and Huang, K. (2012b). Influence of acetated-based and bromo-based ionic liquids treatment on wool dyeing with acid blue 7. *J. Appl. Polym. Sci.* *123*, 3283–3291.

Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 57–63.

Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* *111*, 1021–1058.

Weingärtner, H. (2008). Understanding ionic liquids at the molecular level: facts, problems, and controversies. *Angew. Chem. Int. Ed.* *47*, 654–670.

Welch, T.A. (1984). A technique for high-performance data compression. *Computer* *17*, 8–19.

Wellwood, R.W., and Smith, J.H.G. (1962). Variation in some important qualities of wood from young Douglas-fir and hemlock trees. *Univ. Br. Columbia Fac. For. Vanc. BC Res Pap* *50*.

Welton, T. (1999). Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem. Rev.* *99*, 2071–2084.

Wery, M., Describes, M., Thermes, C., Gautheret, D., and Morillon, A. (2013). Zinc-mediated RNA fragmentation allows robust transcript reassembly upon whole transcriptome RNA-Seq. *Methods* *63*, 25–31.

Willats, W.G., Marcus, S.E., and Knox, J.P. (1998). Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- $\alpha$ -l-arabinan. *Carbohydr. Res.* *308*, 149–152.

Willats, W.G., Steele-King, C.G., McCartney, L., Orfila, C., Marcus, S.E., and Knox, J.P. (2000). Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiol. Biochem.* *38*, 27–36.

- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., Saake, B., Uotila, K., Simolin, H., Hemming, J., et al. (2009). Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind. Crops Prod.* *29*, 571–580.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* *18*, 6531–6535.
- Wilson, B.F. (1984). *The Growing Tree* (Univ of Massachusetts Press), pp. 138.
- Winistorfer, P.M., Xu, W., and Wimmer, R. (1995). Application of a drill resistance technique for density profile measurement in wood composite panels. *For. Prod. J.* *45*, 90.
- Woltering, E.J. (2010). Death proteases: alive and kicking. *Trends Plant Sci.* *15*, 185–188.
- Woodhead, M., Taylor, M.A., Davies, H.V., Brennan, R.M., and McNicol, R.J. (1997). Isolation of RNA from blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruit. *Mol. Biotechnol.* *7*, 1–4.
- Woods, J.H. (1993). Breeding programs and strategies for Douglas-fir in North America. In *Breeding Strategies of Important Tree Species in Canada*. Compiled by Y.S. Park and G.W. Adams. Can. For. Serv. Marit. Reg. Inf. Rep. M-X-186E, pp. 1–11.
- Xie, Y., Wu, G., Tang, J., Luo, R., Patterson, J., Liu, S., Huang, W., He, G., Gu, S., Li, S., et al. (2014). SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* *30*, 1660–1666.
- Yamada, T. (2001). Defense mechanisms in the sapwood of living trees against microbial infection. *J. For. Res.* *6*, 127–137.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 225–251.
- Yamamoto, K. (1982). Yearly and seasonal process of maturation of ray parenchyma cells in *Pinus* species. *Res Bull Coll Exp Hokkaido Univ* *39*, 245–296.
- Yang, D., Zhong, L.-X., Yuan, T.-Q., Peng, X.-W., and Sun, R.-C. (2013). Studies on the structural characterization of lignin, hemicelluloses and cellulose fractionated by ionic liquid followed by alkaline extraction from bamboo. *Ind. Crops Prod.* *43*, 141–149.
- Yang, J., Park, S., Kamdem, D.P., Keathley, D.E., Retzel, E., Paule, C., Kapur, V., and Han, K.-H. (2003). Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol. Biol.* *52*, 935–956.
- Yang, J., Kamdem, D.P., Keathley, D.E., and Han, K.-H. (2004). Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. *Tree Physiol.* *24*, 461–474.
- Yang, X., Dorman, K.S., and Aluru, S. (2010). Reptile: representative tiling for short read error correction. *Bioinformatics* *26*, 2526–2533.
- Yates, E.A., Valdor, J.F., Haslam, S.M., Morris, H.R., Dell, A., Mackie, W., and Knox, J.P. (1996).

Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6, 131–139.

Yeh, T.-F., Braun, J.L., Goldfarb, B., Chang, H., and Kadla, J.F. (2006). Morphological and chemical variations between juvenile wood, mature wood, and compression wood of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Holzforschung* 60, 1–8.

York, W., and Oneill, M. (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up? *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 258–265.

Yoshida, K., Futamura, N., and Nishiguchi, M. (2012). Collection of expressed genes from the transition zone of *Cryptomeria japonica* in the dormant season. *J. Wood Sci.* 58, 89–103.

Yoshizawa, N., Watanabe, N., Yokota, S., and Idei, T. (1993). Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. *IAWA J.* 14, 139–151.

Yu, X.-H., Perdue, T.D., and Jones, A.M. (2002). Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ.* 9, 189–198.

Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J., and Spiess, A.C. (2009). High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. *Bioresour. Technol.* 100, 2580–2587.

Zerbino, D.R., and Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821–829.

Zha, H.-G., Liu, T., Zhou, J.-J., and Sun, H. (2013). MS-desi, a desiccation-related protein in the floral nectar of the evergreen velvet bean (*Mucuna sempervirens* Hemsl): molecular identification and characterization. *Planta* 238, 77–89.

Zhang, C., Lei, X., Scott, C.T., Zhu, J.Y., and Li, K. (2014). Comparison of dilute acid and sulfite pretreatment for enzymatic saccharification of earlywood and latewood of Douglas fir. *BioEnergy Res.* 7, 362–370.

Zhang, H., Wu, J., Zhang, J., and He, J. (2005). 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride room temperature ionic liquid: a new and powerful nonderivatizing solvent for cellulose. *Macromolecules* 38, 8272–8277.

Zhang, L., Ji, J., Deng, D., Shu, Z., and Chen, X. (2008). Preparation of one kind of acetate based ionic liquid. *Chin. Pat. CN A 101108827*.

Zhao, W., He, X., Hoadley, K.A., Parker, J.S., Hayes, D.N., and Perou, C.M. (2014). Comparison of RNA-Seq by poly (A) capture, ribosomal RNA depletion, and DNA microarray for expression profiling. *BMC Genomics* 15, 1.

Zobel, B. (1981). Wood quality from fast-grown plantations. *Tappi* 64.

Zobel, B.J., and Buijtenen, J.P. van (2012). *Wood Variation: Its Causes and Control* (Springer Science & Business Media), pp. 376.

Zobel, B., and Sprague, J. (1998). *Juvenile wood in trees* (New York: Timell T.E.), pp. 304.