



HAL
open science

Vers l'élaboration d'un modèle de construction des parois secondaires des fibres de bois chez le peuplier

Clément Cuello

► **To cite this version:**

Clément Cuello. Vers l'élaboration d'un modèle de construction des parois secondaires des fibres de bois chez le peuplier. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2021. Français. NNT : 2021ORLE3118 . tel-04552245

HAL Id: tel-04552245

<https://theses.hal.science/tel-04552245>

Submitted on 19 Apr 2024

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 D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE 'Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant'

INRAE, ONF, UMR0588 'Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt' (BioForA)

THÈSE présentée par :

Clément CUELLO

soutenue le : 16 avril 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie végétale intégrative

Vers l'élaboration d'un modèle de construction des parois secondaires des fibres de bois chez le peuplier

THÈSE dirigée par :

Dr. DÉJARDIN Annabelle
Dr. PILATE Gilles

Chargée de Recherche, INRAE Val de Loire
Directeur de Recherche, INRAE Val de Loire

RAPPORTEURS :

Dr. GUILLON Fabienne
Dr. GUYOMARC'H Soazig

Directrice de Recherche, INRAE Pays de la Loire
Maître de Conférences, Université de Montpellier

JURY :

Dr. DÉJARDIN Annabelle
Dr. GUILLON Fabienne
Dr. GUYOMARC'H Soazig
Dr. HANO Christophe
Pr. HAWKINS Simon
Dr. PILATE Gilles

Chargée de Recherche, INRAE Val de Loire
Directrice de Recherche, INRAE Pays de la Loire
Maître de Conférences, Université de Montpellier
Maître de Conférences, Université d'Orléans
Professeur, Université de Lille – *Président du jury*
Directeur de Recherche, INRAE Val de Loire

À mon grand-père,

REMERCIEMENTS

*« Voyager c'est grandir. C'est la grande aventure. Celle qui laisse des traces dans l'âme. »
Marc Thiércelin*

La thèse est un périple fait de joie et de doutes. Ce voyage initiatique permet à celui qui le réalise de révéler le chercheur qui sommeille en lui. Arpenter ces chemins tumultueux, se transformer, ne peut se faire seul. C'est pourquoi je tiens à profiter de ces quelques pages pour remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont aidé à franchir chaque étape, m'indiquant les meilleurs chemins à suivre.

▣ Je tiens dans un premier temps à remercier Dr. Annabelle DÉJARDIN, chargée de recherche, et Dr. Gilles PILATE, directeur de recherche, qui m'ont accordé leur confiance en me donnant l'opportunité d'intégrer leur équipe pour réaliser ma thèse. J'ai grandement apprécié l'autonomie que vous m'avez laissée et qui m'a permis de développer mes propres réflexions et raisonnements scientifiques. Merci également pour votre disponibilité, votre rigueur, votre écoute et votre bienveillance, la qualité de nos échanges, aussi bien scientifiques qu'extraprofessionnels. Je tiens également ici à remercier Dr. Françoise LAURANS, ingénieure de recherche, qui a co-encadré ma thèse. Ta bonne humeur, ta bienveillance, ta générosité, ta franchise, ta rigueur et ton perfectionnisme sont autant d'éléments qui m'ont permis d'apprécier chacun de nos échanges.

▣ Je voudrais également remercier les membres de mes différents comités de thèse : Dr. Marie-Françoise DEVAUX, ingénieure de recherche, Dr. Étienne DELANNOY, chargé de recherche, Dr. Grégory MOUILLE, directeur de recherche, Dr. Vincent SEGURA, chargé de recherche et Dr. Aurélien CHATEIGNER, post-doctorant. Vos compétences et vos conseils m'ont été précieux dans le choix des orientations à prendre dans les différents axes de ma thèse.

▣ De même, je remercie chaleureusement Dr. Soazig GUYOMARC'H, maître de conférences, et Dr. Fabienne GUILLON, directrice de recherche, toutes deux rapporteurs, ainsi que Dr. Christophe HANO, maître de conférences, et Pr. Simon HAWKINS, professeur des universités, tous deux examinateurs, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Merci pour votre bienveillance et la qualité de nos échanges.

▣ Je remercie également l'ensemble du personnel de l'UMR BioForA pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse qui ont embelli chacune de mes journées ces trois années et demi. Je voudrais particulièrement remercier les personnes qui m'ont aidé tant au niveau scientifique, technique qu'administratif. Véronique et Camille, merci pour votre implication sans limite, votre disponibilité et votre gentillesse. J'ai énormément appris à vos côtés ! Merci d'avoir rendu

ces (parfois longues, on se souviendra longtemps de cette journée d'échantillonnage !) journées de travail plus agréables par vos petits mots et vos petites blagues. Marie-Claude, merci pour tes conseils, ta disponibilité et ta bonne humeur. Orlane, tant de bonnes journées et de bons moments avec toi ! Merci pour ton professionnalisme à toute épreuve et ton dynamisme qui ont permis d'embellir ces longues journées au LICA qui n'auraient probablement pas été les mêmes sans toi ! Vanina, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton sourire qui m'ont réjoui à chacun de mes (rares) passages au labo de biologie moléculaire. Kévin, Jean-Paul, Nassim, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse ainsi que pour nos échanges autour de la spectroscopie IR. Harold, nous ne nous sommes connus que peu de temps mais je tiens à te remercier pour tes judicieux conseils, notamment dans l'interprétation et l'analyse des réseaux. Marc, comment ne pas te remercier pour ton investissement (intégration dans EDIFICE, prolongation du contrat doctoral et j'en passe), ta gentillesse et ton envie de bien faire ! Je remercie également le comité de direction qui a toujours répondu présent ainsi que l'ensemble du personnel administratif de l'unité : Patricia, Véronique, Brigitte, Thibault et François pour leur efficacité et leur disponibilité. Ce travail n'aurait également pas été le même sans la contribution des différents stagiaires, Romaric MONTEIL, Alexandre CORDIER, et Laurent CHAPILLON, que j'ai eu l'occasion d'encadrer et que je tiens ici à grandement remercier. Les lycéens (Margot, Moussa, Amélia, Ibrahim, Justine, Mathilde, Valentin, Loevan et Withney) que j'ai pu sensibiliser à la recherche par la recherche dans le cadre du projet EDIFICE puis EDIFICE2.0 m'ont également grandement apporté notamment en qualité pédagogique. Je tiens ainsi à tous les remercier pour leur curiosité et leur envie d'apprendre qui a rendu nos séances très motivantes, dans les deux camps je l'espère.

📖 Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre (LICA) co-géré par l'UMR BioForA et l'unité expérimentale GBFor. Il me tient donc à cœur ici de remercier le personnel de cette unité, en particulier celles et ceux qui ont œuvré pour une gestion optimale des expérimentations en serre. Merci Anita pour ton implication, ta motivation et ta rigueur qui ont permis aux différentes phases d'élevage de se dérouler au mieux. Merci également pour ta curiosité, ta disponibilité et ton sourire qui ont rendu moins longues nos nombreuses séances d'acclimatation, d'empotage et de mesures. Merci également à Patrick pour ta sympathie, ta vigilance et ta bienveillance. Merci enfin à Jacky et Jonathan pour leur gestion de l'ensemble du bâtiment (on se souviendra longtemps des fuites d'eau et CTA qui sautent) et la mise au point du dispositif permettant d'assurer un maintien droit des arbres.

☐ Durant ma thèse, j'ai également bénéficié d'un appui extérieur et pu construire de nouvelles collaborations. Je tiens dans un premier temps à remercier le Collegium Doctoral Val de Loire pour la qualité et la richesse des formations mises en place. Je remercie plus particulièrement l'école doctorale 'Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant', notamment Dr. Agnès DELMAS et Mme Pauline LOURY pour leur disponibilité, la qualité de nos échanges et l'organisation du colloque annuel en collaboration avec l'association Biotechnocentre, journées passionnantes permettant de s'évader un temps de sa spécialité. Dans un deuxième temps, je remercie grandement M. Clément PICHOT (doctorant à l'Institut de sciences des plantes Paris-Saclay) pour sa disponibilité et nos échanges réguliers concernant la préparation de noyaux isolés. De même, mes remerciements sincères sont adressés à Mme Ludivine SOUBIGOU-TACONNAT et Dr. Étienne DELANNOY pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur professionnalisme. J'ai grandement apprécié les efforts fournis pour finaliser la mise au point du scRNA-Seq ! Dans un troisième temps, je souhaiterais remercier chaleureusement la plateforme d'histocytologie et d'imagerie végétale (CIRAD, Montpellier) pour leur accueil et leur bienveillance. Je remercie plus particulièrement Dr. Geneviève CONEJERO, Dr. Christine SANIER et Dr. Jean-Luc VERDEIL pour leur investissement et leur appui dans la mise au point de l'hybridation *in situ* sur bois. Enfin, dans un dernier temps, je tiens à remercier Dr. Julien MILLE pour son investissement dans le groupe de travail SHIVA du RTR DIAMS et le co-encadrement du stage de Laurent Chapillon.

☐ Ce voyage n'a pas seulement été une aventure scientifique mais également une aventure humaine. Il m'est donc tout naturel de remercier ces personnes sans qui l'aventure n'aurait vraiment pas été la même ! Tout d'abord les doctorants et jeunes docteurs dans l'unité (Alexandre, Thibaud, Marie, Marlène, Margarita, Abdou et Parisa) avec qui j'ai grandement apprécié partager le bureau (et un verre !) et échanger, parfois sérieusement, souvent beaucoup moins tout comme avec les non-permanents et stagiaires (Aurélien, Mathilde, Julien, Orlane) qui ont marqué ces trois années par leur passage, leur bonne humeur et leur sympathie. Merci également à Véronique Jorge, Anthony, Céline, Yves et Leopoldo pour nos belles discussions et nos éclats de rire. Je tiens également à grandement remercier deux personnes avec qui une belle amitié s'est nouée, Vincent et Thomas, sans qui ces trois années n'auraient vraiment pas eu la même saveur (houblonnée).

☐ De belles rencontres se sont également produites en dehors des murs du site d'Ardon, à Biotechnocentre puis dans le cadre de l'A.D.S.O. Je veux bien sûr parler d'Isabelle, Barnabé, Anton, Julien, Sylvie et Valentin ! Merci pour tous ces bons moments, nos 'mardis soirs'

détente qui vont me manquer et nos moments de purs bonheurs qui m'ont permis, le temps d'un instant, de m'évader !

▣ Je tiens également à remercier mes amis (Alex, Aurélie, Sandrine, Coco) qui m'ont soutenu (et aider à trouver mes mots lorsqu'ils me manquaient dans la rédaction du manuscrit à suivre) et m'ont (re-)motivé dans les moments de faiblesse. Merci enfin à ma famille, notamment ma maman, qui m'a soutenu à chaque étape, malgré la distance, et jusqu'à ma soutenance !

▣ Ce long périple a bénéficié d'un grand nombre de support financier : Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (contrat doctoral), Région Centre-Val de Loire (projet OPeNSPeNU), Agence Nationale de la Recherche (projet StressInTrees), Réseau Thématique de Recherche 'Données, Intelligence Artificielle, Modélisation, Simulation' (bourse Master 2), IPSC2019 (bourse de voyage). Je remercie donc grandement ces différents financeurs.

Le voyage ne s'arrête pas ici, il ne fait au contraire que commencer ! Je sais que de nombreux défis m'attendent encore. Je sais également pouvoir compter sur toutes les personnes que j'ai croisées et que je croiserai à nouveau pour pouvoir les relever. Je finirai donc ces quelques pages par un mot :

Merci !

« Qui a l'habitude de voyager... sait qu'il arrive toujours un moment où il faut repartir. »

Paulo Coelho

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
I. LE PEUPLIER : ESPÈCE D'INTÉRÊT ÉCONOMIQUE ET MODÈLE POUR LA BIOLOGIE FONCTIONNELLE DES ARBRES	3
II. XYLOGENÈSE.....	5
III. PAROIS CELLULAIRES : STRUCTURE, COMPOSITION ET BIOSYNTHÈSE	9
1. <i>Paroi primaire</i>	10
2. <i>Paroi secondaire</i>	10
2.1 <i>Cellulose</i>	14
2.2 <i>Polysaccharides non cellulosiques</i>	16
2.3 <i>Lignines</i>	20
IV. RÉGULATION GÉNÉTIQUE ET HORMONALE DE LA FORMATION DU BOIS	25
1. <i>Régulation génétique</i>	27
1.1 <i>Facteurs de transcription de la famille NAC</i>	28
1.2 <i>Facteurs de transcription de la famille MYB</i>	29
1.3 <i>Facteurs de transcription à homéodomaine</i>	31
1.4 <i>Autres facteurs de transcription</i>	32
1.5 <i>microARN et ARN longs non codants</i>	33
1.6 <i>Petits peptides et récepteurs kinase</i>	34
2. <i>Régulation hormonale</i>	35
2.1 <i>Auxine</i>	35
2.2 <i>Gibbérellines</i>	36
2.3 <i>Cytokinines</i>	37
2.4 <i>Autres hormones</i>	37
V. PROBLÉMATIQUE DE L'ÉQUIPE D'ACCUEIL ET OBJECTIF DE LA THÈSE.....	39
CHAPITRE I : CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE	41
I. MISE AU POINT PRÉALABLE	44
1. <i>Préparation des échantillons</i>	45
2. <i>Acquisition des spectres</i>	46
3. <i>Traitement spectral</i>	47
II. MISE EN ŒUVRE D'UNE MÉTHODE SEMI-AUTOMATISÉE D'ANALYSE D'IMAGES ATR-FTIR POUR CARACTÉRISER DES BOIS AUX PROPRIÉTÉS CONTRASTÉES.....	49
1. <i>Contexte</i>	49
2. <i>Objectifs et implication dans mon projet de thèse</i>	50
3. <i>Stratégie</i>	50
4. <i>Résultats</i>	51
5. <i>Conclusion</i>	52
6. <i>ATR-FTIR microspectroscopy brings a novel insight into the study of cell wall chemistry at the cellular level (article 1)</i>	53
7. <i>Tables et figures supplémentaires de l'article 1</i>	67
III. UTILISATION D'UNE MÉTHODE MANUELLE ERGONOMIQUE D'ASSIGNATION DES PIXELS ET REVISITE DES RÉSULTATS.....	94
1. <i>Développement d'un outil d'assignation manuelle</i>	94
2. <i>Identification des différences physico-chimiques des fibres et vaisseaux entre les différents types de bois sur les données annotées manuellement</i>	97
2.1 <i>Fibres</i>	97
2.2 <i>Vaisseaux</i>	100
2.3 <i>Discussion</i>	102
IV. CONCLUSIONS	104

(ii)

CHAPITRE II : ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE	107
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	110
1. <i>Matériel biologique et préparation des coupes</i>	110
2. <i>Microdissection par capture laser et préparation des banques RNA-Seq</i>	111
3. <i>Analyse différentielle et enrichissement fonctionnel</i>	112
4. <i>Microspectroscopie ATR-FTIR</i>	113
5. <i>Construction de réseaux de co-expression</i>	113
II. RÉSULTATS.....	114
1. <i>Identification des DAWNs</i>	114
2. <i>Transcriptome des deux types cellulaires</i>	117
3. <i>Spécificité du transcriptome des fibres</i>	120
4. <i>Spécificité du transcriptome des rayons</i>	121
5. <i>Vers une intégration des données d'analyse pariétale et de transcriptome</i>	122
6. <i>Vers un réseau de co-expression associé à la composition des parois secondaires</i>	124
6.1 <i>Le module M1, un module complexe</i>	124
6.1.1 <i>Le sous-module M1.1</i>	124
6.1.2 <i>Le sous-module M1.2</i>	131
6.1.3 <i>Le sous-module M1.3</i>	131
6.2 <i>Le module M2</i>	132
6.3 <i>Le module M3</i>	132
III. DISCUSSION, LIMITES ET PERSPECTIVES.....	146
1. <i>Composition chimique des parois</i>	146
2. <i>Cellulose synthase like : force et faiblesse de l'analyse intégrative</i>	147
3. <i>Transporteur à ATP-binding cassette : une nouvelle famille identifiée pour le transport des monolignols ?</i>	148
4. <i>L'acide abscissique : régulateur de la formation du bois et des parois secondaires ?</i>	149
5. <i>Les miR165/166 : éléments centraux dans la régulation de la formation du bois ?</i>	151
6. <i>WRKY12 : un chef d'orchestre ?</i>	152
IV. CONCLUSIONS.....	154
CHAPITRE III : CARACTÉRISATIONS PHYSIOLOGIQUE, ANATOMIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE LIGNÉES TRANSGÉNIQUES	155
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	158
1. <i>Matériel biologique</i>	158
2. <i>Caractérisation histologique</i>	160
3. <i>Microspectroscopie ATR-FTIR</i>	161
4. <i>Analyses statistiques</i>	161
II. RÉSULTATS.....	162
1. <i>Descriptions anatomique et physiologique des quatre lignées après 3 mois de culture</i>	162
1.1 <i>Physiologie de croissance</i>	162
1.2 <i>Anatomie</i>	164
1.2.1 <i>Anatomie de la lignée CCR⁻</i>	164
1.2.2 <i>Anatomie de la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺</i>	164
1.2.3 <i>Anatomie de la lignée MYB156⁺</i>	166
1.3 <i>Identification des paramètres les plus discriminants</i>	166
1.4 <i>Quel lien entre anatomie et croissance ?</i>	167
2. <i>Identification des modifications des propriétés physico-chimiques des parois des trois lignées transgéniques sélectionnées</i>	169
2.1 <i>Modifications de la composition des parois de fibres</i>	169
2.2 <i>Modifications de la composition des parois de vaisseaux</i>	173
III. DISCUSSION, LIMITES ET PERSPECTIVES.....	176
1. <i>Lignée CCR⁻</i>	176
2. <i>Lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺</i>	178

3. Lignée MYB156 ⁺	180
IV. CONCLUSIONS	181
DISCUSSION GÉNÉRALE	183
I. CRITIQUES MÉTHODOLOGIQUES	185
1. Analyse de la composition des parois à l'échelle cellulaire	185
2. Analyse du transcriptome à l'échelle cellulaire.....	188
II. ENRICHISSEMENT DU MODÈLE DE FORMATION DES FIBRES DE BOIS	188
1. SCR : un initiateur de la mise en place des parois secondaires des fibres ?	189
2. Acide abscissique : intermédiaire de la formation des parois secondaires des fibres ?	191
3. Un facteur de transcription régissant les dernières étapes de la différenciation ?.....	192
4. MYB156 : répresseur fort de la lignification des parois secondaires ?.....	194
III. PERSPECTIVES	194
EPILOGUE : VERS UNE CARACTÉRISATION DYNAMIQUE DU TRANSCRIPTOME ASSOCIÉ À LA XYLOGÉNÈSE À L'ÉCHELLE CELLULAIRE	197
I. MATÉRIELS ET MÉTHODES	200
1. Matériel végétal	200
2. Préparation des protoplastes	200
3. Observations histologiques	202
II. RÉSULTATS ET DISCUSSION	202
1. Mise au point d'un protocole de préparation de protoplastes	202
2. Application du protocole établi aux lignées transgéniques étudiées dans le chapitre III.....	207
III. LIMITES ET PERSPECTIVES	209
1. scRNA-Seq de xylème secondaire : un premier essai.....	209
2. Vers une interprétation biologique des résultats futurs	210
3. Limites de la méthode	212
CONCLUSION GÉNÉRALE	213
RÉFÉRENCES.....	217
TABLES ET FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	247

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Anatomie en coupes transversales du bois de mélèze (A), de peuplier (B) et châtaignier (C)	5
Figure 2 Comparaison des différents plans d'une coupe de bois de feuillu (Camefort, 1977)	6
Figure 3 Différenciation des fibres et des vaisseaux (Courtois-Moreau et al., 2009)	7
Figure 4 Représentation schématique de la structure des parois de fibres de bois normal (A) et de bois de tension (B) (Déjardin et al., 2010)	8
Figure 5 Représentation schématique de la composition d'une paroi primaire non lignifiée (Brett et Waldron, 1990)...	10
Figure 6 Représentation schématique de la différenciation du bois et de la mise en place des parois et de leurs composants (d'après Hertzberg et al., 2001)	11
Figure 7 Représentation schématique des voies de biosynthèse des parois secondaires	13
Figure 8 Représentation des précurseurs des lignines et de leur constituant aromatique (Lewis et Yamamoto, 1990)...	21
Figure 9 Régulation de la formation du bois de peuplier	26
Figure 10 Comparaison d'un séchage avec ou sans éthanol sur des coupes transversales de bois de peuplier	46
Figure 11 Comparaison d'une normalisation SNV (A,C) et d'une correction detrend (B,D) sur 91 spectres de fibres de bois opposé et de bois de tension	49
Figure 12 Workflow	57
Figure 13 Assignation of pixel to cell wall categories	58
Figure 14 Comparison of raw images (A–C) et cluster map (D–F) of tension wood (A, D), opposite wood (B, E) et normal wood (C, F) using one representative image per type of wood	59
Figure 15 Chemical differences between the G-layer from tension wood fibers et the S-layers from fibers of tension, opposite et normal wood	60
Figure 16 Infrared images of selected DAWNs of representative images of NW (A, D, G), OW (B, E, H) et TW (C, F, I)	61
Figure 17 Chemical differences between vessel S-layers of tension, opposite et normal wood	62
Supplementary figure 1 Crystal impacts on UT_12-C cross-section.	67
Supplementary figure 2 PCA score plot of fibres on the whole data set.	67
Supplementary figure 3 PCA loading plots of fibre S- et G-layers (A) et vessel S-layers (B)	68
Figure 18 Efficacité d'assignation de la méthode développée dans l'article 1 calculée sur quatre images par type de bois entièrement annotées manuellement à l'aide de l'outil <i>PixelAnnotation</i>	95
Figure 19 Différences chimiques entre couche-G de fibres de bois de tension et couches-S de fibres de bois de tension, de bois opposé et de bois normal.	98
Figure 20 Différences chimiques entre vaisseaux de bois de tension, de bois opposé et de bois normal.	100
Figure 21 Coupes ayant servi à la microdissection des fibres (A) et des rayons (B)	111
Figure 22 Différences physico-chimiques entre parois de fibres et de rayons de bois normal.	115
Figure 23 Identification des différences transcriptomiques entre fibres et rayons	118
Figure 24 Identification de gènes différentiellement exprimés associés aux nombres d'onde différentiellement absorbés entre parois de rayons (A-C) et parois de fibres (D-F).	123
Figure 25 Réseau de co-expression des DEG identifiés entre fibres et rayons.	127
Figure 26 Simplification du sous-groupe de gènes M1.1β	128
Figure 27 Dispositif expérimental du printemps 2019	159
Figure 28 Images photoniques des quatre lignées étudiées	160
Figure 29 Cinétique de croissance primaire (A) et secondaire (B) des quatre lignées étudiées	163
Figure 30 Caractéristiques anatomiques générales des quatre lignées étudiées	165
Figure 31 Caractéristiques anatomiques des fibres des quatre lignées étudiées	165
Figure 32 Caractéristiques anatomiques des vaisseaux des quatre lignées étudiées	166
Figure 33 Projection des individus, de variables sélectionnées et des groupes obtenus par HCPC sur les deux premières composantes de l'ACP	167
Figure 34 Graphique des corrélations entre les différents paramètres anatomiques, la hauteur et le diamètre final	168
Figure 35 Différences physico-chimiques entre parois de fibres des différentes lignées étudiées	171
Figure 36 Images photoniques en couleur de la lignée sauvage (A) et MYB156 ⁺ (B-C)	171
Figure 37 Différences physico-chimiques entre parois de vaisseaux des différentes lignées étudiées	174

Figure 38 Apports au modèle de formation des fibres de bois chez le peuplier : formation des parois secondaires et mort cellulaire programmée	191
Figure 39 Influence des différents paramètres testés durant la phase de mise au point sur le nombre de protoplastes recueillis.....	203
Figure 40 Protocole de préparation de protoplastes pour scRNA-Seq.....	204
Figure 41 Coupes transversales des tiges non écorcées (A), écorcées (B) et après digestion (C).....	206
Figure 42 Application du protocole de préparation de protoplastes aux lignées transgéniques	208
Figure 43 Vérification de l'absence de paroi sur les protoplastes isolés	210
Figure S1 Projection sur les deux premiers axes d'une analyse en composantes principales des spectres correspondant aux parois de vaisseaux de bois normal, de bois opposé et de bois de tension	249
Figure S2 Réseau de co-expression complet des DEG identifiés entre fibres et rayons.	250
Figure S3 Distribution des spectres de fibres des trois lignées transgéniques et de la lignée sauvage sur les deux premières composantes d'une analyse en composante principale.	251

LISTE DES TABLES

Supplementary table 1 Assignment of absorption bands, related to wood polymers, used in this study.	69
Supplementary table 2 Clustering efficiency	71
Supplementary table 3 <i>P</i> -value resulting from pairwise Wilcoxon test between G-layer from fibres of tension wood et S-layer from fibres of tension wood, opposite wood et normal wood	72
Supplementary table 4 <i>P</i> -value resulting from pairwise Wilcoxon test between vessels of tension wood, opposite wood et normal wood.	83
Table 1 Récapitulatif des échantillons utilisés dans cette étude.....	110
Table 2 Termes GO enrichis en utilisant la liste des gènes spécifiquement induits dans les fibres ou dans les rayons .	121
Table 3 Liste des 251 DEG représentés dans les modules M1, M2 et M3	134
Table 4 Évolution de la significativité de l'effet lignée et des différences entre chacune des trois lignées transgéniques et la lignée sauvage pour la croissance en hauteur et en diamètre.	163
Table S1 Assignation des bandes d'absorbance utilisée dans le manuscrit.....	252
Table S2 Significativité de l'effet lignée et des différences entre chacune des trois lignées transgéniques et la lignée sauvage pour les vingt-deux paramètres anatomiques analysés.....	255

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ACP	analyse en composantes principales
AGL12	AGAMOUS-like 12
AGP	protéines à arabinogalactanes
AP	Aspartic protease
ARF	Auxine Responsive Factor
ATR-FTIR	infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée
BES1	BRI EMS Suppressor 1
bHLH	Basic helix-loop-helix
CLE	Clavata/embryo surrounding region-like
Couche G	couche gélatineuse
CPUORF	Conserved peptide upstream open reading frame
CSL	Cellulose synthase like
CYP	Cytochrome P450
DAWN	Nombres d'onde différenciellement absorbés
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
GO	Gene ontology
GT	glycosyltransférase
HD-ZIP-III	Class III Homeodomain Leucine Zipper
LRR	Leucine-rich receptor-like
M46RE	MYB46-responsive cis-regulatory element
MAP	Microtubules-associated protein
miR	microARN
MLP	major latex protein-like
MRS	spectre moyen représentatif
MYB	myeloblastoma
NAC	NAM, ATAF1,2, CUC2
NST	NAC secondary cell wall thickening
NW_FibS	Couches-S des fibres de bois normal
NW_Ves	parois des vaisseaux de bois normal
OW_FibS	Couches-S des fibres de bois opposé
OW_Ves	parois des vaisseaux de bois opposé
pcc	Coefficient de corrélation de Pearson
PCN	popCORONA
PP2C	Protein phosphatase 2C
PRE	popREVOLUTA
PYR/PYL	Pyrabactin resistance / PYR1-Like
RG-I/II	rhamnogalacturonanes de type I/II
RISC	RNA-induced silencing complex
SCR	SCARECROW
SHR	SHORT ROOT
SMBE/TERE	Secondary wall NAC-binding element / tracheary element-regulating cis-element
SNBE	Secondary wall NAC binding element
SND	Secondary wall-associated NAC-domain protein
SnRK	sucrose nonfermenting 1-Related Kinase
SuSy	Sucrose synthase
TBL	trichome birefringence-like
TW_FibG	Couche-G des fibres de bois de tension
TW_FibS	Couches-S des fibres de bois de tension
TW_Ves	parois des vaisseaux de bois de tension

VND	Vascular-related NAC-domain
VNI	VND-interacting2

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Le peuplier : espèce d'intérêt économique et modèle pour la biologie fonctionnelle des arbres

Originaires des régions tempérées à froides de l'hémisphère Nord, les peupliers sont des *Eudicotylédones de la famille des Salicacées*. Les trente espèces du genre *Populus* sont réparties en six sections botaniques (*Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Populus*, *Tacamahaca* et *Turanga*) sur la base de critères écologiques et morphologiques (Dickmann et Kuzovkina, 2014). Les peupliers sont une essence pionnière des ripisylves et milieux humides (Dickmann et Kuzovkina, 2014). En France, on trouve trois espèces autochtones qui sont le peuplier noir (*Populus nigra* L.), le peuplier blanc (*Populus alba* L.) et le tremble (*Populus tremula* L.). Ces espèces constituent une part importante du patrimoine naturel forestier et paysager. Dans ces populations naturelles, il n'est pas rare de retrouver des hybrides interspécifiques (e.g. *P. tremula* x *P. alba*). Des croisements interspécifiques non-sympatriques, notamment entre des peupliers européens et nord-américains, ont par la suite été réalisés (e.g. *Populus deltoides* x *P. nigra*) (Dickmann et Kuzovkina, 2014). Ces hybrides se sont montrés plus performants à plusieurs niveaux : croissance et qualité du bois, résistance aux pathogènes ou encore résilience aux fluctuations environnementales (Stettler et al., 1988; Marron et al., 2006; Dillen et al., 2013).

Sa rapidité de croissance et la qualité de son bois ont conduit à l'exploitation croissante du peuplier au niveau mondial. En France, le peuplier est la deuxième essence feuillue la plus récoltée après le chêne (Sédillot, 2017). Les peupleraies sont principalement des cultures monoclonales avec une rotation relativement rapide (15-20 ans). Son bois est essentiellement valorisé dans l'industrie du déroulage (emballage léger, panneau de contreplaqué). Il peut également être utilisé par l'industrie papetière toutefois moins rémunératrice. Le peuplier peut également être cultivé, de manière plus anecdotique, en taillis à courte rotation (5-7 ans). Son bois est alors dédié à l'industrie bioénergétique sous forme de granulés et de plaquettes. Des projets sont également en cours de développement pour que son bois puisse être utilisé pour la production de bioéthanol. L'industrie papetière valorise principalement la fibre de cellulose du bois. Pour une utilisation en biocarburant, l'intérêt porte essentiellement sur la fraction polysaccharidique (cellulose et, dans une moindre mesure, hémicelluloses) de la biomasse (Abramson et al., 2010). Or, les lignines, via leur hydrophobicité, empêchent fortement la libération de ces sucres (Li et al., 2008; Vanholme et al., 2010; Höfte, 2013; Meineke et al., 2014). On parle alors de récalcitrance de la biomasse lignocellulosique. Ces industries ont alors recours à des procédés nécessitant l'emploi de produits chimiques toxiques ou des traitements

thermiques très énergivores. Par ingénierie génétique, il est possible de modifier la structure et la quantité de lignines dans la paroi (*e.g.* Pilate et al., 2002; Leplé et al., 2007; Van Acker et al., 2014, 2017). Cependant, il faut veiller à ce que cette modification n'impacte que faiblement la croissance de l'arbre et sa tolérance aux pathogènes. La structure et la composition des parois cellulaires du bois, et plus particulièrement des fibres de bois, se posent donc comme des facteurs clefs de la valorisation des arbres.

Outre son fort intérêt économique, le peuplier présente également un intérêt en recherche fondamentale. En effet, sa vitesse de croissance, la facilité d'obtenir des clones par bouturage (Zufa, 1971; Brown et Sommer, 1982; Chun, 1993), la possibilité d'étudier la fonction des gènes *in planta* par transformation génétique (Leplé et al., 1992; Busov et al., 2005; Maheshwari et Kovalchuk, 2016) ainsi que la disponibilité et la petite taille de son génome (*Populus trichocarpa* Torr & Gray cv Nisqually-1, 423 Mbp) (Tuskan et al., 2006) l'ont imposé comme espèce modèle pour les feuillus (Bradshaw et al., 2000; Taylor, 2002; Brunner et al., 2004; Cronk, 2005; Jansson et Douglas, 2007; Ellis et al., 2010; Douglas, 2017). La publication du génome de *P. trichocarpa* (Tuskan et al., 2006) et la découverte de nombreux variants alléliques de type polymorphisme nucléotidique (Geraldès et al., 2013; Faivre-Rampant et al., 2016; Rogier et al., 2018) a permis l'application de la génétique d'association au peuplier. Ces études ont alors permis de découvrir des régions génomiques associées, par exemple, à la croissance de l'arbre et la qualité du bois (Zhang et al., 2006; Freeman et al., 2009; Baison et al., 2019; Müller et al., 2019). Ces études, associées à la facilité de transformation de certains génotypes de peupliers, ont permis l'avènement de la génomique fonctionnelle. Cette approche repose sur l'étude de la fonction d'un gène par (i) génétique inverse (*i.e.* étude du phénotype de plantes transformées ou mutées pour le gène étudié), (ii) analyse de sa séquence et comparaison à d'autres gènes proches (*e.g.* identification de motifs conservés), (iii) localisation de la protéine (dans la cellule et/ou l'organisme), (iv) analyse des interactants moléculaires (*e.g.* identification de séquences cis-régulatrices en région promotrice) et (v) analyse de l'expression du gène. Avec 458 articles publiés¹, le clone INRA 717-1B4 (*Populus tremula* x *Populus alba*), très sensible à *Agrobacterium tumefaciens* (Leplé et al., 1992) et dont le génome est séquencé (Mader et al., 2016), semble être un des éléments clefs des recherches en génomique fonctionnelle chez le peuplier. Ainsi, depuis près de trente ans, un grand nombre de laboratoires utilisent ce génotype afin de comprendre divers processus

¹ "INRA 717" sur Google Scholar, Mars 2021

biologiques spécifiques des arbres tels que la survie pluriannuelle, les réactions de l'arbre face aux contraintes biotiques et abiotiques ou encore la formation du bois.

II. Xylogénèse

Toute croissance végétale se déroule au niveau de méristèmes. Les méristèmes, tissus composés de cellules peu différenciées pouvant se diviser activement, peuvent être primaires ou secondaires. Les méristèmes primaires se retrouvent au niveau des coiffes racinaires, de l'apex des tiges et rameaux et à l'aisselle des feuilles dans les bourgeons axillaires. Ils assurent alors la croissance de la plante en longueur. On parle de croissance primaire. Les méristèmes secondaires assurent ce qu'on appelle la croissance secondaire. Ces derniers ne sont donc pas présents dans tout le règne végétal. Ils se développent après la mise en place des tissus primaires et permettent la croissance des tissus secondaires. Ces méristèmes sont le phellogène qui forme les tissus protecteurs de l'arbre et le cambium qui forme les tissus conducteurs et de soutien de celui-ci. Dans cette thèse, nous nous intéressons à la formation du bois, produit au niveau du cambium, et ne développerons donc pas plus avant la croissance primaire des arbres ainsi que la formation de leurs tissus protecteurs.

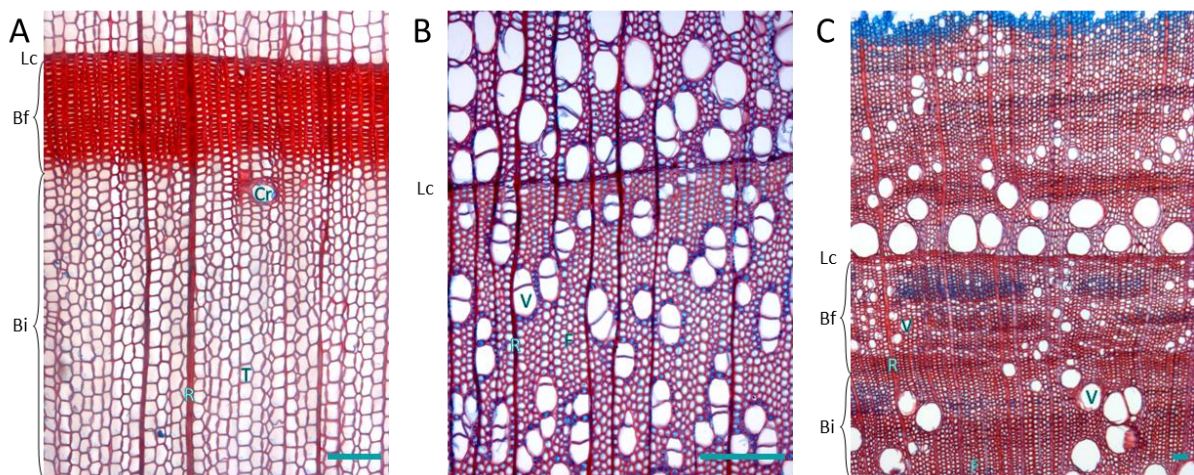


Figure 1 Anatomie en coupes transversales du bois de mélèze (A), de peuplier (B) et châtaignier (C) (Crédit photo : Françoise Laurans, INRAE Val de Loire).

Bi : bois initial, Bf : bois final, Lc : limite de cerne, Cr : canal résinifère, T : trachéïdes, R : rayons, V : vaisseaux, F : fibres. Coloration Bleu alcian – Safranine. Barre d'échelle : 200 μ m.

Les arbres atteignent des hauteurs et des durées de vie considérables grâce, notamment, aux propriétés remarquables de leur bois. En effet, le bois remplit trois fonctions principales : (i) la conduction de l'eau de la racine au houppier, (ii) le support et maintien mécanique de l'arbre en croissance et face aux aléas environnementaux et (iii) le stockage de réserves temporaires, capitales pour la survie de l'arbre au fil des ans (Plomion et al., 2001; Déjardin et

al., 2010). Ces trois fonctions sont assurées par des types cellulaires bien distincts. Chez les résineux comme le mélèze, le bois est majoritairement composé de trachéides assurant la conduction de la sève et le maintien mécanique, et de rayons parenchymateux assurant les échanges entre le phloème et le xylème ainsi que le stockage des réserves (**fig. 1A**). Chez les feuillus, alors qu'on retrouvera les rayons parenchymateux, on observe une spécialisation cellulaire avec les cellules de vaisseaux impliquées dans le transport de la sève brute et les cellules de fibres assurant en grande partie le support mécanique. Bien que possédant ces trois types cellulaires, le bois chez les feuillus peut, suivant les espèces, présenter une organisation différente. Les bois dit à pores diffus comme chez le peuplier (**fig. 1B**) présentent une répartition homogène des pores (*i.e.* des vaisseaux) tout au long de l'année. A l'inverse, les bois dit à zone initiale poreuse comme chez le châtaignier (**fig. 1C**) présentent des vaisseaux d'un diamètre plus important dans le bois produit au printemps que dans le bois d'été (Carlquist, 1988; Déjardin et al., 2010). Par ailleurs, le bois, qu'il soit de résineux ou de feuillu, présente une structure anisotrope (**fig. 2**). En effet, il est composé de deux systèmes, l'un vertical, l'autre horizontal. Le système vertical, composé des cellules mortes de fibres et de vaisseaux, assure la conduction de la sève brute et le support mécanique comme annoncé plus haut. Le système horizontal, composé des cellules vivantes de rayon parenchymateux, permet, lui, le transfert des assimilats et leur stockage en hiver sous forme d'amidon et de lipides. Ainsi, le bois est un assemblage complexe des parois secondaires des fibres et vaisseaux, interconnectés aux cellules vivantes de rayons (Déjardin et al., 2010).

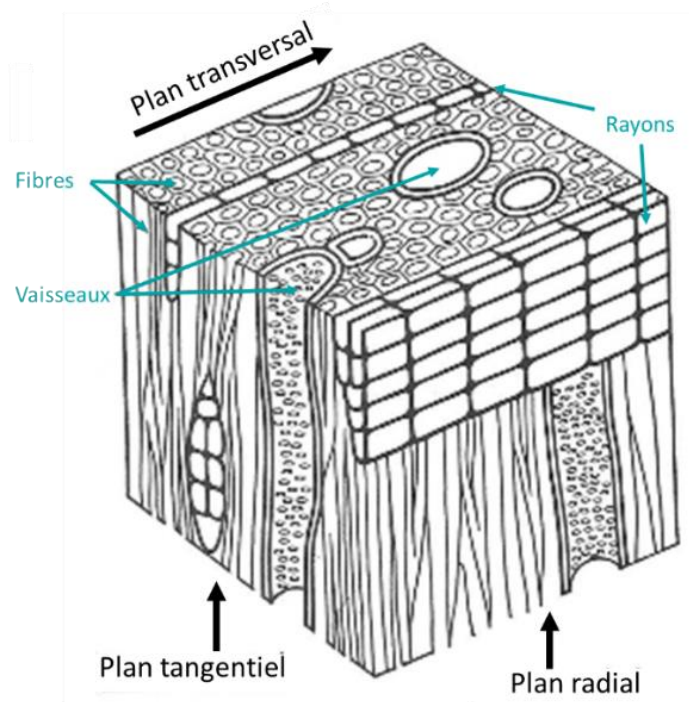


Figure 2 Comparaison des différents plans d'une coupe de bois de feuillu (Camefort, 1977)

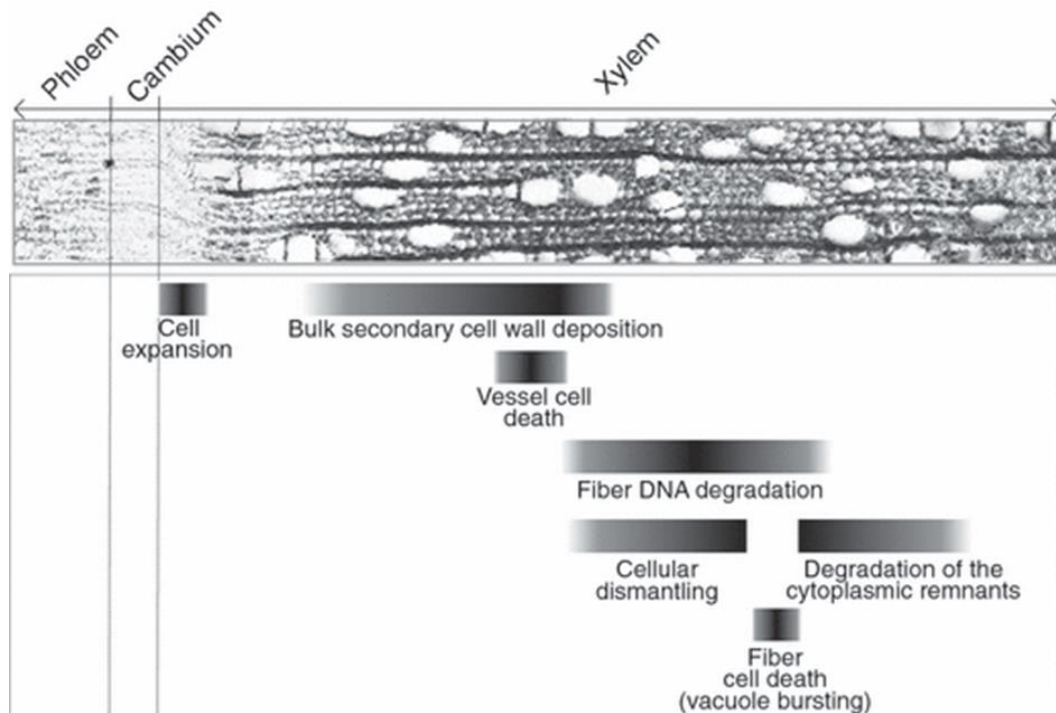


Figure 3 Différenciation des fibres et des vaisseaux (Courtois-Moreau et al., 2009)

Par ailleurs, chacun de ces types cellulaires présente un schéma de développement spécifique (**fig. 3**). En zone tempérée, au printemps, le cambium reprend son activité de division cellulaire. Suite à ces divisions, les cellules méristématiques produisent des cellules appelées initiales radiales et d'autres appelées initiales fusiformes. Les premières ont une croissance transversale et donnent les cellules de rayon alors que les secondes se différencient en cellules allongées longitudinalement, à l'origine des fibres et des vaisseaux (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Déjardin et al., 2010). Les vaisseaux sont de longs tubes à fort diamètre. Ils sont produits après autolyse des cellules de vaisseaux qui sont reliées entre elles par des ponctuations créées par lyse des parois transversales (Bailey, 1944). Les jeunes cellules de vaisseaux subissent une forte augmentation de leur volume vacuolaire ainsi qu'une formation rapide de leur paroi. Cette paroi est très rapidement lignifiée, rendant alors les cellules hydrophobes (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Laurans et al., 2006; Déjardin et al., 2010). Suite à de fortes contraintes spatiales, les jeunes cellules de fibre ont, elles, une croissance intrusive (Siedlecka et al., 2008). Une épaisse paroi secondaire commence à se déposer après cette phase d'expansion cellulaire. Ce dépôt est associé au processus de lignification, qui débute au niveau des coins cellulaires et se propage de la lamelle moyenne vers la membrane plasmique. Pour les cellules de fibres et de vaisseaux, la différenciation cellulaire se termine par l'hydrolyse du protoplasme et donc la mort de la cellule (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Laurans et al., 2006; Courtois-Moreau et al., 2009; Déjardin

et al., 2010). Enfin, les cellules de rayons proviennent de divisions des initiales radiales. Contrairement aux cellules de fibres et de vaisseaux qui subissent rapidement une mort cellulaire, les rayons parenchymateux restent vivants beaucoup plus longtemps. La mort des cellules de rayons conduit à la libération de phénols, étape essentielle à la formation d'un bois durable : le duramen. Contrairement à l'aubier, ce bois est alors composé exclusivement de paroi de cellules végétales mortes (Déjardin et al., 2010). Ces éléments laissent donc entrevoir un lien étroit entre xylogénèse, différenciation cellulaire et parois végétales.

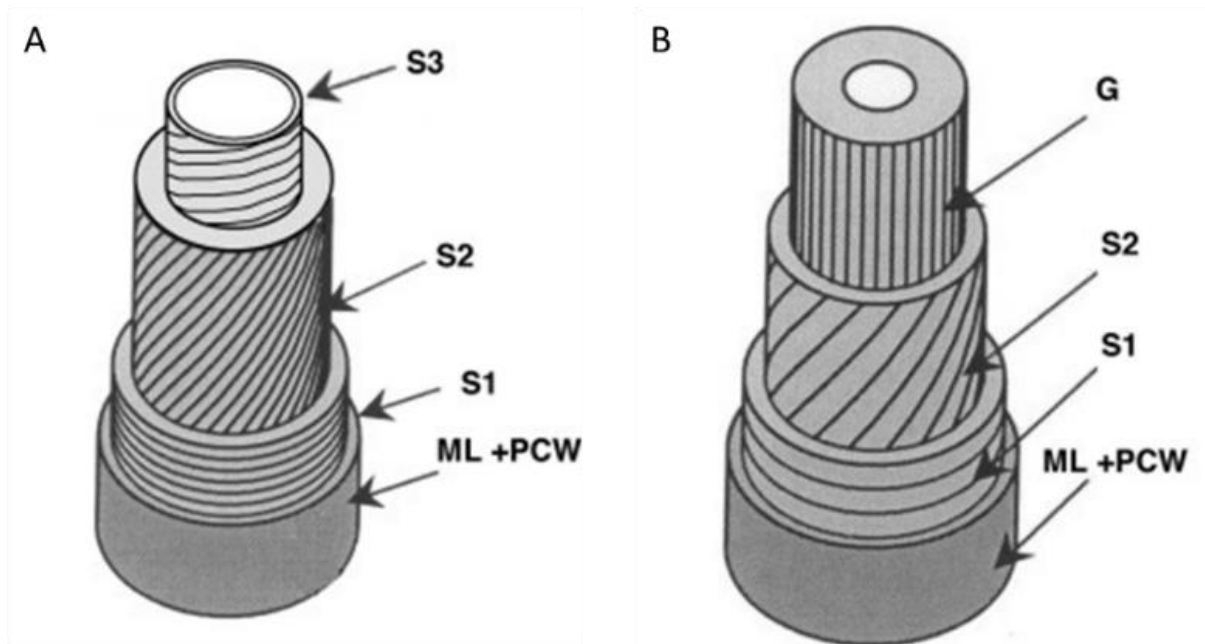


Figure 4 Représentation schématique de la structure des parois de fibres de bois normal (A) et de bois de tension (B) (Déjardin et al., 2010)

ML : lamelle moyenne, *PCW* : paroi primaire, *S1-3* : sous-couches 1, 2 et 3 de la paroi secondaire, *G* : couche gélatineuse.

Au-delà de cette complexité cellulaire, le bois est un tissu extrêmement variable. En région tempérée, l'arbre produit deux types de bois au cours de la saison de végétation : le bois initial formé au printemps et le bois final formé en été (fig. 1). Le bois initial est caractérisé par de larges trachéides aux parois minces chez les résineux et des vaisseaux souvent plus larges chez les feuillus. Ce bois est généralement moins dense que le bois final (Higuchi, 1997). La structure de ces deux bois reflète par ailleurs les conditions climatiques régnant lors de leur formation, avec notamment une plus grande disponibilité en eau au printemps. Ainsi, le bois peut être révélateur d'aléas climatiques passés. Par exemple, en cas de sécheresse ou de canicule, l'arbre va arrêter sa croissance ce qui laissera apparaître un faux-cerne (Gruber et al., 2010). En réponse à certaines contraintes environnementales (*e.g.* pente, vents forts et persistants), l'arbre produit un bois de réaction appelé bois de tension (tension wood, TW) chez

les feuillus. Ce bois, aux propriétés mécaniques exceptionnelles, permet à l'arbre de se redresser et de maintenir son port. Les fibres de bois de tension de peuplier comportent une couche extra-numéraire très particulière nommée couche gélatineuse (ou couche G) (Daniel et al., 2006). Cette couche, située à la place des habituelles S2 et/ou S3 (cf **III** et **fig. 4**), est constituée majoritairement de cellulose, de polysaccharides non-cellulosiques, principalement des RG-I¹ et des AGP² (Gorshkova et al., 2015; Guedes et al., 2017). Jusqu'alors, le consensus scientifique sur la présence ou non, en faible quantité, de lignines, ou du moins de composés phénoliques, dans cette couche n'a pas été établi (Joseleau et al., 2004; Pilate et al., 2004; Gierlinger et Schwanninger, 2006a). Dans la couche G, les microfibrilles de cellulose sont beaucoup plus cristallines et sont orientées dans l'axe de la fibre (**fig. 4**; Norberg et Meier, 1966; Gorshkova et al., 2015). D'après l'étude de Clair et ses collaborateurs (2008), les microfibrilles de cellulose sont mises sous tension dans la couche G et sont impliquées dans la mise en place des contraintes de maturation permettant à l'arbre de se redresser.

III. Parois cellulaires : structure, composition et biosynthèse

Chez tout organisme pluricellulaire, on retrouve une matrice extracellulaire permettant la cohésion des cellules entre elles. Chez les végétaux, cette matrice porte le nom de paroi végétale et se décompose en lamelle moyenne, paroi primaire. Certaines cellules spécialisées développent également une paroi secondaire (**fig. 4**). La paroi définit la forme des cellules végétales et donc la morphologie des organes et tissus. Elle a principalement un rôle de protection contre les agressions biotiques et abiotiques et de résistance mécanique (McFarlane et al., 2014). Les parois végétales sont constituées de réseaux complexes de polymères interagissant entre eux. On y retrouve des polysaccharides tels que la cellulose, les hémicelluloses ou les pectines, des glycoprotéines telles que des extensines ou des AGP et des polyphénols tels que les lignines (Held et al., 2015). La proportion de chaque composé varie en fonction des espèces, des types cellulaires ou des types de parois. Dans le bois mature de peuplier (composé essentiellement des parois de cellules mortes, cf **II**), on retrouve environ 50% de cellulose, 20 à 30 % d'hémicelluloses et 20 à 30% de lignines avec un ratio polysaccharides/polyphénols de 3,2 (Déjardin et al., 2010; Sannigrahi et al., 2010; Chen et al., 2018; Wang et al., 2018). Les pectines et protéines, majoritairement situées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire, sont présentes à l'état de traces.

¹ rhamnogalacturonanes de type I

² protéines à arabinogalactanes

1. Paroi primaire

Synthétisée durant les dernières étapes de la division cellulaire, dès le début de la différenciation, la paroi primaire est fine et très hydratée. Elle se compose majoritairement de cellulose dans un premier temps. Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées sans organisation précise. Des hémicelluloses, principalement des glucuronoxylanes, des pectines, principalement des RG-I, des protéines de structure et des lignines sont ensuite déposées entre les microfibrilles de cellulose (**fig. 5**; Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Cosgrove et Jarvis, 2012). Cette paroi reste relativement souple durant toute l'étape de différenciation cellulaire pour permettre l'expansion de la cellule.

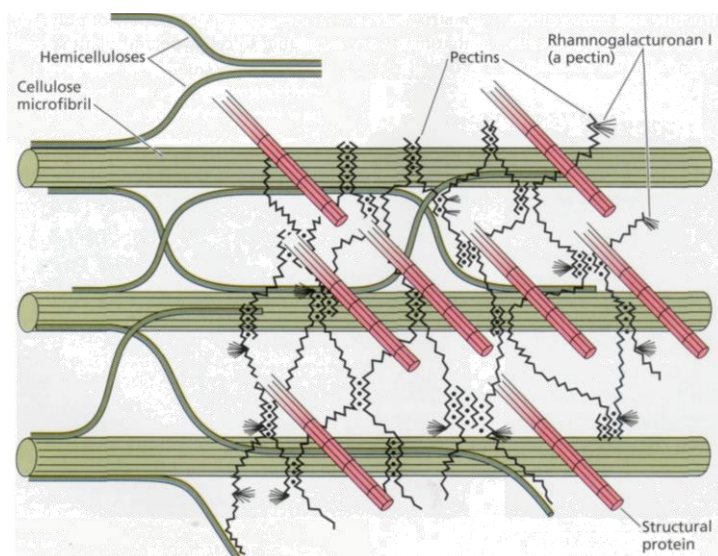


Figure 5 Représentation schématique de la composition d'une paroi primaire non lignifiée (Brett et Waldron, 1990)

2. Paroi secondaire

La paroi secondaire est synthétisée à la fin de l'élongation cellulaire (**fig. 6**). Elle peut être considérée comme la plus importante de par son épaisseur et son rôle dans les propriétés mécaniques du bois. Elle est divisée en trois sous-couches distinctes (nommées S1, S2 et S3), dont la S2 est la plus épaisse (**fig. 4**). Ces sous-couches se distinguent notamment par l'orientation des microfibrilles de cellulose par rapport à l'axe de la cellule et par la cristallinité de la cellulose (Barnett et Bonham, 2004). En effet, alors que l'angle des microfibrilles (MFA) est presque perpendiculaire (60 à 90°) à la cellule pour les sous-couches S1 et S3, cet angle est très faible (5 à 40°) dans la sous-couche S2 (Kollmann et Côté, 1968; Plomion et al., 2001). La structure des parois secondaires est souvent comparée à celle du béton armé, les microfibrilles de cellulose prenant lieu et place du grillage métallique et les hémicelluloses et lignines, plus amorphes, représentant le béton. Leurs propriétés mécaniques s'apparentent également à celles de ce matériau composite (Kerstens et al., 2001; Barnett et Bonham, 2004). La formation des

parois secondaires est un processus très ordonné durant lequel la biosynthèse et le transport des différents composés de la paroi sont contrôlé spatio-temporellement. Elle peut être divisée en quatre moments clés : production des précurseurs des polymères, production des enzymes biosynthétiques, transfert des enzymes et, enfin, précurseurs et assemblage de la paroi (Carpita et al., 2001a; Kumar et al., 2016).

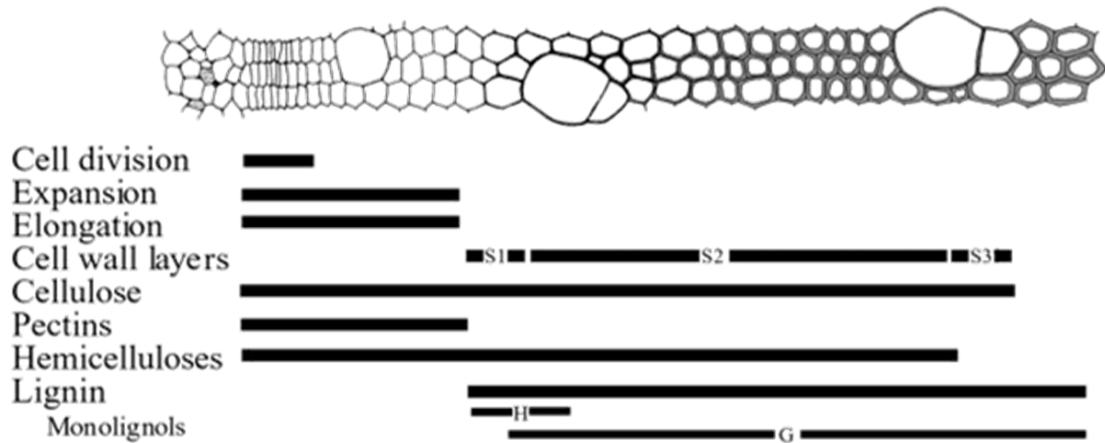
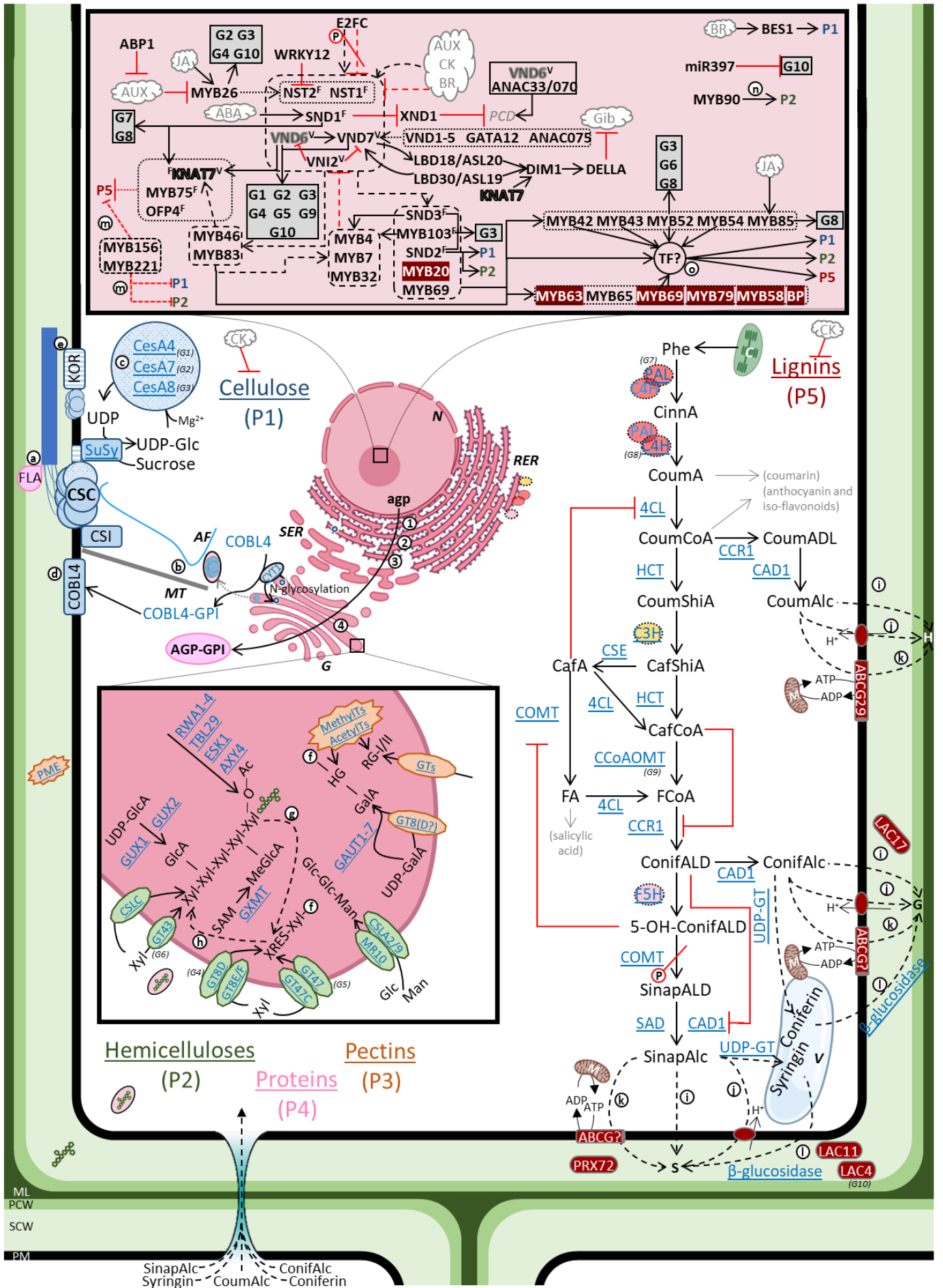


Figure 6 Représentation schématique de la différenciation du bois et de la mise en place des parois et de leurs composants (d'après Hertzberg et al., 2001)



◀ **Figure 7** Représentation schématique des voies de biosynthèse des parois secondaires

Cette représentation schématique se base sur une revue extensive de la littérature et se veut représentative des connaissances actuelles.

(1) Ancrage GPI (2) transformation des prolines en hydroxyprolines (3) glycosylation mineure par l'action de galactosyltransferase (GALT)2 (4) glycosylation par l'action de GALT2, GALT5, GALT9; GALT29A, GALT31A, galacturonique actid transferase (GalAT)14A, GalAT14B, GalAT14C, fucosyltransferase (FUT)4, FUT6 et/ou reduced arabinose yariv(RAY)1 ; (a) FLA serait impliqué dans les premières étapes de la formation des microfibrilles de cellulose. (b) Les vésicules contenant les CSC sont conduites vers la membrane plasmique à l'aide soit des microtubules, soit des filaments d'actines. (c) Chaque lobe est composé de trois, quatre ou six unités catalytiques. Ces unités peuvent être hétéromériques ou homomériques. (d) COBL4 serait impliqué dans la biosynthèse et l'extension de la cellulose. (e) KOR serait en interaction avec le CSC et aurait un rôle dans la terminaison de la chaîne de glucane, la cristallinité de la cellulose et/ou la formation des microfibrilles. (f) la XRES serait produite par ajout de glycosyl sur un résidu de xylose attaché à une molécule comme une protéine, un lipide ou un HG. (g) XRES servirait de site d'initiation pour la croissance de la chaîne de xylose par transfert sur l'extrémité non-réductrice. (h) XRES pourrait également être le terminateur de la synthèse de la chaîne de xylane. (i-l) une fois produits, les précurseurs des lignines sont transférés vers la paroi par diffusion passive (i), transport actif secondaire (j), transport actif primaire (k) ou libération post-mortem des précurseurs glycosylés stockés dans la vacuole (l). (m) MYB156 et MYB221 semblent avoir un rôle d'inhibiteur dans les voies de biosynthèse de la cellulose (P1) et des hémicelluloses (P2) et des lignines (P5). (n) MYB90 aurait un rôle d'activateur de la voie de biosynthèse des hémicelluloses. (o) les interactions précises entre facteurs de transcription et cibles dans les voies de biosynthèses n'ont pas encore été totalement élucidées. Il est possible que ces interactions passent par d'autres facteurs de transcription.

Gras noir : transcrits ; bleu : enzyme ; bleu souligné : enzyme active ; noir : métabolites ; Gris : hormone ; Flèche noire : activateur ou action enzymatique ; Flèche plate rouge : inhibiteur ; fond rouge foncé : facteur de transcription activant la voie de biosynthèse des lignines.

ML : lamelle moyenne ; PCW : paroi primaire ; SCW : paroi secondaire ; N : noyau ; RER : réticulum endoplasmique rugueux ; SER : réticulum endoplasmique lisse ; G : appareil de Golgi ; M : mitochondrie ; C : chloroplaste ; V : vacuole ; AF : filament d'actine ; MT : microtubule ; PCD : mort cellulaire programmée ; AUX : auxine ; JA : acide jasmonique ; ABA : acide abscissique ; CK : cytokinine ; BR : brassinolides ; Gib : gibbérellines ; ABP : auxin binding protein ; BRI : brassinostéroïde insensible ; BES1 : BRII EMS suppressor ; miR : microRNA ; MYB : Myeloblastoma ; E2FC : E2-promoter binding factor C ; NST : Nac Secondary Cell Wall Thickening ; SND : secondary wall-associated NAC-domain protein ; VND : vascular NAC-domain ; XND : xylem NAC-domain ; ANAC : abscissic acid responsive NAC ; VNI : VND-interacting ; LBD : lateral organ boundaries domain ; ASL : asymmetric leaves2-like ; DIM : defective entry into mitosis ; KNAT : knotted Arabidopsis thaliana ; OFP : ovate family protein ; TF : facteur de transcription ; CSC : cellulose synthase complex ; Cesa : cellulose synthase ; SuSy : sucrose synthase ; FLA : fasciclin-like arabinogalactane ; KOR : korrigan ; CSI : cellulose synthase interactive ; COBL : cobra-like ; CYT : cytochrome ; GPI : glycosylphosphatidylinositol ; AGP : protéine à arabinogalactane ; PME : pectin méthylesterase ; MethylTs : méthyltransferases ; AcetylTs : acétyltransferases ; GUX : glucuronyltransferase ; GT : glycosyl transferase ; CSLC : cellulose synthase-like C ; CSLA : cellulose synthase-like A ; GXMT : glucuronoxylan méthyltransferase ; GAUT : galaturonosyltransferase ; RWA : reduced wall acetylation ; TBL : trichome birefringence like ; ESK : eskimo ; AXY : altered xyloglucan ; MR : mucilage related ; PAL : phenylalaline ammonia-lyase ; C4H : cinnamic acid 4-hydrolase ; 4CL : 4-coumarate coenzyme A ligase ; CCR : cinnamoyl coenzyme A reductase ; CAD : cinnamyl alcohol deshydrogenase ; HCT : shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase ; C3H : p-coumarate 3-hydroxylase ; CSE : caféoyl shikimate esterase ; COMT : caféric acid O-méthyltransferase ; CCoAOMT : caféoyl coenzyme A O-méthyltransferase ; SAD : sinapyl alcohol deshydrogenase ; UDP-GT : uridine diphosphate glycosyltransferase ; ABCG : ATP-binding cassette transporter ; LAC : laccase ; PRX : peroxidase. UDP : uridine diphosphate ; Glc : glucose ; GlcA : acide glucuronique ; Xyl : xylose ; MeGlcA : acide glucuronique méthylé ; SAM : S-adenosylmethionine ; GalA : acide galacturonique ; ; Man : mannose ; Ac : acétyle ; XRES : xylan reducing end sequence ; HG : homogalacturonanes ; RG : rhamnogalacturonanes ; SinapAlc : alcool synapylique ; CoumAlc alcool coumarylique ; ConifAlc : alcool coniferylique ; Phe : phenylalaline ; CinnA : acide cinnamique ; CoumA : acide p-coumarique ; CoumCoA : p-coumaroyl coenzyme A ; CoumALD : p-coumaraldehyde ; CoumShiA : acide p-coumaroyl shikimique ; CafA : acide caféique ; CafShiA : acide caféoyl shikimique ; CafCoA : caféoyl coenzyme A ; FA : acide férulique ; FCoA : feruloyl coenzyme A ; ConifALD : coniferaldehyde ; SinapALD : sinapaldehyde ; ATP : adenosine tri-phosphate ; ATP : adenosine diphosphate. Les spécificités cellulaires sont indiquées en exposant des facteurs de transcription. F : fibres ; V : vaisseaux.

2.1. Cellulose

La cellulose est un polymère linéaire plus ou moins cristallin de glucoses liés par des liaisons $\beta,1-4$ (Martínez-Sanz et al., 2017). Elle est synthétisée au niveau de la membrane plasmique par de petites rosettes transmembranaires appelées CSC¹. Ces complexes sont composés de six complexes protéiques eux-même constitués de plusieurs unités catalytiques appelées CesA². Ces unités catalytiques sont produites dans les ribosomes associés au réticulum endoplasmique. Elles sont ensuite assemblées dans l'appareil de Golgi puis transportées vers la membrane sous forme de MASC³ ou SmaCC⁴ le long des microtubules ou à l'aide des filaments d'actine (fig. 7; Haigler et Brown, 1986; Baskin, 2001; Paredez et al., 2006; Wightman et Turner, 2008, 2010; Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009; Sampathkumar et al., 2013). Chaque CesA synthétise une chaîne de glucane par conversion d'UDP-Glc⁵ cytoplasmique, produit, pour tout ou partie, par l'enzyme SuSy⁶ (fig. 7; Amor et al., 1995; Pear et al., 1996; Delmer, 1999; Barratt et al., 2009; Coleman et al., 2009; Endler et Persson, 2011). Ces chaînes se lient ensuite les unes aux autres pour former une structure cristalline (Wightman et Turner, 2010). Il est donc possible d'identifier le nombre de CesA composant chaque globule de CSC en étudiant le nombre de chaîne par fibrille élémentaire. Un premier modèle composé de 36 chaînes de glucane laisse suggérer que chaque globule de CSC est composé de six unités catalytiques (Herth, 1983; Scheible et al., 2001; Doblin et al., 2002; Mutwil et al., 2008). Ce modèle, largement adopté par la suite, a été remis en question par la combinaison d'analyses en spectroscopies WAXS⁷, SANS⁸, et RMN⁹ et FTIR¹⁰ (Kennedy et al., 2007; Fernandes et al., 2011; Jarvis, 2013; Newman et al., 2013; Thomas et al., 2013). Deux nouveaux modèles ont alors été proposés. Le premier modèle, établi par comparaison d'observations SAXS à une simulation informatique, est composé de 24 chaînes de glucanes (Fernandes et al., 2011). Ici, chaque globule de CSC serait alors composé de quatre CesA. Le second modèle est composé de 18 chaînes de glucanes ce qui porte ici à trois le nombre de CesA par globule (Kennedy et al., 2007; Fernandes et al., 2011; Jarvis, 2013; Newman et al., 2013; Thomas et al., 2013). Ce dernier modèle est appuyé par l'existence d'une stœchiométrie équimolaire de chaque protéine

¹ Cellulose synthase complex

² Cellulose synthase

³ Microtubule-associated cellulose synthase

⁴ Small cesa compartments

⁵ Uridine diphosphate glucose

⁶ Sucrose synthase

⁷ Wide angle x-ray scattering

⁸ Small angle neutron scattering

⁹ Résonance magnétique nucléaire

¹⁰ Infrarouge à transformée de Fourier

au sein d'un globule de CSC (Gonneau et al., 2014; Hill et al., 2014). Il est également possible que ces trois modèles coexistent et ne diffèrent qu'en fonction des espèces.

Chez le peuplier, dix-huit gènes *CesA* ont été identifiés, contre dix chez *Arabidopsis thaliana* (Richmond et Somerville, 2000; Djerbi et al., 2005). Parmi eux, onze (*CesA4*, *CesA7A*, *CesA7B*, *CesA8A*, *CesA8B*, *CesA1A*, *CesA1B*, *CesA3C*, *CesA3D*, *CesA6A* et *CesA6B*) ont été identifiés comme intervenants dans la synthèse des microfibrilles de cellulose (Xi et al., 2017; Turner et Kumar, 2018). La cellulose de la paroi primaire est principalement synthétisée par les *CesA1*, *CesA3* et *CesA6* (Arioli et al., 1998). Les *CesA4*, *CesA7* et *CesA8* sont, elles, plutôt spécifiques de la formation de la paroi secondaire (fig. 7; Turner et Somerville, 1997; Taylor et al., 1999, 2003; Gardiner et al., 2003). Ces trois *CesA* sont retrouvées de façon équimolaire chez *Arabidopsis thaliana* et *Picea abies*. Dans le xylème en formation de peuplier en revanche, on retrouve respectivement trois et deux fois plus de *CESA8* et *CESA4* que de *CESA7*. Ces ratios sont même exacerbés lors de la formation de bois de tension avec respectivement huit et trois fois plus de *CESA8* et *CESA4* que de *CESA7* (Zhang et al., 2018). Au vu de ces ratios, le premier modèle établi par Herth (1983), à savoir six *CesA* par globule de CSC, est celui qui correspond le mieux pour le peuplier (fig. 7; Doblin et al., 2002; Zhang et al., 2018). Ainsi, chaque globule de CSC serait un hétérohexamère composé de trois *CesA8*, deux *CesA4* et une *CesA7*, toutes n'étant pas nécessairement actives simultanément (Zhang et al., 2018). Par ailleurs, la présence de ces trois protéines est nécessaire pour un fonctionnement correct des CSC (Taylor et al., 2003; Song et al., 2010; Joshi et al., 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, la position des CSC au sein de la membrane plasmique est définie par les *AtMAP70-5*¹ et *AtMAP70-1* (Pesquet et al., 2010). Plus récemment, une expérience de dépolymérisation des microtubules chez *Arabidopsis thaliana* a montré un défaut d'organisation des CSC au niveau de la membrane plasmique, sans réel impact sur leurs déplacements au niveau de la membrane plasmique ni sur la quantité de cellulose produite (Watanabe et al., 2015). Enfin, une étude combinant transcriptomique, protéomique et trois types de métabolomiques avec une modélisation par projection orthogonale aux structures latentes a permis d'élucider le rôle des protéines membranaires de type SCAMP² dans la formation des parois (Obudulu et al., 2018). Ces protéines réguleraient l'accumulation de composés pariétaux en changeant, notamment, le trafic membranaire. Cela a pour effet de régler avec précision l'abondance de précurseurs pariétaux et/ou des protéines impliqués dans la formation des parois, *CesA* comprises.

¹ MAP : Microtubules-associated protein

² Secretory carrier-associated membrane proteins

Longtemps considérée comme plus simple que les autres voies de biosynthèse, la biosynthèse de la cellulose se révèle tout aussi complexe. En effet, le fonctionnement et la régulation de ces Cesa au niveau de la membrane plasmique impliquent un grand nombre de gènes dont les gènes *COBRA*, *KOR*¹ et *CSI*² (**fig. 7**; Doblin et al., 2002; Roudier et al., 2005). L'étude des gènes coexprimés avec les *Cesa* a mis en évidence que les gènes *COBLA*³, *germin-like*, *CTL2*⁴ ainsi que des gènes codant pour des AGP comme les gènes *FLA*⁵ étaient exprimés au cours de la formation de la cellulose (**fig. 7**; Brown et al., 2005). Les gènes *COBRA* et *COBL* produisent des protéines transmembranaires impliquées dans la biosynthèse et l'extension de la cellulose (Schindelman et al., 2001; Li et al., 2003; Persson et al., 2005; Hochholdinger et al., 2008; Dai et al., 2011). La protéine COBL4 plus particulièrement semble faciliter la formation des microfibrilles (**fig. 7**; Brown et al., 2005; Persson et al., 2005). Cependant, la relation précise entre CSC et protéines COBRA et COBL n'a pas encore été élucidée. Le gène *KOR* code pour une endo- β -glucanase qui serait nécessaire dans les dernières étapes de formation de la cellulose (**fig. 7**; Nicol et al., 1998; Lane et al., 2001; Sato et al., 2001; Szyjanowicz et al., 2004). Plus récemment, une étude a montré que cette enzyme fait partie intégrante des CSC et est impliquée dans le déplacement des CSC au niveau de la membrane plasmique et leur trafic intracellulaire (Vain et al., 2014). Le gène *CSI* code lui aussi pour un composant structurel des CSC. Il est responsable des interactions entre le CSC et les microtubules corticaux (**fig. 7**; Gu et Somerville, 2010; Bringmann et al., 2012; Li et al., 2012c). Les protéines CTL1 et CTL2 agissent sur la cristallinité de la cellulose, l'orientation de ses microfibrilles et les interactions entre la cellulose et les hémicelluloses chez *Arabidopsis thaliana* (**fig. 7**; Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Une mutation dans le gène *AtCTLI* a également montré un dépôt ectopique de lignines (Zhong et al., 2002) suggérant une implication des CTL dans la lignification.

2.2. Polysaccharides non cellulosiques

Entre ces microfibrilles très fortement orientées sont déposées des hémicelluloses et des lignines (Zhong et Ye, 2007). Les hémicelluloses sont un groupe de polysaccharides hétérogènes, c'est-à-dire composés de plusieurs sucres. Chez les végétaux, on retrouve trois principales familles d'hémicelluloses : les xylanes, les xyloglucanes et les mannanes. Les xylanes sont les hémicelluloses structurelles majoritaires des parois secondaires des Dicotylédones (Ebringerová, 2005). Il s'agit d'hétéropolymères composés d'une chaîne

¹ Korrigan

² Cellulose synthase interactive

³ COBL : COBRA-like

⁴ CTL : chitinase-like

⁵ Fasciclin-like AGP

principale de xyloses liées en β ,1-4 et substitués en C2 par des acides glucuroniques (on parle alors de glucuronoxylanes), C2 ou C3 par des arabinoses (on parle alors d'arabinoxylanes) ou les deux (on parle alors d'arabinoglucuronoxylanes et de glucuronoarabinoxylanes) (Izydorczyk et Biliaderis, 1995; Carpita et al., 2001b; Ebringerová, 2005; Faik, 2010; Kulkarni et al., 2012). Chez les feuillus, on retrouve majoritairement des glucuronoxylanes (Timell, 1964; Ebringerová, 2005). Les xylanes présentent deux principaux domaines, un majeur avec des chaînes latérales tous les huit à dix xyloses et permettant vraisemblablement des liaisons avec les microfibrilles de cellulose et un mineur avec des chaînes latérales tous les cinq à sept xyloses principalement responsables de liaisons entre les hémicelluloses (Bromley et al., 2013). Chez plusieurs espèces, notamment *Picea abies*, *Arabidopsis thaliana* et le peuplier, une séquence terminal réductrice dite XRES¹ a également été identifiée (Johansson et Samuelson, 1977; Andersson et al., 1983; Peña et al., 2007; Lee et al., 2011). Les xylanes présenteraient par ailleurs des groupements acétyles assurant des liaisons avec les lignines (Imamura et al., 1994; Balakshin et al., 2011).

La biosynthèse des hémicelluloses est assez différente de celle de la cellulose. En effet, ces polysaccharides sont produits dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases puis transférés dans la matrice extracellulaire par exocytose de petites vésicules (fig. 7; Atmodjo et al., 2013; Rennie et Scheller, 2014). Deux modèles de biosynthèse des xylanes ont été proposés (fig. 7). Dans un premier modèle, XRES est un initiateur de la formation des xylanes. Elle serait alors produite par addition de xyloses sur un élément inconnu probablement lipidique, protéique ou pectinique. La chaîne de xylose s'allongerait ensuite par transfert de xyloses sur l'extrémité non réductrice (Brown et al., 2007; Lee et al., 2007a). Dans un second modèle, les chaînes de xylanes seraient synthétisées *de novo* par transfert de xylose sur l'extrémité réductrice. Ici, XRES est alors considéré comme un terminateur de la synthèse des xylanes (Brown et al., 2007; Lee et al., 2007a). Ces deux modèles peuvent également coexister et varier en fonction des espèces, des tissus ou encore des cellules (York et O'Neill, 2008). Plus récemment, Faik (2013) a émis l'hypothèse que XRES pourrait être un guide dans la sécrétion des xylanes nouvellement synthétisés en plus de son rôle de terminateur.

On retrouve de nombreux gènes associés à la formation des hémicelluloses (fig. 7). Le squelette des xylanes serait majoritairement synthétisé par de gènes de la famille des GT43² codant pour des β -1,4-xylosyltransferase (Brown et al., 2005, 2007, 2009; Lee et al., 2007a; Peña et al., 2007; Keppler et Showalter, 2010; Wu et al., 2010a; Chiniquy et al., 2013). Des

¹ Xylan reducing end sequence

² GT : glycosyltransferase

enzymes CSL¹ semblent également impliquées dans cette synthèse, notamment la CSLC (Cocuron et al., 2007). Les chaînes latérales d'acides glucuroniques sont, elles, ajoutées par les enzymes produites par les gènes *GUX1*² et *GUX2* (Mortimer et al., 2010; Lee et al., 2012; Bromley et al., 2013). Ces enzymes utilisent un xylohexaose comme accepteur et ajoutent un acide glucuronique au cinquième xylose (Rennie et al., 2012; Bromley et al., 2013). La méthylation de ces acides glucuroniques est assurée par les enzymes GXMT³ qui transfèrent le groupement méthyle de S-adénosylméthionines en O-4 des acides glucuroniques présents sur les glucuronoxylanes (Lee et al., 2012; Urbanowicz et al., 2012). L'acétylation des xylanes est essentielle pour assurer l'intégrité des parois végétales. Plusieurs gènes, dont *ESK1*⁴, *RWA1-4*⁵, *TBL29*⁶ et *AXY4*⁷, interviennent dans l'O-acétylation des xylanes (fig. 7; Gille et al., 2011; Urbanowicz et al., 2012; Manabe et al., 2013; Xiong et al., 2013; Yuan et al., 2013). *ESK1* et *TBL29*, par exemple, semblent acétyler certains xylanes du squelette en position O-2 et O-3 (Manabe et al., 2013; Xiong et al., 2013; Yuan et al., 2013). Plusieurs gènes sont également impliqués dans la synthèse de XRES (fig. 7). Le gène *PARVUS*, codant pour une galacturonosyltransferase de la famille des GT8E/F serait notamment responsable du transfert de XRES sur cet élément inconnu (Brown et al., 2007; Lee et al., 2007a, 2007b). Des gènes de la famille des GT47 (*F8H*⁸) et GT47C (*FRA8*⁹) seraient également impliqués dans la formation de XRES (Peña et al., 2007). Enfin, le rôle de *GAUT12*¹⁰, de la famille des GT8D n'est pas encore totalement élucidé. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant *irx8*¹¹, dont l'expression de *GAUT12* est réduite, présente une diminution de la quantité de glucuronoxylanes et d'homogalacturonanes et une disparition complète de XRES (Brown et al., 2007; Persson et al., 2007; Peña et al., 2007). De même, des peupliers sous-exprimant *GAUT12* présentent une diminution de leur quantité de xylanes et de pectines (Biswal et al., 2015, 2018). Ainsi, *GAUT12* permettrait soit la synthèse de XRES, soit la synthèse d'une fraction des pectines (Brown et al., 2007; Persson et al., 2007; Peña et al., 2007; Biswal et al., 2015, 2018). Il ne fait cependant nul doute que ce gène revêt une importance capitale pour le bon ancrage des xylanes et l'architecture générales des parois (Biswal et al., 2018).

¹ Cellulose synthase like

² GUX : glucuronyltransferase

³ Glucuronoxylan methyltransferase

⁴ Eskimo1

⁵ RWA : reduced wall acetylation

⁶ TBL: trichome birefringence-like

⁷ AXY : altered xyloglucan

⁸ Flavone 8-hydrolase

⁹ Fragile fiber 8

¹⁰ galacturonosyltransferase

¹¹ IRX : irregular xylem

Les pectines sont des polysaccharides non-cellulosiques que l'on retrouve principalement dans la paroi primaire et la couche gélatineuse de bois de tension. Il s'agit de polysaccharides complexes caractérisés par une forte teneur en acide galacturonique et chargés négativement (Mohnen, 2008; Atmodjo et al., 2013). Elles se divisent en trois groupes majeurs. Les homogalacturonanes sont un polymère linéaire d'acides galacturoniques liés en α -(1,4) avec beaucoup de méthylestérification en C6 et quelques acétylations en O-2 et/ou O-3 (Mohnen, 2008). Les RG-I présentent un squelette composé d'acides galacturoniques et de rhamnoses liés comme suit : [4)- α -DGalA-(1,2)- α -LRha-(1,)]_n (McNeil et al., 1980; Lau et al., 1985). Les RG-II présentent une plus grande complexité structurale. Ils sont composés d'un squelette similaire aux homogalacturonanes substitué par quatre types d'oligosaccharides en O-2 et/ou O-3 (Ishii et Matsunaga, 1996; O'Neill et York, 2003; Matsunaga et al., 2004). Ces polysaccharides sont, eux aussi, synthétisés dans l'appareil de Golgi puis transportés dans la paroi via des vésicules (fig. 7; Zhang et Staehelin, 1992; Mohnen, 2008). La biosynthèse des pectines est complexe et requiert au moins 67 transférases dont des GT, des méthyltransférases et des acétyltransférases (fig. 7; Mohnen, 2008). L'identité de ces enzymes n'a que peu été étudiée jusqu'à présent. Ainsi, outre GAUT12 présentée précédemment, seules GAUT1 et GAUT7 ont été identifiées comme ayant un rôle dans la biosynthèse des homogalacturonanes. En effet, ces deux protéines forment un complexe fonctionnel au sein de l'appareil de Golgi et transfèrent un acide galacturonique sur l'extrémité non réductrice de l'homogalacturonane en cours de synthèse (Sterling et al., 2006; Atmodjo et al., 2011). Par ailleurs, deux modèles de biosynthèses ont été proposés par Atmodjo et ses collaborateurs (2013). Le premier considère qu'un groupe de GT est associé à la production des squelettes des homogalacturonanes et RG-I ainsi que des branches des RG-I. Le second considère que des oligosaccharides sont synthétisés pour produire des homogalacturonanes et RG-I puis sont transférés sur d'autres domaines en extension par des oligosaccharyltransférases.

On retrouve trois principaux types de protéoglycanes au sein des parois : les protéines riches en glycine, les protéines riches en proline et les protéines riches en hydroxyproline. Dans cette dernière catégorie se trouvent notamment les extensines et les AGP. Les AGP sont des protéines caractérisées par une forte proportion de proline (modifiée en hydroxyproline), d'alanine, de serine et de thréonine et une forte glycosylation des hydroxyprolines par de l'arabinose et du galactose. Ces protéines permettent, notamment, de réaliser des ponts entre les hémicelluloses et les pectines (Kjellbom et al., 1997; Tan et al., 2013). La fonction précise de ces protéines n'a cependant pas encore été élucidée. Leur biosynthèse peut être divisée en plusieurs étapes (fig. 7) : (i) traduction des ARN messagers codant pour la protéine cœur des

AGPs, (ii) translocation de la protéine dans le réticulum endoplasmique rugueux et ancrage GPI¹ en C-terminal de la protéine si besoin, (iii) modification post-traductionnelle au sein du réticulum endoplasmique des prolines en hydroxyprolines, (iv) glycosylation de la protéine cœur, dans le réticulum endoplasmique et, surtout, dans l'appareil de Golgi, (v) sécrétion vers la membrane plasmique pour les protéines avec ancrage GPI et (vi) hydrolyse possible par des glycosyl-hydrolases (Held et al., 2015). Ces différentes étapes font appel à différents gènes. Ainsi, la glycosylation initiale de la protéine se fera par l'intermédiaire des enzymes GALT² dans le réticulum endoplasmique et GALT5, GALT9, GALT29A et GALT31A dans l'appareil de Golgi (Qu et al., 2008; Basu et al., 2013; Geshi et al., 2013; Dilokpimol et al., 2014). Chacune de ces enzymes a une fonction bien précise. Par exemple, GALT9 produit des chaînes de galactanes liées en β -(1,3) (Qu et al., 2008). Sur les chaînes produites, l'ajout d'un acide galacturonique en β -(1,6) est assuré par GALT29A. Les chaînes en β -(1,6) sont à leur tour allongées par l'intermédiaire de GALT31A (Geshi et al., 2013; Dilokpimol et al., 2014). L'ajout des acides glucuroniques fait lui appel à une autre famille d'enzyme, les β -glucuronosyltransférases dont GlcAT14A, GlcAT14B, GlcAT14C (Knoch et al., 2013; Dilokpimol et al., 2014). L'ajout des fucoses fera lui appel à des α -fucosyltransférases dont FUT3 et FUT6 (Wu et al., 2010b) alors que l'ajout des arabinoses fera appel aux arabinosyltransférases comme RAY1 (Gille et al., 2013). On retrouvera un schéma de biosynthèse similaire pour les extensines (Showalter, 1993; Kieliszewski et Lamport, 1994).

2.3. Lignines

Les lignines protègent la cellulose et les hémicelluloses de la dégradation chimique et microbienne (Whetten et al., 1998). Elles sont liées de façon covalente aux hémicelluloses et pectines (Jeffries, 1991). Des complexes lignocellulosiques ont également été identifiés. Au sein de ces complexes se trouvent des liaisons glycosidiques entre un glycosyl et un phénol ou un hydroxyphénol, des ponts éther entre un glycosyl et un phénol et des ponts ester entre un acide glucuronique et/ou galacturonique et un hydroxyphénol (Hao et Mohnen, 2014). Chez les Dicotylédones, ce polymère phénolique est issu de la polymérisation de deux monolignols principaux : l'alcool coniférylique (donnant les unités G après intégration dans le polymère) et l'alcool synapylique (donnant les unités S après intégration dans le polymère). Le ratio entre ces deux unités varie entre les différents types cellulaires (Donaldson et al., 2001). En effet, les vaisseaux présentent des lignines riches en unités G et les fibres des lignines riches en unités S (Terashima et al., 1993). Un troisième monolignol, l'alcool *p*-coumarylique (donnant les unités

¹ Glycosylphosphatidylinositol

² GALT : Galactose-1-phosphate uridylyltransferase

H après intégration dans le polymère), est également présent dans certaines lignines, notamment chez les monocotylédones. Ces trois monolignols diffèrent par leur degré de méthylation (**fig. 8**; Lewis et Yamamoto, 1990; Boerjan et al., 2003). D'autres monomères phénoliques peuvent également être intégrés dans les lignines. Ainsi, récemment, Vanholme et ses collaborateurs (2019) ont fait état de 35 monomères phénoliques pouvant être intégrés aux lignines. La liaison entre monomères se fait vraisemblablement sans ordre précis ni répétition. La structure des lignines est donc difficilement prévisible (van Parijs et al., 2010). De par leur hydrophobicité, les lignines préservent les sucres de leur dégradation (Li et al., 2008; Höfte, 2013). Ainsi, afin de mieux comprendre la récalcitrance de la biomasse lignocellulosique, la biosynthèse des lignines a été grandement étudiée dans les vingt dernières années (Boerjan et al., 2003; Bonawitz et Chapple, 2010; Vanholme et al., 2010, 2019). Le processus de lignification peut être résumé en trois étapes : synthèse des précurseurs, transport vers la paroi et polymérisation (Boudet et al., 1995; Whetten et Sederoff, 1995).

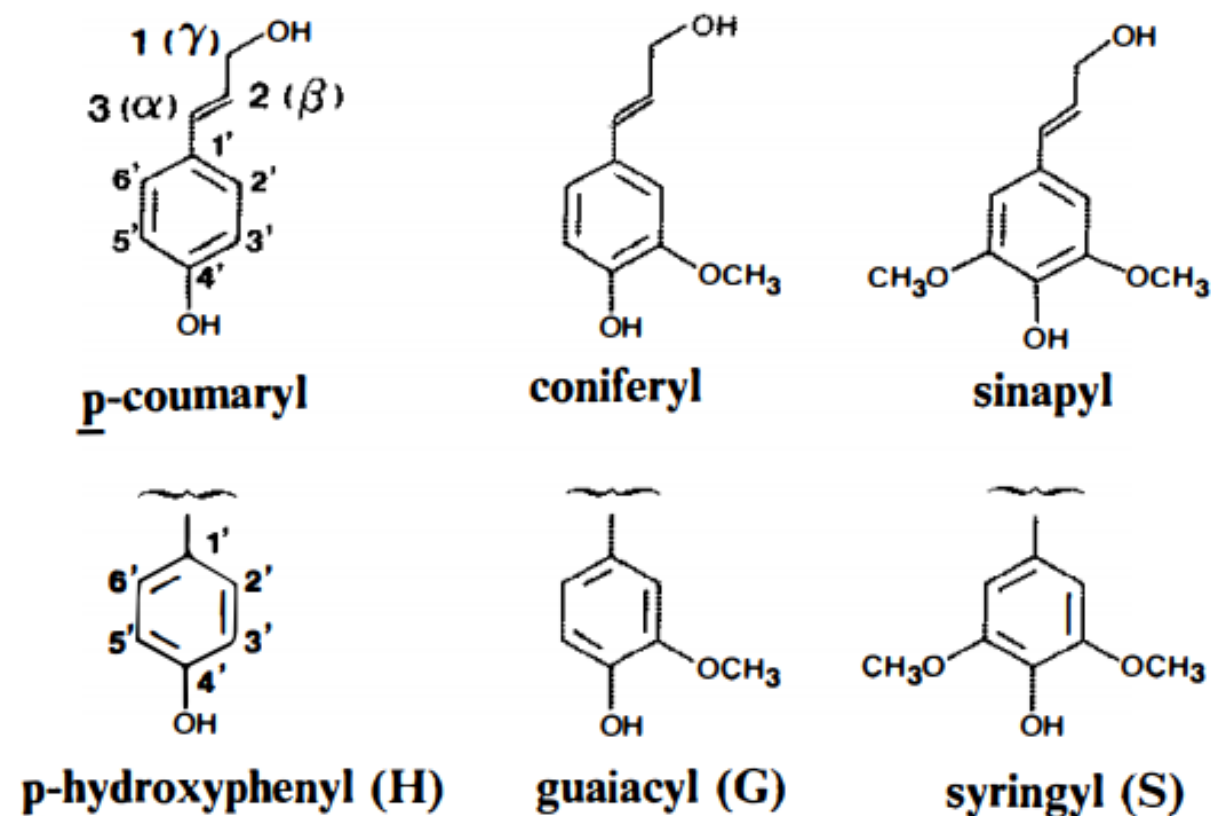


Figure 8 Représentation des précurseurs des lignines et de leur constituant aromatique (Lewis et Yamamoto, 1990)

Quelle que soit l'unité produite, la biosynthèse des monolignols démarre par la déamination de la phénylalanine par une PAL¹ (**fig. 7**; Boerjan et al., 2003; Bonawitz et Chapple, 2010; Vanholme et al., 2010, 2019; Zhao et al., 2013; Schuetz et al., 2014; Kumar et al., 2016). La C4H² puis la 4CL³ permettent de produire du *p*-coumaroyl-CoA, premier nœud entre les trois monomères. Pour produire des unités H, deux enzymes (la CCR⁴ puis la CAD⁵) vont transformer le *p*-coumaroyl-CoA en alcool *p*-coumarylique. La différenciation entre unités G et S se fait à partir du coniferaldéhyde. Le passage du *p*-coumaroyl-CoA au coniferaldéhyde nécessite l'action de quatre enzymes : HCT⁶, C3H⁷, CCoAOMT⁸ et CCR. L'action de ces enzymes, suivie de celle de la CAD permet de produire de l'alcool coniférylique. Le passage à l'alcool synapilique nécessite, lui, l'action de trois enzymes : F5H⁹, COMT¹⁰ et CAD. Une fois synthétisés, les monomères sont transportés vers la matrice extracellulaire en vue de leur polymérisation. L'ensemble des étapes de synthèse des différents monolignols est réalisé dans le cytoplasme. Cependant, certaines enzymes à cytochrome semblent se trouver à la surface du réticulum endoplasmique (**fig. 7**). C'est le cas notamment de la C3H, la F5H ainsi qu'un complexe enzymatique composé de la PAL et de la C4H (Rasmussen et Dixon, 1999). Cette voie de biosynthèse est bien établie. Elle présente toutefois quelques voies alternatives. La plus connue est la voie de la CSE¹¹ puis de la 4CL permettant, chez *Arabidopsis thaliana*, de compenser partiellement l'action d'une HCT déficiente (Vanholme et al., 2013; Kumar et al., 2016). L'existence de cette enzyme chez le peuplier n'a cependant pas encore été établie.

Les monolignols produits dans le cytosol sont transférés dans l'apoplasme soit tel quel, soit sous forme glycoconjuguée, c'est-à-dire après ajout d'un 4-O- β -glucoside par une UDP-GT¹² (Donaldson et al., 2001; Boerjan et al., 2003). En effet, on observe une forte concentration en glycoconjugués dans les tissus en lignification (Boerjan et al., 2003; Tsuyama et al., 2013) et dans la sève cambiale de nombreux arbres (Whetten et al., 1998). Plusieurs hypothèses ont été avancées quant au transport des monolignols vers la matrice extracellulaire (**fig. 7**). Il pourrait s'agir d'une diffusion passive. Ce serait notamment le cas pour les alcools et/ou les

¹ Phenylalanine ammonia-lyase

² Cinnamic acid 4-hydroxylase

³ 4-coumarate:coa ligase

⁴ Cinnamoyl-coa reductase

⁵ Cinnamyl alcool dehydrogenase

⁶ Shikimate/quinat hydroxycinnamoyltransferase

⁷ *p*-coumarate 3-hydroxylase

⁸ Caffeoyle-coa o-methyltransferase

⁹ Ferulate 5-hydroxylase

¹⁰ Caffaic acid o-methyltransferase

¹¹ Caffeoyle shikimate esterase

¹² Uridine diphosphate glycosyltransférase

aldéhydes hydroxycinnamique (Sibout et Höfte, 2012). Un transport vésiculaire a également été envisagé, notamment de la forme glycoconjuguée de l'alcool coniférylique, la coniférine (Escamilla-Treviño et al., 2006; Liu et al., 2011). Deux modes de transport actif ont également été étudiés. Un transport actif primaire via un transporteur de type ABC¹, consommant donc de l'ATP², a dans un premier temps été exploré (Samuels et al., 2002; Ehltng et al., 2005; Kaneda et al., 2008; Miao et Liu, 2010; Alejandro et al., 2012). Ce mode de transport serait plus efficace pour les alcools non glycosylés. Une étude menée par Alejandro et ses collaborateurs (2012) a montré que l'expression du transporteur *AtABCG29* chez la levure conduit au transport de l'alcool *p*-coumarylique. Ils ont alors supposé que ce transporteur prenne en charge le transfert de l'alcool *p*-coumarylique vers la paroi chez *Arabidopsis thaliana*. La possibilité que chaque monolignol soit associé à un transporteur ABC spécifique a alors été exploré. Ainsi, six nouveaux candidats ont pu être identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (Sibout et Höfte, 2012). Contrairement à *Arabidopsis thaliana*, le transport des monolignols (ou du moins de leur glycoconjugué) chez les arbres, notamment le peuplier et le cyprès, semble être réalisé par des transporteurs actifs secondaires (Miao et Liu, 2010; Tsuyama et al., 2013). Le transport est ici dépendant d'un gradient de proton. Cette hypothèse permettrait principalement un stockage des glycoconjugués dans la vacuole. Ils seraient alors libérés après autolyse de la cellule (Sibout et Höfte, 2012). Cette hypothèse est notamment appuyée par l'augmentation de la lignification après la mort de la cellule (Pesquet et al., 2010). Ce serait notamment le cas pour les vaisseaux matures pour lesquels la lignification débute après mort cellulaire et dépôt des polysaccharides pariétaux (Derbyshire et al., 2015). En effet, une étude a montré, chez le peuplier, que la coniférine se concentre dans la zone de différenciation et d'expansion du xylème (Tsuyama et Takabe, 2014). Cela suggère donc que la coniférine soit utilisée pour la lignification des vaisseaux. Cette même étude a mis en évidence une plus grande quantité d'alcool synapilique que de syringine, sa forme glycoconjuguée, dans le xylème en formation. Par ailleurs, l'alcool synapilique présente un pic de concentration à la fin de la zone de formation des parois. Cela suggère alors que la forme non glycosylée de l'alcool synapilique est utilisée durant la lignification des fibres, celles-ci présentant des lignines riches en unités S.

La polymérisation des lignines nécessite dans un premier temps une activation des monolignols. Cette activation passe par la perte d'un proton et d'un électron afin d'obtenir des radicaux libres pouvant ensuite se coupler. Cette production de radicaux libres est réalisée par deux grandes familles multigéniques, les laccases et les peroxydases (Tognolli et al., 2002;

¹ ATP-binding cassette

² Adenosine tri-phosphate

Boerjan et al., 2003; McCaig et al., 2005; Bonawitz et Chapple, 2010; Vanholme et al., 2010, 2019; Zhao et al., 2013; Schuetz et al., 2014; Kumar et al., 2016). Alors que les peroxydases consomment du peroxyde d'hydrogène pour oxyder leur substrat, les laccases, elles, utilisent du dioxygène. Les laccases ont un rôle clair dans la lignification, prouvé notamment par des études de génétique inverse (Berthet et al., 2011). Ainsi, la cosuppression de trois gènes codant pour des laccases (*AtLAC4*¹, *AtLAC11* et *AtLAC17*) conduit à une disparition presque entière de la lignification (Zhao et al., 2013). Par ailleurs, la sous-expression de *LAC17* chez *Arabidopsis thaliana* a mis en évidence une diminution du dépôt des lignines de type G dans les fibres de la hampe florale (Berthet et al., 2011). *AtLAC17* semble donc utiliser préférentiellement l'alcool coniférylique comme substrat. À l'inverse, des plants d'*Arabidopsis thaliana* dont le gène *AtPRX72*² a été supprimé ou co-supprimé avec les gènes *AtPRX2*, *AtPRX25* ou *AtPRX71* présentent une altération des lignines plus légère (Herrero et al., 2014; Shigeto et al., 2015). *PRX72* semble montrer une utilisation préférentielle de l'alcool synapilique comme substrat tant chez *Zinnia elegans* (Gabaldón et al., 2006) que chez *Arabidopsis thaliana* (Herrero et al., 2013). Bien qu'il soit établi que la lignification débute dans la lamelle moyenne au niveau des coins cellulaires, les sites moléculaires d'initiation de la lignification n'ont, pour le moment, pas encore été clairement définis. Ceux-ci pourraient être des pectines présentes dans la lamelle moyenne ou la paroi primaire (Donaldson et al., 2001; Lairez et al., 2005), des hydroxycinnamates (Ishii, 1997; Ralph et al., 2004a) ou encore des arabinoxylanes ferulés (Ishii, 1997; Ralph, 2010) pouvant créer des sites de nucléation pour la polymérisation des lignines (Ralph et al., 2004b; Ralph, 2010). Les sites de polymérisation des lignines G doivent, par ailleurs, être riches en calcium (Westermarck, 1982).

Les différentes enzymes impliquées dans la synthèse ou la polymérisation des monolignols peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles permettant de les réguler. Ces régulations peuvent se faire par différents facteurs, notamment des microARN. Ainsi, chez *Brachypodium distachion*, *Arabidopsis thaliana*, le riz, le maïs et le peuplier, le miR397³, sous ses deux formes (miR397a et miR397b), permet, sous certaines conditions, d'éteindre l'expression de certaines laccases (Le Bris et al., 2013; Lu et al., 2013; Wang et al., 2014). La phosphorylation de certaines enzymes permet également de réguler la lignification. Ainsi, il a été montré que la phosphorylation de la COMT bloquait son activité permettant notamment de réguler la synthèse de l'alcool synapilique (fig. 7; Wang et al., 2015). Par ailleurs, une étude

¹ LAC : laccase

² PRX : peroxidase

³ miR : microARN

réalisée par Lee et Voit (2010) a permis de réaliser un modèle mathématique du métabolisme associé à la biosynthèse des monolignols et donc la régulation de l'activité enzymatique induite par certains métabolites (**fig. 7**). On notera, par exemple, une inhibition de l'activité de la CAD par l'aldéhyde coniférylique. Enfin, la teneur en unité G pourrait, notamment, être modulée par la présence de PME (Hedenström et al., 2009). En effet, les lignines de peupliers présentant un défaut d'expression des PME sont moins riches en unité G. Ces peupliers présentent également une diminution de la quantité de *p*-hydroxybenzoates dans leur paroi.

Par ailleurs, il a été montré que, chez certaines espèces, la lignification pouvait avoir une source autre que la cellule en cours de lignification. En effet, plusieurs études menées chez *Zinnia elegans* ont montré que les cellules indifférenciées produisaient les monolignols nécessaires à la lignification des éléments trachéaires en différenciation (Hosokawa et al., 2001; Tokunaga et al., 2005; Pesquet et al., 2013; Iakimova et Woltering, 2017). Chez *Arabidopsis thaliana*, les cellules du parenchyme et, dans une moindre mesure, les fibres en développement semblent produire les monolignols nécessaires à la lignification des vaisseaux (Smith et al., 2013, 2017). Cette hypothèse dite du bon voisin a été récemment éprouvée chez *Picea abies* par la comparaison de résultats transcriptomiques et métabolomiques à l'échelle cellulaire (Blokchina et al., 2019). Grâce au développement très récent du RNA-Seq couplé à la microdissection par capture laser et de la métabolomique cellulaire *in situ*, cette étude a permis de proposer un modèle de lignification des trachéides dans le xylème en développement. Dans ce modèle, les rayons seraient impliqués dans la lignification des trachéides. Enfin, plus récemment, des phénomènes de régulation de la lignification plus fins ont été révélés. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine PIRIN2, localisée dans les cellules adjacentes des vaisseaux, semble moduler la composition des lignines en réprimant la synthèse de lignines de type S permettant un enrichissement en lignines de type G dans les vaisseaux (Zhang et al., 2020). Ainsi, tout porte à croire que les lignines n'ont pas encore révélé tous les secrets de leur formation.

IV. Régulation génétique et hormonale de la formation du bois

Une fois établi, le cambium est capable de rester actif jusqu'à plusieurs siècles. Il est fort probable que son activité soit régie par des systèmes de régulation proches de ceux impliqués dans le maintien des méristèmes apicaux (Groover, 2005) et que chaque étape de la xylogénèse soit régulée par des facteurs hormonaux et/ou génétiques (**fig. 9**; Zhang et al., 2014). La formation des parois secondaires constitue une étape clef de la xylogénèse puisqu'elle

conditionne en grande partie les propriétés physico-chimiques et mécaniques du bois. Cette étape nécessite l'expression coordonnée des gènes impliqués dans la biosynthèse des différents composés pariétaux. Au niveau transcriptionnel, cette coordination est assurée, en partie, par une cascade de facteurs de transcription (**fig. 7**; Demura et Fukuda, 2007; Zhong et Ye, 2012; Nakano et al., 2015). Plusieurs familles de facteurs de transcription sont impliquées dans ces processus dont les MYB (Stracke et al., 2001; Wilkins et al., 2009; Nakano et al., 2015), les NAC (Ooka et al., 2003; Zhong et al., 2010; Nakano et al., 2015) et les KNOX (Hay et Tsiantis, 2010).

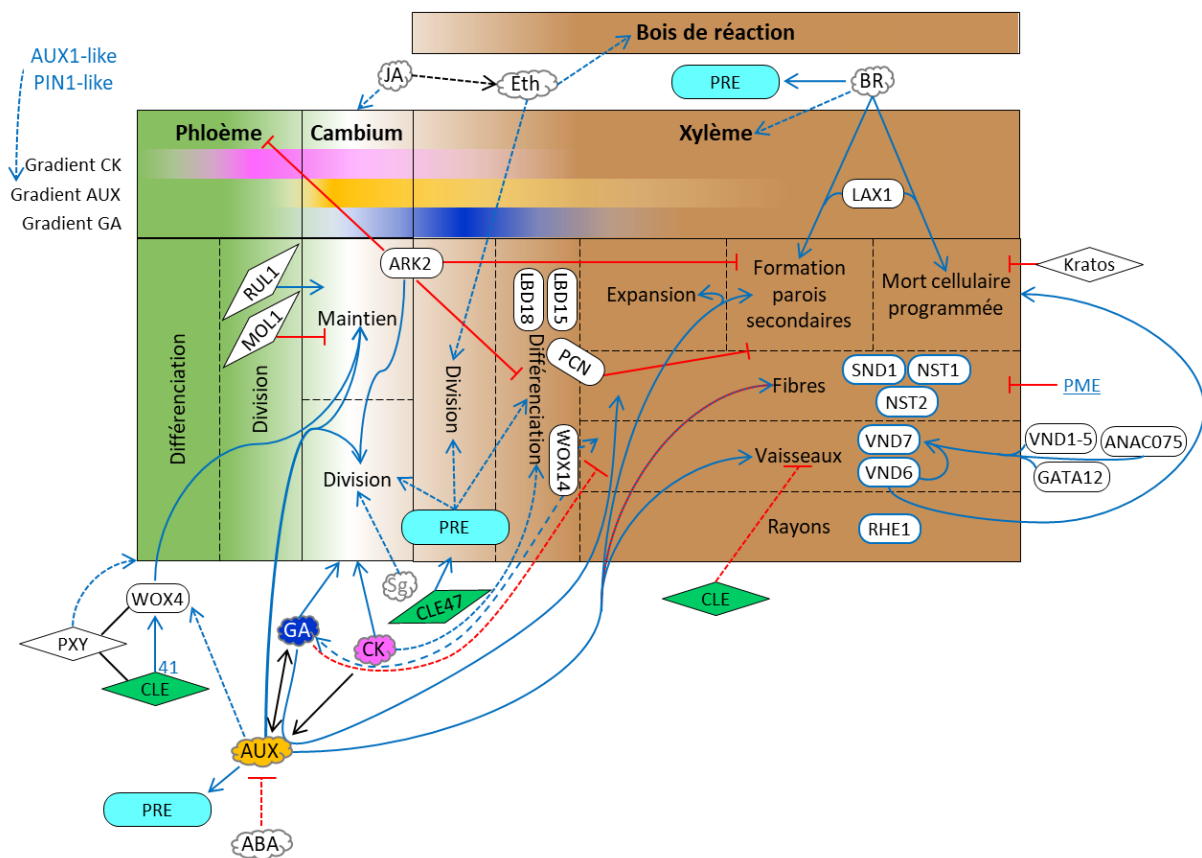


Figure 9 Régulation de la formation du bois de peuplier

Cette représentation schématique se base sur une revue extensive de la littérature et se veut représentative des connaissances actuelles.

Flèche bleu : activateur ; flèche plate rouge : inhibiteur ; flèche noire : crosstalk hormonaux ; flèches en pointillé : action possible, Nuage : hormone ; losange : peptide signal ; ovale : gène, bleu souligné : enzyme.

AUX : auxine ; GA : acide gibbérellique, CK : cytokinines ; ABA : acide abscissique ; JA : acide jasmonique ; Eth : éthylène ; BR : brassinostéroïdes ; CLE : clavata/esr-like ; PXY : phloème intercalated with xylem ; RUL1 : reduced in lateral growth 1 ; MOLI : more lateral growth 1 ; ARK2 : arborknox 2 ; PRE : poprevoluta ; LAX1 : ; LBD15/18 : lateral organ boundaries domain 15/18 ; PCN : popcorona ; SND : secondary wall associated-NAC domain ; NST1-2 : NAC secondary cell wall thickening 1-2 ; VND1-7 : Vascular Nac Domain 1-7 ; ANAC075 : abscissique acid responsive NAC 075 ; RHE1 : root hair element 1 ; WOX4/14 : wuchsel homeobox-related 4/14 ; PME : pectine methylesterase

1. Régulation génétique

La première vision d'ensemble des gènes exprimés durant la xylogenèse a été permise par l'identification de plus de 5 000 ESTs¹ dans le xylème de peuplier en développement (Sterky et al., 1998). La même année, Allona et ses collaborateurs (1998) identifiaient un peu plus de 1 000 ESTs dans le xylème immature de *Pinus taeda*. Plus tard, une étude menée sur le clone INRA 717-1B4 a identifié environ 5 000 gènes exprimés à différentes étapes de la formation du bois, de la zone cambiale au xylème mature (Déjardin et al., 2004). Cette étude a par ailleurs permis de mettre en évidence que les cellules cambiales exprimaient principalement des gènes associés au cycle cellulaire et à la synthèse protéique alors que les cellules de xylème en développement ou mature exprimaient fortement des gènes associés à la méthylation des précurseurs de lignines, au cytosquelette, à la structure des parois et au métabolisme des sucres. Le séquençage d'EST a permis le développement d'une première approche transcriptomique : le microarray ou puce à ADN. En 2001, une étude a alors porté sur l'expression de près de 3 000 gènes le long du gradient de différenciation du xylème chez *P. tremula* x *Populus tremuloides* (Hertzberg et al., 2001). Cette étude a permis de construire le premier modèle d'expression des gènes accompagnant la formation du bois. Elle a montré, notamment, que (i) l'expression coordonnée de gènes de cycline est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire dans la zone cambiale et que (ii) les gènes impliqués dans la synthèse de la cellulose, des lignines ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la formation du bois subissent une forte régulation transcriptionnelle spécifique à chaque étape de développement. Les premières études transcriptomiques ont également reposé sur la méthode cDNA-AFLP². Une étude publiée en 2005 utilisant cette approche montre que la plupart des gènes sur-exprimés dans le bois sont impliqués dans la formation des parois et, plus particulièrement, des lignines (25%) (Prassinis et al., 2005). Cette étude a également permis de mettre en évidence l'implication de gènes liés à la mort cellulaire programmée, à des protéines d'interaction avec le cytosquelette, à des transporteurs et à des facteurs de transcription impliqués dans la formation du bois, certains d'entre eux étant spécifiquement exprimés dans le xylème. La formation du bois est donc un mécanisme de développement complexe impliquant des milliers de gènes dont la fonction est souvent encore inconnue (McCann et Carpita, 2008; Mewalal et al., 2014).

¹ Expressed sequence tags

² Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés sur ADN complémentaire

1.1. Facteurs de transcription de la famille NAC

Une grande famille de facteurs de transcription joue un rôle important dans la régulation de la xylogénèse : les NAC¹. Peu de facteurs de transcription de cette famille régulent directement les gènes de biosynthèse des différents composés pariétaux. En effet, la majorité d'entre eux se situent au sommet de la cascade de régulation, on parle de maîtres-régulateurs (**fig. 7**). Les NAC sont des régulateurs spécifiques au règne végétal. Il s'agit d'une des plus grandes familles de facteurs de transcription et les NAC sont impliqués dans plusieurs processus développementaux. Parmi eux, on retrouve trois sous-familles de régulateurs clés : les VND², les NST³ et les SND⁴ (Camargo et al., 2019). Plusieurs facteurs peuvent influencer l'expression de ces gènes. En effet, ils peuvent être induits ou réprimés sous l'action d'un mélange de différentes hormones dont l'auxine, les cytokinines et les brassinostéroïdes (Kubo et al., 2005). Par ailleurs, la régulation de l'activité des facteurs de transcription à domaine-NAC, notamment la co-régulation des familles VND et SND, se ferait majoritairement par épissage alternatif (*i.e.* rétention d'introns) (Li et al., 2012b; Zhao et al., 2014; Lin et al., 2017).

Parmi les VND, *VND6* et *VND7* sont impliqués dans la formation des éléments vasculaires (Kubo et al., 2005). *VND7* est par ailleurs spécifiquement exprimé dans les jeunes vaisseaux, principalement lors de la formation des parois secondaires (Mitsuda et al., 2005). Une étude menée sur 68 facteurs de transcription a mis en évidence que l'expression de *VND7* était dépendante de quatorze facteurs de transcription (Endo et al., 2015). Parmi eux, on notera les gènes *VND1-6* et *ANAC075* qui, en se fixant sur le motif SMBE/TERE⁵ de la région promotrice de *VND7*, activent son expression (**fig. 7, 9**; Endo et al., 2015). D'autres facteurs de transcription, *GATA12* et *LBD30*⁶/*ASL19*⁷, induirait l'expression de *VND7* (Soyano et al., 2008; Liu et al., 2014; Li et al., 2016). À l'inverse, *VNI2*⁸ inhibe l'expression de *VND7* et *VND6* (Yamaguchi et al., 2010a). Bien qu'une augmentation de l'expression de ces deux facteurs de transcription ait induit une augmentation de l'expression des gènes *CesA4*, *CesA7*, *CesA8*, *GAUT12*, *GT47*, *CCoAOMT* et *LAC4* (Yamaguchi et al., 2010b), il est probable que *VND6-7* ne se fixe pas directement en région promotrice de ces gènes et donc que le lien soit indirect et se fasse par une cascade de régulation. L'étude des sites de fixation de *VND7* en levure simple

¹ NAM, ATAF1,2, CUC2

² Vascular-related nac-domain

³ NAC secondary cell wall thickening

⁴ Secondary wall-associated NAC-domain protein

⁵ Secondary wall NAC-binding element / tracheary element-regulating cis-element

⁶ LBD : lateral boundary domain

⁷ ASL : Asymmetric leaves

⁸ VND-interacting2

hybride a identifié *REVOLUTA* comme une cible directe, elle-même ciblant ensuite la *PAL* (Taylor-Teeple et al., 2015a). Des études de mutants ont ensuite montré que *VND7* réprime l'expression de *REVOLUTA*, réprimant lui-même la *PAL* et donc la synthèse des lignines. Cette étude appuie, une fois encore, l'action indirecte de ces maîtres régulateurs sur la formation des parois secondaires. Par ailleurs, *VND6*, ainsi qu'*ANAC33* et *ANAC070*, ont également été identifiés comme étant activateurs de gènes associés à la mort cellulaire programmée (Ohashi-Ito et Fukuda, 2010).

Les gènes *SND1*, *NST1* et *NST2* seraient, eux, impliqués spécifiquement dans la formation des fibres (fig. 9; Zhong et Ye, 2015). *NST2* et *SND1* sont deux facteurs de transcription pouvant se fixer sur les promoteurs de gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose (*CesA4*, *CesA7*, *CesA8*, *KOR*). Le gène *SND1* serait également un régulateur spécifique de certains gènes. Ainsi, il induirait l'expression des gènes *PAL* et *C4H* et réprimerait l'expression du gène *XNDI*¹, inhibiteur du programme de mort cellulaire (Zhao et al., 2005, 2007, 1; Ko et al., 2007, 012; Ohashi-Ito et Fukuda, 2010; Yamaguchi et al., 2011). Une analyse par séquençage d'ADN après immunoprécipitation de la chromatine a cependant mis en évidence que *SND1* dirige un réseau de régulation à quatre couches et n'avait donc pas de relation directe avec les gènes de biosynthèse (Chen et al., 2019). Comme les facteurs de transcription VND, les SND et NST présentent une régulation spécifique (fig. 7). Ainsi, *NST2* est spécifiquement réprimé par *WRKY12* (Wang et al., 2010) et *SND1* est spécifiquement induit par l'acide abscissique (Jensen et al., 2014). Par ailleurs, les gènes *NST1* et *NST2* seraient spécifiquement régulés par le facteur de transcription *MYB26*, lui-même régulé par deux hormones : l'auxine et l'acide jasmonique (Yang et al., 2007; Cecchetti et al., 2013; Jung et al., 2013).

1.2. Facteurs de transcription de la famille MYB

Les MYB² forment un large groupe de facteurs de transcription liés au développement végétal et à la différenciation cellulaire. Chez les végétaux, on retrouve principalement deux grandes sous-familles : les R1-MYB et les R2R3-MYB (Wilkins et al., 2009). Parmi ces facteurs de transcription, on retrouve des régulateurs majeurs de la formation des parois secondaires, principalement dans la sous-famille des R2R3. En effet, ils activent (ou inhibent) l'expression soit d'autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme des lignines et des polysaccharides, soit de gènes directement impliqués dans ces métabolismes (e.g. McCarthy et al., 2009; Zhong et Ye, 2012).

¹ Xylem NAC domaine

² myeloblastoma

Parmi ces facteurs de transcription, on retrouve notamment des répresseurs de la transcription des gènes associés à la biosynthèse des monolignols. Chez *Populus tomentosa*, par exemple, *PtoMYB156* est un répresseur fort de cette voie (Yang et al., 2017a). En effet, une augmentation de son expression conduit à une forte diminution de la teneur en lignines et de l'épaisseur des parois des fibres. En revanche, la suppression de ce gène par KO conduit à une augmentation de la quantité de lignines, xyloxyènes et cellulose. De tels résultats ont par ailleurs été démontrés lors de l'étude de l'orthologue d'*Eucalyptus grandis*, *EgMYB1* (Legay et al., 2010). En effet, la surexpression de ce gène chez *Arabidopsis thaliana* et le clone de peuplier INRA 717-1B4 conduit à une diminution de la lignification des fibres, de l'épaisseur des parois et de l'expression de gènes associés à la formation des lignines, de la cellulose et des hémicelluloses. Un autre gène MYB, *PdMYB221*, orthologue de *AtMYB4* chez *Populus deltoides*, est lui aussi un régulateur de la formation des parois secondaires durant la formation du bois (Tang et al., 2015). En effet, sa surexpression chez *Arabidopsis thaliana* conduit (i) à la diminution de l'épaisseur des parois de fibres et vaisseaux, (ii) à la diminution de la quantité de cellulose, hémicelluloses et lignines et (iii) à la suppression de l'expression de certains gènes clés de la biosynthèse des parois : *CesA7*, *CesA8*, *GT47C*, *COMT* et *CCR*. Exprimé majoritairement dans les cellules de bois en développement, *PdMYB221* est donc un répresseur de transcription. Ces deux MYB peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles régulant leur activité. En effet, Zheng et ses collaborateurs (2019) ont récemment montré que l'enzyme PtoUBC34¹, localisée au niveau du réticulum endoplasmique, interagit avec *PtoMYB156* et *PtoMYB221*. Cette interaction conduirait alors à la translocation des deux protéines dans le réticulum endoplasmique où elles seront dégradées, réduisant alors leur activité.

Par ailleurs, les MYB peuvent être régulés par des facteurs de transcription à domaine NAC (Zhong et Ye, 2009; Zhang et al., 2014). Ainsi, l'expression des *MYB46* et *MYB83* est induite par les gènes *NST1*, *NST2*, *SND1*, *VND6* et *VND7*. Ces deux MYB viennent ensuite activer l'expression d'autres MYB comme le *MYB69* et le *MYB103* ou directement des gènes liés à la formation des parois secondaires comme *CESA3*, *CESA4*, *GUX1*, *GUX2* ou encore *PAL1* (Zhong et al., 2007; McCarthy et al., 2009; Zhong et Ye, 2015; Zinkgraf et al., 2017). Les familles MYB et NAC se placent donc comme les acteurs principaux dans la régulation de la formation des parois secondaires (Mitsuda et al., 2005; Zhong et al., 2010, 2013).

¹ *Populus tomentosa* E2 Ubiquitin-Conjugating enzyme 34

1.3. Facteurs de transcription à homéodomaine

Plusieurs familles de facteurs de transcription possèdent un domaine de type homéobox. Parmi eux se trouvent les HD-ZIP III¹. Ces facteurs de transcription, spécifiques du règne végétal, participent à la maintenance des méristèmes et au développement vasculaire (Ariel et al., 2007). Parmi eux, on retrouve les gènes *REV/IFL1*² dont *PRE*³ est un des représentants (Schrader et al., 2004). Ce gène est principalement exprimé pendant la croissance secondaire de l'arbre et aurait un rôle dans l'initiation cambiale et la formation des tissus secondaires. Outre *PRE*, d'autres gènes de cette classe ont été montrés comme importants dans la différenciation xylémienne aussi bien chez *Arabidopsis thaliana* que *Populus spp.* Le gène *popCORONA*, par exemple, est fortement exprimé dans le cambium, les fibres phloémiennes et le xylème en développement. La perturbation de son expression dans le peuplier INRA 717-1B4 entraîne une lignification de la moëlle en cas de sous-expression et un retard de lignification des fibres xylémiennes en cas de surexpression (Du et al., 2011). Son homologue chez *Arabidopsis thaliana* présente un phénotype similaire (Kim et al., 2005). *popCORONA* semble donc être un inhibiteur de la formation des parois secondaires des fibres (**fig. 9**).

Les KNOX⁴ sont une autre famille de facteurs de transcription à homéodomaine. Ils sont impliqués dans le maintien des initiales cambiales et le développement des parois secondaires (Schrader et al., 2004; Hay et Tsiantis, 2010). Les KNOX sont des facteurs de transcription à homéodomaine présents dans l'ensemble du règne végétal (Hake et al., 2004). Ils sont divisés en deux classes, la première s'exprimant principalement dans les méristèmes apicaux, la seconde s'exprimant de façon plus ubiquiste (Kerstetter et al., 1994; Serikawa et al., 1997). Ils sont généralement impliqués dans le maintien des méristèmes et le développement des organes (Hake et al., 2004). Parmi ces facteurs de transcription se trouvent les gènes *ARK2*⁵, *KNAT3*⁶ et *KNAT7*. La surexpression de *ARK2* dans le peuplier INRA 717-1B4 induit une prolifération importante des cellules cambiales au détriment de la différenciation aussi bien en xylème qu'en phloème. L'expression des gènes associés à la biosynthèse des parois y est également fortement négativement impactée (Du et al., 2009; Du et Groover, 2010; Gerttula et al., 2015). *ARK2* pourrait donc être un inhibiteur de la différenciation cellulaire et de la formation des parois. *KNAT7* est également un inhibiteur de la formation des parois secondaires

¹ Class III Homeodomain Leucine Zipper

² REVoluta/InterFascicular Fiberless 1

³ Poprevoluta

⁴ Knotted1-Like Homeobox

⁵ arborknox2

⁶ KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA7

(Li et al., 2012a). En effet, il réprime l'expression de gènes de biosynthèse des lignines (*PAL1*, *C4H*, *4CL-1*, *CCR1*, *HCT*, *C3H1*, *CCoAOMT1*, *COMT1*), de la cellulose (*CesA7*, *CesA8*) et des xylanes (*IRX8*, *IRX9* et *FRA8*). Ce facteur de transcription est associé à un certain nombre d'autres facteurs. Chez *Arabidopsis thaliana*, *KNAT7* est associé à *MYB75* dans un complexe multiprotéique régulant la formation des parois de la hampe florale (Bhargava et al., 2013). Placé sous l'influence de NAC et de MYB, *KNAT7* présente une régulation fine au niveau cellulaire (fig. 7; Zhong et al., 2011; Zhong et Ye, 2012). En effet, son expression est induite par *SND1* dans les fibres et *VND6* et *VND7* dans les vaisseaux. Contrairement à *ARK2* et *KNAT7*, *KNAT3* régulerait positivement la formation des parois secondaires (Wang et al., 2020). En effet, les hampes florales de plants d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant ce facteur de transcription présentent une augmentation de l'épaisseur des parois. Récemment, deux études ont montré le rôle synergique de *KNAT3* et *KNAT7* dans la régulation de la biosynthèse des parois, notamment des lignines (Qin et al., 2020; Wang et al., 2020). En effet, la mutation de *knat3* chez des mutants *knat7* d'*Arabidopsis thaliana* a eu pour impact d'augmenter grandement le phénotype des mutants *knat7*, à l'exception de la teneur en lignines. Contrairement au mutant *knat7*, le mutant *knat3 knat7* ne présente pas de diminution de la teneur en lignines mais une forte diminution du ratio S/G (Wang et al., 2020). Cette diminution a pu être associée à une forte diminution de l'expression de la *F5H*, déterminante dans la synthèse des unités S. Dans l'hétérodimère *KNAT3/KNAT7*, seul *KNAT3* a montré une interaction avec *NST1* et *NST2* (Qin et al., 2020). *KNAT3* activerai alors la *F5H* et donc la synthèse des unités S dans les fibres.

1.4. Autres facteurs de transcription

Les facteurs de transcription de la famille LBD¹ sont également spécifiques du règne végétal. Ils jouent un rôle important dans le développement et la croissance des plantes. Ils ont notamment un rôle dans le développement du pollen ou encore la réponse à des stress biotiques et abiotiques (Rubin et al., 2009; Oh et al., 2010; Thatcher et al., 2012; Kim et al., 2015). Chez *Arabidopsis thaliana*, *ASL19/LBD30* et *ASL20/LBD18* contrôlent la différenciation des éléments trachéaires via une boucle de régulation avec *VND7* (Soyano et al., 2008; Yamaguchi et al., 2010a). Chez le peuplier, on observe l'expression des gènes *PtaLBD15* et *PtaLBD18* principalement au niveau de la transition cambium-xylème (Yordanov et al., 2010; Bdeir et al., 2016). Cela suggère que ces facteurs de transcription sont impliqués dans le développement xylémien chez le peuplier.

¹ LBD : lateral organ boundaries domain

Des facteurs de transcription de la famille E2F¹ interviennent également dans la formation du bois, notamment dans la régulation de la formation des parois secondaires. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Helin, 1998; Lavia et Jansen-Dürr, 1999; Veylder et al., 2003; Inzé, 2005). Une étude menée sur cinquante promoteurs a démontré la capacité de *E2FC* à se fixer sur le promoteur de 23 gènes (Taylor-Teeple et al., 2015b). Parmi eux, on retrouve notamment des maîtres régulateurs (*VND6-7*, *VNI2*), des facteurs de transcription de la famille MYB (*MYB43*, *MYB46*, *MYB52*), des gènes associés à la formation du xylème (*REVOLUTA*) et des gènes associés à la synthèse de la cellulose (*CesA4*, *CesA7*, *COBLA*), des hémicelluloses (*GUX2*, *FRA8*, *GT43*) et des lignines (*C4H*, *CCoAOMT*, *CAD4*, *LAC4*, *LAC17*). L'action d'*E2FC* est dose-dépendante. En effet, il active (Kosugi et Ohashi, 2002; Heckmann et al., 2011) ou réprime (de Jager et al., 2001; del Pozo et al., 2007) l'expression des gènes ciblés suivant la quantité de protéine E2FC présente dans la cellule. L'expression de *VND7*, par exemple, est ainsi réprimée lorsque E2FC est présent en faible quantité et induite lors d'une augmentation de la quantité d'E2FC (Taylor-Teeple et al., 2015). Au-delà de cette régulation dose-dépendante, une disparition complète de l'activité d'E2FC a été montrée lorsque la protéine est phosphorylée, formant alors un hétérodimère avec DPB² (del Pozo et al., 2002, 2006, 2007).

Enfin, des facteurs de transcription de la famille LIM, impliqués dans l'assemblage du cytosquelette, seraient des régulateurs de la biosynthèse des lignines (Kawaoka et al., 2000). Plus récemment, des peupliers sur- ou sous-exprimant *PtaGLIM1a* ont montré une augmentation (*resp.* une diminution) de la largeur de xylème produit ainsi qu'une augmentation (*resp.* une diminution) de leur quantité de lignines, sans impact significatif sur la structure du xylème (Yang et al., 2017b).

1.5. microARN et ARN long non codants

Grâce au small RNA-Seq, Puzey et ses collaborateurs (2012) ont identifié un grand nombre de microARN régulant l'expression de gènes associés à la croissance secondaire. Deux études menées par Chen et ses collaborateurs (2015a, 2015b) ont permis de mieux comprendre la formation du bois de tension chez le peuplier. D'une part, ils ont mis en évidence deux réseaux de régulation transcriptionnelle impliqués dans la formation du bois de tension. Ces réseaux ont permis de mieux comprendre la régulation des voies de biosynthèse de la cellulose et des lignines (Chen et al., 2015a). D'autre part, ils ont également pu identifier des ARN long non-codants impliqués dans la formation du bois. Ces ARN sont des régulateurs de transcription

¹ E2 Factor

² D-site binding protein

et semblent donc jouer un rôle important dans la régulation de la formation du bois (Chen et al., 2015b).

1.6. Petits peptides et récepteurs kinase

Parmi les grandes familles de régulateurs se trouvent les petits peptides associés à des récepteurs kinase. Dans cette famille, on retrouve notamment le système CLE¹-WOX² (Schoof et al., 2000; Dievart, 2003; Fiers et al., 2007; Kinoshita et al., 2007; Hirakawa et al., 2008; Jun et al., 2008; Butenko et al., 2009). Les CLE sont de petits peptides présents dans le domaine extracellulaire capables (i) de migrer dans cet espace et donc de transporter un signal et (ii) de se fixer sur des récepteurs kinases. Les PXY³ sont des récepteurs de CLE (Fisher et Turner, 2007; Hirakawa et al., 2008). La fixation des CLE sur les PXY entraîne ensuite une cascade de phosphorylation inhibant ou induisant la transcription des facteurs de transcription WOX, eux-mêmes régulant la synthèse des CLE (Schoof et al., 2000; Dievart, 2003; Fiers et al., 2007; Kinoshita et al., 2007; Hirakawa et al., 2008; Jun et al., 2008; Butenko et al., 2009).

Identifié pour la première fois au début des années 2000 (Schoof et al., 2000), ce système permet la mise en place d'une boucle de régulation permettant la maintenance du méristème apical. Un système similaire a par la suite été observé pour le maintien des méristèmes racinaires (Stahl et al., 2009). Les divisions et différenciations cellulaires au niveau du cambium semblent également être régulées par ce système (**fig. 9**). En effet, le mutant *pxy* d'*Arabidopsis thaliana* présente un problème d'organisation du phloème et du xylème (Fisher et Turner, 2007). De même, *AtWOX4*, induit par CLE41, est considéré comme un facteur assurant le maintien du caractère pluripotent des cellules cambiales (Hirakawa et al., 2010b). En effet, sa mutation provoque une forte diminution du nombre de division cambiale. *AtWOX4* serait également un médiateur de l'induction des divisions cambiales par l'auxine (Suer et al., 2011). Contrairement à *AtWOX4*, *AtWOX14* semble lui impliqué dans la différenciation cellulaire, notamment des vaisseaux. Il serait également impliqué dans la stimulation de la synthèse des gibbérellines (Denis et al., 2017). Des systèmes semblables ont été observés chez le peuplier (Kucukoglu et al., 2017). Plus récemment, une étude portant sur le peptide CLE47 a montré que des peupliers (*P. tremula* x *P. tremuloides*) sous-exprimant ce peptide présentent une croissance radiale diminuée et une plus faible proportion de xylème secondaire (Kucukoglu et al., 2020). Il semble donc tout opportun de penser que *PttCLE47* est un activateur de l'activité cambiale régulant principalement la différenciation en xylème (**fig. 9**). Les CLE ont par ailleurs

¹ clavata/embryo surrounding region-like

² wuchsel homeobox related

³ phloem intercalated with xylem

été montrés, chez *Zinnia elegans*, comme inhibiteurs de la différenciation en éléments vasculaires (**fig. 9**; Ito et al., 2006).

D'autres récepteurs kinase et petits peptides jouent un rôle dans la formation du bois. En effet, la division et le maintien des cellules cambiales sont induits par la receptor-like kinase RUL1¹ et inhibé par la receptor-like kinase MOL1² (Agusti et al., 2011). Récemment, un petit peptide, Kratos, a été identifié dans un système de culture de cellule d'*Arabidopsis thaliana* se différenciant en éléments type trachéaire (Escamez et al., 2019). Ce peptide serait libéré dans la matrice extracellulaire par les éléments subissant une mort cellulaire programmée. Il serait alors un élément limitant la diffusion de la mort cellulaire de proche en proche.

2. Régulation hormonale

2.1. Auxine

Les phytohormones jouent également un rôle important dans le développement du bois (Little et Savidge, 1987). Les premiers travaux portant sur l'effet des phytohormones dans le développement du bois remontent à la fin des années 1930. Ainsi, il a été montré que l'auxine est un facteur régulant la réactivation du cambium après le repos hivernal chez plusieurs espèces dont *Populus balsamifera* (Brown et Cormack, 1937) et *P. deltoides* x *P. nigra* cv Robusta (Digby et Wareing, 1966). Par ailleurs, l'arrêt de l'activité cambiale survient après une diminution de la photopériode (Howe et al., 1995) accompagnée par une diminution du transport et de la sensibilité à l'auxine (Little et Bonga, 1974; Lachaud et Bonnemain, 1984). Chez *Pinus sylvestris* et *P. tremula* x *P. tremuloides* a été mis en évidence un gradient radial de concentration de cette hormone présentant un maximum au niveau de la zone cambiale et décroissant plus rapidement côté phloème que xylème (**fig. 9**; Uggla et al., 1996; Tuominen et al., 1997). Ce gradient serait régulé par l'action d'ARF³ tels que les AUX1-like et PIN1-like (Schrader, 2003) ou établi par diffusion polaire symplasmique (Kaldeway, 1984; Uggla et al., 1996). L'auxine a alors été proposé comme l'équivalent des morphogènes chez les animaux, contrôlant le temps passé à chaque stade de développement (Wilson et Howard, 1968; Uggla et al., 1996). Cet argument est appuyé par l'influence dose-dépendante de l'auxine dans le développement des fibres et des vaisseaux. En effet, l'auxine est un régulateur de l'expansion cellulaire (Little et Savidge, 1987; Kutshera, 1994) régulant la taille du lumen des fibres et des vaisseaux aussi bien radialement que longitudinalement (Doley et Leyton, 1968; Sundberg et

¹ reduced in lateral growth1

² more lateral growth1

³ Auxine Responsive Factor

al., 2000; Nilsson et al., 2008). Cette régulation est probablement spécifique à chaque type cellulaire, fibres et vaisseaux ayant chacun un schéma de développement différent (cf **II** et **fig. 3**). Outre leur rôle potentiel dans la régulation du gradient d'auxine, les ARF comme *LAX1*¹ semblent impliqués dans les processus de dépôt des parois secondaires et de mort cellulaire programmée. Enfin, l'auxine serait également un activateur de la formation des parois secondaires (**fig. 9**; Smoliński et al., 1972, 1973; Phelps et al., 1974, 1977; Yamaguchi et al., 1980, 1983; Timell, 1986; Sundberg et al., 1994). Le rôle de l'auxine dans la formation des parois secondaires n'est pas encore totalement défini et il est possible que son action soit dépendante de sa concentration. En effet, le mutant *wat1*² d'*Arabidopsis thaliana*, pour lequel une réduction de la concentration et du transport de l'auxine a été remarquée, présente des fibres aux parois secondaires minces (Denancé et al., 2010; Ranocha et al., 2010). Par ailleurs, chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients pour la perception de l'auxine, on observe une anticipation de la lignification associée à une surexpression de *MYB26* (Cecchetti et al., 2013).

2.2. Gibbérellines

L'action différenciée de l'auxine sur les fibres et les vaisseaux pourrait être liée à des co-régulations hormonales. En effet, une autre hormone, les gibbérellines, semble également intervenir dans la régulation de la formation du bois. Elle serait notamment nécessaire dans les premières étapes de la formation du bois puisqu'on observe, chez *P. tremula*, une forte proportion de gibbérellines au niveau du xylème en différenciation (**fig. 9**; Israelsson et al., 2005). Cette hormone agirait en combinaison avec l'auxine dans la stimulation de l'activité cambiale et l'élongation des fibres dans le xylème en développement (**fig. 9**; Digby et Wareing, 1966; Hess et Sachs, 1972; Aloni, 1979, 1985, 2001; Eriksson et al., 2000; Biemlet et al., 2004; Israelsson et al., 2005; Björklund et al., 2007; Mauriat et Moritz, 2009; Dayan et al., 2010, 2012, 2012; Ragni et al., 2011). En effet, les travaux de Dayan et ses collaborateurs (2012) ont montré que l'application de gibbérellines et d'auxine sur des tabacs décapités restaure l'activité cambiale. Ils ont également montré que l'application de gibbérellines induit majoritairement une différenciation en fibres alors que l'application d'auxine induit plutôt une différenciation en vaisseaux. Ces travaux montrent donc bien la co-régulation existante entre ces deux hormones. Par ailleurs, les voies de l'auxine et des gibbérellines sont connectées. En effet, l'auxine est un activateur des gènes de biosynthèse des gibbérellines (Ross et al., 2000; Wolbang et Ross, 2001; Wolbang et al., 2004) et les gibbérellines sont un régulateur du transport de l'auxine (Björklund et al., 2007).

¹ Like-AuXine1

² Walls are thin1

2.3. Cytokinines

L'activité cambiale semble également être régulée par la présence de cytokinines (**fig. 9**). En effet, des peupliers ont été modifiés pour produire plus ou moins de cytokinines. Les peupliers déficients en cette hormone présentent des tiges d'un diamètre plus faible (Nieminen et al., 2008), alors que ceux présentant une production accrue de cette hormone présentent une augmentation de la taille du cambium en division sans modification de l'anatomie de leur bois (Immanen et al., 2016). De plus, des quadruples mutants d'*Arabidopsis thaliana* ne produisant plus de cytokinines ne développent alors plus de cambium (Matsumoto-Kitano et al., 2008). Ainsi, cette hormone semble être responsable du maintien des cellules cambiales et de leur division (**fig. 9**; Milioni et al., 2001; Mähönen et al., 2006; Matsumoto-Kitano et al., 2008; Nieminen et al., 2008). Cette hormone et ses gènes de signalisation se retrouvent principalement au niveau du phloème en différenciation (**fig. 9**; Immanen et al., 2016) et sont connus pour réguler le transport (Björklund et al., 2007; Šimášková et al., 2015) et l'homéostasie (Jones et al., 2010) de l'auxine. Par ailleurs, les cytokinines semblent être des activateurs de la transcription de gènes associés à la formation des parois secondaires. En effet, la surexpression de *AtHP4*¹, régulateur positif de la voie de signalisation des cytokinines, chez *Arabidopsis thaliana* induit une diminution de la quantité de lignines, de l'épaisseur des parois et de l'expression des gènes associés à la formation des parois secondaires (Jung et al., 2008). Sa sous-expression entraîne, elle, une augmentation de la lignification (Hutchison et al., 2006).

2.4. Autres hormones

D'autres hormones semblent également jouer un rôle dans le développement xylémien mais ont été moins intensivement étudiées. Ainsi, l'éthylène aurait un rôle dans la levée de dormance et les divisions cambiales (**fig. 9**; Biro et al., 1980; Little et Savidge, 1987; Eriksson et al., 2000; Andersson-Gunnerås et al., 2003; Du et Yamamoto, 2003; Junghans et al., 2004; Love et al., 2009). Il serait également impliqué dans la formation de bois de tension (Little et Pharis, 1995; Love et al., 2009). En effet, on observe une induction asymétrique de gènes de biosynthèse de l'éthylène en réponse à un inclinaison de la tige principale de *P. tremula* x *P. tremuloides* (Andersson-Gunnerås et al., 2003). Les gènes *ERF*² sont également identifiés comme des régulateurs de la croissance secondaire des arbres (Vahala et al., 2013; Seyfferth et al., 2018; Wessels et al., 2019).

Les brassinostéroïdes seraient plutôt impliquées dans la mort cellulaire programmée et le dépôt des parois secondaires (**fig. 9**; Iwasaki et Shibaoka, 1991; Demura et Fukuda, 1994;

¹ Histidine-containing phosphotransfer protein 4

² Ethylene Responsive Factor

Fukuda, 1997; Yamamoto et al., 1997, 2001). En effet, les brassinostéroïdes induiraient la transcription des gènes associés à la formation des parois et son remodelage (Sun et al., 2010). Ces hormones semblent particulièrement impliquées dans la synthèse de la cellulose (Xie et al., 2011; Sun et al., 2015). En effet, elles induisent l'expression de la plupart des *CesA*, probablement au travers de l'activation de la transcription du gène *BES1*¹. Par ailleurs, dans son étude, Fukuda (1997) a également montré que ces hormones stimulent l'expression de gènes associés au développement du xylème dans un système de culture de cellules de *Zinnia elegans*. Ils semblent également réguler la différenciation cellulaire en association avec l'auxine par la régulation de gènes tels que les HD-ZIP III² (cf **IV.1.3**; Baima et al., 1995, 2001; Ohashi-Ito et Fukuda, 2003; Ramachandran et al., 2017; Xu et al., 2019).

Par ailleurs, l'acide abscissique serait impliqué dans la régulation de la formation des fibres. En effet, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en acide abscissique montrent un retard de production des fibres, sans modification de la quantité de xylème produit (Campbell et al., 2018). L'application d'acide abscissique exogène sur ces mutants restaure la production de fibres. La déficience en acide abscissique endogène conduit également à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation en fibres, notamment *NST1*, *SND1* et *SND2*. Seule l'expression de *NST1* et *SND1* est partiellement restaurée par l'application d'acide abscissique exogène. Le rôle de l'acide abscissique sur l'expression de *NST1* a récemment été démontré (Liu et al., 2021). L'activation de ce facteur de transcription est réalisée via sa phosphorylation par une protéine kinase, SnRK2³, laquelle conserve sa forme phosphorylée en présence d'acide abscissique. En effet, SnRK2 est déphosphorylée par des protéine phosphatases de type PP2C⁴ qui, en se liant aux récepteurs PYR/PYL⁵ via l'acide abscissique, perdent leur activité phosphatase. Enfin, l'activité cambiale semble régulée par l'action des strigolactones (**fig. 9**; Agusti et al., 2011), et de l'acide jasmonique (**fig. 9**; Sehr et al., 2010), ce dernier ayant, par ailleurs, une action sur l'éthylène (Zhu et al., 2011b).

¹ BRI EMS Suppressor 1

² Class III Homeodomain Leucine Zipper

³ sucrose nonfermenting 1-Related Kinase

⁴ Protein phosphatase 2C

⁵ Pyrabactin Resistance / PYR1-Like

V. Problématique de l'équipe d'accueil et objectif de la thèse

Les recherches menées dans l'unité mixte de recherche BioForA¹ (<https://www6.val-de-loire.inrae.fr/biofora/>), née de la fusion d'une unité INRAE et d'une unité ONF au 1^{er} janvier 2018, visent à une meilleure conservation et valorisation des ressources génétiques forestières en vue d'une production durable de bois dans un contexte de changement climatique. Pour mener à bien ces travaux, l'unité associe des compétences variées allant de la physiologie à la génomique en passant par la génétique ou la génomique fonctionnelle.

L'équipe « Physiologie moléculaire de la formation du bois » (<https://www6.val-de-loire.inrae.fr/biofora/Recherche/Equipe-BOIS>), dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, a pour objectif d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés à la xylogénèse et la mise en place des propriétés physico-chimiques et mécaniques du matériau bois, conditionnant fortement sa valorisation. Pour ce faire, l'équipe utilise une démarche de biologie intégrative sur le modèle peuplier, en utilisant le bois de tension comme modèle d'étude. Les recherches menées se regroupent autour de trois objectifs majeurs : (i) mettre en évidence les réseaux de transcription liés à la formation du bois et leur régulation, (ii) identifier l'impact de la modification de l'expression de gènes clefs sur les propriétés du bois et son utilisation potentielle et (iii) déterminer les mécanismes associés à la formation d'un gel dans les couches G des fibres de bois de tension.

Dans le cadre de différents projets de l'équipe, des lignées de peupliers aux propriétés chimiques et / ou mécaniques altérées ont été produites. Les gènes dont l'expression a été modifiée sont impliqués dans la lignification, la biosynthèse de la cellulose ou sa cristallinité ou codent pour des régulateurs majeurs et des protéines pariétales dont la fonction n'est pas complètement élucidée. La plupart de ces lignées ont déjà été caractérisées aux niveaux anatomique, moléculaire et biochimique à l'échelle du tissu bois. Cependant, la diversité cellulaire du bois représente un obstacle conséquent dans l'étude des mécanismes moléculaires liés à la formation du bois. En effet, au-delà de leurs différences de fonction et de composition chimique de leur paroi, ces différents types cellulaires présentent des schémas de développement qui leur sont propres (*e.g.* Courtois-Moreau et al., 2009). De même, ils semblent présenter des mécanismes de régulation de leur développement qui leur sont spécifiques (*e.g.* VND-NST, *cf* **IV.1.1**). Tout l'enjeu pour gagner en compréhension des mécanismes associés à la formation du bois est donc de prendre en considération la spécificité de chaque type cellulaire

¹ Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt

composant le bois. Ainsi, dans le cadre de ma thèse, j'ai développé une approche de phénotypage des parois à l'échelle cellulaire. J'ai ensuite réalisé une analyse intégrant les données obtenues par cette approche à des données transcriptomiques également obtenues à l'échelle cellulaire. Cette intégration m'a alors permis d'établir un modèle de formation des parois secondaires des fibres de bois, objectif final de ma thèse.

Afin de mieux comprendre la mise en place des propriétés du bois et d'étudier la construction des parois de fibres de bois, j'ai conduit ma thèse suivant trois grands axes : (i) caractérisation des propriétés physico-chimiques des parois à l'échelle cellulaire (**chapitre I**), (ii) caractérisation d'un réseau de gènes associé aux propriétés des parois des fibres et des rayons (**chapitre II**) et (iii) caractérisations physiologique, anatomique et physico-chimique de lignées transgéniques (**chapitre III**). Toutes les études présentées dans ce manuscrit portent sur le clone INRA 717-1B4 (*P. tremula* x *P. alba*).

CHAPITRE I

Caractérisation des propriétés physico-chimiques des parois à l'échelle cellulaire

Chez les Angiospermes, le bois est composé de trois types cellulaires majoritaires : les fibres, les vaisseaux et les rayons (Déjardin et al., 2010). La structure et la composition des parois de ces cellules varient considérablement en fonction des stades de développement et des conditions environnementales. En réponse à des contraintes mécaniques, par exemple, les feuillus produisent un bois dit de tension sur la face supérieure de leur tronc incliné afin de se redresser. Ce bois est caractérisé par la présence d'une couche surnuméraire dans les parois des fibres, appelée couche G, composée majoritairement de cellulose et de polysaccharides non cellulosiques (Pilate et al., 2004). Le bois est donc un assemblage complexe des parois cellulaires de fibres et vaisseaux interconnectés aux cellules vivantes de rayons. Cette complexité rend difficile le décryptage des mécanismes moléculaires associés à la formation du bois et à la mise en place de ses propriétés physico-chimiques et mécaniques. Cette difficulté tend à être de plus en plus contournée par le développement récent d'approches à l'échelle cellulaire et le microphénotypage.

Ces dernières décennies ont vu l'émergence de méthodes de phénotypage haut-débit pour l'analyse de la composition chimique de la biomasse lignocellulosique. Ces méthodes utilisent principalement la spectroscopie vibrationnelle en proche et moyen infrarouge. En effet, les longueurs d'ondes émises par les faisceaux IR¹ sont spécifiquement absorbées par des types de liaisons chimiques. Il est alors possible d'attribuer spécifiquement des longueurs d'onde à un composé (McCann et al., 1992; Kacurakova et Wilson, 2001). La composition et les propriétés des parois peuvent être estimées par des équations de prédiction basées sur des spectres d'absorbance en proche infra-rouge. Cette méthode a notamment montré son efficacité chez *Arabidopsis thaliana* (Jasinski et al., 2016), le maïs (Baldy et al., 2017; Cuello et al., 2019), le riz (Huang et al., 2017) et le peuplier (Gebreselassie et al., 2017). La spectroscopie FTIR² est une approche spectroscopique en moyen infrarouge. En effet, c'est en moyen-IR, soit de 4000 à 400 cm⁻¹ que sont émises les vibrations fondamentales des molécules. Cela permet donc une détection des liaisons moléculaires présentes dans l'échantillon analysé (Bertrand et Dufour, 2006; Allison, 2011). Cette approche a notamment permis d'étudier la composition des parois de mutants chez *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 1998). Afin de prendre en considération la variabilité cellulaire au sein d'un tissu, la spectroscopie FTIR a été couplée à de l'imagerie. Il a alors été possible d'étudier *in situ* la formation du bois de cœur chez le mélèze (Piqueras et al., 2020), l'orientation des différents composés pariétaux, notamment dans la couche G (Olsson

¹ infrarouge

² infrarouge à transformée de Fourier

et al., 2011) et les différences de composition entre les différents types cellulaires – fibres, rayons et vaisseaux – (Gorzsás et al., 2011). L'imagerie chimique par spectroscopie ATR-FTIR¹ est une des méthodes les plus résolutive actuellement disponibles. Cependant, elle n'a que peu été employée sur des échantillons de tissus végétaux. En effet, une seule étude utilisant l'imagerie ATR-FTIR a été rapportée (Warren et al., 2015). Cette étude menée sur le grain de blé et la feuille d'*Arabidopsis thaliana* a notamment permis d'étudier la microstructure et la composition, notamment en amidon, de ces deux organes. Dans ce premier chapitre, je développerai donc la mise au point de cette méthode de microspectroscopie infrarouge appliquée à l'étude de la composition chimique des parois des cellules de bois.

I. Mise au point préalable

Afin de mettre au point cette méthode de microphénotypage, j'avais à ma disposition, au sein du Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre (resp. Dr. Gilles Pilate), l'imageur infrarouge Spotlight 400 couplé à un spectromètre Spectrum 400 (PERKIN ELMER, Wellesley, États-Unis). Cet appareil est équipé d'un détecteur linéaire composé de seize capteurs afin de gagner en rapidité d'acquisition. Il dispose de plusieurs modes d'imagerie (réflectance, transmittance et ATR) et de plusieurs modes d'acquisition (point et image). Le mode ATR est celui présentant la plus grande résolution avec un pixel de 1.56 μm de côté. Deux éléments permettent d'obtenir cette faible taille de pixel. Une première diminution est obtenue par l'utilisation d'un cristal de Germanium. En effet, ce matériau présente un fort indice de réfraction (4.01) et permet alors d'obtenir une résolution spatiale de 3.1 μm . Afin d'obtenir un pixel de 1.56 μm de côté, le pas d'acquisition est diminué de moitié résultant en un suréchantillonnage de facteur 2. Deux types de cristaux de Germanium sont disponibles : un cristal point et un cristal plan. J'ai choisi d'utiliser un cristal plan permettant de diminuer le risque de contamination du signal lors de l'acquisition. En effet, lorsqu'un cristal plan est utilisé, c'est l'ensemble cristal-échantillon qui se déplace sous le faisceau IR. À l'inverse, lorsqu'un cristal point est utilisé, celui-ci est détaché de l'échantillon à chaque acquisition et seul l'échantillon est déplacé. Avant son application à trois types de bois contrasté reportée dans l'article 1, l'imagerie ATR-FTIR a nécessité une mise au point préalable. Plusieurs aspects techniques étaient notamment à maîtriser : préparation de l'échantillon, acquisition et traitement des spectres.

¹ infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée

1. Préparation des échantillons

Comme pour toute méthode d'imagerie, la qualité finale des images obtenues est fortement dépendante de la qualité des échantillons au départ. La préparation des échantillons analysés par imagerie ATR-FTIR est simple et rapide. En effet, afin de ne pas intervenir sur les liaisons chimiques au sein des parois, aucun traitement (*e.g.* coloration, lyse des contenus cellulaires) n'est appliqué sur les échantillons. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la qualité de l'image obtenue. Parmi eux se trouve l'épaisseur de la coupe réalisée. En effet, bien qu'il soit théoriquement possible d'analyser des échantillons en bloc, la réalisation de coupes fine reste préférable afin d'identifier au mieux les types cellulaires. L'état hydrique des coupes analysés pourrait compliquer la comparaison d'une image à l'autre. En effet, comme toute molécule, la molécule d'eau présente un spectre d'absorbance qui lui est propre au moyen infrarouge. Une variation de la quantité d'eau présente entre les différentes coupes analysées conduirait alors à des variations dans le spectre d'absorbance qui ne seraient pas le reflet d'une différence biologique. Il est donc nécessaire de laisser sécher les coupes réalisées avant utilisation. Cependant, en séchant, le bois subit des déformations et a donc tendance à gondoler. Il faut alors également veiller à conserver la planéité des coupes afin d'éviter une déformation du tissu.

Afin d'identifier l'épaisseur optimale de l'échantillon, j'ai réalisé des coupes transversales de tiges à plusieurs épaisseurs (15 μm , 20 μm , 30 μm et 60 μm) à l'aide d'un microtome (RM2155 ; LEICA, Wetzkar, Allemagne). À 15 μm d'épaisseur, il est très difficile d'obtenir une coupe entière, sans déchirure. À 60 μm , la coupe obtenue reste entière mais l'image hyperspectrale est de très faible qualité. Couper à 20 ou 30 μm d'épaisseur est tout aussi délicat. Les lumens des cellules étant mieux définis sur les coupes à 20 μm , j'ai conservé cette épaisseur de coupe pour l'ensemble de mes expériences.

Pour maintenir la planéité des coupes, elles sont séchées entre deux lames de microscopie. Dans le but de faciliter leur étalement sur la lame, j'ai envisagé de les poser sur une goutte d'éthanol absolu. Afin de vérifier l'absence d'impact du traitement à l'éthanol sur les spectres d'absorbance, j'ai réalisé des coupes séchées dans une goutte d'éthanol et d'autres séchées directement à l'air. Le séchage entre deux lames est réalisé sur la nuit sur une table de macroscopie. Les échantillons sont ensuite transférés dans une salle dédiée à la spectroscopie où la température et l'hygrométrie sont régulées (23°C, 45%HR¹). Après ACP², on observe la

¹ Pourcentage d'humidité relative

² analyse en composantes principales

superposition des spectres acquis sur coupes séchées à l'éthanol et à l'air (**fig. 10**). Nous pouvons donc conclure sur l'absence d'effet détectable de ce séchage à l'éthanol sur les spectres acquis. Ainsi, pour la suite de mon travail, j'ai choisi de travailler avec des coupes séchées entre deux lames de verre dans une goutte d'éthanol absolu.

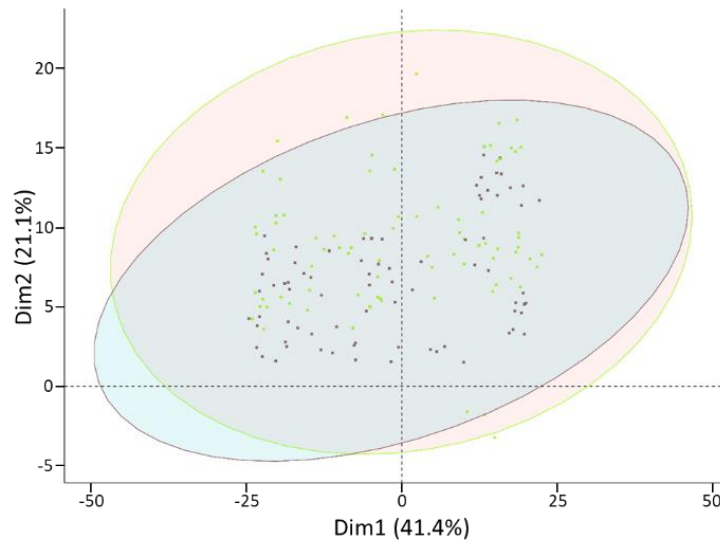


Figure 10 Comparaison d'un séchage avec ou sans éthanol sur des coupes transversales de bois de peuplier

Chaque point représente un spectre après dérivée première et normalisation SNV (voir plus loin). Vert : coupes séchées à l'air, Violet : coupes séchées à l'éthanol absolu, ellipses : 99% des spectres dans le cas d'une distribution normale.

2. Acquisition des spectres

Pour l'acquisition des images spectrales, j'ai utilisé l'imageur infrarouge Spotlight 400 couplé à un spectrophotomètre Spectrum 400 (PERKIN ELMER, Wellesley, États-Unis). Afin de maximiser le ratio temps-machine et la qualité de l'image, j'ai travaillé sur plusieurs paramètres tels que la résolution spectrale, le nombre de scans par pixel et la taille de l'image qui influencent grandement le temps d'acquisition. La résolution spectrale a été testée de 1 cm^{-1} à 16 cm^{-1} . De 1 à 3 cm^{-1} , les spectres obtenus sont extrêmement bruités et il est très difficile d'en sortir une information convenable. Au-delà de 6 cm^{-1} , les spectres s'en trouvent très fortement lissés. Cela conduit à la disparition de certains pics. Ainsi, la résolution spectrale que j'ai jugée optimale se situe à 4 cm^{-1} . Le paramètre 'nombre de scans par pixel' est un paramètre capital dans la maximisation du ratio signal-bruit. En effet, il détermine le nombre de spectres moyennés avant d'obtenir le spectre final du pixel. Cependant, il s'agit également du facteur influençant le plus le temps d'acquisition. Ainsi, j'ai réalisé des tests à 2, 4, 8, 16 et 32 scans par pixel. La qualité des images et spectres obtenus se trouve très fortement augmentée lorsqu'on passe de 2 à 16 scans par pixel. Au-delà de 16 scans, la qualité évolue peu et le temps d'acquisition augmente drastiquement. Ainsi, j'ai défini le nombre de scans par pixel optimal à 16.

3. Traitement spectral

Comme pour toute méthode spectroscopique, il est possible que les spectres présentent du bruit lié à la mesure ou à des variations incontrôlées dans la ligne de base. Il faut alors réaliser un ou des prétraitements avant l'analyse plus poussée des spectres. Dans un premier temps, le spectre est réduit à la région allant de 1 800 à 850 cm^{-1} . En effet, il s'agit de la zone présentant les pics d'absorbance majeurs des composés pariétaux. Plusieurs prétraitements des spectres existent pour corriger les erreurs de mesure : lissage, standard normal variation (SNV), detrend ou dérivée.

Afin de réduire l'éventuel bruit résiduel lié à la mesure (erreur non systématique), un lissage a été effectué. Le lissage Savitzky-Golay (Savitzky et Golay, 1964) est classiquement utilisé en spectroscopie. Cet algorithme correspond à un lissage polynomial appliqué à une fenêtre mobile. Brièvement, à chaque nombre d'onde, la valeur d'absorbance est remplacée par la valeur d'un polynôme de degré p ajusté sur une fenêtre de largeur n centrée sur le nombre d'onde. Ces deux paramètres, n (largeur de fenêtre, obligatoirement impaire) et p (degré du polynôme de lissage), sont alors à définir. Il faut toutefois s'assurer que n soit supérieur à p . Il faut également noter que si n augmente trop, le lissage est trop fort. Après plusieurs tests, j'ai décidé d'effectuer un lissage doux systématiquement avec une largeur de fenêtre de 5 et un degré du polynôme de 2.

La diffusion peut être responsable d'une réduction sensible de l'intensité des spectres pour certaines longueurs d'ondes. Afin de corriger ces effets, la normalisation SNV (Barnes et al., 1989, 1993) est l'une des méthodes de prétraitement les plus utilisées en spectroscopie infrarouge (Sanderson et al., 1996; Carballo-Meilan et al., 2014). Après cette correction, les spectres présentent toujours une moyenne nulle et une variance de 1. Cette méthode consiste à corriger chaque spectre individuellement. Il est alors centré sur sa propre déviation standard. Elle est calculée comme suit :

$$X_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{X}_i}{\sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{X}_i)^2}{p - 1}}}$$

avec X_{ij} l'absorbance corrigée du spectre i au nombre d'onde j , x_{ij} l'absorbance brute du spectre i au nombre d'onde j , \bar{X}_i l'absorbance moyenne brute du spectre i et p le nombre de nombres d'onde.

Afin de supprimer les effets dus à la variation incontrôlée de la ligne de base, deux prétraitements sont classiquement utilisés : la dérivation et le detrend (Popescu et al., 2013). Dans le cas d'une dérivée première, le maximum des pics se retrouve rapporté à 0 et les points d'inflexion de la courbe au maximum. Une dérivée seconde sépare clairement les pics et bandes

d'absorption qui se chevauchent en temps normal. En revanche, ce prétraitement amplifie la complexité des spectres par l'augmentation du bruit. Dans les deux cas, les courbes résultantes ressembleront davantage à des signaux qu'à des spectres d'absorbance. Ces prétraitements sont très utilisés en spectroscopie infra-rouge.

Une autre méthode, la méthode detrend est également utilisée (Barnes et al., 1989, 1993). Tout comme la normalisation SNV, cette approche effectue une correction individuelle de chaque spectre. Ici, la tendance globale du spectre est modélisée par un polynôme. Dans le cas d'une correction detrend d'ordre 1, le polynôme modélisé correspond à la droite ($ax + b$) qui s'ajuste le mieux à tous les points du spectre. Afin d'obtenir le spectre corrigé, à chaque nombre d'onde, la valeur du polynôme est soustraite à la valeur d'absorbance brute suivant la formule :

$$X_{ij} = x_{ij} - P_{ij}$$

avec X_{ij} l'absorbance corrigée du spectre i au nombre d'onde j , x_{ij} l'absorbance brute du spectre i au nombre d'onde j , P_{ij} la valeur prise par le polynome au nombre d'onde j du spectre i

La sélection du prétraitement le plus efficace s'est basée sur sa capacité à regrouper correctement les spectres semblables ensemble et à distinguer les différents types d'échantillons entre eux. Une ACP réalisée sur 91 spectres issus de différents types de bois et ayant subis différents prétraitements (normalisation SNV ou correction detrend) ne montre que peu d'influence de ces deux prétraitements (**fig. 11A-B**). En effet, une nette séparation des trois types de spectres (OW_FibS¹, TW_FibS², TW_FibG³) reste visible quel que soit le prétraitement utilisé. Il est toutefois à noter une augmentation de la variance expliquée par la première composante lorsqu'une correction detrend est appliquée. Après regroupement hiérarchique sur composantes principales (HCPC), cinq groupes sont identifiés sur les données ayant subi une normalisation SNV (**fig. 11C**). En forçant l'identification de trois groupes, seuls trois spectres appartenant à la catégorie TW_FibS se situent en dehors du groupe regroupant les spectres de TW_FibS. Ainsi, il est probable qu'un bruit résiduel soit présent malgré cette correction. Malgré la présence de spectres de OW_FibS dans deux groupes, la correction detrend conduit, elle, à l'identification automatique de trois groupes (**fig. 11D**). Le groupe central correspond à un mélange de spectres appartenant aux groupes OW_FibS et TW_FibS. La correction detrend donnant des résultats satisfaisants sera donc préféré pour la suite.

¹ Couches-S des fibres de bois opposé

² Couches-S des fibres de bois de tension

³ Couche-G des fibres de bois de tension

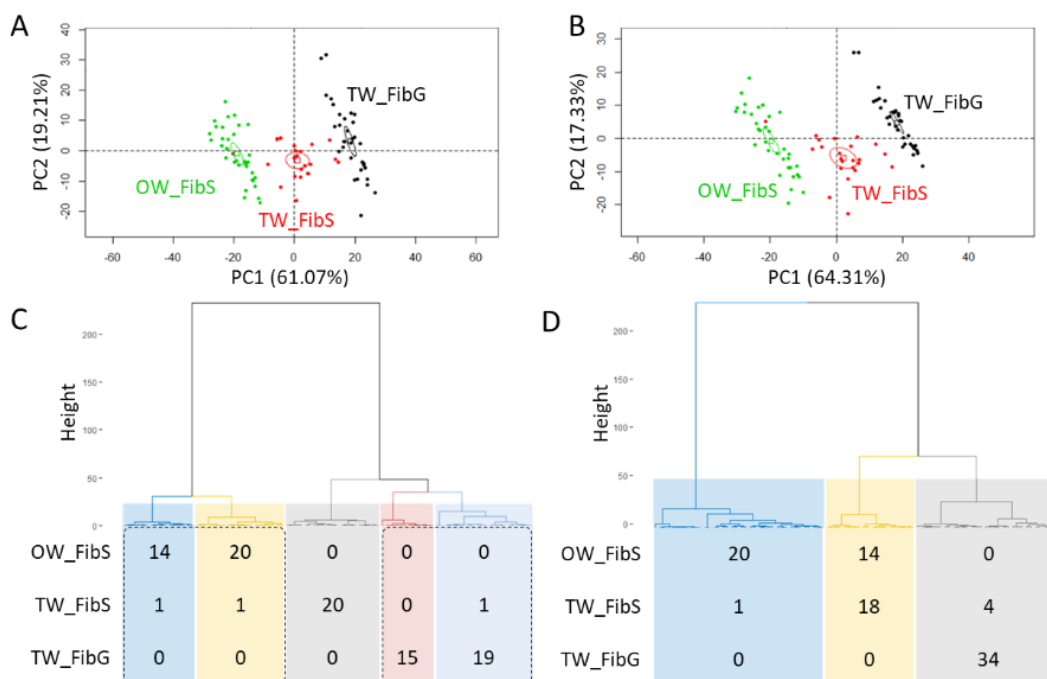


Figure 11 Comparaison d'une normalisation SNV (A,C) et d'une correction detrend (B,D) sur 91 spectres de fibres de bois opposé et de bois de tension.

Le jeu de données est composé de 34 spectres des couches-S de fibres de bois opposé (OW_FibS), 34 spectres de de couche-G de fibres de bois de tension ((TW_FibG) et 23 spectres de couches-S de fibres de bois de tension (TW_FibS). Les couches-S de fibres de bois de tension sont plus difficilement observables sur une image expliquant leur plus faible nombre. (A-B) Graphique présentant la distribution des spectres sur les deux premières composantes d'une analyse en composante principale. Chaque point représente un spectre. (C-D) Classification hiérarchique sur composantes principales des spectres. Les cadres pointillés correspondent aux groupes obtenus en forçant l'identification de trois groupes.

II. Mise en œuvre d'une méthode semi-automatisée d'analyse d'images ATR-FTIR pour caractériser des bois aux propriétés contrastées

Cette partie reprendra la méthode, les principaux résultats et les conclusions présents dans l'article publié *Frontiers in Plant Science* en février 2020 fourni en fin de partie. Afin de faciliter la lecture, la numérotation des figures de cet article a été modifié en bleu pour suivre la numérotation du manuscrit.

1. Contexte

Trois fonctions sont attribuées au bois dans l'arbre : conduction de l'eau des racines au houppier, soutien mécanique de la masse toujours en croissance et stockage de réserves temporaires. Chez les feuillus, ces fonctions sont assurées par les trois types cellulaires majoritaires présents : les vaisseaux, les fibres et les rayons respectivement (Plomion et al., 2001; Déjardin et al., 2010). Ces cellules proviennent de la différenciation d'initiales cambiales.

À la fin de leur développement, elles produisent une épaisse paroi secondaire. Cette paroi, multicouche, détermine les propriétés mécaniques du bois. Chaque couche de cette paroi correspond à un assemblage complexe de microfibrilles de cellulose semi-cristalline recouvertes d'une matrice amorphe composés de polysaccharides non cellulosiques (principalement des hémicelluloses) et de lignines (Mellerowicz et Sundberg, 2008).

En réponse à des environnements changeants, le bois est capable de s'adapter. Ainsi, en réponse à de fortes contraintes mécaniques (*e.g.* une pente), les Angiospermes produisent un bois spécifique, dit de tension, sur la face supérieure du tronc incliné. La particularité de ce bois réside en la modification de la structure des parois de ses fibres. En effet, une couche extra-numéraire, dite couche G, est produite à la place de certaines couches de la paroi secondaire (Daniel et al., 2006). La composition de cette couche diffère grandement des habituelles parois secondaires : forte proportion de cellulose très cristalline et de polysaccharides non cellulosiques (RG-I et AGP notamment) avec peu à pas de composés phénoliques (Norberg et Meier, 1966; Joseleau et al., 2004; Pilate et al., 2004; Gierlinger et Schwanninger, 2006; Gorshkova et al., 2015; Guedes et al., 2017). Le bois opposé est lui situé sur la face inférieure du tronc incliné, à l'opposé donc du bois de tension. Le bois dit normal est, quant à lui, le bois produit par l'arbre sans contraintes et donc droit.

2. Objectifs et implication dans mon projet de thèse

L'objectif général de l'étude présentée dans l'article 1 est de développer une méthode permettant d'obtenir des spectres IR spécifiques de chaque type cellulaire : fibres, rayons et vaisseaux. Pour cela, j'ai comparé trois types de bois présentant des phénotypes marqués et très contrastés : le bois de tension, le bois opposé et le bois normal. Pour cette comparaison, j'ai développé (i) une méthode de segmentation des images hyperspectrales et (ii) une approche *a priori* permettant d'identifier et de caractériser les différences vibrationnelles entre les différents types cellulaires des différents types de bois.

3. Stratégie

Pour cette analyse, j'ai utilisé six échantillons de peuplier INRA 717-1B4 cultivés en serre pendant trois mois en 2011 ou 2012. Trois d'entre eux (TT_11-A, TT_12-A et TT_12-B) ont été inclinés à 45° deux mois avant échantillonnage pour induire la formation de bois de tension. Après échantillonnage, les fragments de tige ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

L'étape déterminante de l'analyse a été de classer correctement les pixels dans chacun des types cellulaires. Des méthodes classiques de regroupement de données telles que la classification ascendante hiérarchique, la méthode des k plus proches voisins ou des k -moyennes, n'ont pas permis une bonne segmentation des images. J'ai alors développé une nouvelle approche basée sur un score de corrélation de Spearman du pixel à un MRS¹ de chaque type pariétal dans chaque type de bois. Ces MRS sont obtenus en moyennant 30 pixels, sélectionnés manuellement, de chaque type pariétal sur une image de chaque arbre. Ils correspondent donc à la moyenne de 90 spectres pour chaque type pariétal dans chaque type de bois. J'ai ensuite développé une méthode permettant de détecter des DAWNs² entre deux types pariétaux. Les pics d'absorbance reflétant la présence de groupes fonctionnels (*i.e.* d'un type de liaison chimique) dans le spectre, seuls les DAWNs présents au niveau de maxima locaux ont été conservés. Les données d'absorbance ne répondant pas aux critères de normalité, y compris après pré-traitement, j'ai alors opté pour une analyse non-paramétrique basée sur le test pairé de Wilcoxon associé à un ajustement de Bonferroni de la p -valeur.

4. Résultats

La stratégie de segmentation d'image présentée en [fig. 12](#) permet d'identifier les parois de fibres, que ce soit les couches-S dans les différents types de bois ou la couche-G dans le bois de tension. En effet, l'application de cette méthode à des spectres dont l'identité est connue, ceux utilisés pour produire les MRS, a montré une bonne assignation allant de 97% à 100% ([fig. 13A](#)). Cette méthode d'assignation peut également être considérée comme satisfaisante pour les parois des vaisseaux avec une bonne classification allant de 73% à 82% selon les types de bois. En revanche, elle a montré ses limites dans la classification des parois de rayons, avec seulement de 48% à 72% de bonnes identifications. La difficulté d'identification des parois de rayons peut être expliquée par la grande variabilité au sein de ce groupe. En effet, les rayons de peuplier étant unisériés (IAWA Committee, 1989), il n'y a que peu de paroi rayon-rayon sur des coupes transversales. Ainsi, les pixels de cette catégorie correspondent à un mélange de parois de rayons et de fibres ou de vaisseaux. Par ailleurs, les rayons peuvent être subdivisés en trois différents types (Braun, 1967; Nakaba et al., 2012) qui pourraient présenter des parois de composition différente. Pour l'étude de la composition des parois de rayon, il serait préférable

¹ spectre moyen représentatif

² nombres d'onde différentiellement absorbés

d'analyser des coupes transversales, permettant d'obtenir des spectres de paroi rayon-rayon, comme ce sera le cas dans le **chapitre II**.

L'analyse des DAWNs au niveau des fibres m'a permis de mettre en évidence deux groupes de nombres d'onde dont le comportement diffère suivant le type de bois. Ainsi, j'ai pu montrer une absorbance plus forte, synonyme d'un enrichissement, des nombres d'onde associés à la cellulose, notamment cristalline, à certaines hémicelluloses et lignines et à certaines protéines dans la couche-G de fibres de bois de tension par rapport aux couches-S de fibres tout bois confondu (**fig. 15C**, groupe E). J'ai également montré un enrichissement en xylanes, notamment acétylés, et en lignines dans les couches-S de fibres de bois opposé et normal par rapport aux couches-S et à la couche-G de fibres de bois de tension (**fig. 15C**, groupe B). Par ailleurs, cette approche m'a permis de mettre en évidence des différences de qualité des hémicelluloses et des lignines entre couches-S de fibres de bois opposé et couche-S de fibres de bois normal (**fig. 15C**, groupes A et C). Enfin, j'ai pu obtenir le profil d'absorbance des couches-S de fibres de bois de tension qui semble se rapprocher de la couche-G tout en présentant des caractéristiques des couches-S des fibres de bois opposé et normal (**fig. 15A**).

L'imagerie ATR-FTIR m'a également permis de dresser le premier spectre IR des parois de vaisseau (**fig. 17B**). L'analyse des DAWNs obtenus sur ces profils IR est relativement complexe. En effet, une grande variabilité a pu être observée au sein d'une même catégorie (*e.g.* parois de vaisseau de bois opposé). Cette variabilité pourrait être expliquée par le faible nombre de pixels étudiés par rapport aux parois de fibres. L'analyse des DAWNs m'a tout de même permis d'identifier deux grands groupes de nombres d'onde. On notera un enrichissement en xylanes acétylés dans les parois de vaisseaux de bois normal (groupe F) et un enrichissement en cellulose dans les parois de vaisseaux de bois de tension (**fig. 17C**, groupe A). Nous avons également mis en évidence des différences de structure et/ou de qualité des lignines et hémicellulose entre les différents types de bois (**fig. 17C**, groupes B et D). À ma connaissance, il n'existe pas d'étude sur la composition des parois des vaisseaux de ces trois types de bois. Ainsi, des analyses complémentaires par imagerie Raman ou immunohistocalisation sont nécessaires afin de valider ces observations.

5. Conclusion

L'imagerie ATR-FTIR m'a permis, grâce à sa grande résolution, d'obtenir des profils IR des parois de vaisseaux et de fibres. La méthode de traitement des images hyperspectrales que j'ai développée permet à la fois une assignation rapide du pixel à une catégorie et une identification de nombres d'ondes différenciellement absorbés entre échantillons. J'ai appliqué

cette méthode à différents types de bois, dont le bois de tension dont la composition chimique a été intensément étudié. J'ai alors identifié une forte absorbance des bandes associées à la cellulose cristalline et à des protéines dans la couche-G des fibres de bois de tension. Ces résultats sont en accord avec le savoir existant (Norberg et Meier, 1966; Lafarguette et al., 2004; Andersson-Gunnerås et al., 2006; Nishikubo et al., 2007; Guedes et al., 2017). J'ai également détecté une absorbance plus forte dans la couche-G des fibres de bois de tension correspondant à des composés phénoliques ce qui a également été rapporté précédemment (Joseleau et al., 2004; Gierlinger et Schwanninger, 2006a). L'imagerie ATR-FTIR permet donc bien de caractériser finement les propriétés physico-chimiques des parois à l'échelle de la cellule. Cette analyse *in situ* permet également d'avoir accès aux informations d'arrangement supramoléculaire. Ainsi, j'ai pu détecter de nombreux DAWNs non encore répertoriés dans la littérature pouvant être le reflet de modifications dans les liaisons entre molécules pariétales. Enfin, il m'a été possible de reconstruire des images permettant de visualiser la distribution de certains composés chimiques (fig. 14). L'imagerie ATR-FTIR semble donc être un outil puissant de microphénotypage à l'échelle de la paroi. Cependant, il est difficile d'assigner de façon univoque les bandes d'absorbance à des composés pariétaux. Ainsi, il reste nécessaire d'avoir recours à la validation des observations réalisées par des approche complémentaires moins haut-débit comme l'immunohistocalisation.

6. ATR-FTIR microspectroscopy brings a novel insight into the study of cell wall chemistry at the cellular level (article 1)



ATR-FTIR Microspectroscopy Brings a Novel Insight Into the Study of Cell Wall Chemistry at the Cellular Level

Clément Cuello¹, Paul Marchand^{1†}, Françoise Laurans^{1,2}, Camille Grand-Perret¹, Véronique Lainé-Prade^{1,2}, Gilles Pilate¹ and Annabelle Déjardin^{1*}

OPEN ACCESS

¹ INRAE, ONF, BioForA, Orléans, France, ² INRAE, Phenobois, Orléans, France

Edited by:

Andras Gorzsas,
Umeå University, Sweden

Reviewed by:

Lennart Salmén,
Research Institutes of
Sweden (RISE),
Sweden
Barbara Hinterstoisser,
University of Natural Resources and
Life Sciences Vienna, Austria
Frédéric Jammé,
Soleil Synchrotron, France

*Correspondence:

Annabelle Déjardin
annabelle.dejardin@inrae.fr

† Present address:

Paul Marchand,
INRAE, AgroParisTech, Université
Paris-Saclay,
ECOSYS, Thiverval-Grignon,
France

Specialty section:

This article was submitted to Technical
Advances in Plant Science,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 19 November 2019

Accepted: 23 January 2020

Published: 21 February 2020

Citation:

Cuello C, Marchand P, Laurans F,
Grand-Perret C, Lainé-Prade V,
Pilate G and Déjardin A (2020) ATR-
FTIR Microspectroscopy Brings a
Novel Insight Into the Study of Cell Wall
Chemistry at the Cellular Level.
Front. Plant Sci. 11:105.
doi: 10.3389/fpls.2020.00105

Wood is a complex tissue that fulfills three major functions in trees: water conduction, mechanical support and nutrient storage. In Angiosperm trees, vessels, fibers and parenchyma rays are respectively assigned to these functions. Cell wall composition and structure strongly varies according to cell type, developmental stages and environmental conditions. This complexity can therefore hinder the study of the molecular mechanisms of wood formation, underlying the construction of its properties. However, this can be circumvented thanks to the development of cell-specific approaches and microphenotyping. Here, we present a non-destructive microphenotyping method based on attenuated total reflectance–Fourier transformed infrared (ATR-FTIR) microspectroscopy. We applied this technique to three types of poplar wood: normal wood of staked trees (NW), tension and opposite wood of artificially tilted trees (TW, OW). TW is produced by angiosperm trees in response to mechanical strains and is characterized by the presence of G fibers, exhibiting a thick gelatinous extra-layer, named G-layer, located in place of the usual S2 and/or S3 layers. By contrast, OW located on the opposite side of the trunk is totally deprived of fibers with G-layers. We developed a workflow for hyperspectral image analysis with both automatic pixel clustering according to cell wall types and identification of differentially absorbed wavenumbers (DAWNs). As pixel clustering failed to assign pixels to ray S-layers with sufficient efficiency, the IR profiling and identification of DAWNs were restricted to fiber and vessel cell walls. As reported elsewhere, this workflow identified cellulose as the main component of the G-layers, while the amount in acetylated xylans and lignins were shown to be reduced. These results validate ATR-FTIR technique for *in situ* characterization of G layers. In addition, this study brought new information about IR profiling of S-layers in TW, OW and NW. While OW and NW exhibited similar profiles, TW fibers S-layers combined characteristics of TW G-layers and of regular fiber S-layers. Unexpectedly, vessel S-layers of the three kinds of wood showed significant differences in IR profiling. In conclusion, ATR-FTIR microspectroscopy offers new possibilities for studying cell wall composition at the cell level.

Keywords: ATR-FTIR microspectroscopy, phenotyping, poplar, cell wall, G-layer, wood

INTRODUCTION

Trees are able to live long and reach a considerable height, partly thanks to the remarkable properties of their wood. Indeed, wood—or secondary xylem—fulfills three major functions in trees: (i) water conduction from the roots to the crown, (ii) mechanical support of the ever-increasing mass of the growing tree submitted to different environmental cues (wind, slope, light, ...), and (iii) storage of temporary reserves, important for tree perennial growth (Plomion et al., 2001; Déjardin et al., 2010). In Angiosperm trees, vessels, fibers and parenchyma rays are respectively assigned to each of these functions. These different xylem cell types originate from the differentiation of cambial cells. When reaching their final dimensions, xylem cells build a secondary cell wall that will be deposited onto the primary wall and middle lamella. Vessels are rapidly submitted to programmed cell death after lignification of their cell walls, then fibers have the same destiny (Courtois-Moreau et al., 2009), while ray cells remain alive for several years (Nakaba et al., 2012). Therefore, wood results in the complex assembly of the cell walls of dead fibers and vessels, connected to living parenchyma rays (Déjardin et al., 2010).

Wood cell walls exhibit a multi-layered structure, determinant for wood mechanical properties: middle lamella and primary cell wall are overlaid by three layers of secondary cell walls (SCW), named S1, S2, and S3, S2 being the thickest. Each layer results from the assembly of semi-crystalline cellulose microfibrils embedded in an amorphous matrix of polysaccharides and lignins. They differ according to cellulose microfibril orientation and the nature and proportion of the matrix components (pectins, hemicelluloses and lignins) (Mellerowicz and Sundberg, 2008). The middle lamella and primary cell wall are known to be rich in lignins, pectins and xyloglucans, with apparently cellulose microfibrils oriented at random. By contrast, the S-layers are rich in xylans with oriented cellulose microfibrils: the angle formed between the cell axis and cellulose microfibrils, named microfibril angle (MFA) is wide in the S1- and S3-layers, while it is fairly low in the S2-layer (Barnett and Bonham, 2004). At the end of cell wall deposition, lignification occurs, leading to the impermeabilization of the cell walls. Lignins are phenolic polymers merely resulting, in hardwood species, from the polymerization of two classes of monolignols (coniferyl alcohol or G unit and synapyl alcohol or S unit) that differ in their degree of methoxylation (Freudenberg and Neish, 1968). They are synthesized in the cytoplasm, then transported to the cell wall, turned into chemical radicals by the activity of laccases and peroxidases and probably get polymerized in a random manner. Lignin structure is therefore highly diverse and difficult to predict (van Parijs et al., 2010).

Wood cell walls are highly variable according to developmental processes or various environmental stresses. First, it is known that secondary cell wall composition differs between vessels, fibers and ray cells (e.g. Donaldson et al., 2001). The cell wall of vessel elements is enriched in G-units while fiber cell wall is richer in S-units (Terashima et al., 1993). Wood cell wall composition can also be affected by various environmental cues. For example, in response to mechanical strains,

Angiosperm trees produce tension wood on the upper side of inclined trunks or branches in order to reorient them or at least to reach a new equilibrium. In poplar, tension wood fibers exhibit a thick gelatinous extra-layer, named G-layer (Jourez, 1997). Located in place of the usual S2 and/or S3 layers, G-layer is rich in cellulose, rhamnogalacturonan type I pectins (RG-I), and arabinogalactan proteins (AGP) (Gorshkova et al., 2015; Guedes et al., 2017), with nearly no lignin (Joseleau et al., 2004; Pilate et al., 2004; Gierlinger and Schwanninger, 2006). In G-layer, cellulose is more crystalline and MFA is close to 0° (Norberg and Meier, 1966; Gorshkova et al., 2015).

Thus, wood is both a highly complex and variable tissue, which does not facilitate the study of the molecular mechanisms underlying its formation and the building of its properties. However, this hindrance may be alleviated thanks to the development of cell-specific approaches and microphenotyping. Particularly, the development of microphenotyping methods may provide extensive biochemical information at the cell wall level. In the last decade, Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopy made possible high throughput biochemical analyses of lignocellulosic biomass. Indeed, the wavenumbers emitted by infrared beams are differentially absorbed according to the chemical bonds, therefore the functional groups, present in the sample. Cell wall composition may be determined by prediction equations based on near-infrared absorbance spectra of ground plant materials. This technique has been successfully used to predict cell wall composition in *Arabidopsis thaliana* (Jasinski et al., 2016), forage crops (Fairbrother and Brink, 1990; Molano et al., 2016; Baldy et al., 2017; Li et al., 2017), rice (Huang et al., 2017) and poplar (Gebreselassie et al., 2017). Mid-infrared (MIR) spectroscopy is complementary to predictive near-infrared (NIR) spectroscopy. Indeed, MIR spectroscopy targets the fundamental vibrations of the molecules, which gives a good visualization of the molecular bonds present in the sample (Bertrand and Dufour, 2006; Allison, 2011) and also to assign variations in the absorbance at a given wavenumber to a class of compounds (McCann et al., 1992; Kacurakova and Wilson, 2001). For example, FTIR spectroscopy was used to discriminate between different *Arabidopsis* cell wall mutants (Chen et al., 1998). FTIR spectroscopy coupled with microscopy imaging makes possible *in situ* analysis of cell wall assembly (Mouille et al., 2003; Gierlinger et al., 2008; Gorzsás et al., 2011; Chazal et al., 2014; Gierlinger, 2018).

In this methodological study, we present a non-destructive high-throughput microphenotyping method based on ATR-FTIR microspectroscopy, one of the most resolving methods currently available. The objective was to develop a method to obtain IR spectra specific to wood cell types, fibers, vessels and rays. Therefore, we have developed a high-throughput pipeline for hyperspectral image analysis with both automatic pixel clustering and identification of differentially absorbed wavenumbers between samples. We have implemented this pipeline on different types of wood, including tension wood, a model that has been extensively characterized from a biochemical point of view. We confirmed previously known results, which validates this *in situ* approach, and we generated for the first time an IR profile for vessel walls in three different types of wood.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Sample Preparation

The study was carried out on six three-month-old ramets, originating from *in vitro* micropropagated shoots of the INRA 717-1B4 clone (*Populus tremula* L. x *Populus alba* L.). Two ramets were grown in a greenhouse in spring 2011 and the four others in the autumn and winter 2012. In the latter case, the plants were supplemented with sufficient amount of artificial light to keep the cambium active. In order to induce the production of TW, three of these trees (TT_11-A in 2011, TT_12-A and TT_12-B in 2012) were tilted at 45° two months before sampling. The three other poplar plants (UT_11-C, UT_12-C and UT_12-D) were grown upright in the same conditions and produce no or very few TW. Three-centimeter-long stem fragments were sampled at the base of each tree. NW was collected on upright trees, TW and OW on the upper and lower side of artificially tilted trees, respectively. The samples were stored at -20°C until use.

For each tree, 20 µm-thick cross-sections were cut from the frozen wood samples using a RM2155 microtome (LEICA, Wetzlar, Germany). The sections were ethanol-dried between two glass slides to ensure flatness and stored at 23°C and 45% RH until ATR-FTIR analysis.

Hyperspectral Imaging

ATR-FTIR images were produced from stem cross-sections by a mid-IR light (1,800–850 cm⁻¹) at a 4 cm⁻¹ spectral resolution using a Spotlight 400 FTIR imaging system coupled to a Spectrum 400 FTIR spectrophotometer (PERKIN ELMER, Wellesley, USA). According to the manufacturer's procedure, the wood section was pushed by pressure into direct contact with the tip of the 600-µm diameter plane Germanium crystal. **Supplementary Figure 1** shows the contact area after pressure release showing the intimate contact of the sample with the crystal. Sixteen scans per pixel were taken in order to enhance signal-to-noise ratio. For each type of wood (TW, OW and NW), three (100 x 100) µm² images from each cross section were taken at a (1.56 x 1.56) µm² pixel size. The acquisition time of an image of this size was 40 minutes. This maximal pixel resolution corresponded to an oversampling factor of two, compared with the diffraction-limited spatial resolution of 3.1 µm. At this pixel resolution, the image size was 4,096 pixels. Therefore, for each type of wood, the data set was composed of 36,864 spectra (3 different trees x 3 images x 4,096 pixels). The spectra were then corrected using different functions of the SpectrumImage software (v.1.6.4): background correction during acquisition, noise reduction and atmospheric correction, using default parameters. No ATR correction was performed.

Multivariate Image Analysis

We analyzed ten classes of cell wall corresponding to the existing associations between cell wall layers (G- or S-layers), cell types (fiber, ray or vessel) and wood types (TW, OW or NW): TW fiber G-layer, TW fiber S-layer, OW fiber S-layer, NW fiber S-layer, TW ray S-layer, OW ray S-layer, NW ray S-layer, TW vessel S-layer, OW vessel S-layer and NW vessel S-layer. Multivariate image analysis has been performed independently

for each type of wood using R (v. 3.4.4) (**Figure 1**). Principal component analysis (PCA) was applied on raw spectra using PCA function implemented in FactoMineR package (v. 1.40). False RGB images were then obtained using quilt.plot (fields, v.9.6). Red, blue and green intensities were based on pixel contribution to first, second and third principal component, respectively. Based on these false RGB images, specific mean representative spectrum (MRS) were built for each cell wall class, from the average of 90 selected spectra (that is 30 spectra manually selected in one of the three images of each biological replicate of each wood type). Both MRS and pixel spectra were corrected using the detrend function implemented in the prospectr package (v. 0.1.3). Correlations between each pixel spectrum and MRS of its type of wood were determined using the Spearman correlation test implemented in cor.test (stats, v.3.5.2). The correlation score was used to assign pixels to a cell wall class or to lumen. A pixel was considered as lumen when its correlation scores with all MRS were below the threshold value of 0.90. Pixels with very similar correlation scores with all MRS (less than 1% difference) were classified as "not assigned" (NA). Finally, the pixel was assigned to the cell wall class whose MRS has the highest correlation score with the pixel.

Identification of Differentially Absorbed Wavenumbers (DAWNs)

DAWNs were determined using the pairwise Wilcoxon test from the R stats package (v.3.5.2). A Bonferroni adjusted *P*-value of 0.001 was used as cut-off criterion. Only DAWNs located at a local maximum (± 3 cm⁻¹) were considered for further analysis. Local maxima were identified on the average spectra resulting from all pixels assigned to a class of cell wall. A single wavenumber (σ) was considered as a local maximum when its absorbance was higher compared to $\sigma-2$ and $\sigma+2$ cm⁻¹. The assignation of DAWNs to cell wall components was based on an *in-lab* database (**Table S1**) compiling data from the literature and from the Histochem database (Durand et al., 2019; <https://pfl.grignon.inra.fr/shistochem/>).

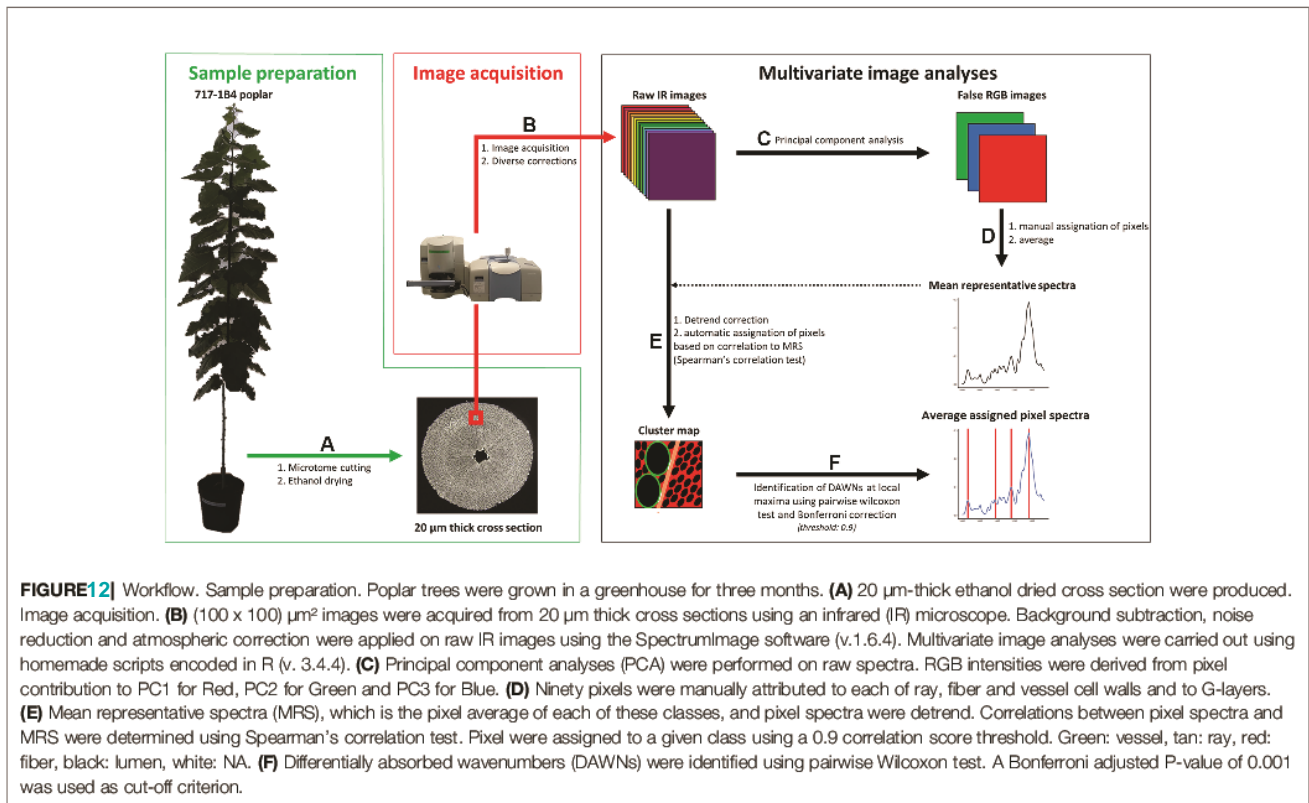
Statistical Analysis

For each cell type, a PCA was carried out on the whole spectra to discriminate between the different types of wood. Loadings were calculated as follow: $Loadings = Eigenvector \cdot \sqrt{Eigenvalues}$. Due to the huge size of the data set, pixels corresponding to the cell wall of each cell type in each image were averaged to produce heatmaps using heatmap.2 function (gplots package, v. 3.0.1.1), scaling on columns. Heatmaps dendrograms were calculated considering Pearson's correlation between wavenumbers as a distance.

RESULTS

From Raw Infra-Red Images to Pixel Clusters of the Different Cell Wall Types

One of the most important steps of the workflow was to produce a good assignation of the pixels to the different cell

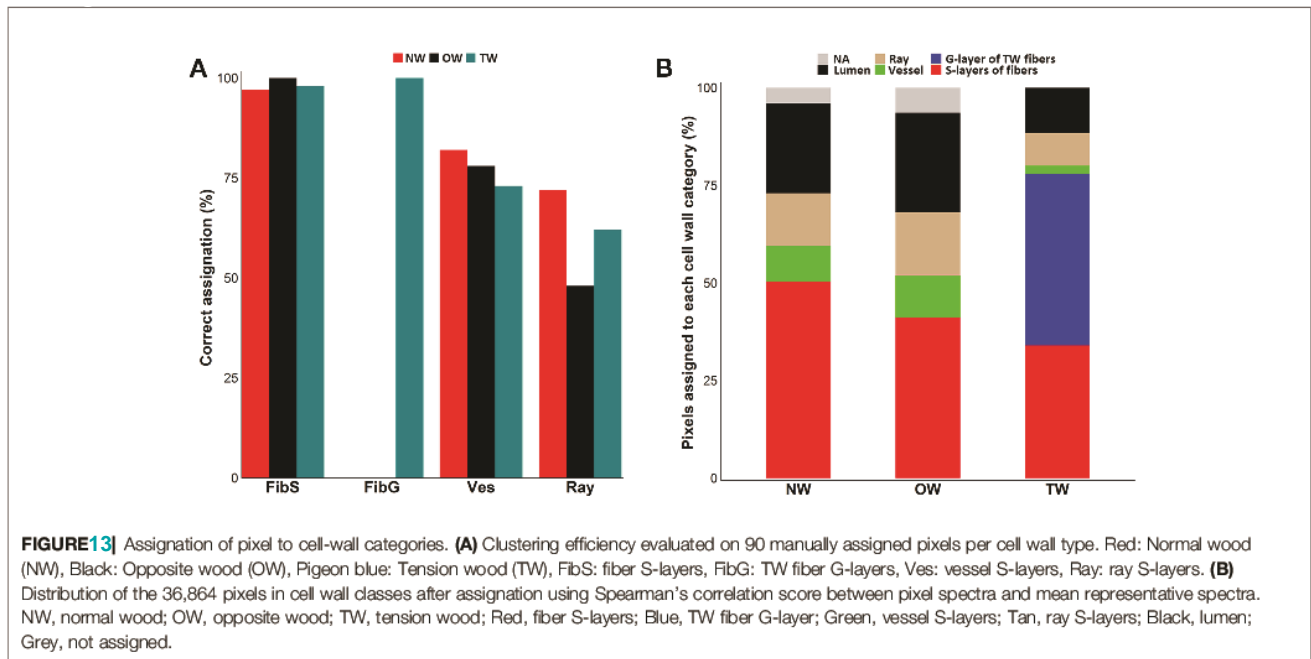


types from the different types of wood. Classic clustering methods, such as hierarchical clustering based on principal components, Ascending Hierarchical Classification, k-nearest neighbor and k-means were not conclusive. The most effective clustering method was the assignment based on Spearman's correlation score between pixel spectra and a mean representative spectrum (MRS) for each class of cell wall.

We applied this method to the spectra used to calculate the MRS of the different classes of cell wall (Table S2). When applied to pixels with a known assignment, our method correctly assigned 48% to 100% of the pixels depending on the cell wall category (Figure 2A). All the spectra from TW fiber G-layer were properly assigned, whereas, no spectrum from any TW S-layer class was wrongly assigned to the G-layer class. Likewise, all spectra of OW fiber S-layers were correctly assigned, while only three of them were identified as ray S-layers in NW and two of them were also identified as ray S-layers in TW. Our method correctly assigned a large part of vessel spectra: 78% in OW, 82% in NW and 73% in TW. In TW, nearly all wrongly assigned vessel spectra (23 out of 24) were classified as ray S-layers. In NW, only six vessel spectra were classified as ray S-layers, while four others had a correlation score below 0.90 with all MRS and were therefore classified as lumen. Finally, six spectra that presented similar correlation values to all MRS were in consequence not assigned. In OW, six vessel spectra were

categorized as ray S-layers, three as fiber S-layers, four as lumen and seven were not assigned. Conversely, the wrong assignment of ray spectra was rather high reaching 52% in OW, 28% in NW and 38% in TW.

Subsequently, we used this workflow to assign the 36,864 spectra from the pixels of each type of wood. In NW, 50% of the spectra were categorized as fiber S-layers, 14% as ray S-layers, 9% as vessel S-layers and 23% as lumen, while 4% of the spectra could not be assigned. In OW, 41% of the spectra corresponded to fiber S-layers, 16% to ray S-layers and 11% to vessel S-layers, while 26% of the spectra, with a correlation score below 0.90, were considered as lumen. Finally, 6% of the spectra with similar correlation levels to MRS from all classes, were not assigned and therefore excluded from the analysis. In TW, the fiber G-layer was the largest class with 44% of the spectra. The fiber S-layers, ray S-layers, vessel S-layers and lumen categories were composed of 34%, 8%, 2% and 12% of the spectra, respectively. Interestingly, unlike OW and NW, all TW spectra have been assigned (Figure 2B). The comparison between the raw IR images and the corresponding cluster maps (Figure 3) revealed a correct adjustment especially for fibers and vessels, indicative of the efficiency of the clustering method used to predict these two cell types. The pixels that could not be assigned mainly corresponded to pixels at the interface between cell types. As the assignment for ray S-layers was not very efficient, IR profiling was restricted to fiber and vessel SCW.



IR Profiling of Fiber and Vessel SCW Fibers

The fiber spectra, assigned by automatic clustering, were first analysed by PCA. When performed on all the images, PCA clearly discriminated three groups of spectra: TW fiber G-layer, TW fiber S-layers and a group combining spectra from both NW and OW fiber S-layers. However, in the latter group, two populations of spectra were detected, with the minor one gathering spectra all coming from the same 4 images (3 from NW and 1 from OW) (**Supplementary Figure S2**). These 4 images were therefore removed from the subsequent analysis as they may induce unwanted variability for technical or biological reasons. A new PCA was performed (**Figure 4A**), whose first dimension explained 42.5% of the variance and discriminated rather well TW fiber G-layer from the fiber S-layers of both OW and NW, whereas TW fiber S-layers stood in between. **Figure 4B** shows the average infrared spectrum of pixels assigned to the four types of fiber layers. The TW fiber G-layer spectrum shows significant changes compared to the OW and NW fiber S-layers spectra, including the disappearance of two bands at 1,594 and 1,506 cm^{-1} , corresponding to aromatic skeletal vibration of lignins (**Table S1**) and the appearance of a well-resolved double band at 1,336 and 1,316 cm^{-1} , that can be attributed to cellulose (**Table S1**, O-H in-plane bending and CH₂ rocking vibration, respectively). It is also characterized by the appearance of a band at 1,200 cm^{-1} , that can be attributed to OH in-plane deformation in cellulose. This band is masked in the other S-layers because of the overlap of a more intense band at 1,236 cm^{-1} , corresponding to acetyl and carboxyl vibration in xylan and to C-C, C-O and C=O stretch in lignins. Finally, a last band is clearly visible in TW fiber G and S-layers at 1,052 cm^{-1} , corresponding to C-O valence vibration, mainly from C3-O3H, most probably from cellulose. This latter band is detectable only

as a shoulder on the spectra of NW and OW fiber S-layers. The spectrum of TW fiber S-layers is intermediate, in particular with weak bands at 1,506 cm^{-1} , resembling the spectra of NW and OW; it also presents the G-layer characteristic bands at 1,136, 1,316, and 1,052 cm^{-1} . In terms of absorbance differences, the bands at 1,736 and 1,236 cm^{-1} mainly differentiate TW and OW/NW fibers, with a higher absorbance in the latter (**Figure 4B**): they can be mainly attributed to acetylated xylans, and to a lesser extent to lignins (**Table S1**). The PCA loading plots underline the spectral features associated with the first and second dimensions, which are responsible for most of the variance (**Supplementary Figure S3A**). The samples were discriminated only by the first dimension (**Figure 4A**). The loading for PC1 is quite complex and cannot be easily interpreted by simple changes in few compounds. The loading is positive mostly for six ranges of absorbance bands (1,576–14, 1,492–74, 1,446–28, 1,412–1,384, 1,360–1,280, 1,014–992 cm^{-1}). The first four ranges of bands do not correspond to known IR bands, while the two last groups may correspond to cellulose (crystalline cellulose at 1,335 cm^{-1} and 1,318–12 cm^{-1} , C–O valence vibration at 996–85 cm^{-1}) and lignins (1,330–24 cm^{-1} , S ring plus G ring condensed). The loading is negative for four ranges of bands (1,758–08, 1,268–06, 1,136–16, 1,098–68 cm^{-1}). The first three groups contain bands attributed to hemicelluloses, cellulose and lignins (**Table S1**). In order to identify more precisely differences between cell wall, we have identified DAWNs in the vicinity of a local maximum ($\pm 3 \text{ cm}^{-1}$), that were further used to generate a heatmap (**Figure 4C**, **Table S3**). The analysis was limited to these DAWNs because the most relevant biological information in an IR spectrum is carried by the wavenumbers at the level of the most intense bands. The heatmap shows 2 clusters of DAWNs that have a very contrasted absorbance profile between TW G-layer and S-layers of OW or NW fibers, while

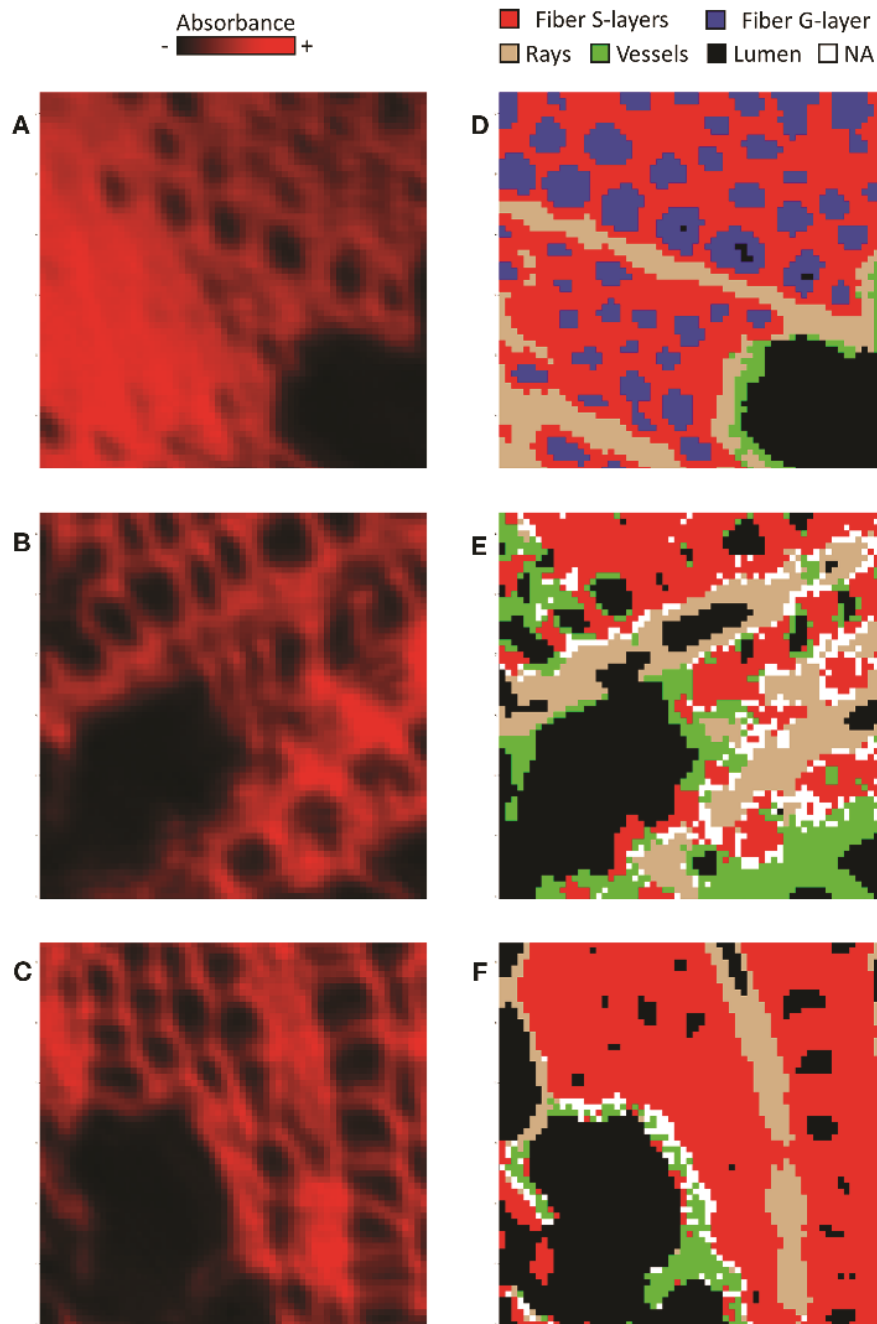


FIGURE 14 | Comparison of raw images (A–C) and cluster map (D–F) of tension wood (A, D), opposite wood (B, E) and normal wood (C, F) using one representative image per type of wood. Note that these images were not the ones used to determine MRS. (A–C) In raw images, the intensity in red reflects the mean absorbance of the pixel. (D–F) Red, fiber S-layers; Blue, fiber G-layer; Green, vessel S-layers; Tan, ray S-layers; White, NA; Black, lumen.

TW fiber S-layer has an intermediate profile. Cluster B gathers DAWNs with a high absorbance in NW and OW S-layers and a low absorbance in TW S- and G-layers. On the reverse, Cluster E groups DAWNs with a high absorbance in TW G-layer and to a lesser extent in TW S-layers and a low absorbance in NW and OW

S-layers. Cluster B contains DAWNs in the range of 1,742–28 and 1,238–32 cm^{-1} related mainly to acetylated xylans, and in the range of 1,596–90 and 1,508–04 cm^{-1} related to lignins. Surprisingly, this latter group was weakly absorbed in NW fiber S-layers, compared to OW fiber S-layers. Cluster B also contains

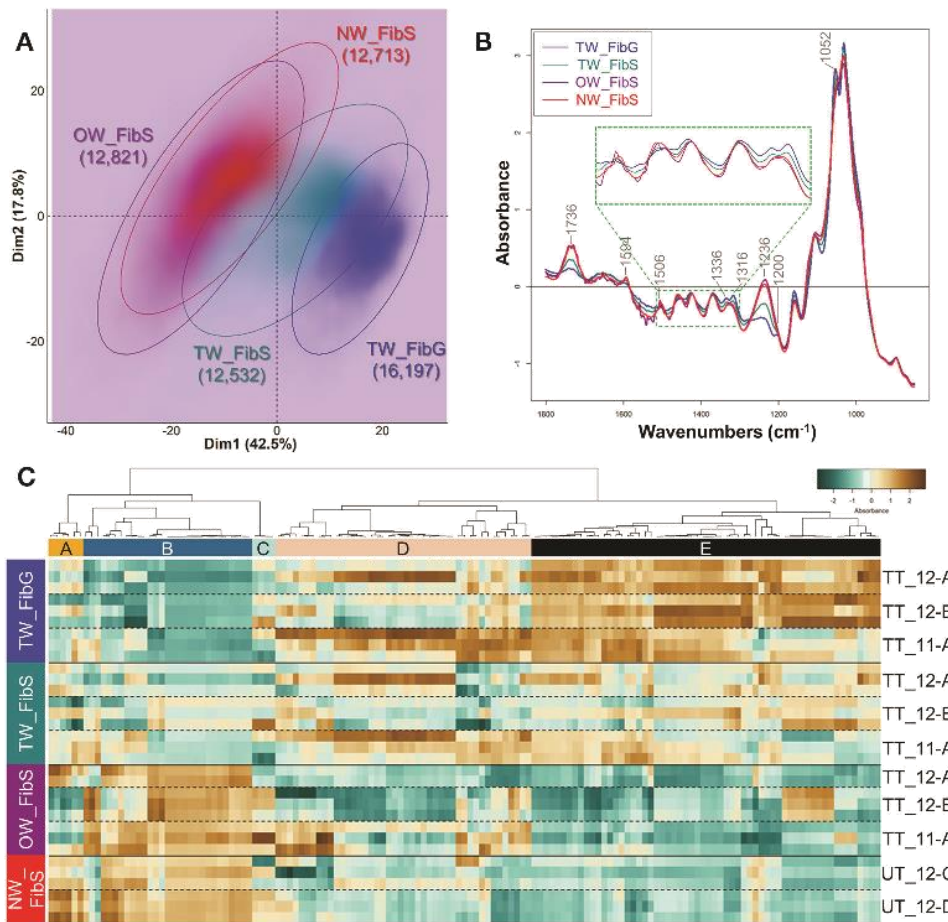


FIGURE 15 | Chemical differences between the G-layer from tension wood fibers and the S-layers from fibers of tension, opposite and normal wood. **(A)** PCA score plot. Blue, TW fiber G-layer; Turquoise, TW fiber S-layers; Purple, OW fiber S-layers; Red, NW fiber S-layers. Ellipses encompass 95% of the data in a normal distribution. Numbers in brackets refer to the number of pixels assigned to the different cell wall categories. Color intensity reflects the density of individuals. **(B)** Average ATR-FTIR spectra. Blue, TW fiber G-layer; Turquoise, TW fiber S-layers; Purple, OW fiber S-layers; Red, NW fiber S-layers. The green dotted line insertion represents a zoom of the [1,510–1,300] cm^{-1} region. **(C)** Heatmap of differentially absorbed wavenumbers. TW_FibG, TW fiber G-layer; TW_FibS, TW fiber S-layers; OW_FibS, OW fiber S-layers; NW_FibS, NW fiber S-layers.

DAWNs in the range of 1,248–1,244 cm^{-1} , that may be attributed to lignins (stretching of phenolics), and in the range of 1,464–58 cm^{-1} , where both cellulose, lignins and xylans may contribute (CH₂ of pyran ring symmetric scissoring; OH- and CH-deformation). Cluster E contains DAWNs that may correspond to crystalline cellulose (1,428–26, 1,336–1,314 cm^{-1} , which appear as a double band in the TW G-layer spectra). Likewise, it contains DAWNs in the range of 1,282–78 and 1,162–56 cm^{-1} that may be also attributed to cellulose. Cluster E contains DAWNs in the range of 1,056–50 and 1,036–30 cm^{-1} , that can be attributed to cellulose, hemicelluloses (and also to lignins for the latter group). Interestingly, it contains a group of DAWNs at 1,518–12 cm^{-1} that can be attributed to lignins (aromatic skeletal vibration, higher absorbance in G lignin in comparison to S lignin, **Table S1**) and one in the range of 1,556–48 cm^{-1} than can be attributed to proteins (Amide II: N-H deformation + stretching contribution

from C-N stretching, **Table S1**). Finally, some groups of DAWNs cannot be easily related to known IR assignment (1,790–74, 1,696–92, 1,562, 1,540–30, 1,478–74 cm^{-1}).

Figure 5 shows images reconstructed on the basis of the absorbance level for each pixel at a given wavenumber. Three wavenumbers were chosen: 1,736 cm^{-1} (acetylated xylans), 1,316 cm^{-1} (crystalline cellulose), and 1,236 cm^{-1} (acetylated xylans and lignins). In particular, the images clearly show the absorbance gradient between fiber G-layer and S-layer in TW.

Vessels

PCA analysis on vessel S-layers spectra slightly discriminates the spectra from TW, OW and NW, according to the first two dimensions, explaining 36 and 17.7% of the variance (**Figure 6A**). When the first dimension partially separates TW vessel S-layers from both OW and NW vessel S-layers, the second one

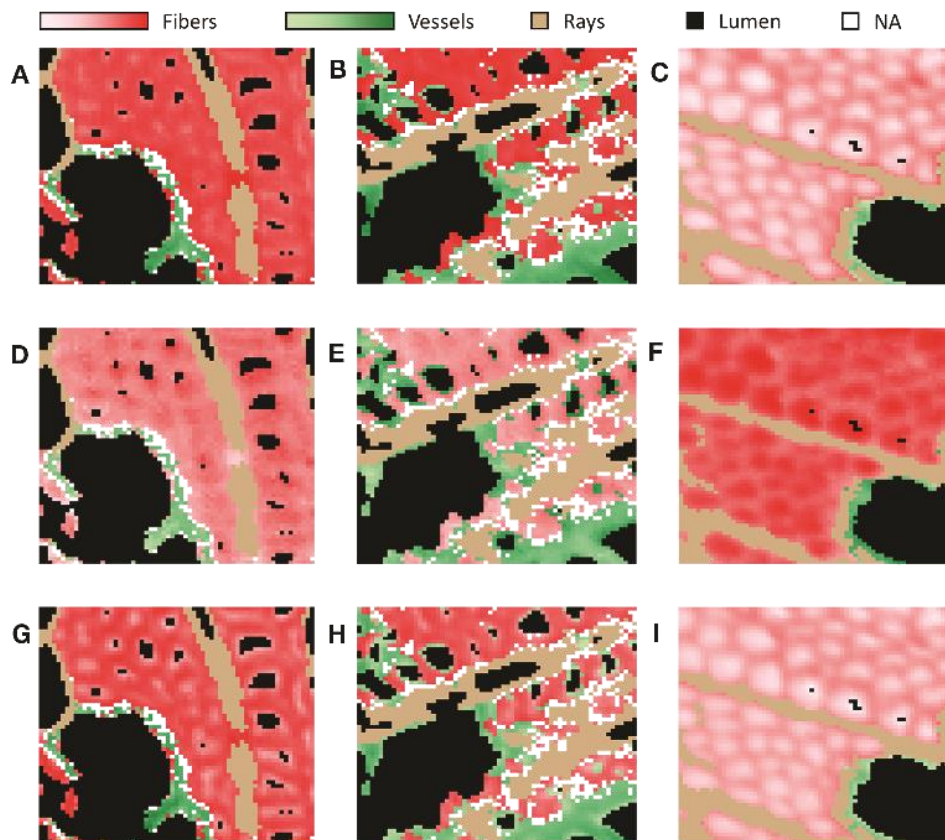


FIGURE 16 | Infrared images of selected DAWNs of representative images of NW (A, D, G), OW (B, E, H) and TW (C, F, I). Selected DAWNs: 1,236 cm^{-1} corresponding to acetylated xylans and lignins (A–C), 1,316 cm^{-1} corresponding to crystalline cellulose (D–F) and 1,736 cm^{-1} corresponding to acetylated xylans (G–I). Red, fiber S-/G-layers; Green, vessel S-layers; Tan, ray S-layers; White, NA; Black, lumen. Red, and green intensities are proportionate to the absorbance of pixels assigned to fiber S/G-layers and vessel S-layers, respectively.

slightly distinguishes OW and NW vessel S-layers. The average infrared spectra of the vessel S-layers from the three types of wood appear rather similar (Figure 6B). The average spectra of OW and TW vessel S-layers exhibit an important noise between approximately 1,800 and 1,450 cm^{-1} . Nevertheless, we can clearly distinguish in these two spectra, three double bands at 1,736, 1,460, and 1,374 cm^{-1} , while there is only one band in the NW spectrum at these wavenumbers. Acetylated xylans mainly contribute to the first band and cellulose, hemicelluloses and lignins to the two others. The bands at 1,736 (acetylated xylans), 1,332–26 (lignins, S ring plus G ring condensed), 1,236 (acetylated xylans and lignins) and 1,034 cm^{-1} (cellulose and lignins) makes possible to differentiate TW, NW and OW vessel S-layers (Figure 6B). The PCA loading plots (Supplementary Figure S3B) show that on PCA first dimension, the loading is positive for four spectral zones (1,580–26, 1,494–74, 1,450–1,380, and 976–904 cm^{-1}), that cannot be easily assigned to reported IR bands except the region of 1,430–21 cm^{-1} that can be assigned to cellulose, hemicelluloses and lignins (Table S1), 996–85 cm^{-1} to cellulose and 925–15 cm^{-1} to lignins. The loading is negative for

three ranges of bands (1,760–22 cm^{-1} , 1,256–36 cm^{-1} and 1,138–1,034 cm^{-1}), corresponding respectively to lignins and acetylated xylans, lignins, cellulose and lignins (Table S1). On the second dimension, two main ranges of bands (1,800–1,756 cm^{-1} and 1,206–1,164 cm^{-1}) presented positive loadings, the second one being potentially attributed to cellulose, hemicelluloses and lignins (Table S1). The loading is negative mainly for two groups of bands (1,676–56 and 1,650–1,590 cm^{-1}). They both correspond to lignins (C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones/aromatic skeletal vibrations, higher absorbance in G lignin in comparison to S lignin, Table S1). As done for fiber analysis, the DAWNs in the vicinity of a local maximum ($\pm 3 \text{ cm}^{-1}$) were used to generate a heatmap (Figure 6C, Table S4). The heatmap shows more variability between samples, compared to the heatmap for fiber, most likely because vessel/fiber area ratio is small in wood and in consequence, there were fewer vessel pixels available. Cluster A corresponds to DAWNs that have a low absorbance in NW vessel S-layers, and a high absorbance in TW vessel S-layers, while the absorbance is generally contrasted between the two sections of OW analyzed.

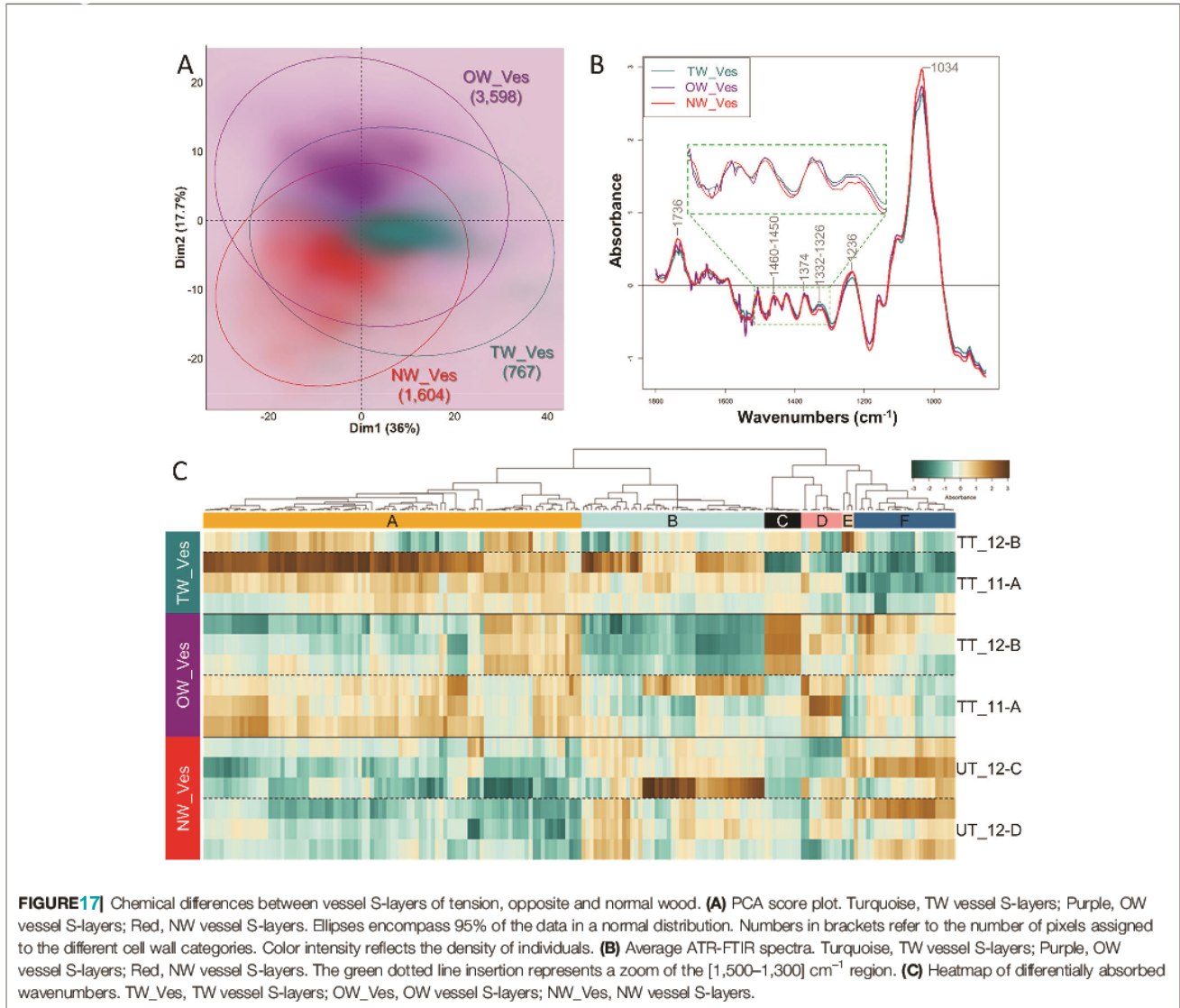


FIGURE 17 | Chemical differences between vessel S-layers of tension, opposite and normal wood. **(A)** PCA score plot. Turquoise, TW vessel S-layers; Purple, OW vessel S-layers; Red, NW vessel S-layers. Ellipses encompass 95% of the data in a normal distribution. Numbers in brackets refer to the number of pixels assigned to the different cell wall categories. Color intensity reflects the density of individuals. **(B)** Average ATR-FTIR spectra. Turquoise, TW vessel S-layers; Purple, OW vessel S-layers; Red, NW vessel S-layers. The green dotted line insertion represents a zoom of the [1,500–1,300] cm^{-1} region. **(C)** Heatmap of differentially absorbed wavenumbers. TW_Ves, TW vessel S-layers; OW_Ves, OW vessel S-layers; NW_Ves, NW vessel S-layers.

Cluster A contains DAWNs in the range of 1,364–60 and 1,346–42 cm^{-1} , that may be mostly attributed to cellulose and in the range of 1,336–22 cm^{-1} , that may be attributed to crystalline cellulose and also to lignins (S ring plus G ring condensed). DAWNs of 1,374–72 cm^{-1} may be attributed both to cellulose and hemicelluloses (CH deformation vibration and CH bending, **Table S1**). The isolated DAWN of 1,506 cm^{-1} can be assigned to lignins (aromatic skeletal vibrations; G > S). Besides, a large number of DAWNs cannot be easily related to known IR assignment (1,686–82, 1,572–68, 1,560–58, 1,538–28, 918, 914–10, 936–26 cm^{-1}). Cluster F gathers DAWNs that are less absorbed in TW vessel S-layers, when compared to OW and NW vessel S-layers. DAWNs in the range of 1,236–32 cm^{-1} correspond to acetylated xylans. The 3 groups of DAWNs in the same region of the IR spectra (1,744–36, 1,732–26, 1,722–10 cm^{-1}) are due to C=O stretching, that are mainly due to acetylated xylans too, but the involvement of esterified lignins cannot be excluded

(**Table S1**). On **Figure 6B**, the spectrum for NW shows a unique band around 1,734, while several bands and shoulders can be seen in TW and OW, probably related to a decreased amount of xylans, making visible other individual bands. Finally, both cellulose and lignins may contribute to DAWNs in the range of 1,040–32 cm^{-1} (C–O valence vibration, mainly from C3–O3H; aromatic C–H in-plane deformation, G > S).

DISCUSSION

In this study, we set up a non-destructive method for the microphenotyping of wood cell walls, based on ATR-FTIR microspectroscopy, that makes possible to obtain, in a rather short time, IR spectra from the different wood cell types, thus overcoming the complexity of wood tissue. We have developed a high-throughput pipeline for hyperspectral image analysis

(Figure 1) with both automatic pixel clustering according to cell wall types and identification of DAWNs between samples. This pipeline was used to compare the biochemical composition of the cell wall from both fibers and vessels originating from three kinds of wood in poplar: normal wood of upright trees, tension and opposite wood of artificially tilted trees. As the preparation of the samples is very simple—microtome sectioning at 20 μm , followed by ethanol drying—the acquisition of the images is fast—40 min for a (100 x 100) μm^2 hyperspectral image—and the analysis is mostly an automated process, this method is suitable to screen for differences in IR spectra, a large number of samples, at the fiber or vessel cell walls. Thanks to the high refractive index of the Germanium crystal (4.01), the spatial resolution of ATR-FTIR microspectroscopy is 3.1 μm , and based on an oversampling factor of two, it is possible to reach a pixel resolution of (1.56 x 1.56) μm^2 . This is sufficient to get IR spectra at the level of secondary cell walls, and with respects to the possibility of signal contamination, we obtained the best results for fiber cell walls, due to their higher thickness compared to vessel and ray cell walls. However, this method is not resolutive enough to reach the level of the cell wall layer. For such studies, some other methods of IR nanospectroscopy, such as scattering scanning near-field optical microscopy (s-SNOM) or atomic force microscopy infrared nanospectroscopy (AFM-IR), would be more appropriate. Indeed, the resolution of such methods is beyond the classical diffraction limit of light. These techniques were recently used to investigate the chemical composition of primary cell walls in *Populus* vascular cambium (Pereira et al., 2018). The drawback of these techniques is that ultrathin sections need to be prepared, with potential chemical treatments like DMSO that may alter cell wall composition, and therefore IR spectra.

A critical step to identify differences in cell wall composition using ATR-FTIR microspectroscopy is to unequivocally assign pixels to the right type of cell wall. The clustering method used here makes possible such an assignment with a high efficiency for both fiber S- and G-layers and with an acceptable level of success for vessels. The low score for the assignation of ray pixels probably results from the high diversity in ray cell walls. Indeed, as rays are uniseriate in *Populus* (IAWA Committee, 1989), there are very few ray-to-ray cell walls on transverse sections and most ray cell walls are either neighbored by fiber or vessel cell walls. Therefore, in this study, the pixels classified as ray cell walls correspond in fact to a mixture of ray/vessel and ray/fiber cell walls, whose composition may differ accordingly. Ray cells can be classified into three different cell types, named contact cells, intermediate cells and isolated cells (Braun, 1967; Nakaba et al., 2012) that may have cell walls with rather different features. While contact cells are located predominantly within the upper and lower lines of individual ray lines and are connected to adjacent vessel elements through pits, intermediate cells are located within the same radial lines but are not adjacent to vessel elements. Isolated cells are located within the radial cell lines with no connections with vessels (Braun, 1967). In *Populus sieboldii* x *P. grandidentata*, it has been shown that secondary cell wall thickening is initiated earlier in the upper and lower cell lines of a ray (Nakaba et al., 2012). In

addition, parenchyma ray cells stay alive longer than vessels and fibers and their cell wall composition may also be subjected to modifications according to their age. These aspects may be at least partly circumvented by applying ATR-FTIR technique on longitudinal sections in place of transverse sections. The score for the assignation of vessel pixels is not as high as for fiber pixels: as for rays, vessel pixels may in fact correspond to a mixture of vessel/vessel, vessel/ray and vessel/fiber cell walls. The fact that vessels have thin cell walls may also contribute to some incorrect assignments. Finally, the lower score for the assignment of pixels in OW compared to NW and TW (Figure 2B) may be linked to the reduced growth of xylem cells resulting from the position of OW on the lower side of the tilted stem. The smaller number of pixels assigned to vessel cell wall in TW compared to OW and NW is in accordance with the observations from a number of studies using other approaches, that the number of vessels is decreased in TW in comparison to OW (Jourez et al., 2001; Ruelle et al., 2006; Tarmian et al., 2009) or to NW (Chow, 1947). We also observed in TW a decreased number of lumen-associated pixels, which certainly result in the reduced lumen size due to the presence of the G-layer (Clair et al., 2006; Ruelle et al., 2006; Déjardin et al., 2010; Gorshkova et al., 2010). Finally, the smaller number of pixels assigned to fiber S-layers in TW supports the fact that S-layers are reduced in G fibers, in relation to the deposition of the G-layer.

ATR-FTIR microscopy provided IR profiling of fibers and vessel cell wall layers and DAWNs were identified and used to characterize differences in biochemical composition between layers. Another critical step was to correctly assign these DAWNs to wood polymers as the absorption band from a given functional group may originate from several wood polymers and bands are overlapping in the spectrum. This is the reason why we focused on the DAWNs in the vicinity of visible peaks on the spectra to get information easier to interpret on a biological level. TW and G fibers have been extensively studied using various complementary methods (FTIR, Raman imaging, biochemical analyses, immunolocalization). These are valuable data to validate our results using *in situ* IR profiling. In this study, the IR spectra of TW fiber G-layer is indeed very similar to what was obtained by Olsson et al. (2011) on TW and isolated G-layers, with a large decrease of the bands at 1,736 and 1,236 cm^{-1} , no bands at 1,594 and 1,506 cm^{-1} , and the appearance of 3 specific bands at 1,136, 1,316, and 1,200 cm^{-1} . Basically, it has also the same profile as the one presented in Gierlinger et al. (2008), except that we did not observe, the large band at 1,645 cm^{-1} attributed to the deformation of vibration of adsorbed and free water: this probably reflects a difference in the water status of the samples analyzed. Our results indicate that TW fiber G-layers contained higher amounts of crystalline cellulose and lower amounts of acetylated xylans and lignins than fiber S-layers, although it is not so striking for TW S-layers (see supra for discussion on this). This is consistent with a number of studies demonstrating that the G-layer was mainly composed of cellulose (e.g. Norberg and Meier, 1966; Nishikubo et al., 2007; Guedes et al., 2017). This is also in accordance with the absence or the low levels of xylans and lignins reported

elsewhere. The higher absorbance of a DAWN attributed to proteins is relevant since arabinogalactan proteins were reported as very abundant in TW in a number of studies (e.g. Lafarguette et al., 2004; Andersson-Gunnerås et al., 2006). Interestingly, while most lignin specific DAWNs exhibited lower absorbance in the G-layer, one of them presented a higher absorbance ($1,518\text{--}12\text{ cm}^{-1}$, aromatic skeletal vibration, higher absorbance in G lignin in comparison to S lignin). In addition, a positive loading on the first dimension of PCA was found for a group of bands corresponding also to lignins ($1,330\text{--}24\text{ cm}^{-1}$, S ring plus G ring condensed). This suggests that some lignins, likely different from the fiber S-layer lignins, are actually present in the G-layer, as previously reported in poplar (Joseleau et al., 2004; Gierlinger and Schwanninger, 2006) and in other species (Ghislain et al., 2016; Higaki et al., 2017). Thus, the *in situ* technique described in this paper is validated on TW fiber G-layers, since the results we obtained on individual G-layers were in accordance with other studies made at the tissue level or on isolated G-layers.

Regarding fiber S-layers, many DAWNs exhibited important differences in absorbance between TW fiber S-layers and fiber S-layers from OW or NW. From our observations, the former seemed to have a biochemical composition rather similar to what is described in the G-layer, while some features remained common to the S-layer from OW and NW. For example, the absorption bands for lignins and acetylated xylans were present in TW fiber S-layers but lower than in OW and NW. These observations may reflect biological differences in fiber cell wall assembly between the different wood types. This may be related to the fact that the S-layers in G fibers are not fully developed, in comparison to the S-layers of OW and NW fibers. Alternatively, it remains possible that the induction of tension wood formation, beside inducing G-layer formation, may also act on S-layer differentiation. However, we cannot rule out that these differences result from signal contaminations by the adjacent G-layer. Therefore, it remains to verify with a larger number of observations that our results reflect the biological reality or if the close proximity of the G-layer interferes with the measurements.

IR profiling was also obtained for vessel S-layers. The two first dimensions of PCA were able to discriminate between the three types of wood (Figure 6A) showing that there are some chemical differences in the cell wall of vessels, even between NW and OW, while fiber S-layers were very similar for both types of wood. The analysis of DAWNs between the different kinds of wood was not easy. Indeed, there was an important variability between the different sections analyzed [see for example differences between TT_11A and TT_12B, the 2 replicates for OW vessel cell wall (Figure 6C)]. This certainly reflects the low number of pixels analyzed (in comparison to fibers) that mainly results from the fact that vessels have thin cell wall and are not numerous (still in comparison to fibers). As for fiber cell walls, there are obviously important differences between vessel cell wall from NW and TW, with more cellulose and less acetylated xylans in the latter, two features also observed in TW fiber cell wall. Although, G-layer is absent from vessel cell wall, we cannot rule out a response at the vessel cell wall to stem tilting. The differences between NW and OW vessel S-layers, based on PC2 loadings, are mainly explained

by differences in lignins. As we did not find any information on vessel cell wall composition in the bibliography, it is difficult to go further on these observations without performing measurements on a larger number of samples or using complementary techniques like immunocytochemistry.

CONCLUSION

Thanks to the high pixel resolution of ATR-FTIR hyperspectral images—($1.56 \times 1.56\text{ }\mu\text{m}^2$)—we were able to get IR profiling of fibers and vessels at the cell layer level. We have developed a high-throughput pipeline for hyperspectral image analysis with both automatic pixel clustering and identification of differentially absorbed wavenumbers between samples. We have implemented this pipeline on different types of wood, including tension wood, a model that has been extensively characterized from a biochemical point of view. We confirmed previously known results on G layers, which validates this *in situ* approach, and we generated an IR profile for vessel S-layers in 3 different types of wood, as well as for TW fiber S-layers, providing information on the composition of cell layers rarely described in the literature. This methodological study paves the way for the microphenotyping of cell walls to rapidly and finely characterize various genetic resources or trees submitted to various stresses, and thus to overcome the complexity of wood tissue for all studies aimed at understanding wood formation. We consider that this technique is useful to give some clues about the cell wall compounds underlying cell wall differences. However, with regards to the inherent limitations of this technique (spatial resolution, difficulties to unambiguously assign bands to specific cell wall compounds), the hypotheses raised have to be validated by a complementary low-throughput technique, like immunocytochemistry.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, FL, GP, and AD designed the research. CC, PM, FL, CG-P, and VL-P acquired the data. CC, PM, and AD analyzed the data. CC, GP and AD wrote the article.

FUNDING

This research was funded by Centre Val de Loire Region, APR-IR #2016-00108472 (OPeNSPeNU).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the LICA (Laboratoire d'Ingénierie Cellulaire de l'Arbre) and Phenobois (Wood and Tree Physicochemical Phenotyping Facility for Genetic Resources) for the provision of infra-red instruments. Phenobois is supported by the programme "Investments for the Future" (ANR-10-EQPX-16, XYLOFOREST) from the French National Agency for Research.

The authors would also like to thank the staff of the INRAE experimental unit GBFOR (UE 911) for the establishment and management of the experimental plantation in Orléans, France. CC has been funded by a University fellowship.

REFERENCES

- Allison, G. G. (2011). "Application of Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FTIR) for Research into Biomass Feed-Stocks" in *Fourier Transforms - New Analytical Approaches and FTIR Strategies*. Ed. G. Nikolic (London: IntechOpen). doi: 10.5772/15785
- Andersson-Gunnerås, S., Mellerowicz, E. J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P. M., et al. (2006). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 45, 144–165. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02584.x
- Baldy, A., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Bauland, C., Reymond, M., and Mechin, V. (2017). Energy values of registered corn forage hybrids in France over the last 20 years rose in a context of maintained yield increase. *Am. J. Plant Sci.* 08, 1449–1461. doi: 10.4236/ajps.2017.86099
- Barnett, J. R., and Bonham, V. A. (2004). Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibers. *Biol. Rev.* 79, 461–472. doi: 10.1017/S1464793103006377
- Bertrand, D., and Dufour, E. (2006). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques* (Tec & Doc. Paris: Lavoisier).
- Braun, H. J. (1967). Entwicklung und Bau der Holzstrahlen unter dem Aspekt der kontakt-isolations-differenzierung gegenüber dem Hydrosystem. i. das Prinzip der kontakt-isolations-differenzierung. *Holzforschung* 21, 33–37. doi: 10.1515/hfsg.1967.21.2.33
- Chazal, R., Robert, P., Durand, S., Devaux, M.-F., Saulnier, L., Lapiere, C., et al. (2014). Investigating lignin key features in maize lignocelluloses using infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 68, 1342–1347. doi: 10.1366/14-07472
- Chen, L., Carpita, N. C., Reiter, W.-D., Wilson, R. H., Jeffries, C., and McCann, M. C. (1998). A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.* 16, 385–392. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00301.x
- Chow, K. Y. (1947). A comparative study of the structure and chemical composition of tension wood and normal wood in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Forestry* 20, 62–77. doi: 10.1093/forestry/20.1.62
- Clair, B., Ruelle, J., Beauchêne, J., Prévost, M. F., and Fournier, M. (2006). Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species. *IAWA J.* 27, 329–338. doi: 10.1163/22941932-90000158
- Courtois-Moreau, C. L., Pesquet, E., Sjödin, A., Muñiz, L., Bollhöner, B., Kaneda, M., et al. (2009). A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem. *Plant J.* 58, 260–274. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03777.x
- 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. doi: 10.1016/j.crv.2010.01.010
- Donaldson, L., Hague, J., and Snell, R. (2001). Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung* 55, 379–385. doi: 10.1515/HF.2001.063
- Durand, S., Papineau, P., Robert, P., Devaux, M.-F., and Guillon, F. (2019). HISTOCHEM: a database of reference spectra for plant cell wall polymers. *Berichte Aus Dem. Julius Kühn-Inst.* 204, 91–92. doi: 10.5073/berjki.2019.204.000

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00105/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1 | Crystal impacts on UT_12-C cross-section. Green circles pinpoint the three impacts.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2 | PCA score plot of fibres on the whole data set. Blue: TW fibre G-layer, Turquoise: TW fibre S-layers, Purple: OW fibre S-layers, Red: NW fibre S-layers. Ellipses encompass 95% of the data in a normal distribution. Color intensity reflects the density of individuals.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3 | PCA loading plots of fibre S- and G-layers (A) and vessel S-layers (B). Red: PC1, Green: PC2.

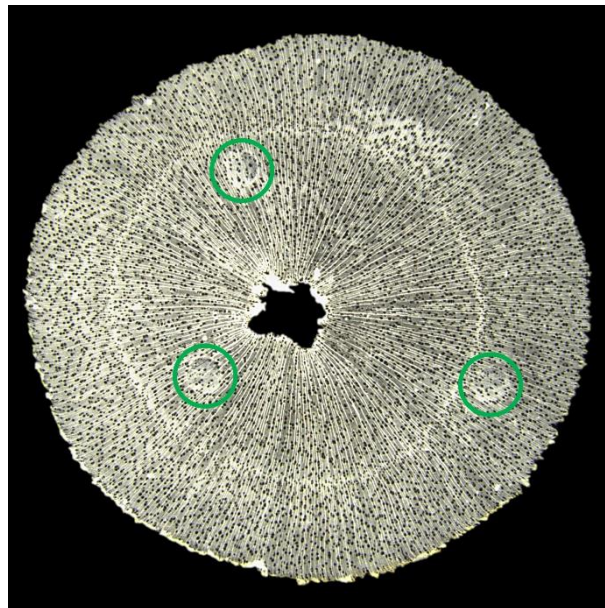
- Fairbrother, T. E., and Brink, G. E. (1990). Determination of cell wall carbohydrates in forages by near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 28, 293–302. doi: 10.1016/0377-8401(90)90160-A
- Freudentberg, K., and Neish, A. C. (1968). *Constitution and biosynthesis of lignin* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 129 pp.
- Gebrelesassie, M. N., Ader, K., Boizot, N., Millier, F., Charpentier, J.-P., Alves, A., et al. (2017). Near-infrared spectroscopy enables the genetic analysis of chemical properties in a large set of wood samples from *Populus nigra* (L.) natural populations. *Ind. Crops Prod.* 107, 159–171. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.013
- Ghislain, B., Nicolini, E.-A., Romain, R., Ruelle, J., Yoshinaga, A., Alford, M. H., et al. (2016). Multilayered structure of tension wood cell walls in Salicaceae *sensu lato* and its taxonomic significance. *Bot. J. Linn. Soc.* 182, 744–756. doi: 10.1111/boj.12471
- Gierlinger, N., and Schwanninger, M. (2006). Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal raman microscopy. *Plant Physiol.* 140, 1246–1254. doi: 10.1104/pp.105.066993
- Gierlinger, N., Goswami, L., Schmidt, M., Burgert, I., Coutand, C., Rogge, T., et al. (2008). *In situ* FT-IR microscopic study on enzymatic treatment of poplar wood cross-sections. *Biomacromolecules* 9, 2194–2201. doi: 10.1021/bm800300b
- Gierlinger, N. (2018). New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Appl. Spectrosc. Rev.* 53, 517–551. doi: 10.1080/05704928.2017.1363052
- Gorshkova, T. A., Gurjanov, O. P., Mikshina, P. V., Ibragimova, N. N., Mokshina, N. E., Salnikov, V. V., et al. (2010). Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 328–341. doi: 10.1134/S1021443710030040
- Gorshkova, T., Mokshina, N., Chernova, T., Ibragimova, N., Salnikov, V., Mikshina, P., et al. (2015). Aspen tension wood fibers contain β -(1→4)-galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls. *Plant Physiol.* 169, 2048–2063. doi: 10.1104/pp.15.00690
- Gozsás, A., Stenlund, H., Persson, P., Trygg, J., and Sundberg, B. (2011). Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem: The chemical landscape of secondary xylem. *Plant J.* 66, 903–914. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04542.x
- Guedes, F. T. P., Laurans, F., Quemener, B., Assor, C., Lainé-Prade, V., Boizot, N., et al. (2017). Non-cellulosic polysaccharide distribution during G-layer formation in poplar tension wood fibers: abundance of rhamnogalacturonan I and arabinogalactan proteins but no evidence of xyloglucan. *Planta* 246, 857–878. doi: 10.1007/s00425-017-2737-1
- Higaki, A., Yoshinaga, A., and Takabe, K. (2017). Heterogeneous distribution of xylan and lignin in tension wood G-layers of the S1+G type in several Japanese hardwoods. *Tree Physiol.* 37, 1767–1775. doi: 10.1093/treephys/tpx144
- Huang, J., Li, Y., Wang, Y., Chen, Y., Liu, M., Wang, Y., et al. (2017). A precise and consistent assay for major wall polymer features that distinctively determine

- biomass saccharification in transgenic rice by near-infrared spectroscopy. *Biotechnol. Biofuels* 10, 294. doi: 10.1186/s13068-017-0983-x
- IAWA Committee (1989). *IAWA List of Microscopic Features for Hardwood Identification IAWA Bulletin* Vol. 10. Eds. E. A. Wheeler, P. Baas and P. Gasson (Leiden: Brill publishers), 219–332.
- Jasinski, S., Lécureuil, A., Durandet, M., Bernard-Moulin, P., and Guerche, P. (2016). *Arabidopsis* Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Front. Plant Sci.* 7, 1682. doi: 10.3389/fpls.2016.01682
- Joseleau, J.-P., Imai, T., Kuroda, K., and Ruel, K. (2004). Detection *in situ* and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibers of *Populus deltoides*. *Planta* 219, 338–345. doi: 10.1007/s00425-004-1226-5
- Jourez, B., Riboux, A., and Leclercq, A. (2001). Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'GHOY'). *IAWA J.* 22, 133–157. doi: 10.1163/22941932-90000274
- Jourez, B. (1997). Le bois de tension. 1 Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 1, 100–112. <http://hdl.handle.net/2268/95404>
- Kacurakova, M., and Wilson, R. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydr. Polym.* 44, 291–303. doi: 10.1016/S0144-8617(00)00245-9
- Lafarguette, F., Leplé, J.-C., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M.-C., et al. (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol.* 164, 107–121. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01175.x
- Li, K., Wang, H., Hu, X., Ma, F., Wu, Y., Wang, Q., et al. (2017). Genetic and quantitative trait locus analysis of cell wall components and forage digestibility in the Zheng58 × HD568 Maize RIL population at anthesis stage. *Front. Plant Sci.* 8, 1472. doi: 10.3389/fpls.2017.01472
- McCann, M. C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P., and Roberts, K. (1992). Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiol.* 100, 1940–1947. doi: 10.1104/pp.100.4.1940
- 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. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.003
- Molano, M. L., Cortés, M. L., Ávila, P., Martens, S. D., and Muñoz, L. S. (2016). Near infrared spectroscopy (NIRS) calibration equations to predict nutritional quality parameters of tropical forages. *Trop. Grassl.-Forrajes Trop.* 4, 139–145. doi: 10.17138/tgft(4)139-145
- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S., and Höfte, H. (2003). Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) microspectroscopy. *Plant J.* 35, 393–404. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01807.x
- Nakaba, S., Begum, S., Yamagishi, Y., Jin, H.-O., Kubo, T., and Funada, R. (2012). Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*. *Trees* 26, 743–750. doi: 10.1007/s00468-011-0640-0
- Nishikubo, N., Awano, T., Banasiak, A., Bourquin, V., Ibatullin, F., Funada, R., 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. doi: 10.1093/pcp/pcm055
- Norberg, P. H., and Meier, H. (1966). Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibers of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* 20, 174–178. doi: 10.1515/hfsg.1966.20.6.174
- Olsson, A.-M., Bjurhager, I., Gerber, L., Sundberg, B., and Salmén, L. (2011). Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal and tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. *Planta* 233, 1277–1286. doi: 10.1007/s00425-011-1384-1
- Pereira, L., Flores-Borges, D. N. A., Bittencourt, P. R. L., Mayer, J. L. S., Kiyota, E., Araujo, P., et al. (2018). Infrared nanospectroscopy reveals the chemical nature of pit membranes in water-conducting cells of plant xylem. *Plant Physiol.* 177, 1629–1638. doi: 10.1016/j.crvi.2004.07.006
- Pilate, G., Déjardin, A., Laurans, F., and Leplé, J.-C. (2004). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytol.* 164, 63–72. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01176.x
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* 127, 1513–1523. doi: 10.1104/pp.010816
- Ruelle, J., Clair, B., Beauchêne, J., Prévost, M. F., and Fournier, M. (2006). Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species. *IAWA J.* 27, 341–376. doi: 10.1163/22941932-90000159
- Tarmian, A., Remond, R., Faezipour, M., Karimi, A., and Perré, P. (2009). Reaction wood drying kinetics: tension wood in *Fagus sylvatica* and compression wood in *Picea abies*. *Wood Sci. Technol.* 43, 113–130. doi: 10.1007/s00226-008-0230-5
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F., and Takabe, K. (1993). "Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall," in *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* (Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America), 247–270. doi: 10.2134/1993.foragecellwall.c10
- van Parijs, F. R. D., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., and Merks, R. M. H. (2010). Modeling lignin polymerization. I. simulation model of dehydrogenation polymers. *Plant Physiol.* 153, 1332–1344. doi: 10.1104/pp.110.154468

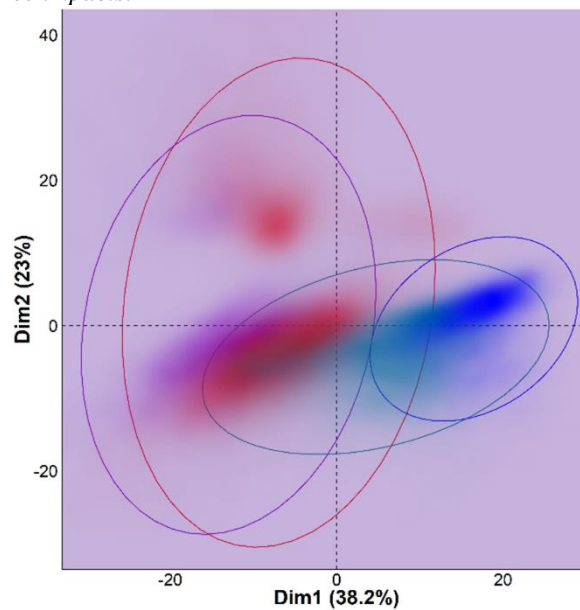
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Cuello, Marchand, Laurans, Grand-Perret, Lainé-Prade, Pilate and Déjardin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

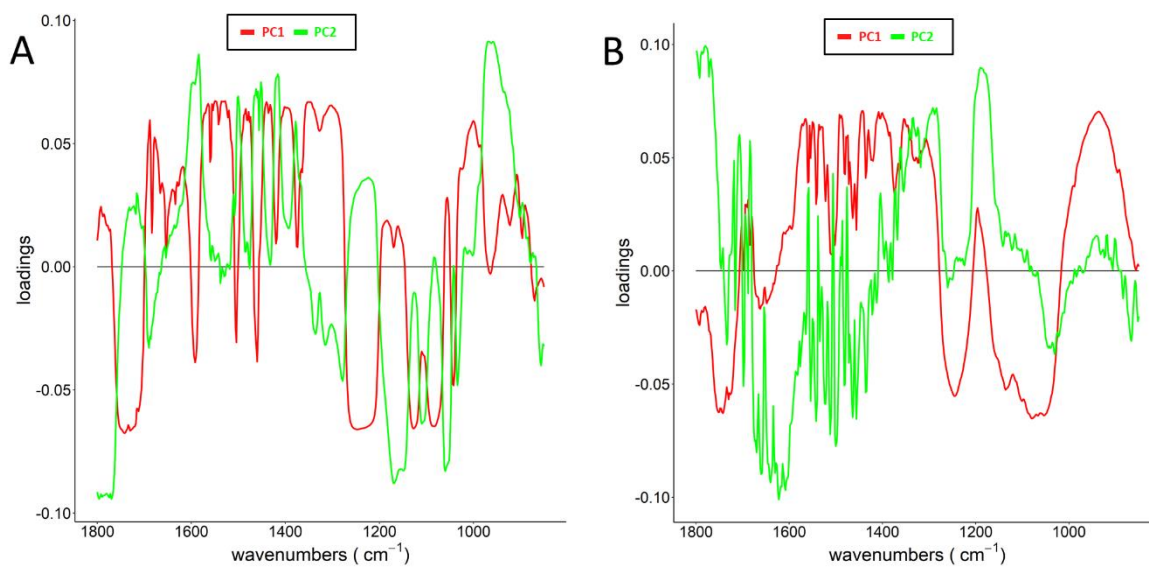
7. Tables et figures supplémentaires de l'article 1



Supplementary figure 1 | Crystal impacts on UT_12-C cross-section. Green circles pinpoint the three impacts.



Supplementary figure 2 | PCA score plot of fibres on the whole data set. Blue: TW fibre G-layer, Turquoise: TW fibre S-layers, Purple: OW fibre S-layers, Red: NW fibre S-layers. Ellipses encompass 95% of the data in a normal distribution. Color intensity reflects the density of individuals.



Supplementary figure 3 | PCA loading plots of fibre S- et G-layers (A) et vessel S-layers (B). Red: PC1, Green: PC2.

Supplementary table 1 | Assignment of absorption bands, related to wood polymers, used in this study.

Range of wavenumber (cm ⁻¹)	Cellulose	Hemicelluloses	Lignins	Proteins	Ref.
1742 - 1730		C = O stretch carboxylic acid			[5, 9]
1738 - 1709			C=O stretch in unconjugated ketone, carbonyl et in ester groups (frequently of carbohydrate origin)		[4]
1675 - 1655			C=O stretch in conjugated p- substituted aryl ketones		[4]
1605 - 1593			aromatic skeletal vibration		[4]
1550				Amide II: N-H deformation +stretching contribution from C-N stretching	[3, 12, 13]
1515 - 1500			aromatic skeletal vibrations; G>S		[4]
1490	CH ₂ scissoring cellobiose				[7]
1470 - 1460	CH ₂ of pyran ring symmetric scissoring; OH plane deformation vibration	CH ₂ symmetric bending (xylose, arabinose)	C-H deformations		[4, 11, 12]
1430 - 1421	crystalline cellulose / C-OH bending	COO- stretch	aromatic skeletal vibrations combined with C-H in plane deformation		[1, 2, 4, 9]
1374 - 1365	CH bending	CH bending	aliphatic C-H stretch in CH ₃ , not in OMe; phen. OH		[4, 8, 10]
1364 - 1335	OH in-plane bending / crystalline cellulose (1335 cm ⁻¹)				[1, 11]
1330 - 1324			S ring plus G ring condensed; (i.e. G ring substituted in pos. 5)		[4]
1318 - 1312	crystalline cellulose / CH ₂ rocking vibration				[1, 10, 11]
1282 - 1277	CH - deformation				[11]

1260 - 1240			C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics	[12]
1239 - 1225		C-O stretch acetyl		[9]
1230 - 1221			C-C plus C-O plus C=O stretch; G condensed > G etherified	[4]
1205 - 1200	OH in-plane deformation	OH in-plane deformation	C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics	[6, 10, 11, 12]
1162 - 1125	C-O-C asymmetric valence vibration	C-O-C asymmetric valence vibration		[10, 11]
1127 - 1126			aromatic C-H in-plane deformation; typical for S units	[4]
1120 - 1115	Asymmetric in-phase ring stretching, C-C et C-O stretching			[11]
1056 - 1050	C-O valence vibration, mainly from C3-O3H / C=O stretching vibration	C=O stretching vibration		[6, 11]
1040 - 1030	C-O valence vibration, mainly from C3-O3H		aromatic C-H in-plane deformation, G > S; plus C-O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated)	[4, 11]
996 - 985	C-O valence vibration			[11]
925 - 915			C-H out-of-plane; aromatic	[4]

[1] Åkerholm, M., et Salmén, L. (2001). Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer* 42, 963–969. doi:10.1016/S0032-3861(00)00434-1.

[2] Åkerholm, M., Hinterstoisser, B., et Salmén, L. (2004). Characterization of the crystalline structure of cellulose using static et dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 339, 569–578. doi:10.1016/j.carres.2003.11.012.

[3] Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., et al. (2001). Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiol* 127, 551–565.

[4] Faix, O. (1991). Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* 45, 21–28. doi:10.1515/hfsg.1991.45.s1.21.

[5] Gou, J.-Y., Park, S., Yu, X.-H., Miller, L. M., et Liu, C.-J. (2008). Compositional characterization et imaging of “wall-bound” acylesters of *Populus trichocarpa* reveal differential accumulation of acyl molecules in normal et reactive woods. *Planta* 229, 15–24. doi:10.1007/s00425-008-0799-9.

[6] Harrington, K. J., Higgins, H. G., et Michell, A. J. (1964). Infrared Spectra of *Eucalyptus regnans* F. Muell. et *Pinus radiata* D. Don. *Holzforschung* 18, 108–113. doi:10.1515/hfsg.1964.18.4.108.

[7] Kačuráková, M., Belton, P. S., Wilson, R. H., Hirsch, J., et Ebringerová, A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides. *Journal of the Science of*

Food et Agriculture 77, 38–44. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<38::AID-JSFA999>3.0.CO;2-5.

[8] Liang, C. Y., et Marchessault, R. H. (1959). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. II. Native celluloses in the region from 640 to 1700 cm.⁻¹. Journal of Polymer Science 39, 269–278. doi:10.1002/pol.1959.1203913521.

[9] Marchessault, R. H., et Liang, C. Y. (1962). The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans. Journal of Polymer Science 59, 357–378. doi:10.1002/pol.1962.1205916813.

[10] Olsson, A.-M., Bjurhager, I., Gerber, L., Sundberg, B., et Salmén, L. (2011). Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal et tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. Planta 233, 1277–1286. doi:10.1007/s00425-011-1384-1.

[11] Schwanninger, M., Rodrigues, J. C., Pereira, H., et Hinterstoisser, B. (2004). Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood et cellulose. Vibrational Spectroscopy 36, 23–40. doi:10.1016/j.vibspec.2004.02.003.

[12] Sene, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H., et Grinter, R. (1994). Fourier-Transform Raman et Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell Walls et Their Components). Plant Physiol. 106, 1623–1631.

[13] Wang, Y., Yao, X., et Parthasarathy, R. (2009). Characterization of Interfacial Chemistry of Adhesive/Dentin Bond Using FTIR Chemical Imaging With Univariate et Multivariate Data Processing. J Biomed Mater Res A 91, 251–262. doi:10.1002/jbm.a.32249.

Supplementary table 2 | Clustering efficiency.

		AA ^(b)								
MA ^(a)		FibS	Ray	Ves	FibG	Lumen	NA ^(c)	N ^(d)	%GA ^(e)	
OW	FibS	90	0	0	NA	0	0	90	100	
OW	Ray	13	43	7	NA	7	20	90	48	
OW	Ves	3	6	70	NA	4	7	90	78	
NW	FibS	87	3	0	NA	0	0	90	97	
NW	Ray	1	65	0	NA	1	23	90	72	
NW	Ves	0	6	74	NA	4	6	90	82	
TW	FibS	88	2	0	0	0	0	90	98	
TW	Ray	26	56	8	0	0	0	90	62	
TW	Ves	1	23	66	0	0	0	90	73	
TW	FibG	0	0	0	90	0	0	90	100	

OW: opposite wood, NW: normal wood, TW: tension wood, FibS: fibre S-layer, FibG: fibre G-layer, Ves: vessels (a) Manually assigned, (b) automatically assigned, (c) not assigned, (d) number of spectra considered, (e) Percentage of properly assigned spectra

Supplementary table 3 | *P*-value resulting from pairwise Wilcoxon test between G-layer from fibres of tension wood et S-layer from fibres of tension wood, opposite wood et normal wood.

Wavenumber (cm ⁻¹)	TW_FibG-TW_FibS	TW_FibG-OW_FibS	TW_FibG-NW_FibS	OW_FibS-NW_FibS	TW_FibS-OW_FibS	TW_FibS-NW_FibS	DAWN_cluster
1800		0 6,1126E-209		0	0 1,53E-52	3,22E-215	NA
1798		0		0	1,36E-199	3,2E-12	2,37E-169 NA
1796		0		0	1,98E-42	3,19E-08	5,63E-121 NA
1794		0		0	0,009837241	9,21E-39	1,7E-73 NA
1792		0		0	1	4,69E-50	1,03E-54 NA
1790		0		0	5,81E-49	0,00000343	2,84E-110 E
1788		0		0	3,88E-86	1	2,52E-126 E
1786		0		0	7,42E-44	0,168579687	9,57E-86 E
1784		0		0	7,05E-47	1	2,48E-75 E
1782		0		0	3,9E-100	0,000000067	6,65E-94 E
1780		0		0	9,8E-97	1,44E-10	1,96E-87 E
1778		0		0	6,6E-56	0,00000526	4,42E-59 E
1776		0		0	1,85E-50	2,78E-09	2,55E-42 E
1774		0		0	1,11E-17	0,000000927	5,64E-12 E
1772		0		0	2,54E-16	0,013985722	7,08E-08 NA
1770		0 1,6712E-204		0	1,52E-19	1,84E-46	0,001973801 NA
1768		0 4,51742E-07	8,4386E-219	4,52E-83	4,93E-214	2,23E-22	NA
1766		0 7,0131E-33	3,65533E-27	2,53E-69		0 1,21E-129	NA
1764	3,9366E-236		0 7,0255E-37	2,49E-107		0 7,21E-290	NA
1762	3,70386E-56		0	2,76E-146		0	0 NA
1760	3,76863E-23		0	1,02E-202		0	0 NA
1758	2,2587E-217		0	6,39E-251		0	0 NA
1756		0	0	6,4E-292		0	0 NA
1754		0	0	0		0	0 NA
1752		0	0	0		0	0 NA
1750		0	0	1E-272		0	0 NA
1748		0	0	6,68E-148		0	0 NA
1746		0	0	1,07E-195		0	0 NA
1744		0	0	0		0	0 NA
1742		0	0	0		0	0 B
1740		0	0	0		0	0 B
1738		0	0	3,17E-148		0	0 B
1736		0	0	1,58E-67		0	0 B
1734		0	0	0,009497148		0	0 B
1732		0	0	1,11E-47		0	0 B
1730		0	0	0		0	0 B
1728		0	0	0		0	0 B
1726		0	0	0		0	0 NA
1724		0	0	2,13E-147		0	0 NA
1722		0	0	1,21E-93		0	0 NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1720	0	0	0	0	0	0	NA
1718	0	0	0	0	0	0	NA
1716	0	0	0	0	0	0	NA
1714	0	0	0	0	0	0	NA
1712	0	0	0	1,34E-62	0	0	NA
1710	0	0	0	3,08E-50	0	0	NA
1708	0	0	0	0,463782509	0	0	NA
1706	1,7152E-230	0	0	3,15E-70	0	0	NA
1704	1,57256E-09	0	0	7,82E-81	0	0	NA
1702	1,9089E-227	0	0	2,84E-12	0	0	NA
1700	0	1,19889E-52	0	0	0	0	NA
1698	0	0	0	0	2,96E-213	0	NA
1696	0	0	8,5515E-179	0	0	0	E
1694	0	0	5,8446E-60	0	2,27E-129	0	E
1692	0	0	0	0	0	3,35E-119	E
1690	0	0	0	0	0	0,0000129	NA
1688	0	0	0	0	0	5,94E-178	NA
1686	0	0	0	2,93E-30	0	0	D
1684	6,64587E-46	1,53043E-07	0	0	8,22E-43	0	D
1682	2,39585E-38	5,8428E-102	0	0	1,5E-50	0	D
1680	0	0	0	0,027493035	0	0	NA
1678	0	0	0	0	0	0	NA
1676	0	0	0	0	0	0	NA
1674	0	0	0	0	0	0	NA
1672	1,4384E-132	0	0	0	0	0	NA
1670	1,96178E-50	0	0	2,85E-201	0	0	NA
1668	0,000259179	0	0	2,05E-108	0	0	D
1666	1,55223E-40	0	0	0	0	0	D
1664	1,70731E-17	0	0	0,0000149	0	0	D
1662	0,000231748	0	0	6,34E-153	0	0	NA
1660	2,63279E-16	0	0	4,54E-114	0	0	NA
1658	6,99203E-40	0	0	3,86E-87	0	0	D
1656	1,8611E-119	0	0	1,24E-22	0	0	D
1654	3,973E-259	3,65987E-24	0	0	5,62E-213	0	D
1652	8,3014E-172	4,79267E-97	0	0	0	0	D
1650	2,6809E-168	0	0	2,33E-69	0	0	D
1648	1,3923E-178	0	0	4,1E-60	0	0	D
1646	1,48214E-74	0	0	0	0	0	D
1644	2,14213E-74	0	0	0	0	0	D
1642	4,5924E-30	0	0	0	0	0	NA
1640	6,52894E-41	0	0	0	0	0	NA
1638	4,50373E-80	0	0	7,8E-100	0	0	NA
1636	2,63167E-68	0	0	6,17E-22	0	0	D
1634	1,1045E-138	0	0	1,08E-79	0	0	D
1632	3,96952E-86	0	0	1,4E-23	0	0	D

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1630	1,47001E-59	0	0	2,72E-86	0	0	D
1628	2,08481E-87	0	0	1,95E-11	0	0	D
1626	9,60891E-89	0	0	0,382121256	0	0	D
1624	4,56285E-47	0	0	6,65E-62	0	0	NA
1622	1,77629E-35	0	0	3,01E-135	0	0	NA
1620	1,34025E-61	0	0	4,25E-94	0	0	NA
1618	8,51089E-46	0	0	5,5E-150	0	0	NA
1616	1,41232E-41	0	0	1,25E-179	0	0	NA
1614	2,189E-152	0	0	0,00000109	0	0	D
1612	1,9742E-211	0	0	1	0	0	D
1610	2,8562E-265	0	0	1	0	0	D
1608	0	0	0	1	0	0	D
1606	0	0	0	1,38E-08	0	0	D
1604	0	4,9907E-126	5,3299E-194	1,76E-14	0	0	D
1602	0	5,67468E-14	6,18007E-27	0,00000356	0	0	NA
1600	0	1,2605E-177	1,30192E-18	3,27E-24	3,18E-274	0	NA
1598	0	0	2,0701E-181	8,87E-67	2,39E-14	8,32E-190	NA
1596	0	0	0	1,43E-46	6,6E-24	8,07E-19	B
1594	0	0	0	4,24E-34	4,14E-129	1,39E-08	B
1592	0	0	0	5,54E-49	8,92E-263	1,41E-30	B
1590	0	0	0	2,52E-59	6,97E-262	4,87E-23	B
1588	0	0	0	5,64E-90	2,44E-145	1	NA
1586	0	0	3,0432E-276	3E-109	2,37E-14	4,55E-85	NA
1584	0	9,4253E-146	0,01420952	5,61E-62	2,01E-76	0	NA
1582	2,2524E-181	6,6604E-106	0	6,78E-30	0	0	NA
1580	6,09469E-13	0	0	4,74E-25	0	0	NA
1578	5,13645E-30	0	0	0,00000109	0	0	NA
1576	0	0	0	2,08E-221	0	0	NA
1574	0	0	0	2,97E-271	0	0	NA
1572	0	0	0	5,15E-198	0	0	NA
1570	0	0	0	1,28E-118	0	0	NA
1568	0	0	0	7,42E-151	0	0	NA
1566	0	0	0	0	0	0	NA
1564	0	0	0	0	0	0	NA
1562	0	0	0	6,13E-201	0	0	E
1560	0	0	0	0	0	0	D
1558	0	0	0	0	0	0	D
1556	0	0	0	0	0	0	E
1554	0	0	0	0	0	0	E
1552	0	0	0	0	0	0	E
1550	0	0	0	0	0	0	E
1548	0	0	0	0	0	0	E
1546	0	0	0	0	0	0	NA
1544	0	0	0	0	0	0	NA
1542	0	0	0	0	0	0	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1540	0	0	0	0	0	0	0	E
1538	0	0	0	3,3E-281	0	0	0	E
1536	0	0	0	0	0	0	0	E
1534	0	0	0	0	0	0	0	E
1532	0	0	0	0	0	0	0	E
1530	0	0	0	0	0	0	0	E
1528	0	0	0	0	0	0	0	NA
1526	0	0	0	0	0	0	0	NA
1524	0	0	0	0	0	0	0	NA
1522	0	0	0	0	0	0	0	NA
1520	0	0	0	0	0	0	0	NA
1518	0	0	0	4,28E-10	0	0	0	E
1516	0	0	0	3,03E-37	0	0	0	E
1514	7,3847E-229	0	0	4,31E-26	0	0	0	E
1512	1,4535E-105	0	0	1,3E-154	0	0	0	E
1510	2,30244E-54	2,63533E-19	0	4,26E-218	1,4E-74	0	0	NA
1508	0	0	0,000536522	0	0	0	0	B
1506	0	0	0	0	0	0	1,54E-08	B
1504	0	0	0	0	0	0	0	B
1502	0	0	0	0	2,42E-16	0	0	A
1500	2,1736E-217	9,40958E-86	0	0	0,325355154	0	0	A
1498	0,024466415	2,4419E-92	0	0	1,31E-75	0	0	NA
1496	5,7107E-191	0	2,06617E-59	0	6,44E-271	0	0	NA
1494	0	0	1,2569E-289	0	0	0	2,82E-37	NA
1492	0	0	0	7,79E-224	4,43E-285	0	8,81E-08	NA
1490	0	0	0	1,78E-73	0	0	2,19E-94	NA
1488	0	0	0	5,93E-271	0	0	1,85E-204	NA
1486	0	0	0	3,61E-225	0	0	5,63E-287	NA
1484	0	0	0	0	0	0	0	NA
1482	0	0	0	0	0	0	0	NA
1480	0	0	0	0	0	0	0	NA
1478	0	0	0	0	0	0	0	E
1476	0	0	0	1,03E-40	0	0	0	E
1474	0	0	0	0	0	0	1,87E-65	E
1472	0	0	0	0	0	0	1,81E-138	NA
1470	5,216E-191	0	0	0	1,21E-58	0	0	NA
1468	1	1,52106E-91	0	0	2,31E-76	0	0	NA
1466	8,8513E-145	0	0	0	0	0	0	NA
1464	0	0	0	0	0	0	0	B
1462	0	0	0	0	0	0	0	B
1460	0	0	0	0,000367214	0	0	0	B
1458	0	0	0	0	0	0	0	B
1456	3,41496E-23	8,49732E-70	0	0	1,66E-22	0	0	A
1454	4,35156E-14	0,107827845	0	0	0,0000899	0	0	A
1452	1,91657E-47	2,07077E-13	0	0	1,78E-11	0	0	A

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1450	4,7232E-186	3,5188E-260	0	0	1	0	A
1448	0	0	9,604E-245	0	1,42E-101	4,43E-138	NA
1446	0	0	0	0	0	0,165890504	NA
1444	0	0	0	0	0	1,45E-70	NA
1442	0	0	0	0	0	1,89E-186	NA
1440	0	0	0	0	0	0	NA
1438	0	0	0	0	0	0	NA
1436	0	0	0	0	0	0	NA
1434	0	0	0	0	0	0	NA
1432	0	0	0	0	0	0	NA
1430	0	0	0	0	0	0	NA
1428	0	0	0	0	0	0	E
1426	0	0	0	0	0	3,05E-136	E
1424	2,5459E-241	0	0	4,39E-43	4,89E-44	0,00000118	D
1422	0,022450971	6,48818E-10	3,10406E-42	3,07E-67	1	1,69E-47	D
1420	1,92024E-32	4,7604E-270	0	1	4,97E-76	1,31E-83	NA
1418	9,0462E-117	0	0	2,85E-49	1,29E-70	0,000000416	NA
1416	2,4425E-119	4,8348E-169	2,2991E-191	1	1	0,311353463	NA
1414	2,04932E-16	1,2079E-225	3,31395E-42	0	9,6E-235	0,017362853	NA
1412	4,9609E-39	0	3,00562E-59	0	0	1	NA
1410	6,3461E-206	0	0	0	0	6,56E-42	NA
1408	0	0	0	0	0	3,48E-149	NA
1406	0	0	0	0	0	2,4E-262	NA
1404	0	0	0	0	0	0	NA
1402	0	0	0	0	0	0	NA
1400	0	0	0	0	0	0	NA
1398	0	0	0	0	0	0	NA
1396	0	0	0	0	0	0	NA
1394	0	0	0	0	0	9,6E-215	NA
1392	0	0	0	0	0	4,41E-122	NA
1390	0	0	0	0	0	1,41E-58	NA
1388	0	0	0	0	0	5,57E-21	NA
1386	0	0	0	0	0	1	NA
1384	0	0	6,5291E-188	0	0	3,62E-47	NA
1382	2,5349E-304	0	0,002364207	0	1,28E-271	4,25E-282	NA
1380	3,985E-190	0	3,6169E-296	0	2,64E-43	0	NA
1378	2,07273E-83	0,05267974	0	0	2,28E-51	0	NA
1376	1,77122E-28	0	0	2,78E-36	0	0	NA
1374	1,42076E-87	0	1,5057E-126	1,71E-52	0	0	D
1372	0	6,18436E-07	8,80626E-87	6,01E-45	9,36E-274	1,55E-114	D
1370	0	0	0	7,69E-52	0,000250161	9,11E-88	D
1368	0	0	0	3,34E-150	3,31E-32	1,91E-50	D
1366	0	0	0	1,36E-19	1,36E-09	0,007754583	NA
1364	0	0	0	3,2E-125	6,11E-10	9,54E-57	NA
1362	0	0	0	2,18E-137	2,17E-25	7,34E-262	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1360	0	0	0	0,0000117	0	0	NA
1358	0	0	0	0	0	0	NA
1356	0	0	0	0	0	0	NA
1354	0	0	0	0	0	0	NA
1352	0	0	0	0	0	0	NA
1350	0	0	0	0	0	0	NA
1348	0	0	0	0	0	0	NA
1346	0	0	0	0	0	0	NA
1344	0	0	0	0	0	0	NA
1342	0	0	0	0	0	0	NA
1340	0	0	0	3,97E-275	0	0	NA
1338	0	0	0	2,2E-246	0	0	NA
1336	0	0	0	5,08E-144	0	0	E
1334	0	0	0	0	0	0	E
1332	0	0	0	0	0	0	E
1330	0	0	0	0	0	1,46E-244	E
1328	0	0	0	0	0	2,49E-111	E
1326	0	0	0	0	0	9,79E-134	E
1324	0	0	0	0	0	0	E
1322	0	0	0	0	0	0	E
1320	0	0	0	0	0	0	E
1318	0	0	0	0	0	0	E
1316	0	0	0	0	0	0	E
1314	0	0	0	0	0	0	E
1312	0	0	0	0	0	0	NA
1310	0	0	0	0	0	0	NA
1308	0	0	0	0	0	0	NA
1306	0	0	0	0	0	0	NA
1304	0	0	0	0	0	0	NA
1302	0	0	0	0	0	0	NA
1300	0	0	0	0	0	0	NA
1298	0	0	0	0	0	0	NA
1296	0	0	0	0	0	0	NA
1294	0	0	0	0	0	0	NA
1292	0	0	0	6,55E-272	0	0	NA
1290	0	0	0	4,26E-232	0	0	NA
1288	0	0	0	1,31E-197	0	0	NA
1286	0	0	0	1,44E-129	0	0	NA
1284	0	0	0	1,54E-48	0	0	NA
1282	0	0	0	0,000000104	0	0	E
1280	0	0	0	0,35741546	0	0	E
1278	0	0	0	4,4E-19	3,96E-240	1,87E-261	E
1276	0	0	0	6,37E-78	0,025765608	1,55E-85	NA
1274	1,5511E-78	3,0965E-131	3,06757E-23	7,43E-149	0	0,548161738	NA
1272	2,02143E-53	0	0	1,93E-169	0	2,46E-160	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1270	0	0	0	2,24E-162	0	0	NA
1268	0	0	0	1,32E-172	0	0	NA
1266	0	0	0	8,86E-225	0	0	NA
1264	0	0	0	0	0	0	NA
1262	0	0	0	0	0	0	NA
1260	0	0	0	0	0	0	NA
1258	0	0	0	0	0	0	NA
1256	0	0	0	0	0	0	NA
1254	0	0	0	0	0	0	NA
1252	0	0	0	0	0	0	NA
1250	0	0	0	0	0	0	NA
1248	0	0	0	0	0	0	B
1246	0	0	0	0	0	0	B
1244	0	0	0	0	0	0	B
1242	0	0	0	0	0	0	NA
1240	0	0	0	0	0	0	NA
1238	0	0	0	0	0	0	B
1236	0	0	0	0	0	0	B
1234	0	0	0	0	0	0	B
1232	0	0	0	0	0	0	B
1230	0	0	0	0	0	0	NA
1228	0	0	0	0	0	0	NA
1226	0	0	0	0	0	0	NA
1224	0	0	0	0	0	0	NA
1222	0	0	0	0	0	0	NA
1220	0	0	0	0	0	0	NA
1218	0	0	0	0	0	0	NA
1216	0	0	0	0	0	0	NA
1214	0	0	0	0	0	0	NA
1212	0	0	0	0	0	0	NA
1210	0	0	0	0	0	0	NA
1208	0	0	0	0	0	0	B
1206	0	0	0	0	0	0	B
1204	0	0	0	0	0	0	B
1202	4,72776E-85	0	0	7,86E-267	0	0	NA
1200	1	0	0	2,04E-240	0	0	NA
1198	8,34975E-69	0	6,08039E-20	3,54E-212	0	2,35E-96	NA
1196	7,6768E-202	9,9935E-121	2,06785E-14	1,02E-155	0	3,52E-26	NA
1194	5,8133E-290	1,62159E-07	5,27812E-51	1,34E-103	3,72E-274	1,19E-09	NA
1192	0	0,005983574	1,18366E-68	9,44E-68	2,76E-170	0,0000106	NA
1190	0	5,89789E-17	1,13877E-82	2,34E-55	4,74E-119	0,008646855	NA
1188	0	9,33749E-41	9,2486E-100	1,45E-50	3,18E-84	0,751018925	NA
1186	0	1,44505E-75	1,6677E-121	3,45E-43	2,09E-53	1	NA
1184	0	1,0245E-120	4,1862E-163	7,18E-44	6,08E-32	0,001016925	NA
1182	0	9,9571E-171	1,4833E-219	1,46E-49	1,04E-18	4,64E-11	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1180	0	2,7694E-235	5,2746E-279	6,61E-46	0,000000987	1,78E-19	NA
1178	0	0	0	3,23E-45	1	1,52E-34	NA
1176	0	0	0	7,92E-59	0,16784294	1,14E-61	NA
1174	0	0	0	9,74E-79	0,000422113	2,35E-99	NA
1172	0	0	0	5,94E-115	0,000000318	1,23E-165	NA
1170	0	0	0	1,73E-177	1,81E-19	0	NA
1168	0	0	0	8,92E-238	6,3E-76	0	NA
1166	0	0	0	3,27E-272	3,91E-202	0	NA
1164	0	0	0	9,87E-290	0	0	NA
1162	0	0	0	0	0	0	E
1160	0	0	0	0	0	0	E
1158	0	0	0	0	0	0	E
1156	0	0	0	0	0	0	E
1154	0	0	0	0	0	0	NA
1152	0	0	0	0	0	0	NA
1150	1,8843E-207	0	0	0	2,5E-242	0	NA
1148	1,7794E-110	0	0	0	4,16E-157	0	NA
1146	2,40903E-22	1,0173E-167	0	0	4,02E-56	0	NA
1144	7,55261E-17	9,07771E-21	0	0	1	0	NA
1142	4,3683E-199	0	2,43436E-15	0	3,47E-106	1,24E-213	NA
1140	0	0	3,7263E-271	0	0	2,95E-33	NA
1138	0	0	0	0	0	3,56E-29	NA
1136	0	0	0	0	0	1,56E-251	NA
1134	0	0	0	0	0	0	NA
1132	0	0	0	0	0	0	NA
1130	0	0	0	0	0	0	NA
1128	0	0	0	0	0	0	NA
1126	0	0	0	0	0	0	NA
1124	0	0	0	0	0	0	NA
1122	0	0	0	0	0	0	NA
1120	0	0	0	0	0	0	NA
1118	0	0	0	0	0	0	NA
1116	0	0	0	0	0	6,99E-103	NA
1114	1,93757E-32	0	3,77E-38	0	0	1	NA
1112	1,48797E-06	3,4417E-253	2,0484E-82	0	1,49E-286	2,54E-34	NA
1110	9,68788E-19	5,2656E-123	1,7574E-161	0	2,32E-201	8,95E-55	NA
1108	1,97395E-09	6,6554E-129	7,9296E-122	0	6,16E-176	1,06E-47	C
1106	0,009548298	6,3409E-143	7,24032E-89	0	8,32E-156	9,56E-45	C
1104	1	1,7612E-181	1,09367E-55	0	9,36E-157	4,44E-39	C
1102	2,93338E-13	0	0,511922293	0	9,5E-215	4,11E-15	C
1100	1,5433E-109	0	2,4248E-127	0	0	1	NA
1098	0	0	0	0	0	1,24E-31	NA
1096	0	0	0	0	0	5,43E-147	NA
1094	0	0	0	0	0	0	NA
1092	0	0	0	0	0	0	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1090	0	0	0	0	0	0	0	NA
1088	0	0	0	0	0	0	0	NA
1086	0	0	0	0	0	0	0	NA
1084	0	0	0	0	0	0	0	NA
1082	0	0	0	0	0	0	0	NA
1080	0	0	0	0	0	0	0	NA
1078	0	0	0	0	0	0	0	NA
1076	0	0	0	0	0	0	0	NA
1074	0	0	0	0	0	0	0	NA
1072	0	0	0	0	0	0	0	NA
1070	0	0	0	0	0	0	1,12E-277	NA
1068	0	0	0	0	0	0	6,33E-65	NA
1066	1,5951E-182	0	2,8816E-109	7,5E-273	4,89E-118	7,83E-24	0	NA
1064	9,69808E-15	1,17539E-90	0	5,39E-211	6,53E-33	0	0	NA
1062	0	0	0	6,74E-141	0	0	0	NA
1060	0	0	0	1,78E-85	0	0	0	NA
1058	0	0	0	3,33E-53	0	0	0	NA
1056	0	0	0	6,55E-27	0	0	0	E
1054	0	0	0	1,86E-08	0	0	0	E
1052	0	0	0	0,018334078	0	0	0	E
1050	0	0	0	1	0	0	0	E
1048	0,70671842	4,8608E-272	1,1971E-181	0,294716937	3,83E-239	2,03E-168	0	NA
1046	0	0	0	0,00052141	0,881434558	0,48320429	0	NA
1044	0	0	0	1,59E-09	3,27E-123	2,18E-105	0	NA
1042	0	0	0	4,16E-20	2,55E-170	4,69E-178	0	NA
1040	0	0	0	1,5E-27	7,55E-29	3,81E-64	0	NA
1038	0	4,1889E-133	1,0265E-199	2,36E-38	8,76E-155	1,08E-21	0	NA
1036	0,169099726	0	0	9,12E-68	0	0	0	E
1034	0	0	0	1,55E-103	0	0	0	E
1032	0	0	0	4,11E-119	0	0	0	E
1030	0	0	0	2,06E-130	0	0	0	E
1028	0	0	0	4,39E-168	0	0	0	NA
1026	0	0	0	2,4E-201	0	0	0	NA
1024	0	0	0	4,69E-203	0	0	0	NA
1022	8,6836E-237	0	0	3,01E-193	0	0	0	NA
1020	5,9156E-216	0	0	2,59E-200	0	0	0	NA
1018	9,0425E-261	0	0	3,04E-237	0	0	0	NA
1016	0	0	0	4,66E-295	0	0	0	NA
1014	0	0	0	0	0	0	0	NA
1012	0	0	0	0	0	0	0	NA
1010	0	0	0	0	0	0	0	NA
1008	0	0	0	0	0	0	0	NA
1006	0	0	0	0	0	0	0	NA
1004	0	0	0	0	0	0	0	NA
1002	0	0	0	0	0	0	0	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

1000	0	0	0	0	0	0	0	NA
998	0	0	0	0	0	0	0	NA
996	0	0	0	0	0	0	0	NA
994	0	0	0	0	0	0	2,28E-298	NA
992	0	0	0	0	0	0	7,08E-163	NA
990	0	0	0	0	0	0	6,55E-85	NA
988	0	0	0	0	0	0	5,41E-52	NA
986	0	0	0	0	0	0	6,41E-65	NA
984	0	0	0	0	0	0	8,07E-49	NA
982	0	0	0	0	0	0	1	NA
980	5,38959E-98	0	1	0	0	0	3,1E-99	NA
978	0,728302213	1,13345E-95	0	0	1,12E-93	0	0	NA
976	9,44838E-89	3,54135E-69	0	0	0,13728411	0	0	NA
974	2,6397E-224	0	0	0	3,95E-33	0	0	NA
972	0	0	0	0	3,38E-112	0	0	NA
970	0	0	0	0	1,32E-206	0	0	NA
968	0	0	0	0	0	0	0	NA
966	0	0	0	0	0	0	0	NA
964	0	0	0	0	0	0	0	NA
962	0	0	0	0	0	0	0	NA
960	1,4124E-266	0	0	2,05E-281	0	0	0	NA
958	5,7311E-208	0	0	1,75E-217	0	0	0	NA
956	8,0291E-165	0	0	1,92E-164	0	0	0	NA
954	7,097E-119	0	0	3,35E-136	0	0	0	NA
952	1,14941E-63	0	0	4,16E-112	0	0	0	NA
950	6,43041E-18	0	0	4,71E-88	0	0	0	NA
948	1	0	0	2,44E-66	0	0	0	NA
946	5,94038E-10	0	0	6,65E-48	0	0	0	NA
944	7,74423E-38	4,2056E-224	0	2,15E-41	6,37E-295	0	0	NA
942	1,28769E-78	6,9341E-137	5,5317E-300	1,34E-39	4,11E-250	0	0	NA
940	7,801E-121	2,19449E-94	1,1962E-216	4,05E-34	6,69E-233	0	0	NA
938	3,1513E-154	2,83724E-80	4,0507E-166	4,91E-26	6,67E-238	0	0	NA
936	1,5715E-150	2,1103E-100	6,4784E-147	2,32E-15	8,18E-265	0	0	NA
934	6,4824E-113	1,3912E-155	3,4353E-154	0,00000432	5,89E-304	3,62E-299	0	NA
932	1,54864E-89	1,9286E-184	2,9924E-168	0,000192197	0	2,18E-291	0	NA
930	6,03083E-73	4,2194E-212	1,5523E-189	0,000401437	0	1,1E-288	0	NA
928	1,09477E-49	6,4966E-272	5,173E-203	0,399285954	0	3,55E-271	0	NA
926	2,20104E-26	0	1,0764E-217	1	0	5,28E-251	0	NA
924	0,001039253	0	1,0841E-261	0,674608424	0	3,42E-234	0	NA
922	1	0	6,2008E-272	1	1,48E-305	1,74E-215	0	NA
920	0,004010121	1,5327E-216	3,2779E-216	6,25E-08	3,5E-187	2,43E-191	0	NA
918	6,16539E-08	1,2465E-114	1,1323E-113	0,000014	5,41E-118	2,63E-119	0	NA
916	2,64184E-18	3,16727E-43	5,64402E-15	1	7,33E-67	1,86E-34	0	NA
914	1,52298E-53	1	1,28168E-10	0,34081931	1,69E-18	0,015888946	0	D
912	3,9038E-117	4,3979E-74	1,49166E-83	1	0,24912274	0,0000107	0	D

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

910	4,5943E-211	0	1,4986E-233	0,138801851	5,75E-46	7,69E-32	D
908	4,6983E-284	0	0	0,0000105	1,22E-118	1,53E-62	NA
906	2,5235E-279	0	0	4,22E-12	6,39E-163	4,18E-78	NA
904	1,3425E-220	0	0	2,27E-42	2,39E-199	8,72E-54	NA
902	5,9112E-140	0	5,8626E-144	5,88E-122	2,06E-211	0,0000006	NA
900	3,57127E-76	0	1,82561E-40	7,06E-144	3,66E-157	0,66302592	D
898	1,02934E-26	1,7625E-204	4,32808E-19	3,71E-94	1,38E-103	1	D
896	2,22997E-10	2,0846E-175	1,44825E-70	5,83E-38	4,72E-109	2,84E-30	D
894	1,45557E-32	0	0	2,29E-12	1,5E-175	5,6E-145	D
892	7,87149E-76	0	0	0,0013397	4,36E-271	2,33E-307	NA
890	8,00567E-90	0	0	0,050212538	0	0	NA
888	7,94821E-92	0	0	0,358657307	0	0	NA
886	1,76625E-78	0	0	1,16E-09	6,48E-280	0	NA
884	3,68028E-54	0	0	1,11E-45	7,85E-149	0	NA
882	1,74929E-27	3,561E-236	0	5,65E-46	5,82E-103	0	NA
880	9,05983E-08	4,5387E-140	0	3,99E-41	2,05E-77	2,54E-302	NA
878	1	1,16293E-22	0	1,13E-95	2,59E-24	0	NA
876	8,67054E-22	5,58129E-21	2,0977E-231	4,02E-200	0,541657203	2,25E-307	NA
874	4,78347E-57	3,7599E-104	8,597E-117	5,85E-276	1,23E-17	4,83E-266	NA
872	1,23618E-86	4,5025E-171	1,76028E-94	0	1,25E-33	1,95E-282	NA
870	1,3563E-111	9,9774E-200	9,2357E-119	0	1,28E-40	0	NA
868	1,66209E-95	3,968E-145	4,0909E-226	0	2,64E-28	0	NA
866	3,20159E-66	1,38958E-71	0	0	5,99E-09	0	NA
864	1,61751E-41	3,02051E-12	0	0	0,049744512	0	NA
862	2,23168E-18	2,13384E-10	0	0	1,13E-35	0	NA
860	7,79543E-09	1,72721E-55	0	7,17E-274	3,7E-82	0	NA
858	3,01702E-06	1,6978E-104	0	1,03E-232	3,3E-129	0	NA
856	5,61147E-08	8,5171E-126	0	1,43E-231	1,59E-154	0	NA
854	8,25026E-23	5,5119E-70	0	2,67E-286	5,48E-114	0	D
852	1,57187E-46	4,61099E-34	0	0	1,22E-87	0	D
850	2,7025E-64	2,46356E-25	0	0	6,55E-90	0	D

TW_FibG: fibres' G-layer of tension wood, TW_FibS: fibres' S-layer of tension wood, OW_FibS: fibres' S-layer of opposite wood, NW_FibS: fibres' S-layer of normal wood.

Supplementary table 4 | *P*-value resulting from pairwise Wilcoxon test between vessels of tension wood, opposite wood et normal wood.

Wavenumber (cm ⁻¹)	OW_Ves-NW_Ves	TW_Ves-OW_Ves	TW_Ves-NW_Ves	DAWN_cluster
1800	8,9323E-176	5,2198E-126	9,44653E-08	NA
1798	2,63855E-88	1,4523E-117	1,63399E-22	NA
1796	3,79904E-06	2,46966E-95	1,03264E-54	NA
1794	1,08156E-11	5,13604E-74	3,57411E-79	NA
1792	1,10815E-29	1,24403E-58	1,53868E-85	NA
1790	0,241586541	6,61771E-79	3,72805E-47	C
1788	1,36531E-16	1,14747E-93	1,13413E-35	C
1786	8,78188E-05	6,11839E-91	3,72259E-47	C
1784	0,000361434	1,44508E-91	1,75969E-45	NA
1782	1,89121E-23	4,0208E-107	1,36839E-31	C
1780	1,86813E-30	6,4335E-115	5,61111E-31	C
1778	1,65931E-14	2,4252E-113	1,04614E-41	C
1776	3,28918E-07	9,7558E-115	2,71478E-49	C
1774	1	1,4828E-109	3,41989E-71	C
1772	8,14309E-49	4,79397E-81	5,591E-136	NA
1770	6,94917E-15	1,93686E-90	9,51148E-97	C
1768	0,002643634	6,7223E-102	4,31559E-78	NA
1766	6,15426E-11	1,1783E-105	1,0434E-104	NA
1764	3,23545E-16	1,9009E-107	5,8214E-120	NA
1762	1,10779E-44	5,8021E-91	1,8002E-139	NA
1760	6,33329E-67	8,95599E-83	5,6546E-158	NA
1758	2,30383E-66	1,72624E-89	3,7098E-173	NA
1756	3,66249E-91	1,92733E-86	2,5695E-193	NA
1754	1,7318E-101	1,18193E-82	1,2331E-200	NA
1752	3,19123E-92	1,56513E-82	5,6864E-202	NA
1750	8,6742E-171	5,70727E-61	3,2242E-232	NA
1748	0	3,30944E-43	5,4808E-268	NA
1746	4,5625E-282	1,29908E-50	5,9687E-264	NA
1744	1,5799E-169	9,26131E-68	7,8913E-237	F
1742	1,55033E-85	6,33244E-83	3,4101E-210	F
1740	6,2464E-170	2,96288E-67	8,7712E-240	F
1738	1,5721E-303	3,21005E-47	1,0042E-272	F
1736	0	8,12521E-39	1,3554E-292	F
1734	0	2,13531E-19	0	NA
1732	0	1,26949E-27	4,9549E-279	F
1730	3,26511E-65	2,70551E-76	1,0375E-184	F
1728	8,22816E-23	5,687E-101	4,4987E-166	F
1726	9,68113E-67	1,1494E-107	1,4651E-206	F
1724	3,7852E-124	6,5985E-112	2,8716E-245	NA
1722	3,815E-137	1,5427E-114	6,9216E-250	F
1720	1,5356E-07	2,1946E-158	3,5213E-174	F
1718	2,75058E-08	6,776E-174	2,6954E-114	F

1716	0	7,77332E-12	0	F
1714	0	3,00233E-26	1,4505E-285	F
1712	2,1689E-187	4,8063E-104	5,8617E-228	F
1710	2,9231E-119	1,2458E-135	3,2625E-208	F
1708	4,70079E-49	1,4906E-149	3,0998E-145	NA
1706	2,33768E-18	2,9558E-134	9,32826E-80	NA
1704	3,375E-27	1,15048E-69	1,76601E-58	NA
1702	4,1968E-84	1,60672E-34	3,71148E-83	NA
1700	0	0,001018947	3,0885E-225	NA
1698	0	8,27493E-47	0	NA
1696	0	1,33539E-07	0	F
1694	1,576E-130	9,97786E-43	2,5855E-136	E
1692	1,5238E-214	1,57283E-07	3,4838E-128	E
1690	3,5867E-226	0,004359669	4,9047E-117	NA
1688	7,7687E-218	0,052498981	7,32464E-80	E
1686	7,5186E-191	4,83973E-60	4,68713E-07	A
1684	0	6,77951E-79	3,3225E-248	A
1682	0	3,05987E-35	0	A
1680	3,4705E-299	6,95191E-35	8,6648E-269	NA
1678	1,1842E-16	9,83793E-75	1,1996E-145	B
1676	1,1131E-95	3,1031E-146	1,74456E-35	NA
1674	4,3075E-198	1,2085E-212	1,12012E-16	NA
1672	1,64063E-12	3,8261E-187	3,68078E-53	NA
1670	1	2,9325E-166	1,80642E-51	NA
1668	2,33025E-98	3,69664E-63	7,7928E-113	B
1666	2,9734E-230	3,85546E-14	1,1911E-148	B
1664	4,19892E-61	2,23314E-44	3,341E-72	B
1662	0,000127874	1,3058E-121	1,81185E-28	NA
1660	3,97455E-07	4,2122E-124	1,5052E-32	NA
1658	8,30448E-15	4,2851E-107	3,67209E-41	B
1656	2,31569E-97	1,29991E-32	1,91767E-87	B
1654	0	2,75302E-08	1,2506E-232	D
1652	0	0,001476822	4,9094E-223	D
1650	4,3861E-220	2,14529E-14	1,832E-142	B
1648	2,99215E-59	4,33976E-40	2,20615E-70	B
1646	1,33768E-07	5,8043E-77	7,07704E-30	B
1644	3,56164E-12	2,75908E-68	7,46512E-35	B
1642	0,001418355	4,1216E-109	5,99564E-26	B
1640	1,73031E-06	5,0988E-112	2,97562E-31	B
1638	1,41666E-29	1,1597E-86	2,36342E-58	B
1636	7,68385E-55	3,18218E-69	2,14629E-79	B
1634	1,7659E-227	8,32248E-13	3,5524E-149	B
1632	1,20562E-80	5,66259E-61	7,8487E-100	B
1630	2,38113E-45	2,11024E-86	9,22178E-80	B
1628	1,70254E-87	3,18967E-73	6,4833E-113	B

1626	8,02553E-92	3,55123E-87	6,9021E-128	B
1624	3,83337E-32	6,5689E-128	1,32257E-85	NA
1622	4,68492E-14	2,1628E-153	6,02943E-62	B
1620	4,86253E-26	6,8048E-140	8,3912E-84	B
1618	7,56739E-28	2,4774E-107	1,02366E-72	B
1616	2,84794E-22	1,0247E-105	8,52674E-62	B
1614	5,81684E-86	3,15619E-91	4,5013E-134	B
1612	6,89295E-73	1,363E-114	4,964E-138	B
1610	2,23562E-51	9,0475E-122	2,8476E-121	B
1608	4,38724E-37	1,5822E-126	7,7718E-106	B
1606	2,01454E-55	7,1625E-113	4,2833E-126	B
1604	2,11511E-65	8,9071E-109	7,6443E-140	B
1602	8,43082E-64	1,8578E-104	2,2765E-138	B
1600	1,5623E-123	1,19597E-75	4,2584E-169	NA
1598	1,65E-207	2,14444E-48	1,575E-200	A
1596	2,6216E-202	4,66634E-39	4,7096E-193	A
1594	5,8922E-196	1,73978E-29	1,5499E-180	A
1592	7,1364E-228	7,42889E-19	2,0138E-184	A
1590	1,5287E-247	9,08697E-16	2,2895E-190	A
1588	5,8323E-281	4,02772E-17	4,5572E-212	NA
1586	1,2614E-303	3,92849E-23	1,68E-235	NA
1584	1,796E-268	2,28541E-36	6,6656E-238	NA
1582	2,6005E-233	2,63537E-50	6,5048E-245	NA
1580	3,2113E-250	3,10608E-55	3,1848E-268	NA
1578	1,1112E-296	9,89311E-40	2,0657E-270	NA
1576	8,77307E-81	3,06883E-58	1,6653E-181	A
1574	1,98148E-76	2,72178E-71	1,9291E-207	NA
1572	9,27506E-95	4,43469E-79	1,8289E-231	A
1570	2,4732E-151	4,59546E-63	1,6951E-245	A
1568	1,2398E-145	5,60223E-61	1,7881E-244	A
1566	3,59609E-69	6,22023E-75	1,2877E-218	NA
1564	3,02514E-14	2,86362E-91	9,07E-187	NA
1562	1,5332E-138	2,17227E-58	2,0496E-247	A
1560	0	1	0	A
1558	0	1	0	A
1556	0,71558174	1,6673E-120	1,4153E-167	A
1554	0	2,8541E-165	2,77015E-08	B
1552	4,7719E-192	1,5958E-135	2,64821E-44	B
1550	0,226620309	1,02286E-97	2,4985E-128	A
1548	0,093782814	3,9853E-100	1,1013E-129	A
1546	2,73575E-69	4,3187E-131	3,72795E-90	NA
1544	0	1,179E-170	1,76004E-14	NA
1542	0	6,1297E-169	1,38261E-57	NA
1540	0	1,6746E-141	1,74453E-47	B
1538	3,2536E-178	6,86416E-18	1,1658E-160	A

1536	0,036246804	1,17185E-78	2,74433E-92	A
1534	2,63767E-78	5,4738E-120	9,78102E-68	A
1532	1	5,18017E-96	1,719E-127	A
1530	0,63233683	4,87624E-82	1,6909E-112	A
1528	1,9734E-31	8,57171E-94	8,95436E-64	A
1526	0	4,8862E-141	9,3082E-07	NA
1524	0	9,2906E-160	4,55561E-19	NA
1522	0	9,0756E-152	6,20087E-67	NA
1520	0	3,6387E-137	1	NA
1518	3,52465E-15	5,19216E-63	1,1243E-121	A
1516	5,87251E-10	3,07737E-55	2,0767E-109	A
1514	4,4118E-197	4,43866E-98	3,5454E-07	B
1512	0	2,0446E-122	1,13928E-14	B
1510	3,567E-107	4,75615E-72	1,9357E-13	B
1508	2,4076E-105	1,60495E-07	2,54081E-95	A
1506	0	3,22045E-38	2,2793E-183	A
1504	1,5918E-194	0,000792045	1,94226E-51	A
1502	0	7,28252E-78	2,2247E-120	NA
1500	0	1,98045E-89	5,741E-146	NA
1498	0	7,95875E-97	5,5689E-149	NA
1496	0	6,03133E-85	1,2932E-113	NA
1494	0	1,45251E-60	4,12332E-17	B
1492	5,67452E-43	5,64739E-40	3,45115E-05	A
1490	0,003528792	5,74602E-39	1,15187E-20	A
1488	2,96772E-24	2,24676E-44	6,24067E-11	A
1486	0,955783248	2,81752E-20	5,45872E-19	A
1484	1,88246E-77	3,3878E-104	1,0881E-38	A
1482	1,7136E-148	1,8371E-167	4,3214E-154	NA
1480	6,9544E-146	3,0835E-166	1,4273E-156	NA
1478	1,78902E-23	3,6419E-96	1,96979E-76	A
1476	2,60127E-58	4,74581E-15	2,75769E-64	A
1474	2,9023E-174	1,22281E-53	0,770241369	A
1472	0	3,30938E-73	2,83502E-95	NA
1470	0	2,94813E-41	1,58936E-21	B
1468	0	3,41496E-32	4,01258E-48	NA
1466	0	2,10114E-27	4,834E-100	NA
1464	0	3,52908E-29	1,5884E-126	B
1462	0	5,4695E-20	3,38909E-53	B
1460	0,495678928	0,329921831	0,001088782	A
1458	8,3945E-257	2,97741E-22	8,95137E-19	B
1456	0	5,65728E-81	3,4293E-217	B
1454	0	5,69608E-53	2,2769E-104	B
1452	0	7,31314E-27	1,76922E-65	B
1450	2,5175E-219	1,52667E-19	3,53051E-21	B
1448	9,6559E-105	1,4633E-21	0,018332612	A

1446	1,85156E-91	3,18812E-28	1	A
1444	9,3858E-123	1,47232E-34	0,992217303	A
1442	2,1156E-156	3,4905E-38	0,118596255	NA
1440	3,984E-232	2,21574E-47	0,000273028	NA
1438	0	1,13298E-81	2,37292E-16	NA
1436	0	9,0277E-129	1,38389E-52	NA
1434	0	8,8942E-124	1,50481E-38	NA
1432	0	2,34768E-77	7,18929E-08	NA
1430	2,51119E-96	3,15103E-39	0,000227645	A
1428	6,2559E-12	3,47646E-23	2,98698E-17	NA
1426	0,002473704	7,14764E-12	1,82961E-24	A
1424	1,18439E-30	3,00029E-07	9,11713E-36	A
1422	0,043430231	1,3086E-19	6,59881E-20	A
1420	1	5,72704E-32	3,77904E-41	A
1418	6,66074E-19	2,4693E-43	3,02182E-76	NA
1416	1,12416E-15	5,45138E-36	1,42078E-58	NA
1414	3,27263E-35	4,58365E-38	4,07668E-06	NA
1412	4,9636E-141	8,03442E-42	0,017060555	NA
1410	6,4497E-140	8,03758E-42	0,00522093	NA
1408	5,21801E-53	6,58968E-34	0,953166818	NA
1406	8,89152E-07	5,88085E-24	8,54104E-06	NA
1404	9,96034E-10	1,2182E-25	0,000316504	NA
1402	6,75575E-36	8,2009E-39	0,180770044	NA
1400	1,21241E-47	2,79477E-62	0,015547974	NA
1398	1,8849E-68	3,0761E-91	0,003537941	NA
1396	3,1912E-104	7,2994E-100	0,631846178	NA
1394	6,5928E-122	1,32933E-87	0,817009079	NA
1392	6,3215E-157	7,59672E-73	1,00309E-05	NA
1390	2,0342E-212	3,05812E-68	9,20771E-15	NA
1388	2,598E-249	1,41077E-77	8,22668E-17	NA
1386	2,8522E-255	9,10553E-74	1,46565E-16	NA
1384	1,861E-180	1,84095E-41	9,03617E-15	NA
1382	9,6211E-178	3,53143E-23	1,44535E-25	NA
1380	9,6998E-225	6,09534E-23	4,82415E-40	NA
1378	1,1358E-167	1,48502E-17	4,8623E-30	A
1376	8,53329E-22	0,022581244	9,74624E-06	NA
1374	6,33309E-10	0,165970023	0,236483884	A
1372	1,73609E-24	1	9,36794E-07	A
1370	1,73752E-15	0,000251722	0,59630235	A
1368	1,29706E-38	2,26299E-07	0,026940304	A
1366	0,90368502	0,000227292	4,1852E-05	A
1364	5,6353E-117	1	1,33312E-36	A
1362	4,7441E-168	0,439159094	9,90316E-50	A
1360	2,49868E-81	0,437403582	4,18305E-34	A
1358	0,083450531	3,60385E-09	0,000363115	NA

1356	1,45978E-33	1,39656E-15	1	NA
1354	2,20458E-29	2,30606E-15	1	NA
1352	4,99972E-18	1,01774E-11	1	NA
1350	6,37516E-26	1,80871E-09	0,160591658	NA
1348	2,08476E-25	1,52218E-07	0,046944296	NA
1346	2,58331E-09	9,05195E-06	1	A
1344	0,257786067	0,001023098	0,478349879	A
1342	0,000123516	0,070748548	0,000661402	A
1340	0,004845359	1,48539E-05	3,6841E-06	NA
1338	9,69194E-15	1,22811E-05	3,37494E-15	NA
1336	1,58443E-73	0,744572009	3,2441E-22	A
1334	5,43692E-40	0,001649489	1,05299E-05	A
1332	4,98922E-21	0,000134085	0,320841102	A
1330	5,7678E-19	6,25603E-05	0,795327178	A
1328	1,92644E-19	0,000715004	0,250245473	A
1326	3,07166E-21	0,000436326	0,181844225	A
1324	9,16344E-29	6,70049E-07	0,360966891	A
1322	5,2415E-26	4,70531E-05	0,101332728	A
1320	1	1	1	A
1318	8,28404E-14	0,000922192	1	NA
1316	4,16158E-05	0,00112121	0,998280918	NA
1314	7,4297E-06	1,97653E-05	0,27091882	NA
1312	1,38757E-05	1,75668E-06	0,070078143	NA
1310	0,362143831	0,000107896	0,006090087	NA
1308	0,400993199	1,51121E-05	0,002047571	NA
1306	1	2,20421E-05	0,000616636	NA
1304	1	0,005616304	0,040731815	NA
1302	0,133242104	0,028788286	1	NA
1300	0,000484689	0,168332736	0,79891303	NA
1298	4,2762E-09	1	0,000882352	NA
1296	1,24081E-15	1	3,22695E-07	NA
1294	1,02711E-16	1	5,92954E-10	NA
1292	2,18483E-15	0,316917155	8,50575E-13	NA
1290	4,20914E-22	0,343403891	1,17159E-16	NA
1288	6,82592E-37	0,092368155	5,72836E-27	NA
1286	1,02661E-39	3,31433E-05	5,46828E-40	NA
1284	9,73011E-39	9,49262E-08	3,89557E-47	NA
1282	1,44478E-50	1,87124E-07	1,09805E-57	NA
1280	1,93831E-71	1,28295E-09	6,66209E-85	NA
1278	4,08405E-91	4,20228E-14	1,0517E-117	NA
1276	9,7316E-109	1,24609E-17	3,0933E-142	NA
1274	5,3465E-145	1,33283E-17	1,1998E-173	NA
1272	3,2433E-201	1,26606E-13	4,4214E-213	NA
1270	1,5259E-218	2,11821E-14	7,6524E-232	NA
1268	6,7638E-189	1,54599E-21	2,5785E-229	NA

1266	4,0982E-160	9,89317E-28	1,0654E-219	NA
1264	4,0352E-138	7,85078E-30	6,745E-204	NA
1262	2,1105E-123	3,52938E-30	3,431E-190	NA
1260	5,221E-110	4,91027E-36	6,7371E-185	NA
1258	1,51556E-79	8,12862E-50	9,9587E-179	NA
1256	2,15957E-54	2,11842E-61	3,1583E-174	NA
1254	1,67867E-44	2,25081E-70	1,4519E-179	NA
1252	1,48981E-33	6,86072E-82	8,3617E-183	NA
1250	5,95759E-18	4,21266E-92	6,7774E-172	NA
1248	1,76373E-07	2,5394E-103	1,1425E-164	NA
1246	0,000558307	1,128E-119	1,9271E-174	NA
1244	0,024695456	1,1442E-130	3,707E-181	NA
1242	1	6,0402E-138	1,8812E-178	NA
1240	0,107006773	4,8245E-144	8,0826E-171	NA
1238	2,65606E-07	4,8496E-148	3,6112E-159	NA
1236	1,8469E-16	2,9002E-160	3,081E-158	F
1234	4,20319E-22	2,1362E-168	2,6924E-161	F
1232	6,69156E-19	2,7725E-160	7,7281E-157	F
1230	5,17578E-11	1,8775E-151	2,984E-159	NA
1228	8,86262E-05	3,624E-148	3,5029E-170	NA
1226	0,083828891	2,9228E-144	2,1339E-179	NA
1224	1	6,3727E-140	2,799E-188	NA
1222	0,311043379	5,4925E-140	8,4952E-202	NA
1220	0,000153554	2,8808E-138	1,6818E-212	NA
1218	4,82997E-12	2,3451E-131	8,6863E-221	NA
1216	3,36707E-19	5,8303E-127	6,3108E-226	NA
1214	7,65464E-23	7,0278E-125	3,9995E-224	NA
1212	2,67036E-28	5,2293E-119	3,3228E-214	NA
1210	1,63449E-29	3,9304E-113	6,7675E-193	NA
1208	7,74389E-24	3,7761E-113	1,6951E-170	NA
1206	1,24274E-17	1,4657E-116	7,7427E-154	NA
1204	3,24876E-11	5,7193E-116	5,6471E-133	NA
1202	0,000249603	1,8731E-111	1,2079E-100	NA
1200	0,469710778	8,4673E-99	1,03187E-60	NA
1198	0,380772004	9,6356E-79	1,07837E-35	NA
1196	0,061077804	7,1884E-68	4,04911E-27	NA
1194	0,063287562	3,73223E-70	1,99358E-24	NA
1192	0,045667057	3,30785E-78	2,16805E-26	NA
1190	0,005639031	2,37977E-82	7,12082E-29	NA
1188	0,000526892	9,93935E-82	2,42253E-29	NA
1186	0,000232988	1,15542E-81	1,14364E-29	NA
1184	0,004432923	2,52318E-82	1,29934E-28	NA
1182	0,486322977	1,23306E-85	9,80179E-28	NA
1180	1	1,52175E-93	1,24876E-30	NA
1178	1	3,2376E-99	5,71763E-33	NA

1176	0,173194373	1,4376E-103	3,34484E-32	NA
1174	1,47459E-05	3,697E-115	1,01607E-32	NA
1172	4,86588E-21	4,4697E-131	4,65648E-32	NA
1170	1,71935E-59	8,3229E-138	5,89085E-26	NA
1168	9,182E-114	2,2692E-123	1,10377E-13	NA
1166	1,7187E-147	9,78668E-97	0,000207023	NA
1164	6,8176E-148	4,43777E-74	0,237926396	NA
1162	1,1707E-138	5,30052E-56	1	NA
1160	8,0523E-133	1,4611E-41	0,231221795	D
1158	1,7596E-123	1,14039E-32	0,017240299	D
1156	8,9785E-108	2,11977E-28	0,030318907	D
1154	2,83114E-78	1,23287E-26	1	NA
1152	4,2286E-34	5,08369E-27	0,007224011	NA
1150	3,19637E-06	1,40863E-31	2,13903E-16	NA
1148	0,600680505	3,32014E-34	4,54624E-36	NA
1146	5,58715E-08	2,6944E-32	7,35282E-51	NA
1144	7,10428E-12	4,51091E-33	2,09763E-59	NA
1142	6,34697E-08	5,01295E-35	3,19126E-58	NA
1140	0,011586925	3,22584E-43	3,07698E-59	NA
1138	1	1,58484E-63	1,35066E-74	NA
1136	0,090458195	7,60159E-80	2,10379E-77	NA
1134	4,60137E-15	5,44025E-87	1,80049E-59	NA
1132	1,29685E-45	7,83803E-98	4,17792E-45	NA
1130	2,34161E-87	1,0253E-110	1,42539E-35	NA
1128	1,2918E-137	7,1852E-117	1,08865E-23	NA
1126	4,3846E-187	5,5757E-112	6,16381E-11	NA
1124	1,9896E-214	8,0792E-100	0,000418181	NA
1122	2,4881E-218	8,64424E-93	0,014801783	NA
1120	6,9248E-230	8,05E-89	0,274552351	NA
1118	5,8311E-249	3,41016E-86	1	NA
1116	3,9418E-239	2,94171E-85	1	NA
1114	4,1701E-213	6,86205E-72	1	NA
1112	3,6168E-200	2,15111E-57	0,431293306	D
1110	9,0833E-189	6,2549E-54	0,382640358	NA
1108	8,8511E-166	1,45314E-52	1	D
1106	8,6703E-141	2,99392E-48	1	D
1104	8,7534E-116	7,18618E-43	1	D
1102	8,76378E-95	1,53659E-42	0,045907965	D
1100	1,05859E-91	5,71654E-41	0,028191868	NA
1098	2,72156E-96	7,94819E-33	1	NA
1096	9,8274E-87	1,33722E-27	1	NA
1094	1,00458E-79	4,5445E-27	1	NA
1092	7,7759E-74	3,55059E-30	0,129844591	NA
1090	1,29104E-60	5,25124E-38	9,07631E-06	NA
1088	1,58142E-45	2,48219E-43	9,53288E-12	NA

1086	8,13814E-44	1,18805E-40	6,78695E-11	NA
1084	3,21478E-58	8,20428E-44	5,77422E-09	NA
1082	2,2315E-62	9,06399E-54	3,43631E-13	NA
1080	2,95198E-56	1,64503E-53	4,06492E-15	NA
1078	4,50151E-62	6,72797E-44	2,87466E-08	NA
1076	5,72745E-76	9,76403E-36	0,008949028	NA
1074	4,57151E-88	5,57713E-30	1	NA
1072	1,9151E-99	9,93348E-24	0,243733039	NA
1070	5,6028E-105	7,02968E-19	0,000559174	NA
1068	4,233E-104	2,40322E-17	1,22683E-05	NA
1066	8,1266E-102	2,63038E-14	5,10892E-08	NA
1064	2,69255E-93	4,89229E-08	1,55985E-12	NA
1062	8,73971E-77	0,00239682	8,88935E-16	NA
1060	2,58516E-59	0,631364724	1,48195E-17	NA
1058	2,8331E-41	1	1,46635E-17	NA
1056	1,09663E-21	0,128944917	5,29693E-13	NA
1054	1,7609E-07	0,012699106	4,11466E-08	NA
1052	0,024450728	0,00022087	1,76775E-06	NA
1050	0,529238745	1,72502E-05	1,22091E-05	NA
1048	1	9,55104E-05	0,002255472	NA
1046	0,073452904	0,000278139	0,139153414	NA
1044	5,54409E-05	0,001201472	1	NA
1042	1,79545E-08	0,019360823	0,797010713	NA
1040	2,51089E-10	0,002820996	0,846272328	F
1038	6,48613E-12	1,22078E-06	1	F
1036	8,46168E-14	8,51371E-11	0,85866506	F
1034	1,51019E-14	2,98174E-18	0,022516868	F
1032	1,35576E-15	2,33602E-31	2,27121E-06	F
1030	6,35278E-20	2,83264E-43	2,73501E-10	NA
1028	6,59662E-32	5,74991E-47	8,1434E-10	NA
1026	9,62487E-43	1,57327E-45	1,94075E-08	NA
1024	7,848E-38	3,14709E-48	1,0621E-11	NA
1022	1,09069E-25	1,0803E-55	2,24748E-19	NA
1020	6,74347E-19	5,24333E-60	5,74578E-25	NA
1018	8,05251E-20	1,65913E-61	2,9782E-26	NA
1016	6,42364E-28	2,3617E-65	7,78019E-26	NA
1014	7,18888E-37	4,26907E-67	1,19228E-23	NA
1012	1,20207E-41	9,47615E-71	2,5496E-23	NA
1010	4,87114E-45	4,22166E-75	1,66603E-23	NA
1008	7,42604E-46	2,27144E-64	1,1831E-17	NA
1006	4,54251E-43	1,16973E-50	8,06975E-12	NA
1004	2,40854E-43	2,50612E-47	3,33255E-10	NA
1002	4,26293E-48	1,96658E-49	3,04863E-10	NA
1000	4,19757E-44	1,15096E-52	2,71872E-13	NA
998	4,52606E-35	1,8016E-53	3,8739E-17	NA

996	4,16124E-35	2,83571E-55	7,29283E-18	NA
994	3,87206E-36	2,38656E-60	6,31712E-20	NA
992	1,5237E-31	1,38487E-62	1,83208E-23	NA
990	1,71526E-23	3,51413E-41	5,91785E-14	NA
988	2,67639E-18	9,36146E-17	0,005408163	NA
986	3,90809E-30	4,96575E-22	0,008209824	NA
984	1,22226E-63	5,84964E-44	5,80639E-05	NA
982	2,32467E-88	2,70058E-46	0,021019292	NA
980	2,15483E-83	4,95795E-37	0,430797277	NA
978	6,4376E-66	2,9047E-28	0,744679512	NA
976	1,83505E-63	5,36667E-22	1	NA
974	1,78868E-78	2,41345E-19	0,123382655	NA
972	2,8642E-88	6,71716E-20	0,009820527	NA
970	1,65028E-79	4,4037E-20	0,041034251	NA
968	1,49655E-64	2,49753E-17	0,118230249	NA
966	7,29903E-53	5,22126E-14	0,121175495	NA
964	8,16438E-48	2,49662E-10	0,017980151	NA
962	7,00823E-50	3,95024E-08	0,000448305	NA
960	7,46725E-55	1,56654E-08	4,96043E-05	NA
958	4,04955E-54	1,57394E-09	0,000120792	NA
956	1,5562E-45	2,60307E-08	0,000680238	NA
954	5,07712E-38	2,56206E-05	0,000195318	NA
952	3,76401E-36	0,001230733	1,23696E-05	NA
950	2,13606E-35	0,006000779	3,93424E-06	NA
948	1,34663E-31	0,013759363	1,66186E-05	NA
946	1,42726E-29	0,009256041	6,84973E-05	NA
944	1,71444E-36	0,006201495	1,08562E-06	NA
942	1,52288E-44	0,004446672	5,96207E-09	NA
940	6,8114E-47	0,008598347	3,6689E-10	NA
938	1,31682E-49	0,052797755	1,60827E-12	NA
936	2,03509E-48	0,127964712	9,54048E-13	A
934	2,48788E-39	0,126514941	1,39839E-09	A
932	1,23824E-32	0,297126472	2,08932E-08	A
930	2,59499E-27	1	7,08695E-09	A
928	4,66697E-20	1	2,14982E-08	A
926	3,29029E-15	0,946100292	8,67325E-08	A
924	3,13207E-12	1	4,75379E-06	NA
922	2,89475E-13	1	2,02643E-06	NA
920	1,03926E-14	0,317399701	6,54317E-09	NA
918	9,20677E-11	1	7,41098E-06	A
916	2,85207E-11	0,181931025	0,032672329	NA
914	2,67509E-13	0,000220035	0,557176673	A
912	5,97609E-07	3,05383E-05	1	A
910	0,003021496	5,30835E-07	0,034996114	A
908	0,00353535	1,89977E-09	0,000991215	NA

CHAPITRE I – PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

906	0,376912811	1,45351E-07	9,34158E-05	NA
904	1	0,006979402	0,005394016	NA
902	0,160285666	1	1	A
900	0,000289235	1	0,151561705	A
898	1,11259E-19	0,48972508	1,47781E-12	A
896	4,82713E-49	0,452981253	2,29843E-28	A
894	9,40965E-45	0,358970309	2,25307E-26	A
892	1,10697E-25	0,068518202	5,69601E-19	A
890	3,74798E-19	0,001705662	4,12414E-20	A
888	1,22839E-18	0,000439316	5,91472E-21	NA
886	8,48715E-18	3,46796E-06	2,93303E-27	NA
884	1,22286E-11	3,17361E-08	5,71528E-29	NA
882	5,72717E-14	0,000360566	7,0636E-20	A
880	5,00883E-24	0,692167782	4,0188E-14	A
878	9,67099E-51	1	9,80208E-25	A
876	7,1448E-74	1	1,90734E-46	A
874	4,38411E-66	0,213314142	1,2591E-52	A
872	4,38972E-74	0,082038358	1,46004E-64	A
870	3,7948E-75	0,000909828	2,11418E-82	A
868	7,61253E-52	1,17673E-07	3,38619E-84	A
866	2,50829E-43	4,55607E-07	6,17109E-70	A
864	6,7309E-56	0,006345824	1,48492E-54	NA
862	8,06139E-78	1	6,68018E-49	NA
860	1,52278E-92	0,186902884	3,42666E-44	NA
858	3,84187E-92	0,001800208	7,47137E-35	NA
856	5,80827E-91	0,066472012	1,92089E-40	NA
854	1,37338E-89	0,04887218	5,26609E-73	NA
852	1,95296E-98	3,04011E-07	2,1974E-103	NA
850	1,4311E-130	2,9072E-07	4,0809E-120	NA

TW_Ves: vessels of tension wood, OW_Ves: vessels of opposite wood, NW_Ves: vessels of normal wood.

III. Utilisation d'une méthode manuelle ergonomique d'assignation des pixels et revisite des résultats

1. Développement d'un outil d'assignation manuelle

Comme annoncé précédemment, les approches classiques de segmentation (classification ascendante hiérarchique, k-plus proches voisins, k-moyennes) basées sur les informations spectrales ne se sont pas montrées concluantes. Ainsi, dans le cadre du groupe de travail SHIVA¹ du réseau thématique de recherche DIAMS², j'ai eu l'opportunité de co-encadrer le stage de Laurent Chapillon (Master 2 'Traitement du signal et de l'image', Université de Bourgogne) avec Dr. Julien Mille (LIFAT, INSA Val de Loire) et Dr. Aurélien Chateigner (BioForA, INRAE Val de Loire). L'objectif de ce stage était de comparer l'efficacité de différents algorithmes de segmentation (analyse discriminante linéaire, méthode de machine à support de vecteurs et k-plus proches voisins) pour la segmentation des images hyperspectrales. Ces algorithmes ont été testés sur les données d'absorbance seules, sur les données issues d'un outil d'analyse de texture d'image (ondelette de Gabor) permettant de prendre en considération l'environnement du pixel et sur un jeu de données combinant les données d'absorbance et de texture.

Afin de tester au mieux ces différents algorithmes et de les comparer à la segmentation obtenue dans l'approche développée dans l'article 1, une première étape essentielle était d'obtenir une assignation correcte de l'ensemble des pixels des images étudiées. Pour cela, un outil d'annotation manuel a été développé (appelé *PixelAnnotation* pour la suite du manuscrit). Cet outil, facile d'utilisation, permet une assignation rapide et fiable de l'ensemble des pixels d'une image. J'ai ensuite utilisé cette nouvelle assignation pour calculer l'efficacité de la méthode présentée dans l'article 1 sur un plus grand nombre de pixel (**fig. 18**). En effet, dans cet article, l'efficacité d'assignation a été calculée sur une sélection manuelle de 90 pixels par catégorie ayant été moyenné pour obtenir un MRS. Ce MRS étant utilisé pour l'assignation d'un pixel à une catégorie, il n'est pas étonnant d'obtenir jusqu'à 100% de bonne classification comme c'est le cas pour la catégorie 'couche-G des fibres de bois de tension'. En étudiant l'ensemble des pixels, on s'aperçoit que ce pourcentage est largement surestimé et est fortement dépendant de l'image étudiée. En effet, le taux de vrais positifs pour cette classe varie de 26 à 64% suivant l'image étudié avec une moyenne autour de 48.5% (**fig. 18A**). La majorité des faux

¹ Segmentation of Hyperspectral Images of Vegetal Architecture

² Données, Intelligence Artificielle, Modélisation, Simulation

négatifs, c'est-à-dire des pixels de couche-G assignés à une autre catégorie, ont été assignés à des couches-S de fibres de bois de tension (89 à 98%, **fig. 18B**). Un grand nombre de faux positifs, pixels faussement assignés à la catégorie couche-G, est également à remarquer (**fig. 18C**). Ces faux positifs proviennent majoritairement des classes lumen (13 à 60%) et couches-S des fibres (10 à 76%).

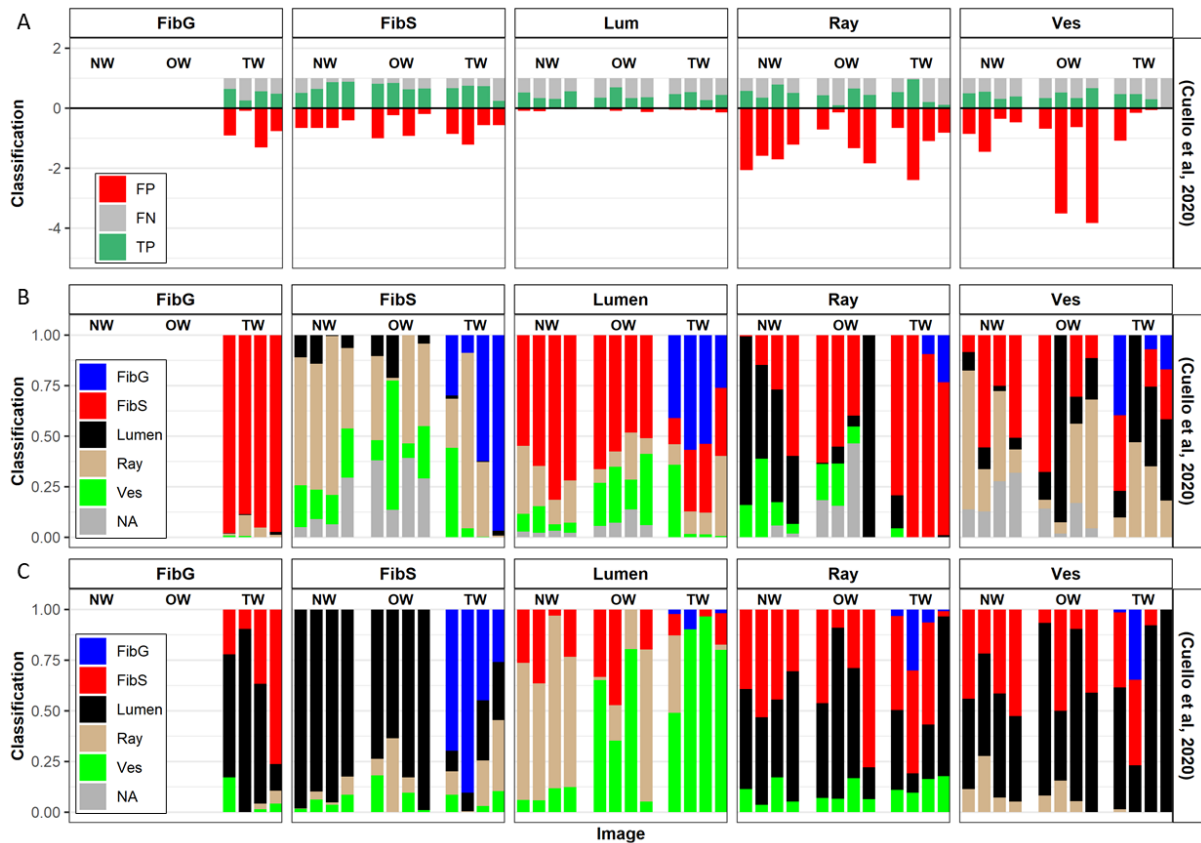


Figure 18 Efficacité d'assignation de la méthode développée dans l'article 1 calculée sur quatre images par type de bois entièrement annotées manuellement à l'aide de l'outil *PixelAnnotation*. (A) Proportion de faux positif (FP) faux négatif (FN) et vrai positif (TP) obtenus sur l'ensemble des pixels (Chapillon, 2020). (B) Répartition des faux négatifs dans les autres catégories de parois. (C) Provenance des faux positifs d'une catégorie de paroi donnée.

Chaque barre représente une image. FibG : couche G des fibres, FibS : couches-S des fibres, Lum : Lumen, Ray : rayons, Ves : vaisseaux, NA : non assigné, NW : bois normal, OW : bois opposé, TW : bois de tension, FP : faux positifs, FN : faux négatifs, TP : vrais positifs.

La même observation peut être faite concernant les couches-S. En effet, les vrais positifs varient ici de 51 à 88% pour le bois normal, de 63 à 84% pour le bois opposé et de 25 à 75% pour le bois de tension (**fig. 18A**). La plupart des faux négatifs sont assignés aux catégories rayons, vaisseaux ou non assignés pour le bois normal (40-79%, 15-24% ; 5-30% respectivement) et le bois opposé (1-54%, 7-64%, 14-39% respectivement) et aux catégories couche-G et rayons pour le bois de tension (9-97%, 1-87% respectivement) (**fig. 18B**). Les faux positifs

proviennent, eux, en grande partie de la catégorie lumen pour le bois normal (82-98%) et le bois opposé (64-99%) et de la catégorie couche-G pour le bois de tension (45-91%) (**fig. 18C**). Pour les vaisseaux, les vrais positifs varient de 31 à 55% pour le bois normal, de 33 à 67% pour le bois opposé et de 0.4 à 48% pour le bois de tension (**fig. 18A**). Les pixels non détectés ont alors majoritairement été assignés aux catégories rayons et couches-S des fibres dans les bois normal (12-69%, 8-55% respectivement) et opposé (4-64%, 0-68% respectivement) et aux catégories lumen, couches-S et couche-G des fibres pour le bois de tension (13-53%, 0-37%, 0-40% respectivement) (**fig. 18B**). Par ailleurs, une proportion non négligeable de faux positifs (allant jusqu'à près de quatre fois le nombre réel de pixel de vaisseaux) peut être observée pour cette catégorie. Ces pixels proviennent majoritairement des catégories lumen (60% en moyenne tous types de bois confondus) et couches-S des fibres (30% en moyenne tous types de bois confondus) (**fig. 18C**).

Enfin, pour les rayons, les vrais positifs varient de 35 à 79% pour le bois normal, de 9 à 66% pour le bois opposé et de 11 à 96% pour le bois de tension (**fig. 18A**). Les pixels non détectés ont alors majoritairement été assignés aux catégories lumen, couches-S des fibres et non assignés dans les bois normal (34-83%, 1-60%, 0-6% respectivement) et opposé (1-100%, 0-63%, 0-46% respectivement) et à la catégorie couches-S des fibres pour le bois de tension (75-100% respectivement) (**fig. 18B**). Une grande proportion de faux positifs (allant jusqu'au double du nombre réel de pixel de rayon) peut être observée pour cette catégorie. Ces pixels proviennent majoritairement des catégories lumen (46% en moyenne tous types de bois confondus) et couches-S des fibres (40% en moyenne tous types de bois confondus) (**fig. 18C**). On observe également une difficulté à l'identification des pixels de lumen. En effet, les vrais positifs varient de 31 à 57% pour le bois normal, de 33 à 69% pour le bois opposé et de 27 à 54% pour le bois de tension (**fig. 18A**). Les pixels manquants ont été identifiés comme appartenant aux quatre autres catégories avec une plus forte proportion dans la catégorie couches-S de fibres (51% en moyenne tous types de bois confondus) (**fig. 18B**). On observe également une très faible proportion de faux négatifs par rapport aux autres catégories avec une majorité de pixels provenant des catégories vaisseaux (45% en moyenne tous types de bois confondus) et rayons (36% en moyenne tous types de bois confondus), déjà identifiés dans l'article comme difficile à classer (Cuello et al., 2020, **fig. 18B**).

Cette première analyse nous a permis de mettre en évidence que l'algorithme présenté dans l'article 1 n'est pas optimal, notamment pour la détection des rayons et des vaisseaux. Cependant, les différents modèles testés durant le stage de Laurent Chapillon ne se sont guère

montrés plus efficaces, que ce soit en intégrant ou non les informations textuelles. Cette faible efficacité des classifieurs classiques pourrait s'expliquer par le faible jeu de donnée d'entraînement (4 images par type de bois). Aussi, un enrichissement de cette base de données sera nécessaire avant toute analyse plus poussée. Par ailleurs, des outils de segmentation plus élaborés basés sur une architecture réseau de neurones comme l'architecture U-Net (Ronneberger et al., 2015), très utilisée dans le domaine biomédical, pourraient également se montrer plus puissants que les outils classiques pour la segmentation d'images hyperspectrales.

2. Identification des différences physico-chimiques des fibres et vaisseaux entre les différents types de bois sur les données annotées manuellement

Comme présenté précédemment, la méthode de segmentation automatique proposée dans l'article n'est pas aussi efficace qu'escomptée. Ainsi, afin de m'assurer de l'authenticité des résultats publiés, je me suis attaché à analyser de nouveaux ces données sur la base des images annotées manuellement. Ici encore, je me suis concentré sur l'analyse des fibres et vaisseaux.

2.1. Fibres

Une analyse en composante principale menée sur les spectres de fibres (couches-S et couche-G) ne montre que peu de différences par rapport aux analyses publiées (**fig. 19A**). En effet, malgré une légère diminution de la proportion de variance expliquée (41% contre 42.5% précédemment), la première composante discrimine toujours plutôt bien les couches-S des fibres de bois opposé et normal de la couche-G des fibres de bois de tension. Les couches-S des fibres de bois de tension semblent, elles, s'être rapprochées de la couche-G des fibres de bois de tension.

L'analyse des spectres moyens pour chaque catégorie (**fig. 19B**) nous mène aux mêmes conclusions que celles présentées dans l'article. On notera notamment l'apparition d'une double bande à 1336 et 1316 cm^{-1} dans la couche-G et les couches-S des fibres de bois de tension qui peut être attribuée à la cellulose ainsi que deux bandes à 1200 et 1052 cm^{-1} , spécifiquement absorbés par la couche G des fibres de bois de tension, ici encore caractéristiques de la cellulose. Les couches-S des fibres de bois de tension présentent à nouveau des caractéristiques des couches-S des fibres de bois normal et opposé. En effet, on remarque notamment une absorbance plus importante dans les couches-S que dans la couche-G des fibres de bois de tension pour les bandes 1236 cm^{-1} et 1736 cm^{-1} , caractéristiques des vibrations de lignines et xylanes, probablement acétylés. Cette augmentation n'atteint pas pour autant le niveau d'absorbance des couches-S des fibres de bois normal et opposé.

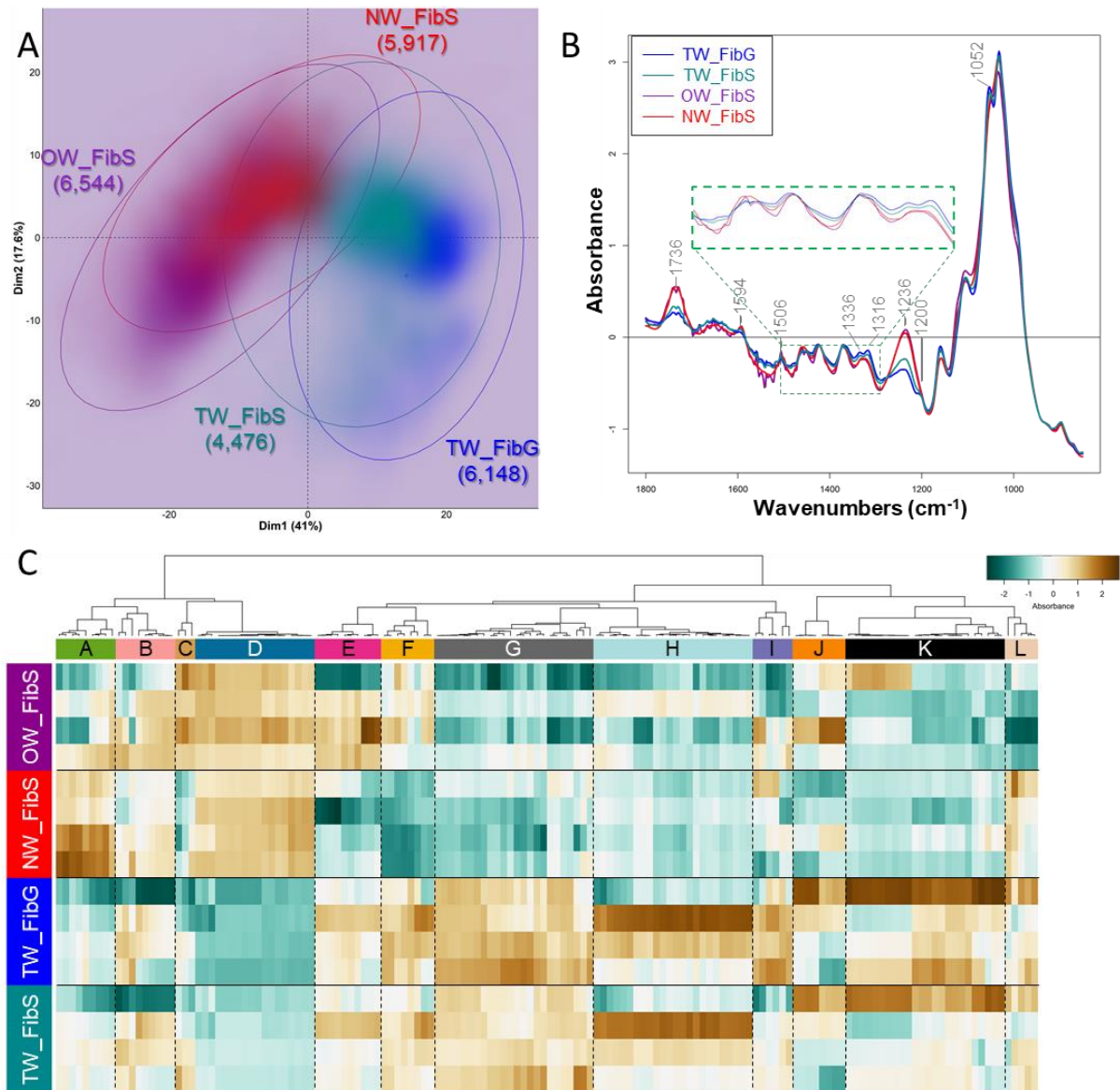


Figure 19 Différences chimiques entre couche-G de fibres de bois de tension et couches-S de fibres de bois de tension, de bois opposé et de bois normal.

(A) Graphique présentant la distribution des spectres sur les deux premières composantes d'une analyse en composantes principales. Bleu : couche-G de fibres de bois de tension, Turquoise : couches-S de fibres de bois de tension, Rouge : couches-S de fibres de bois normal, Violet : couches-S de fibres de bois opposé. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point. (B) Spectre ATR-FTIR moyen. Bleu : couche-G de fibres de bois de tension, Turquoise : couches-S de fibres de bois de tension, Rouge : couches-S de fibres de bois normal, Violet : couches-S de fibres de bois opposé. L'insertion représente un zoom de la région [1,500-1,300] cm⁻¹. (C) Carte de chaleur des nombres d'ondes différenciellement absorbés. OW_FibS : couches-S des fibres de bois opposé, NW_fibS : couches-S des fibres de bois normal, TW_FibG : couche-G des fibres de bois de tension, TW_FibS : couches-S des fibres de bois de tension.

L'analyse des DAWNs nous mène également à des conclusions similaires à celles dressées dans l'article. La carte de chaleur (**fig. 19C**) montre quatre groupes de DAWNs très contrastés entre les couches-S des fibres de bois opposé et normal d'une part et les couches-S et la couche-G des fibres de bois de tension d'autre part. Le groupe D regroupe des DAWNs fortement absorbés dans les couches-S des fibres de bois opposé et normal. Les groupes G, H et K regroupent des DAWNs fortement absorbés dans les couches-S et la couche-G des fibres de bois de tension. Le groupe D contient notamment les bandes 1742-28 et 1244-32 cm^{-1} . Ce cluster se rapproche fortement du groupe B identifiés dans l'article (**fig. 15C**) et est majoritairement associé aux xylanes acétylés et aux lignines. Le groupe G contient notamment les bandes 1552-30, 1518-12 et 1494-74 cm^{-1} , attribué à des protéines, à des lignines et à de la cellulose respectivement. Le groupe H comprend notamment les bandes 1668-64 et 1658-26 cm^{-1} , attribuées aux lignines. Le groupe K regroupe les bandes 1336-16 et 1054-50 cm^{-1} . La première bande est attribuée à la cellulose cristalline et la seconde à la cellulose et, dans une moindre mesure, aux hémicelluloses. On notera sur ce dernier groupe une absorbance légèrement plus faible dans les couches-S des fibres de bois de tension. Les groupes A, E et F semblent distinguer les couches-S des fibres de bois normal des autres catégories. Le groupe A, regroupant des DAWNs plus absorbés dans les couches-S des fibres de bois normal, est représentatif de la bande 1464-52 cm^{-1} attribué aux lignines, aux hémicelluloses et à la cellulose. Les groupes E et F regroupent des DAWNs moins absorbés dans les couches-S des fibres de bois normal. Le premier est représentatif de la bande 914-850 cm^{-1} , associée aux pectines et à la cellulose. Le second est représentatif des bandes 1686-80 et 1654-58 cm^{-1} , cette dernière étant attribuée aux lignines. Enfin, le groupe L regroupe des DAWNs dont l'absorbance est plus faible dans les couches-S des fibres de bois opposé. Ce groupe est majoritairement caractérisé par la bande 1036-30 cm^{-1} , associée aux lignines et à la cellulose.

Cette analyse nous permet d'arriver aux mêmes conclusions que dans l'article 1 à savoir une couche-G de bois de tension riche en cellulose cristalline et en pectines avec des traces de composés phénoliques. De même les couches-S des fibres de bois opposé et normal semblent présenter des différences de composition, tant en polysaccharides qu'en polyphénols. Les couches-S des fibres de bois de tension semblent, ici encore, se rapprocher de la couche G des fibres de bois de tension tout en présentant des caractéristiques des couches-S des fibres de bois opposé et normal.

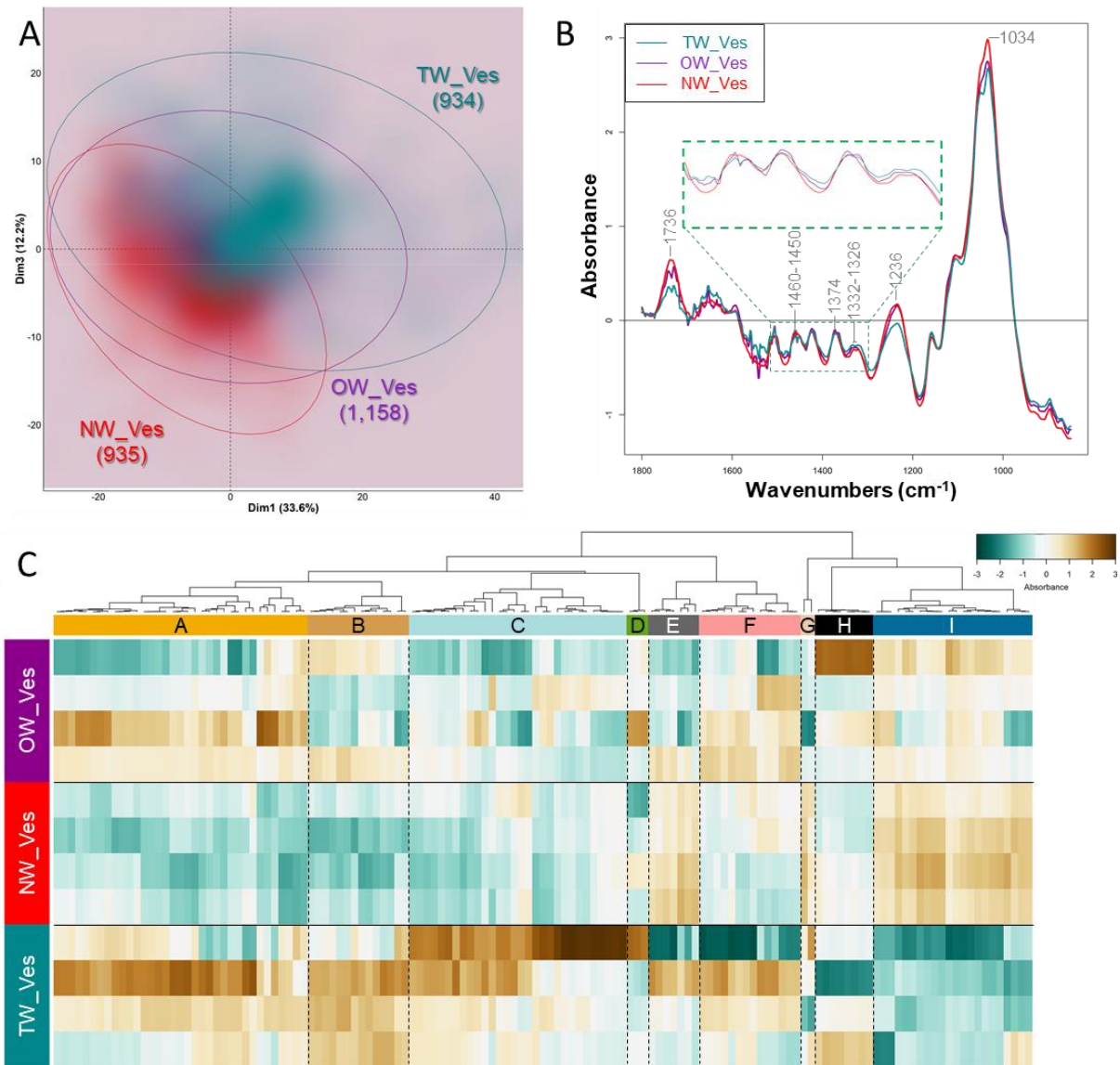


Figure 20 Différences chimiques entre vaisseaux de bois de tension, de bois opposé et de bois normal.

(A) Graphique présentant la distribution des spectres sur les deux premières composantes d'une analyse en composante principale. Turquoise : parois de vaisseaux de bois de tension, Rouge : parois de vaisseaux de bois normal, Violet : parois de vaisseaux de bois opposé. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point. (B) Spectre ATR-FTIR moyen. Turquoise : parois de vaisseaux de bois de tension, Rouge : parois de vaisseaux de bois normal, Violet : parois de vaisseaux de bois opposé. L'insertion représente un zoom de la région [1,500-1,300] cm⁻¹. (C) Carte de chaleur des nombres d'ondes différemment absorbés. OW_Ves : parois de vaisseaux de bois opposé, NW_Ves : parois de vaisseaux de bois normal, TW_Ves : parois de vaisseaux de bois de tension.

2.2. Vaisseaux

L'analyse en composante principale menée sur les spectres des parois de vaisseaux montre, ici une grande différence. En effet, on observe ici une forte augmentation du pourcentage de variance expliquée par la seconde composante (24.7% contre 17.7% précédemment). Cependant, la projection des spectres sur les deux premiers axes de cette

analyse ne permet pas de discriminer les parois de vaisseaux des différents types de bois contrairement à l'analyse précédente (**fig. S1**). La représentation sur les première et troisième composantes, dont l'explication de variance est similaire à celle présentée dans l'article 1, permet de distinguer légèrement les parois de vaisseaux de bois normal de celles de vaisseaux de bois de tension, les parois de vaisseaux de bois opposé étant intermédiaires (**fig. 20A**).

Les spectres moyens des vaisseaux semblent, ici encore, relativement similaires (**fig. 20B**). Malgré une assignation correcte des pixels, les spectres de vaisseaux de bois opposé et de tension présentent un fort bruit entre 1800 et 1450 cm^{-1} . Cependant, tout comme dans l'article présenté, des doubles bandes restent visibles dans ces deux catégories aux bandes 1736, 1460 et 1374 cm^{-1} , là où une seule est visible dans le bois normal. La première est principalement caractérisée par des xylanes acétylés et les deux autres par des lignines, des hémicelluloses et de la cellulose. Alors que la bande 1332-26 cm^{-1} semblait distinguer les différents vaisseaux dans l'article 1, cette bande semble ici moins discriminante. Les bandes 1736, 1236 et 1034 cm^{-1} restent, elles, fortement différemment absorbés par les parois des vaisseaux des différents types de bois.

L'analyse des DAWNs nous mène ici à des conclusions plus tranchées (**fig. 20C**). Les groupes A et B permettent de distinguer les parois des vaisseaux de bois normal des autres par une absorbance plus faible des DAWNs le composant. Le groupe C permet de distinguer les parois des vaisseaux de bois de tension des autres par une absorbance plus forte des DAWNs le composant. Le groupe I permet de distinguer les parois des vaisseaux de bois de tension des autres par une absorbance plus faible. Le groupe A est caractérisé notamment par les bandes 1684-58, 1508-1474, 914-868 et 854-850 cm^{-1} . Les trois premières correspondent à des vibrations typiques de lignines (et de cellulose pour la seconde) alors que la dernière correspond à des pectines. Le groupe B est caractérisé par la bande 1346-18 cm^{-1} , représentative de la cellulose cristalline et des lignines. Le groupe C est caractérisé par les bandes 1680-40 et 1556-30 représentatives des lignines et des protéines respectivement. Le groupe I est caractérisé par les bandes 1744-28, 1722-10, 1234-32 et 1048-32 caractéristiques des hémicelluloses pour la première et la troisième, des lignines pour la seconde et des lignines et de la cellulose pour la dernière.

Cette analyse nous permet de conclure que (i) les parois des vaisseaux de bois de tension seraient riches en pectines, cellulose cristalline et protéines, (ii) les parois de vaisseaux de bois normal seraient pauvres en pectines et cellulose cristallines mais riches en hémicellulose et (iii) les parois des vaisseaux de bois opposé seraient intermédiaires avec une présence de

pectines mais dépourvues de protéines. Des différences de qualité des lignines ont également pu être observées

2.3. Discussion

La composition du bois de tension, et plus particulièrement de la couche-G des fibres de bois de tension, a grandement été étudiée par différentes approches complémentaires à l'imagerie ATR-FTIR proposée ici. Olsson et ses collaborateurs (2011) ont, par exemple, acquis des spectres FTIR sur des couches G isolées. Les spectres obtenus sont relativement similaires à ceux obtenus par imagerie ATR-FTIR : diminution de l'absorbance aux bandes 1736 et 1236 cm^{-1} , apparition de bandes spécifiques à 1336, 1316 et 1200 cm^{-1} . Ces spectres obtenus sont également cohérents avec ceux présents dans l'étude de Gierlinger et ses collaborateurs (2008) à l'exception de la bande 1645 cm^{-1} , spécifiquement absorbés par la molécule d'eau, reflétant une différence dans l'état hydrique des échantillons analysés. La forte teneur en cellulose cristalline observée dans la couche-G des fibres de bois de tension est également en accord avec des observations réalisées par ailleurs et montrant que cette couche est majoritairement composée de cellulose (*e.g.* Norberg et Meier, 1966; Nishikubo et al., 2007). Cette étude a également mis en évidence un DAWN attribué aux protéines. La présence de glycoprotéines dans la couche-G, les AGP, a été montré dans plusieurs études (Lafarguette et al., 2004; Andersson-Gunnerås et al., 2006), validant encore une fois nos résultats. Il est également intéressant de noter que, dans les deux analyses, une bande (1518-12 cm^{-1}) correspondant aux lignines est plus fortement absorbée dans la couche-G de bois de tension que dans les couches-S, tous types de bois confondus. Cela suggère donc la présence de composés phénoliques dans la couche-G comme précédemment rapporté (Joseleau et al., 2004; Gierlinger et Schwanninger, 2006a). Les observations réalisées sur la couche-G des fibres de bois de tension par microspectroscopie ATR-FTIR sont donc en accord avec celles obtenues par d'autres méthodes. Ainsi, cette approche *in situ* permet bien d'étudier la composition des parois à l'échelle de la cellule.

Grâce à la résolution de la microspectroscopie ATR-FTIR, j'ai également pu obtenir un profil infrarouge des couches-S des fibres de bois de tension. Celles-ci présentent des caractéristiques de la couche-G des fibres de bois de tension et des couches-S des fibres de bois normal et opposé. En effet, j'ai identifié des signatures chimiques associées à des protéines et de la cellulose. Cette cellulose semble toutefois moins cristalline que celle présente dans la couche-G de fibres de bois de tension. Des xylanes acétylés semblent également présents dans les couches-S de fibres de bois de tension sans pour autant atteindre les niveaux des couches-S

des fibres de bois opposé et normal. Ces différences de composition entre couches-S de fibres de bois de tension et couches-S de fibres de bois normal et opposé pourraient être expliquées par :

- (i) un développement restreint des couches-S dans les fibres gélatineuses (*i.e.* comportant une couche-G) par rapport aux couches-S de fibres de bois opposé et normal
- (ii) une contamination du signal infrarouge des couches-S des fibres de bois de tension par la couche-G voisine.

À ma connaissance, il n'existe cependant pas d'études de la composition des couches-S de fibres de bois de tension. Des analyses complémentaires permettant de vérifier ces observations seront donc nécessaires. Celles-ci pourront faire appel à d'autres approches d'imagerie chimique comme l'imagerie Raman ou l'immunohistocalisation. Par ailleurs, dans les fibres de bois de tension, la couche-G n'est pas solidaire des couches-S. Ce constat a notamment permis l'étude approfondie de la composition de la couche-G par biochimie humide (*e.g.* Guedes et al., 2017). Il serait donc envisageable de retirer la couche-G du bois de tension et d'analyser à nouveau ces échantillons. Deux éléments seront tout de même à vérifier. Il faudra dans un premier temps s'assurer du retrait complet de la couche-G. Ceci pourrait être réalisé par observation photonique après coloration au bleu Alcian et à la safranine par exemple. La couche-G est extraite par sonication (Norberg et Meier, 1966). Il n'est donc pas improbable que cette extraction influe sur la structure des liaisons chimiques au sein de la paroi. Ainsi, il faudra, dans un second temps, s'assurer de l'absence d'effet de la sonication. Pour cela, il serait envisageable d'acquérir des images ATR-FTIR de bois opposé et/ou normal après sonication.

Enfin, j'ai également été en mesure d'établir des profils IR des parois de vaisseaux des trois types de bois. Alors que les interprétations biologiques étaient complexes dans l'article 1, notamment par la forte variabilité intra-classe (*e.g.* **fig. 17C**, groupes A et C), celle-ci est bien plus simple après annotation manuelle. En effet, la variabilité intra-classe est fortement réduite. Dans l'article 1 comme dans l'analyse *de novo* après annotation manuelle, j'ai pu mettre en évidence une forte quantité de cellulose et une faible quantité de xylanes acétylés dans les parois de vaisseaux de bois de tension. Celles-ci seraient également riches en pectines et protéines d'après l'analyse menée sur les images assignées manuellement. Les parois de vaisseaux de bois normal seraient, elles, riches en xylanes acétylés mais pauvres en pectines et protéines. Enfin, les parois de vaisseaux de bois opposé présenteraient une composition intermédiaire et seraient composés de pectines et de xylanes acétylés. Enfin, les lignines présentes dans les

parois de ces différents types de bois semblent également présenter des différences de qualités. Il n'existe, ici encore, pas, à ma connaissance, d'études de la composition des parois de vaisseaux de ces trois types de bois dans la littérature. Des observations par des approches complémentaires sont donc nécessaires. Par ailleurs, il faut noter que les caractéristiques proposées pour les parois de vaisseaux de bois de tension semblent se rapprocher de la composition de la couche-G et des couches-S des fibres de bois de tension. Il est alors possible que :

- (i) le signal IR des parois de vaisseaux ait été contaminé par le signal des couches-S des fibres de bois de tension adjacentes, les parois de vaisseaux étant plus fines que les parois de fibres.
- (ii) l'inclinaison du tronc provoque des modifications de composition sur toutes les cellules de bois.

Pour éliminer le risque de contamination du signal infra-rouge par les fibres adjacentes, il serait envisageable de cultiver des plants, droits et inclinés, en condition hydrique excédentaire pour augmenter la production de vaisseaux et donc la proportion de paroi vaisseaux-vaisseaux. Si dans ces conditions, ces résultats venaient à se confirmer, une validation par d'autres approches d'imagerie IR, notamment l'imagerie Raman, ou par immunohistochimie permettraient d'appuyer les résultats avancés.

IV. Conclusions

Dans ce premier chapitre, j'ai développé la mise au point d'une méthode d'analyse d'images hyperspectrales obtenues par imagerie ATR-FTIR. La comparaison de la méthode automatique d'assignation des pixels proposé dans l'article 1 à des assignations manuelles a montré la faiblesse de cette approche. Des recherches sont toujours en cours, notamment dans le cadre du groupe de travail SHIVA du RTR DIAMS, afin d'obtenir un algorithme de segmentation automatique des images hyperspectrales permettant une assignation fiable et rapide des pixels aux différentes catégories. En attendant, l'utilisation de l'outil *PixelAnnotation*, permettant une assignation fiable des pixels à chaque catégorie sera préférable et sera donc utilisé pour la suite du manuscrit.

En revanche, la méthode développée permettant d'identifier les différences de composition chimique entre les différentes classes s'est montré relativement efficace puisque celle-ci a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux précédemment observés sur la couche-G des fibres de bois de tension. Bien que les observations réalisées par imagerie ATR-FTIR

nécessitent une validation *a posteriori*, cette méthode permet de caractériser rapidement et finement la composition des parois à l'échelle de la cellule.

CHAPITRE II

Élaboration d'un réseau de gènes associé aux propriétés chimiques des parois à l'échelle cellulaire

Le bois de peuplier est composé de trois types cellulaires majoritaires : les vaisseaux, les fibres et les rayons (Plomion et al., 2001; Déjardin et al., 2010). À chacun de ces types cellulaires est associée une fonction précise dans l’arbre : transport de l’eau des racines au houppier, maintien mécanique et stockage de réserve respectivement. Au-delà de leur différence de fonction, ces types cellulaires se distinguent également par des différences de composition chimique de leur paroi. En effet, par exemple, les parois secondaires des fibres, en plus d’être plus épaisses que celles des vaisseaux et rayons, présentent des lignines plus riches en unités S (Zhou et al., 2011). Par ailleurs, les fibres, vaisseaux et rayons ont tous trois un schéma de développement spécifique (Courtois-Moreau et al., 2009). En effet, les vaisseaux subissent une mort cellulaire programmée très rapidement après leur différenciation alors que les fibres resteront vivantes plus longtemps. Les rayons sont, eux, vivants jusqu’à plusieurs années. La formation du bois se fait donc suivant un gradient temporel qui diffère d’un type cellulaire à l’autre. Le gradient temporel de formation du bois a pu être pris en compte grâce à l’étude de coupes tangentielles cryosectionnées (Sundell et al., 2017). Cette analyse a permis une meilleure compréhension des mécanismes associés à la différenciation des cellules issues du cambium jusqu’au xylème mature. Cependant, elle ne permet pas de considérer chaque type cellulaire indépendamment. Afin de considérer la spécificité de chaque type cellulaire, une méthode consistant à prélever indépendamment chaque type cellulaire, la microdissection par capture laser, a été développée sur le bois de peuplier et d’épicéa (Blokhina et al., 2017). Dans le cadre du projet ANR StressInTrees (2013–2017, coord. B. Clair, <https://anr.fr/Projet-ANR-12-BS09-0004>), des données RNA-Seq sur des fibres et des rayons des trois types de bois étudiées au **chapitre I** (TW, OW, NW) ont été produites. Ce chapitre sera consacré à l’étude des différences transcriptomiques et phénotypiques des fibres et des rayons de bois normal. Les objectifs de ce chapitre sont d’identifier (i) des gènes différentiellement exprimés entre ces deux types cellulaires, (ii) des différences de composition des parois entre fibres et rayons grâce à l’imagerie ATR-FTIR et (iii) des liens entre phénotype pariétal et expression des gènes.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel biologique et préparation des coupes

L'étude a porté sur des tiges principales du clone INRA 717-1B4. Après micro-propagation *in vitro*, neuf plants ont été cultivés droits en serre durant 4 mois, trois en 2016, six en 2017 (**Table 1**). Immédiatement après récolte, les tiges de ces plants ont été découpées en petits camemberts et plongés dans de l'azote liquide. Ces échantillons ont ensuite été stockés à -80°C jusqu'à réalisation des coupes. Deux analyses ont été réalisées sur ces échantillons : une microdissection par capture laser dans le but d'obtenir des données RNA-Seq de fibres et de rayons et une acquisition d'images hyperspectrales en ATR-FTIR afin d'étudier la composition chimique des parois de fibres et de rayons.

Table 1 Récapitulatif des échantillons utilisés dans cette étude.

Plant	Année de culture	Échantillons RNA-Seq	
		Rayons	Fibres
UT_16-A	2016	NW_R1	NW_F1
UT_16-B	2016	NW_R1	NW_F1
UT_16-C	2016	NW_R1	NW_F1
UT_17-A	2017	NW_R2	NW_F2
UT_17-B	2017	NW_R2	NW_F2
UT_17-C	2017	NW_R2	NW_F2
UT_17-D	2017	NW_R3	NW_F3
UT_17-E	2017	NW_R3	NW_F3
UT_17-F	2017	NW_R3	NW_F3

Pour la microdissection par capture laser, huit coupes de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans le plan transversal à l'aide du cryomicrotome 3050S (LEICA, Wetzlar, Allemagne) la veille de la séance de microdissection. Afin de maintenir les échantillons sur le support de coupes, ceux-ci ont été immergés dans du Tissue-Tek O.C.T (SAKURA FINETEK, Alphen-sur-le-Rhin, Pays-Bas) qui a la capacité d'être solide à -80°C et de s'évaporer à température ambiante. Les coupes réalisées sont ensuite déshydratées à l'éthanol 96° sur des lames membranées (Membrane Slides 1.0 PEN, PALM Carl Zeiss GmbH, Munich, Allemagne) et conservées dans une enceinte à hygrométrie contrôlée (22 %HR) et à l'obscurité 20 h au maximum. Une seule coupe est déposée par lame. Toutes ces étapes sont menées en condition exempte de RNase. Le transport des lames entre leur production (INRAE Val de Loire, Site d'Orléans) et leur utilisation (INRAE Versailles-Grignon, Site de Versailles) a été réalisé à l'obscurité dans un double contenant, en présence de gel de silice afin de maintenir une hygrométrie basse et d'éviter la réhydratation des coupes pour limiter la dégradation des ARN.

Pour l’imagerie ATR-FTIR, deux types de coupe par arbre ont été réalisées sur des échantillons de xylème différencié : des coupes transversales pour étudier la composition des fibres et des coupes longitudinales pour étudier la composition des rayons. Ces coupes, de 20 µm d’épaisseur, ont été réalisées à l’aide du même cryomicrotome que les coupes pour la microdissection par capture laser, contrairement aux échantillons analysés dans le [chapitre I](#). Afin d’éviter une éventuelle contamination du signal infrarouge, seule une petite partie de l’échantillon, non coupée, a été immergée dans Tissue-Tek O.C.T pour le fixer au support. Une fois réalisées, les coupes sont séchées dans une goutte d’éthanol absolu entre deux lames de microscopie et stockées dans une salle à 23°C, 45%HR jusqu’à utilisation, comme décrit dans le [chapitre I](#).

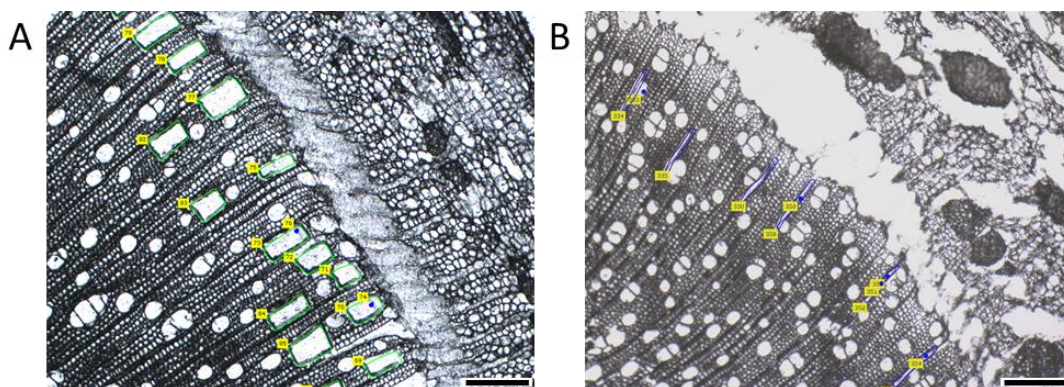


Figure 21 Coupes ayant servi à la microdissection des fibres (A) et des rayons (B) (Crédit photo : Françoise Laurans, INRAE Val de Loire).

Barre d’échelle : 200 µm. (A) Îlots verts : fibres microdisséquées, (B) Îlots bleus : rayons microdisséqués.

2. Microdissection par capture laser et préparation des banques RNA-Seq

Une fois les coupes réalisées, des massifs cellulaires de jeunes fibres ([fig. 21A](#)) et de jeunes rayons ([fig. 21B](#)) ont été découpées à l’aide du micro-dissecteur Axiobserver PALM (ZEISS, Oberkochen, Allemagne). Ces travaux ont été menés en collaboration avec Dr. Bertrand Dubreucq (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAE Versailles-Grignon) sur la plateforme de Cytologie et d’Imagerie du végétal (Observatoire du Végétal, INRAE Versailles-Grignon). Les dissections ont été réalisées à l’objectif 20x pour les fibres, 10x pour les rayons, dans un temps maximal de dix minutes par coupe afin de préserver la qualité des ARN récupérés. Le système utilisé utilise un laser à UV pulsé qui permet de couper des zones avec une grande précision par photoablation du tissu adjacent. Grâce au catapultage de l’échantillon disséqué dans le bouchon du tube collecteur, il n’y a pas besoin de contact entre le tube collecteur et l’échantillon. Cela permet de limiter le risque de contamination pour l’analyse moléculaire. Grâce au système automatisé, il est possible de disséquer plusieurs régions d’intérêt sur un même échantillon qui seront rassemblés dans le même tube collecteur. Ainsi, pour chaque

coupe, ce sont entre 240 000 et 260 000 μm^2 de fibres qui ont été microdisséquées et entre 100 000 et 110 000 μm^2 de rayons.

Une fois les massifs isolés, les ARN de chaque type cellulaire ont été extraits suivant la procédure fabricant du kit ARCTURUS PicoPure (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, USA). Afin de limiter la variabilité biologique entre individus, les ARNs obtenus sur trois arbres sont regroupés (**Table 1**). Ainsi, un échantillon d'ARN de fibres (*resp.* de rayons) est constitué du mélange des ARN des fibres (*resp.* de rayons) obtenus à partir des îlots disséqués sur les quatre coupes de trois arbres. Les ARN ont ensuite été envoyés sur la plateforme GenomeEast (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, Illkirch, France) qui a évalué la qualité et la quantité des ARN sur puce Agilent pico. 0,5 pg d'ARN total a été utilisé pour la préparation des banques avant séquençage. La matrice d'ADN complémentaire a été synthétisée grâce au kit SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA (Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, France), puis pré-amplifiée par 13 ou 14 cycles PCR. Les banques de séquençage sont préparées à partir de 600 pg d'ADNc pré-amplifiés à l'aide du kit Nextera XT DNA Library Prep (Illumina Inc, San Diego, USA), en utilisant 12 cycles d'amplification, la taille et la concentration des banques sont évaluées par électrophorèse capillaire (Fragment Analyzer, Advanced Analytical Technologies, Inc.). Après purification sur billes Agencourt AMPure XP (Beckman-Coulter, Villepinte, France), les banques ont été séquencées sur le HiSeq 4000 (Illumina Inc, San Diego, USA) afin de générer environ 30 millions de séquences paires de 100 nucléotides (nommées reads dans la suite du chapitre) par échantillon d'ARN.

3. Analyse différentielle et enrichissement fonctionnel

Pour quantifier les niveaux d'expression dans chaque type cellulaire, les reads ont été alignés sur le génome de 717-1B4 v.1.1 (Xue et al., 2015) en utilisant STAR (v.2.6.1a_08-27 ; Dobin et al., 2013) avec les paramètres par défaut. Seuls les reads ne s'alignant qu'à un seul locus ont été conservés pour construire la table de comptage, réalisée également à l'aide de STAR. Afin de supprimer le bruit présent dans la table de comptage, j'ai réalisé deux filtres. Tout d'abord, les gènes avec zéro counts dans au moins cinq des six échantillons ont été supprimés. Les gènes pour lesquels moins de dix counts ont été observés dans chaque réplicat ont été supprimés. Les données RNA-Seq ont ensuite été normalisées en utilisant la méthode 'median-of-ratios' implémentée dans le package DESeq2 (v.1.20.0 ; Love et al., 2014). L'expression différentielle entre les rayons et fibres a été estimée en utilisant un modèle linéaire généralisé suivant une distribution binomiale négative avec comme facteur le type cellulaire.

Sont considérés comme différentiellement exprimés (DEG), les gènes présentant une p -valeur ajustée d’après la méthode Benjamini-Hochberg inférieure à 0.05 et logFoldChange (logFC) d’au moins |2|.

L’annotation fonctionnelle des gènes sur le génome de peuplier étant de mauvaise qualité, l’enrichissement fonctionnel a été mené sur la base des termes GO¹ associés aux meilleurs homologues des DEG chez *Arabidopsis thaliana* sur la base des données Phytozome (Goodstein et al., 2012). Plusieurs enrichissements ont été réalisés en comparant l’apparition relative d’un terme GO dans (i) la liste complète des DEG, (ii) les DEG induits dans les fibres et (iii) les DEG induits dans les rayons à leur apparition relative dans les gènes exprimés dans nos échantillons (*i.e.* la table de comptage filtrée). Ils ont été réalisés en utilisant la méthode topGO implémentée dans le package du même nom (v. 2.36.0 ; Alexa et Rahnenfuhrer, 2019). Une p -valeur de 0.001 a été utilisée comme seuil de significativité du terme. Afin de simplifier la lisibilité des résultats, les termes enrichis ont été regroupés à l’aide du package rrvgo (v.1.2.0 ; Sayols, 2020) selon la méthode ‘Wang’ et avec un seuil de 0.7. La p -valeur des termes enrichis dans chaque catégorie ainsi que le logFC des gènes assignés à ce terme ont été visualisés à l’aide de GGplot2 (v.3.3.3 ; Wickham, 2011).

4. Microspectroscopie ATR-FTIR

Les échantillons utilisés dans l’analyse RNA-Seq ont également été étudiés par imagerie ATR-FTIR. Pour chaque coupe, trois images hyperspectrales de (150 x 200) μm^2 ont été réalisées suivant le protocole décrit précédemment (**chapitre I-II**; Cuello et al., 2020). La segmentation des images a été réalisée à l’aide de l’outil *PixelAnnotation* présentée précédemment (**chapitre I-III-1**). Seules les parois fibres-fibres (*resp.* rayons-rayons) ont été conservées. L’identification des DAWNs ainsi que les représentations graphiques ont par la suite été réalisées comme décrit précédemment (**chapitre I-II**; Cuello et al., 2020). L’assignation des DAWNs aux composés a été réalisée à l’aide de la **table S1**.

5. Construction de réseaux de co-expression

Afin d’identifier la corrélation entre le niveau d’expression des DEG et le niveau d’absorbance aux DAWNs, j’ai d’abord calculé un spectre moyen correspondant à chaque échantillon RNA-seq, c’est-à-dire à l’absorbance moyenne des spectres de fibres (*resp.* de rayons) des trois arbres d’un même pool. J’ai ensuite calculé le coefficient de corrélation de Pearson (pcc) entre chaque DEG et chaque DAWN en utilisant la fonction R *cor* implémenté

¹ Gene ontology

dans le package *stat* (v.3.6.3 ; R Core Team, 2020). Un seuil de corrélation absolue à $|0.9|$ a été fixé afin que chaque DAWN soit corrélée à au moins un gène. Les corrélations entre DAWNs et DEG ont été visualisées à l'aide de la fonction *heatmap.2* implémentée dans le package *gplot* (v3.0.1.1 ; Warnes et al., 2020) sans mise à l'échelle. Les dendrogrammes ont été calculés en considérant la corrélation de Pearson comme distance.

Afin de créer un réseau de co-expression, j'ai calculé le pcc entre les profils d'expression des DEG avec un seuil à $|0.994|$. Ce réseau a ensuite été représenté à l'aide de *Cytoscape* (v.3.7.1 ; Shannon, 2003). Chaque nœud correspond à un gène. Chaque lien est tracé en fonction du pcc calculé. Les modules connectés ont été analysés à l'aide de la fonction *NetworkAnalyzer* (v. 2.7 ; Assenov et al., 2008).

II. Résultats

1. Identification des DAWNs

Les données spectrales obtenues après segmentation grâce à *PixelAnnotation* ont, dans un premier temps, été analysées par ACP. Cette analyse, réalisée sur l'intégralité du spectre, permet de distinguer légèrement les spectres des parois de fibres des spectres des parois de rayons sur la première composante expliquant 33% de la variance (**fig. 22A**).

L'analyse des spectres moyens met en évidence quelques différences marquantes entre parois des fibres et des rayons (**fig. 22C**). Ainsi, on observe une augmentation de l'absorbance dans les spectres des parois de rayons aux bandes 1732^1 , $1644-38$, 1504^2 et 1234^3 cm^{-1} , représentant respectivement des vibrations (i) d'hémicelluloses et lignines, (ii) d'un composé dont la signature chimique n'a pas encore été répertoriée à ces nombres d'ondes, (iii) de lignines et (iv) de lignines, d'hémicelluloses et de cellulose. A l'inverse, les bandes 1370^4 , $1326-20^5$ et 1034^6 cm^{-1} sont plus fortement absorbées dans les spectres des parois de fibres. Ces bandes sont représentatives de liaisons associées à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines pour la première, et aux lignines et à la cellulose pour les deux autres. Ainsi, il est possible de mettre

¹ C = O stretch carboxylic acid (Olsson et al, 2011); C=O stretch in unconjugated ketone, carbonyl et in ester groups (Faix, 1991, Olsson et al, 2011)

² aromatic skeletal vibrations; G>S (Faix, 1991, Olsson et al, 2011)

³ OH plane deformation, also COOH (Schwanninger et al, 2004), C–O stretch acetyl, C–O–H deformation et C–O + stretching of phenolics (Séné et al, 1994; Olsson et al, 2011)

⁴ CH bending (Olsson et al, 2011); aliphatic C–H stretch in CH₃, not in OMe; phen. OH (Faix, 1991)

⁵ S ring plus G ring condensed; (i.e. G ring substituted in pos. 5) (Faix, 1991); CH₂ rocking vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁶ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H (Schwanninger et al, 2004); aromatic C–H in-plane deformation, G > S; plus C–O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

en évidence des modifications de composition des parois entre fibres et rayons, notamment en qualité des lignines.

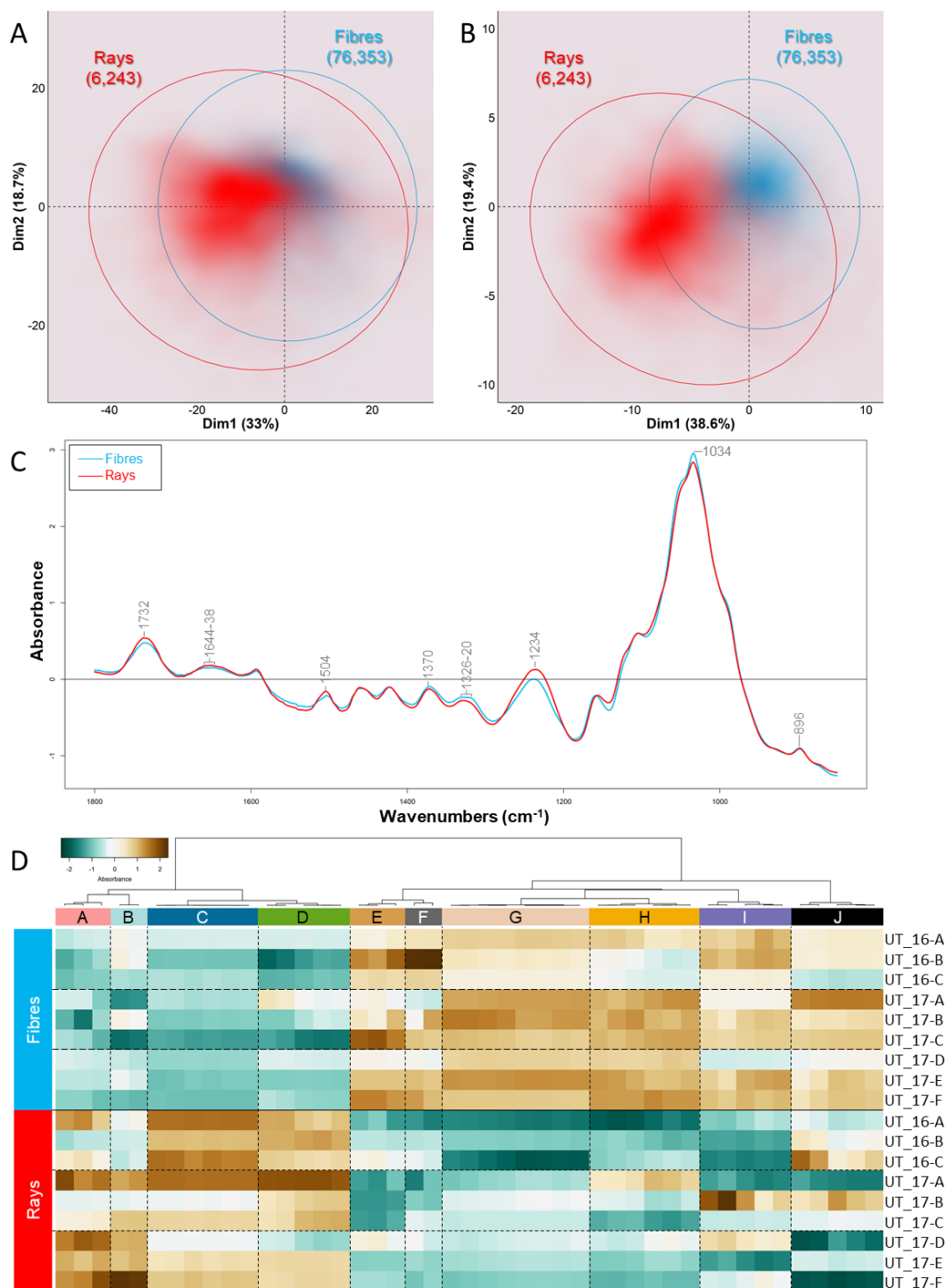


Figure 22 Différences physico-chimiques entre parois de fibres et de rayons de bois normal. (A-B) Graphique présentant la distribution des spectres sur les composantes 1 et 2 d'une analyse en composante principale réalisée sur l'ensemble du spectre (A) ou sur les valeurs d'absorbance aux nombres d'ondes différentiellement absorbés (B). Turquoise : paroi de fibre, Rouge : parois de rayons. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point. (C) Spectre ATR-FTIR moyen. Turquoise : paroi de fibre, Rouge : parois de rayons. (D) Carte de chaleur des absorbances aux nombres d'ondes différentiellement absorbés. Turquoise : paroi de fibre, Rouge : parois de rayons. Chaque ligne représente une image.

Afin d'identifier plus précisément les différences de composition entre parois de fibres et de rayons, j'ai identifié les DAWNs présents aux maxima locaux (fig. 22D). Une ACP réalisée sur ces nombres d'onde permet de distinguer clairement les spectres des parois de fibres des spectres de parois de rayon sur la première composante (fig. 22B). Le pourcentage de variance expliquée par cette composante est par ailleurs augmenté par rapport à l'ACP réalisée sur l'intégralité du spectre, représentant ici 38.6%. L'analyse des DAWNs identifiés aux maxima locaux m'a permis de mettre en évidence dix groupes de nombres d'onde permettant de distinguer les parois de fibres des parois de rayons. Les parois des rayons sont marquées par une absorbance plus forte des groupes A à D alors que les parois des fibres sont marquées par une absorbance plus forte des groupes E à J. Les groupes A et B sont composés des nombres d'ondes correspondant à la bande d'absorbance $1508-00^1 \text{ cm}^{-1}$. Ces groupes sont donc représentatifs des lignines. Le groupe C quant à lui est caractérisé par la bande $1238-32^2 \text{ cm}^{-1}$ étant assignée à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines. La bande d'absorbance $1736-28^3 \text{ cm}^{-1}$, caractéristique des hémicelluloses et des lignines, se trouve dans le groupe D. On retrouve des nombres d'ondes associés à la cellulose dans le groupe G ($1320-16^4 \text{ cm}^{-1}$), I ($992-84^5 \text{ cm}^{-1}$) et J ($1038-30^6 \text{ cm}^{-1}$). Les groupes G et J sont également représentatifs des lignines. La bande d'absorbance $1330-22^7 \text{ cm}^{-1}$ présente dans le groupe G représenterait des lignines riches en unité S et/ou en unité G condensée (Faix, 1991). Dans le groupe J, les unités G contribueraient plus fortement que les unités S à la bande $1,038-30^8 \text{ cm}^{-1}$ (Faix et al, 1991). Le groupe H est composé de la bande $1376-66^9 \text{ cm}^{-1}$ correspondant à des vibrations types de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines. Enfin, les groupes E et F, représentant la bande $1548-40 \text{ cm}^{-1}$, n'ont pas d'assignation répertoriée dans la littérature actuelle et pourraient donc être représentatifs d'arrangements supramoléculaires.

¹ aromatic skeletal vibrations; G>S (Faix, 1991, Olsson et al, 2011)

² OH plane deformation, also COOH (Schwanninger et al, 2004), C–O stretch acetyl, C–O–H deformation et C–O + stretching of phenolics (Séné et al, 1994; Olsson et al, 2011)

³ C = O stretch carboxylic acid (Olsson et al, 2011); C=O stretch in unconjugated ketone, carbonyl et in ester groups (Faix, 1991, Olsson et al, 2011)

⁴ crystalline cellulose / CH₂ rocking vibration (Akerholm et Salmen, 2001; Olsson et al, 2011; Schwanninger et al, 2004)

⁵ C–O valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁶ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H (Schwanninger et al, 2004); aromatic C–H in-plane deformation, G > S; plus C–O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

⁷ S ring plus G ring condensed; (i.e. G ring substituted in pos. 5) (Faix, 1991); CH₂ rocking vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁸ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H (Schwanninger et al, 2004); aromatic C–H in-plane deformation, G > S; plus C–O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

⁹ aliphatic C–H stretch in CH₃, not in OMe; phen. OH (Faix, 1991; Liang et Marchessault, 1959); CH bending (Olsson et al, 2011)

Au vu des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les parois des fibres présentent une signature chimique fortement associée à la cellulose alors que les parois de rayons semblent, elles, plutôt riches en hémicelluloses. Nous avons également pu mettre en évidence une différence de qualité des lignines. En effet, des bandes d'absorbance attribuables aux lignines ont pu être identifiées comme plus absorbées dans les parois des fibres et des rayons. On remarquera tout de même la présence d'une bande d'absorbance correspondant à des lignines riches en unité S et/ou en unité G condensée plus absorbée dans les parois de fibres.

2. Transcriptome des deux types cellulaires

L'alignement des reads sur le génome du clone INRA 717-1B4 a permis, après filtration, la détection de l'expression pour 25 236 gènes. Parmi eux, 1 465 ont été détectés comme étant différentiellement exprimés entre les fibres et les rayons (**fig. 23A**). Ainsi, 1 184 gènes sont préférentiellement exprimés dans les fibres et 281 gènes dans les rayons. Il est intéressant de noter que parmi les gènes préférentiellement exprimés dans l'un ou l'autre type cellulaire, 570 sont exclusivement exprimés dans les fibres et 4 dans les rayons.

Une vue d'ensemble de la fonction des DEG et des processus biologiques sous-jacents peut être obtenue par une étude de leur classification fonctionnelle selon la GO¹ (Ashburner et al., 2000). Dans cette ontologie, les produits des gènes sont classés en fonction des fonctions moléculaires qu'ils accomplissent (MF), des compartiments cellulaires auxquels ils s'appliquent (CC) ou des processus biologiques (BP) auxquels ils participent. J'ai réalisé une étude d'enrichissement des termes GO. Globalement, cela revient à identifier les termes pour lesquels on observe plus de gènes dans notre jeu de données DEG que si le tirage se faisait au hasard dans l'ensemble de la population des 25 236 gènes. Ainsi, ces termes sont représentatifs des BP, CC ou MF majoritairement représentés dans le jeu de données étudié. J'ai alors pu identifier 42 BP, 7 CC et 22 MF enrichis (**fig. 23B-D**). Afin de faciliter l'interprétation de ce grand nombre de termes, j'ai réalisé une analyse de similarité sémantique entre terme. J'ai alors pu obtenir sept groupes de BP, trois groupes de CC et onze groupes de MF. Parmi les sept termes CC enrichis, cinq font partie du groupe 'matrice extracellulaire' (**fig. 23C**). Ainsi, nous pouvons conclure que les transcriptomes étudiés sont enrichis en gènes ciblant la paroi végétale. Le métabolisme secondaire, comprenant le métabolisme des polymères pariétaux, est par ailleurs un groupe de termes BP (**fig. 23B**). Dans ce groupe, on retrouve notamment des termes associés à la biosynthèse des phénylpropanoïdes et de composés contenant des groupements

¹ Gene Ontology

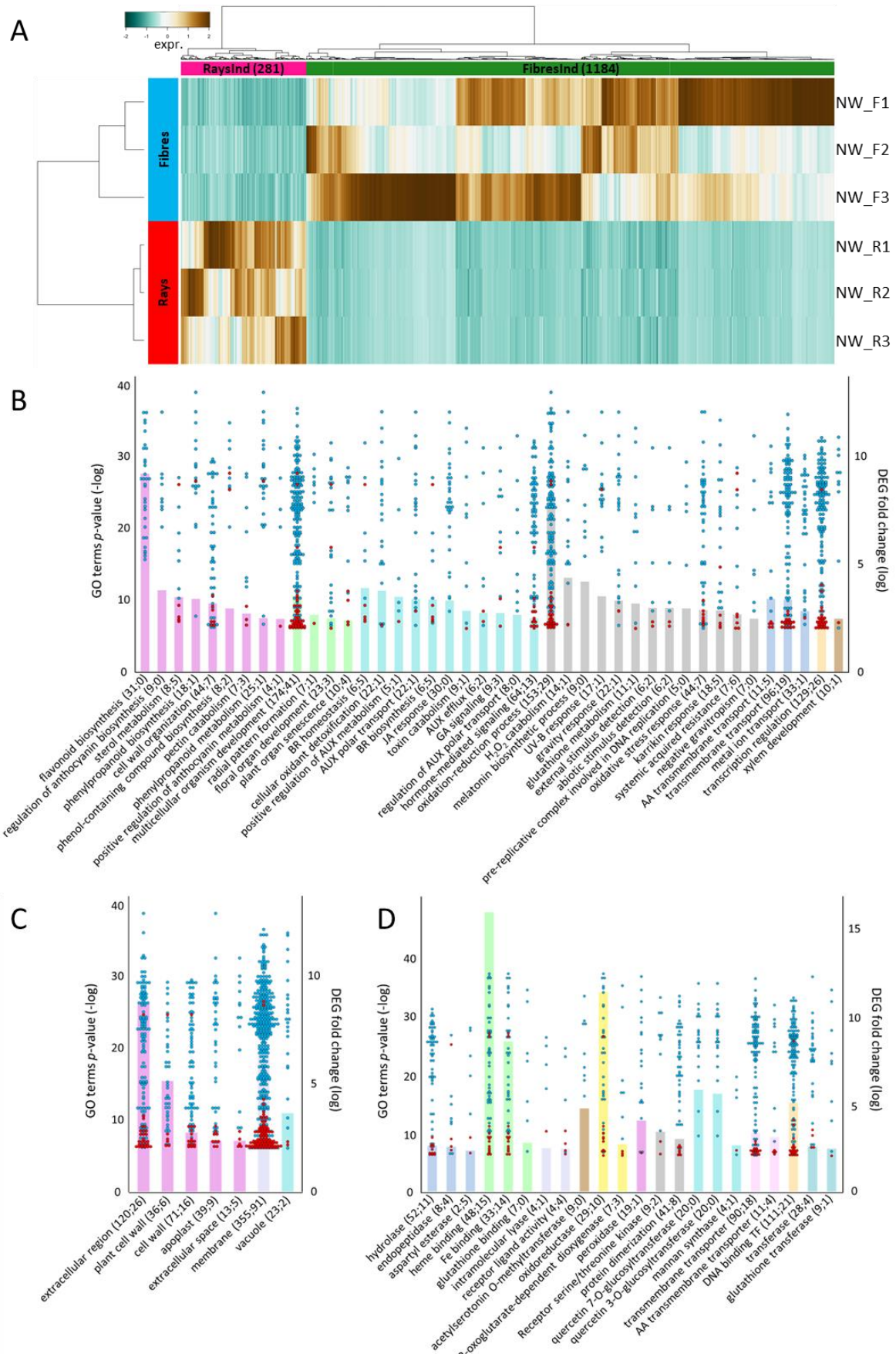
phénols. Il est intéressant de noter que peu de gènes dans ce groupe sont induits dans les rayons. Il en est de même pour le terme associé au développement du xylème où seul un gène est induit dans les rayons contre dix dans les fibres. Parmi eux, on retrouve notamment :

- Trois facteurs de transcription de la famille NAC : Potri.001G325100, homologue de *AtVNI2* (AT5G13180), Potri.003G113000, homologue de *AtVND4* (AT1G12260) et Potri.007G105000, homologue de *AtXND1* (AT5G64530).
- Trois gènes codant pour des peptides signaux de la famille CLE : Potri.001G049700, homologue de *AtCLE44* (AT4G13195) ainsi que Potri.002G241300 et Potri.012G019400, homologues de *AtCLE41* (AT3G24770).

Les transcriptomes des fibres et des rayons sont également enrichis en termes associés à la réponse, au transport, au catabolisme ou au métabolisme de certaines hormones. Le transcriptome des fibres tend à être associé à la régulation du transport de l'auxine et son métabolisme, à la réponse à l'acide jasmonique et à la signalisation par les gibbérellines. À l'inverse, les gènes exprimés préférentiellement dans les rayons se retrouvent majoritairement dans les termes associés à la biosynthèse et l'homéostasie des brassinostéroïdes.

► **Figure 23** Identification des différences transcriptomiques entre fibres et rayons

(A) Carte de chaleur de l'expression des DEG identifiés. Les données d'expression ont été normalisées par gène. Rouge : Rayons, Turquoise : Fibres, Rose : gènes induits dans les rayons, vert : gènes induits dans les fibres. (B-D) Termes GO enrichis sur la base de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés. L'histogramme représente l'inverse du log de la p-valeur d'enrichissement (échelle de gauche). Chaque point représente un gène présent sous ce terme ainsi que son FoldChange (échelle de droite). Bleu : gène induit dans les fibres. Rouge : gène induit dans les rayons. BR : brassinostéroïdes, AUX : auxine, JA : acide jasmonique, GA : gibbérellines, AA : acide aminé. (B) Processus Biologiques enrichis. Rose : métabolisme secondaire, Vert : métabolisme général, Bleu : Hormone, Gris : Réponse aux stimuli, Bleu foncé : Transport, Orange : facteurs de transcription, Marron : développement du xylème. (C) Compartiments cellulaires enrichis. Rose : matrice extracellulaire, Violet : membrane plasmique, Bleu : tonoplaste. (D) Fonctions moléculaires enrichies. Bleu foncé : activité sur l'aspartyl, Vert : activité de liaison, Violine : activité de ligand, Marron : activité d'O-méthyl transférase, Jaune : activité d'oxydoréductase, Rose : activité de peroxydase, Gris : activité de récepteur-ligand, Bleu : activité de synthèse de sucres, Rose pâle : transport, Orange : facteurs de transcription, Bleu gris : activité de transférase.



3. Spécificité du transcriptome des fibres

Parmi les 25 236 gènes présents dans la table de comptage, 665 sont fortement exprimés dans les fibres sans être détectés dans les rayons. Parmi eux, 95 ne sont pas identifiés comme étant différentiellement exprimés par DEseq2, probablement parce que ces gènes sont généralement fortement exprimés dans un réplicat biologique et beaucoup plus faiblement exprimés dans les deux autres réplicats. On y trouve notamment les gènes Potri.001G340400, Potri.001G340300 et Potri.001G340200, homologues du gène AT3G01680 codant pour une protéine impliquée dans la formation du phloème (*AtSEORI*¹, Anstead et al., 2012) ainsi que le gène Potri.013G102600, homologue de AT1G71692 codant pour le facteur de transcription *AtAGL12*². Chez *Arabidopsis thaliana*, ce gène est très fortement exprimé dans les racines et est impliqué dans la modulation entre prolifération et différenciation cellulaire dans le méristème apical racinaire (Tapia-López et al., 2008). En effet, les auteurs suggèrent également que ce gène ait un rôle de médiateur de l'auxine dans la prolifération cellulaire ainsi qu'un rôle dans l'élongation des cellules. Plus récemment, *PtAGL12* a été identifié comme gène potentiellement impliqué dans la régulation de la formation des parois (Weighill et al., 2018; Furches et al., 2019). En effet, *PtAGL12* est coexprimé avec des gènes de biosynthèse des lignines, de la cellulose et des xylanes ainsi qu'un gène associé au dépôt des parois secondaires : *PtMAP70-5* (Furches et al., 2019). L'implication de *AGL12* dans la formation des parois, et plus particulièrement des lignines, est également appuyé par l'augmentation de la quantité de lignines dans des lignées de bouleau le surexprimant (Li et al., 2016a).

L'enrichissement fonctionnel basé uniquement sur les gènes induits dans les fibres a permis d'identifier sept termes GO spécifiquement enrichis (**Table 2**). On y retrouve notamment deux processus biologiques d'intérêt dans notre étude : 'cell fate specification' (GO:0001708) et 'response to auxin' (GO:0009733). Les onze gènes présents dans le terme 'cell fate specification' codent pour des facteurs de transcription. Parmi eux, on notera notamment la présence de deux facteurs de transcription de la famille WRKY et un facteur de réponse à l'auxine (ARF). Ce facteur de transcription est également présent sous le terme 'response to auxin'. Sous ce terme se retrouvent également d'autres gènes de réponse à l'auxine. On y retrouve notamment Potri.003G163600, homologue de *AtARF2* (AT5G62000), Potri.010G119900, homologue de *AtIAA32* (AT2G01200), et Potri.005G233600, homologue de *AtWAT1* (AT1G75500).

¹ SIEVE ELEMENT OCCLUSION-RELATED 1

² AGAMOUS-like 12

Table 2 Termes GO enrichis en utilisant la liste des gènes spécifiquement induits dans les fibres ou dans les rayons

Catégorie	Identifiant	Terme	Liste	p-valeur
BP	GO:0001708	cell fate specification	Fibres	0.0003
BP	GO:0000727	double-strand break repair via break-induced replication	Fibres	0.00055
BP	GO:0007178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	Fibres	0.00056
BP	GO:0042908	xenobiotic transport	Fibres	0.00071
BP	GO:0009733	response to auxin	Fibres	0.00078
MF	GO:0004675	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	Fibres	0.00039
MF	GO:0042910	xenobiotic transmembrane transporter activity	Fibres	0.0006
BP	GO:0071456	cellular response to hypoxia	Rays	0.00012
MF	GO:0016705	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	Rays	0.00018
MF	GO:0004497	monoxygenase activity	Rays	0.00024
MF	GO:0005179	hormone activity	Rays	0.0003
MF	GO:0001653	peptide receptor activity	Rays	0.00037

BP : biological process, MF : molecular function

4. Spécificité du transcriptome des rayons

Parmi les 25,236 gènes présents dans la table de comptage, 19 sont à l’inverse exprimés dans les rayons, sans expression détectée dans les fibres. Parmi eux, 15 ne sont pas identifiés comme étant DEG. Tout comme dans les fibres, les gènes fortement exprimés dans les rayons et non considérés DEG sont fortement détectés dans un réplicat biologique et à des niveaux beaucoup plus faibles dans les deux autres. C’est notamment le cas pour le gène Potri.015G110500, homologue de AT5G51110 impliqué dans la réponse à l’acide abscissique (*AtSDIRIP1*¹, Zhang et al., 2015; Oh et al., 2017).

L’enrichissement fonctionnel basé uniquement sur les gènes induits dans les rayons a permis d’identifier cinq termes GO spécifiquement enrichis (**Table 2**). On y retrouve notamment une fonction moléculaire d’intérêt dans notre étude : ‘peptide receptor activity’ (GO:0001653). Seuls trois gènes sont présents sous cette catégorie : Potri.001G161000 (homologue de AT1G72300), Potri.002G106800 (homologue de AT1G09970) et Potri.019G078400 (homologue de AT1G72180). Tous trois codent pour des protéine kinases. Les protéine kinases sont des enzymes régulant l’activité de protéines par phosphorylation. Les trois protéine kinases identifiées font partie de la famille LRR². Cette famille joue un rôle

¹ SDIR1-INTERACTING PROTEIN

² Leucine-rich receptor-like

important dans le développement végétal et la réponse au stress (Liu et al., 2017). Cependant, le rôle précis de chaque LRR protein kinase n'a pas encore été établi.

5. Vers une intégration des données d'analyse pariétale et de transcriptome

Afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des parois secondaires, j'ai réalisé une analyse de corrélation linéaire entre niveau d'expression de gènes et niveau d'absorbance aux DAWNs. Pour chaque gène, ces corrélations ont ensuite été moyennées en regroupant les DAWNs par composé pariétal d'après leur assignation dans la littérature (cf II-1). Pour la cellulose, par exemple, j'ai moyenné les pcc obtenus pour chaque gène avec les bandes 1320-16 et 992-84 cm^{-1} pour obtenir un score de corrélation moyen de l'expression de ce gène à la cellulose. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence 445 gènes induits dans les fibres associés à au moins un composé, soit environ 38% des DEG induits dans les fibres (fig. 24D) et 257 gènes induits dans les rayons, soit environ 91.5% des DEG induits dans les rayons (fig. 24A). Les gènes induits dans les fibres sont majoritairement positivement corrélés à la cellulose et aux lignines, dont les bandes étaient plus fortement absorbées dans les fibres. Les gènes induits dans les rayons sont, eux, majoritairement corrélés aux lignines, dont les bandes étaient plus fortement absorbées dans les rayons, et aux hémicelluloses (fig. 24B,E). Parmi les gènes induits dans les fibres, la majorité n'est associée qu'à un seul composé. À l'inverse, parmi les gènes induits dans les rayons, une grande partie des DEG est associée à au moins deux composés (fig. 24A,D). Ainsi, afin de faciliter la représentation et la lisibilité du réseau de co-expression (cf II-6), j'ai sélectionné les corrélations maximales de chaque DEG en excluant les catégories de DAWNs NA (*i.e.* sans assignation connue dans la littérature), NS_C (*i.e.* assignés à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines contenus dans le groupe C de la fig. 22D) et NS_H (*i.e.* assignés à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines contenus dans le groupe H de la fig. 22D) (fig. 24C,F). En effet, ces trois catégories, bien que contenant une information importante sur la composition physico-chimique des parois, ne permettent pas d'identifier clairement la nature des composés. Il est intéressant de noter que cinq gènes ont des niveaux de corrélation équivalents pour deux composés. Ainsi, les gènes Potri.003G206000 (homologue d'AT5G12950), induit dans les fibres, et Potri.004G045300 (homologue d'AT1G28260), induit dans les rayons sont corrélés, positivement pour le premier, négativement pour le second mais de façon équivalente, à la cellulose et aux lignines. Le gène Potri.018G111400 (homologue d'AT4G31020), induit dans les fibres, est corrélé positivement à la cellulose et négativement aux lignines tandis que les gènes Potri.002G054400 (homologue d'AT5G19160, *AtTBL11*) et Potri.001G422900, induits dans les rayons, sont corrélés

négativement à la cellulose et positivement aux lignines. Bien que présentant des homologies avec des gènes d’*Arabidopsis thaliana*, la fonction de ces gènes reste encore à découvrir. Ainsi, il est difficile de conclure sur leur implication dans la biosynthèse des composés pariétaux sans des analyses plus poussées.

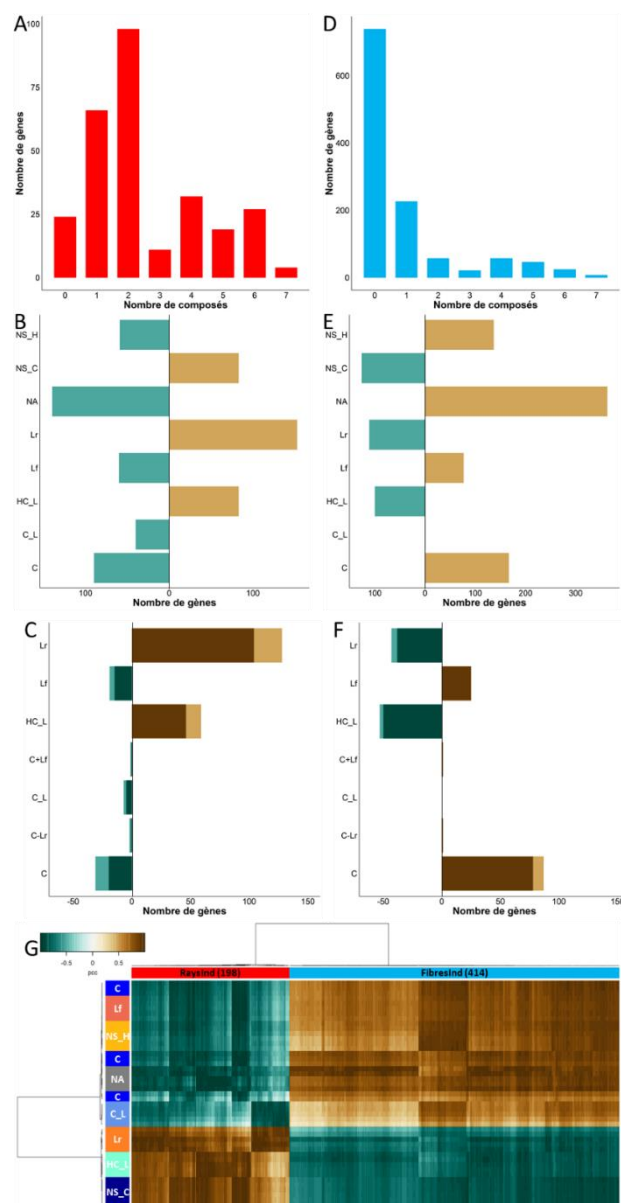


Figure 24 Identification de gènes différentiellement exprimés associés aux nombres d'onde différentiellement absorbés entre parois de rayons (A-C) et parois de fibres (D-F).

(A,D) Nombre de gènes corrélés ou non à un composé pariétal. (B, E) Nombre de gènes corrélés à chaque groupe de DAWNs. (C,F) Nombre de gènes corrélés à chaque groupe de DAWNs en ne considérant que la corrélation la plus forte. (G) Carte de chaleur des corrélations entre DEG intégrés au réseau et DAWNs.

C : cellulose, C_L : cellulose et lignines, HC_L : hémicelluloses et lignines, Lr : lignines présentes dans les rayons, Lf : lignines présentes dans les fibres, NS_C : assignation à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines, groupe C de la figure 2D, NS_H : assignation à la cellulose, aux hémicelluloses et aux lignines, groupe H de la figure 2D, NA : sans assignation connue, C-Lr : corrélation positive à la cellulose et négatives aux lignines fortement absorbées dans les rayons, C+Lf : corrélation positive à la cellulose et négatives aux lignines fortement absorbées dans les fibres, C+Lr : corrélation positive à la cellulose et négatives aux lignines fortement absorbées dans les fibres, RayInd : DEG induits dans les rayons, FibInd : DEG induits dans les fibres. (B,C,E,F) Vert : corrélation négative, marron : corrélation positive, (C,F) Vert et marron foncé : gènes intégrés au réseau de co-expression.

6. Vers un réseau de co-expression associé à la composition des parois secondaires

Pour mieux comprendre la co-régulation potentielle entre les DEG, j'ai réalisé une analyse de co-expression. Le réseau de co-expression intègre 1 351 DEG, soit plus de 90% des DEG identifiés, pour 14 618 pcc dont la valeur absolue est supérieure à 0.994 (**fig. S2**). Ce seuil correspond à un bon compromis entre haute valeur de corrélation et nombre de gènes intégrés au réseau. Ces gènes sont regroupés en 44 modules connectés dont un regroupe la majorité des DEG intégrés : le module M1 avec 1 183 DEG soit près de 88%. Sur ces réseaux, j'ai représenté, d'une part, les composants pariétaux corrélés au DEG (**fig. S2A**) et, d'autre part, les groupes de processus fonctionnels enrichis ayant trait à la biosynthèse des parois, la formation du xylème, la réponse aux hormones ou des facteurs de transcription (**fig. S2B**). Parmi les DEG intégrés au réseau de co-expression, 414 gènes induits dans les fibres et 198 gènes induits dans les rayons sont corrélés à un moins un composé pariétal (**fig. 24G**). Ces gènes intégrés sont représentatifs des corrélations observées sur l'ensemble des DEG identifiés (**fig. 24C,F**).

Afin d'identifier des processus biologiques clairs, mon attention s'est portée particulièrement sur les modules M1, M2 et M3, le premier regroupant la plus grande partie du réseau, les deux autres étant composés de gènes associés majoritairement aux lignines des rayons et à la cellulose (**fig. 25A**).

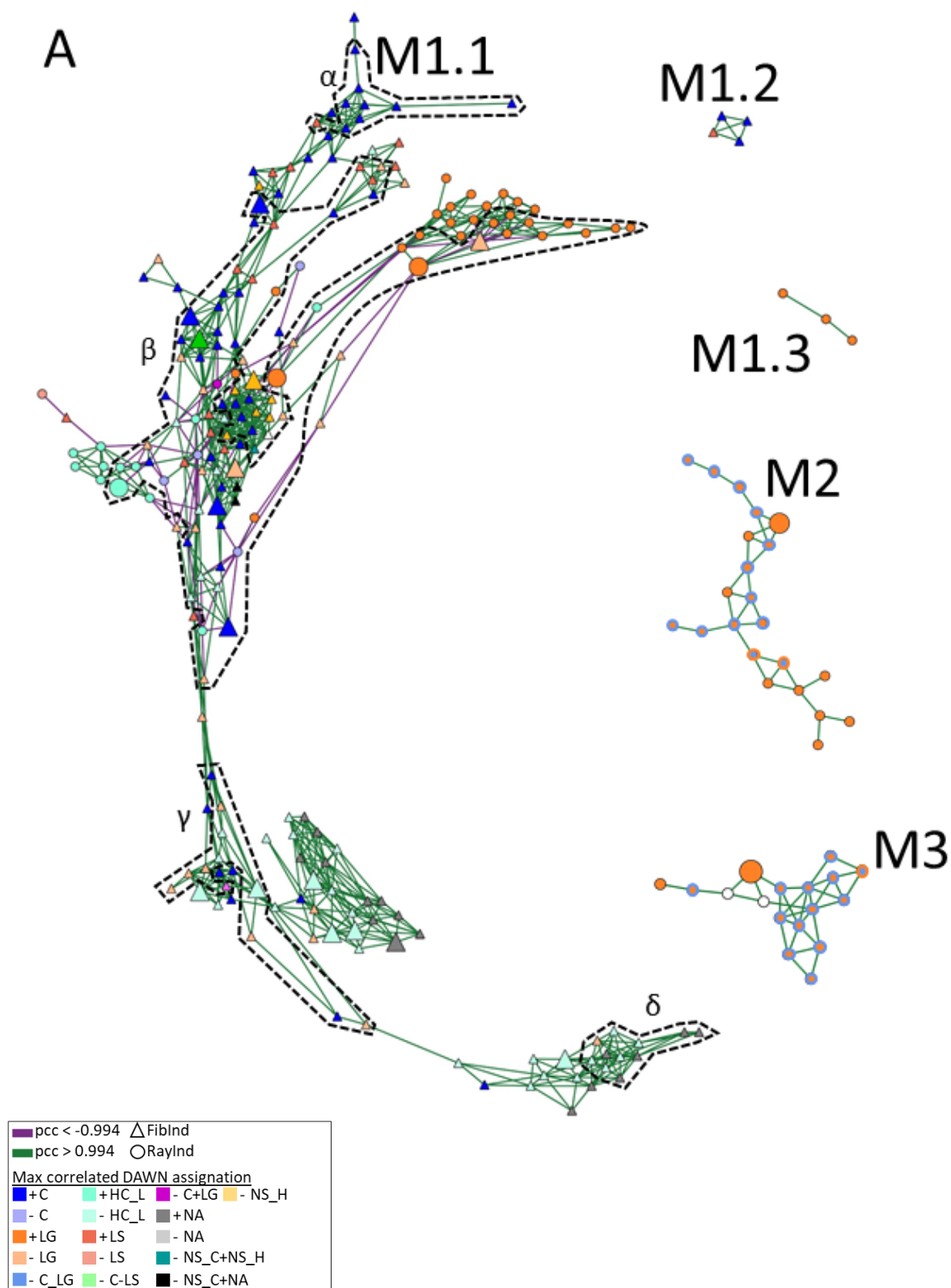
6.1. Le module M1, un module complexe

Le module M1 est un sous-réseau complexe comportant près de 81% des gènes différentiellement exprimés (**fig. S2**). Parmi eux, on retrouve 1 096 gènes induits dans les fibres et 87 induits dans les rayons. Dans ce module, on observe un grand nombre de gène non corrélés à un DAWN (700/1183), corrélés avec des DAWNs appartenant aux groupes NA, NS_C ou NS_H (213/1183), ou encore sans appartenance à des groupes de processus biologiques enrichis (899/1183) (**fig. S2**). Afin de tirer l'essentiel de l'information biologique accessible dans ce réseau, j'ai alors sélectionné les gènes qui (i) étaient corrélés à au moins un DAWN associé à un composé pariétal et (ii) étaient classés dans un terme GO enrichi. Cela m'a alors permis de sélectionner 52 gènes dans ce réseau. En sélectionnant leurs premiers voisins (*i.e.* les gènes dont l'expression est directement corrélée à ceux-ci), j'ai alors pu identifier trois sous-modules connectés : M1.1, M1.2 et M1.3 (**fig. 25**).

6.1.1. Le sous-module M1.1

Parmi les 50 gènes conduisant à la formation du module M1.1 se trouvent 42 gènes induits dans les fibres et huit induits dans les rayons. Parmi les gènes induits dans les fibres, 19

sont positivement corrélés à la cellulose, trois aux lignines présentes dans les fibres, huit négativement corrélés aux lignines présentes dans les rayons et 12 aux hémicelluloses et aux lignines. Parmi les gènes induits dans les rayons, deux sont positivement corrélés aux hémicelluloses et aux lignines, cinq aux lignines présentes dans les rayons et un négativement corrélé aux lignines présentes dans les fibres. Ces 50 gènes peuvent être regroupés en onze grandes familles de gènes suivant leur fonction. Ainsi, la moitié d'entre eux codent pour des facteurs de transcription appartenant à plusieurs familles dont les familles MYB, NAC, bHLH, et WRKY. Parmi eux, on notera notamment la présence des gènes Potri.008G140400, Potri.015G033100, Potri.010G101200 (homologues d'*AtIDD15*), Potri.006G114200 (homologue d'*AtSGRI*), Potri.015G020000 (homologue d'*AtANAC100*), Potri.018G068700 (homologue d'*AtANAC075*), Potri.001G325100 (homologue d'*AtVNI2*), Potri.005G233600 (homologue d'*AtWATI*) et Potri.007G105000 (homologue d'*AtXND1*), tous induits dans les fibres, ainsi que les gènes Potri.002G04060 (homologue d'*AtCPUORF7*) et Potri.002G138900 (homologue d'*AtWRKY12*), tous deux induits dans les rayons. Trois facteurs de transcription sont également directement influencés par l'acide abscissique (Potri.015G091900, homologue d'*AtAITR5*) ou l'auxine (Potri.003G163600, homologue d'*AtARF2* et Potri.010G119900, homologue d'*AtIAA32*). Six autres gènes sont également impliqués dans la réponse aux hormones ou la transduction du signal. Parmi eux, deux répondent aux cytokinines. L'auxine, les brassinostéroïdes et les acides abscissique et salicylique ciblent, eux, un gène chacun. Quatre protéine kinases sont également présentes parmi ces 50 gènes. On notera notamment la présence de Potri.005G241500 (homologue d'*AtCLV1*) et Potri.001G049700 (homologue d'*AtCLE44*), faisant partie du système CLE-WOX. Parmi les 13 autres gènes, on retrouve six gènes associés au métabolisme des polysaccharides pariétaux, trois gènes codant pour des cytochrome P450, deux gènes codant pour des méthyltransférases, un gène impliqué dans la glycosylation des flavonoïdes, une pectine méthylestérase, une glutathione S-transférase et un gène impliqué dans la méthylation des histones.



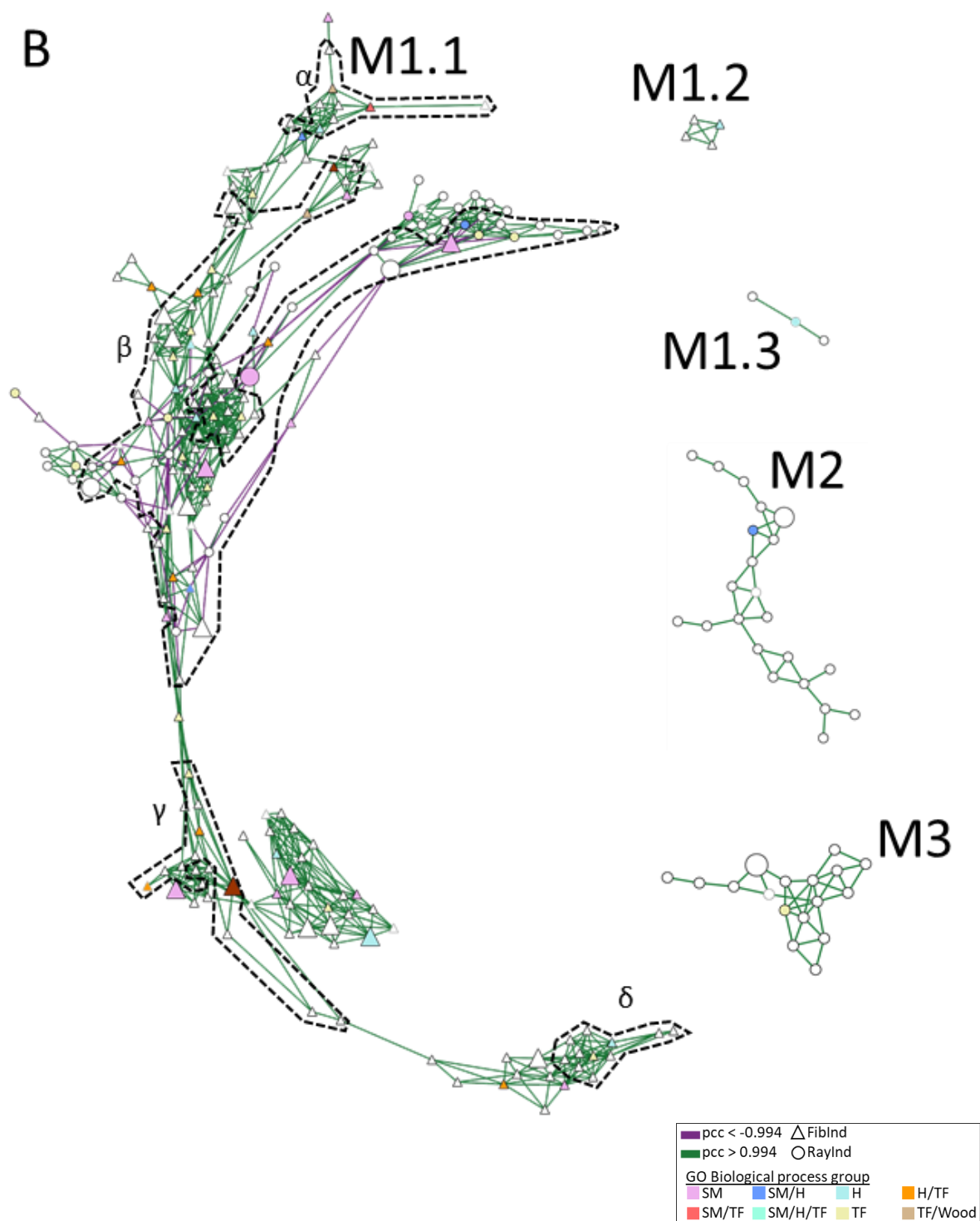


Figure 25 Réseau de co-expression des DEG identifiés entre fibres et rayons.

pcc: coefficient de corrélation de Pearson, *FibInd*: DEG induit dans les fibres, *RayInd*: DEG induit dans les rayons. Les gros nœuds représentent les gènes appartenant au groupe de CC ‘matrice extracellulaire’. Les pointillés représentent les sous-modules M1.1a-δ.

(A) Les nœuds sont colorés suivant le groupe de DAWNs dont la corrélation est maximale (hors NA, NS_C et NS_H). + : corrélation positive, - : corrélation négative.

C : cellulose, C_L : cellulose et lignines, HC_L : hémicelluloses et lignines, Lr : lignines présentes dans les rayons, Lf : lignines présentes dans les fibres, Bordure bleue : corrélation négative aux DAWNs associés à la cellulose, Bordure orange : corrélation positive aux DAWNs associés aux lignines fortement absorbées dans les rayons.

(B) Les nœuds sont colorés suivant le(s) groupe(s) de BP enrichi(s) dont ils font partie. SM : métabolisme secondaire, TF : facteurs de transcription, H : hormones (métabolisme, réponse, transport, homéostasie, synthèse), Wood : formation du xylème

Parmi les seize gènes mis en évidence dans le sous-modules M1.1, certains sont directement coexprimés entre eux. C'est le cas des homologues des gènes *AtVNI2* et *AtANAC075*, de l'homologue d'*AtIAA32* coexprimé avec les homologues des gènes *AtANAC100* et *AtATR5* ainsi que d'un des homologues du gène *AtIDD15* (Potri.010G101200) et de l'homologue du gène *AtWAT1*. En intégrant les premiers voisins (i.e. les gènes directement coexprimés avec ces seize gènes), on observe la création de quatre sous-groupes (M1.1 α - δ). Ainsi, *AtVNI2* et *AtANAC075* sont à l'origine d'un sous-groupe rassemblant sept gènes supplémentaires (M1.1 α). Ces gènes, tous corrélés positivement à la cellulose à l'exception d'un gène majoritairement corrélé aux lignines présentes dans les fibres, codent pour deux protéine phosphatases (Potri.004G066200, homologue d'*AtPP2C6* et Potri.001G142500, homologue d'*AtPYRI*), une protéine kinase (Potri.005G188700, homologue d'*AtRGI2*), une protéine associée aux microtubules (Potri.015G131400, homologue d'*AtMAP65-3*), une purine perméase (Potri.001G352100, homologue d'*AtPUP10*), une aspartic protéase (Potri.007G063800) et un gène de fonction inconnue (Potri.003G112200) mais dont l'homologue chez *Arabidopsis thaliana* (AT4G22580) serait impliqué dans la glycosylation des protéines.

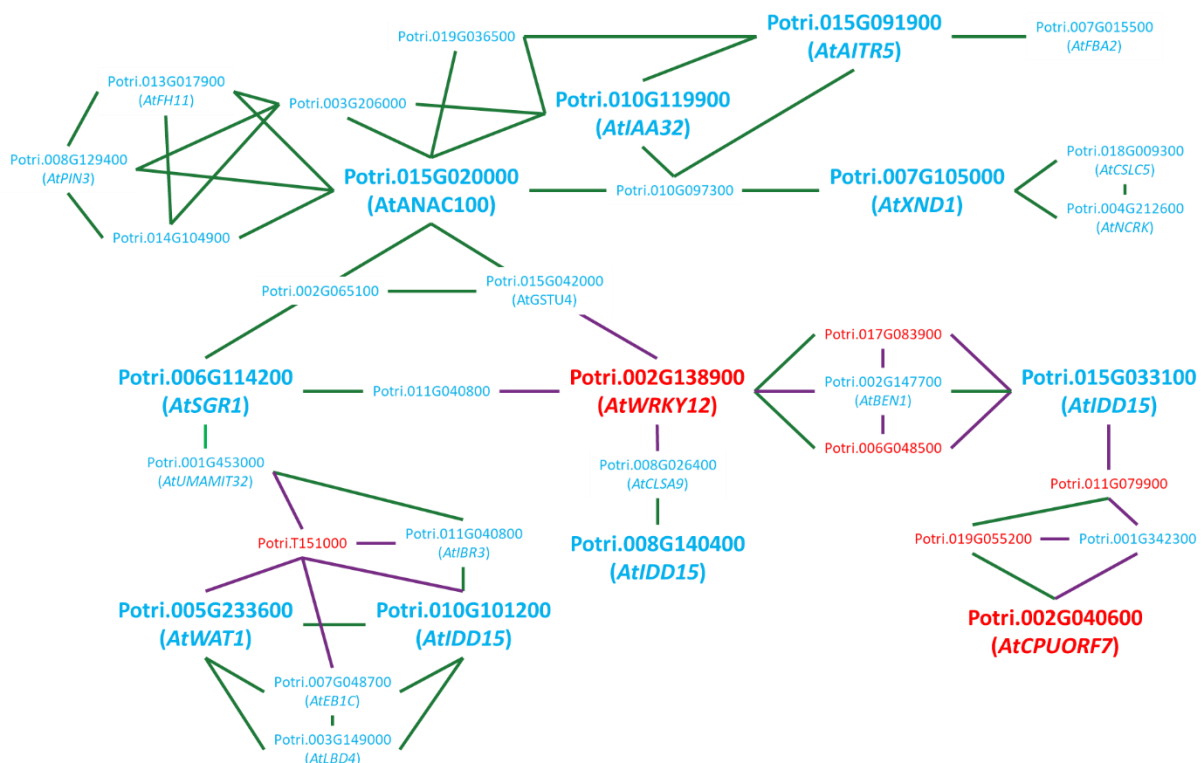


Figure 26 Simplification du sous-groupe de gènes M1.1 β .

Bleu : gènes induits dans les fibres, Rouge : gènes induits dans les rayons, Violet : corrélation négative, Vert : corrélation positive. Les noms entre parenthèses correspondent au gène homologue chez *Arabidopsis thaliana*.

Le sous-groupe M1.1 β regroupe onze des seize gènes mis en évidence dans le sous-modules M1.1 (fig. 26). En intégrant les premiers voisins de ces onze gènes, le sous-groupe M1.1 β intègre 66 autres gènes dont 24 sont induits dans les rayons. Il est intéressant de noter qu'aucun gène n'est coexprimé avec l'ensemble des trois homologues d'*AtIDD15* pourtant présents dans ce groupe. Par ailleurs, ces trois gènes sont corrélés avec des DAWNs correspondant à différents composés pariétaux. En effet, bien qu'ils soient tous corrélés, dans le même sens, aux DAWNs NA et NS_C, les corrélations à la cellulose, aux hémicelluloses (+ lignines) et aux lignines présentes dans les rayons ne sont, pour chacun de ces composés pariétaux, partagées que par deux des homologues d'*AtIDD15*. Ainsi, il est fort probable que le gène *AtIDD15* ait subi une forte spécialisation chez le peuplier conduisant à ces trois homologues. Deux groupes de gènes très connectés sont créés à partir des homologues d'*AtWAT1* et d'un des homologues d'*AtIDD15* (Porti.010G101200) d'une part et les homologues d'*AtXND1*, *AtANAC100*, *AtIAA32* et *AtAIR5* d'autre part. En effet, en plus d'être directement coexprimés entre eux, *AtWAT1* et Porti.010G101200 partagent cinq de leurs sept gènes coexprimés. Parmi eux, on retrouve notamment une protéine kinase (Potri.T151000), une protéine de liaison aux microtubules (*AtEB1C*) et l'homologue d'*AtLBD4* (Potri.003G149000). Dans le second groupe, l'homologue d'*AtIAA32* est coexprimé avec les homologues d'*AtANAC100* et *AtAIR5*. Il est intéressant de noter que tous les gènes coexprimés avec *AtIAA32* le sont également avec *AtANAC100* ou *AtAIR5*. Seuls deux gènes sont coexprimés avec les trois gènes sus-cités : Potri.019G036500, dont l'homologue chez *Arabidopsis thaliana* (AT4G38040) serait impliqué dans la glycosylation des protéines et Potri.010G097300, qui est un gène orphelin (*i.e.* sans annotation fonctionnelle ni homologue identifié). On notera également que ce dernier est également coexprimé avec l'homologue d'*AtXND1*. Parmi les gènes présents dans ce groupe, on notera notamment la présence :

- d'une glycosylase : Potri.003G206000 (coexprimé avec *AtANAC100* et *AtIAA32*) ;
- d'un gène codant pour des protéines PADRE : Potri.014G104900 (coexprimé avec *AtANAC100*) ;
- d'un gène de liaison aux filaments d'actines : Potri.013G017900 (homologue d'*AtFH11* coexprimé avec *AtANAC100*) ;
- de gènes de réponse aux hormones : Potri.008G129400 (homologue d'*AtPIN3* coexprimé avec *AtANAC100*) et Potri.007G015500 (homologue d'*AtFBA2*, coexprimé avec *AtAIR5*) ;

- d'un gène impliqué dans la synthèse des xyloglucanes : Potri.018G009300 (homologue d'*AtCSLC5*, coexprimé avec *AtXND1*) ;
- d'une protéine kinase : Potri.004G212600 (homologue d'*AtNCRK* coexprimé avec *AtXND1*).

Par ailleurs, trois gènes semblent centraux dans le sous-groupe M1.1 β : *AtSGR1* (Potri.006G114200), *AtIDD15* (Potri.015G033100) et *AtWRKY12* (Potri.002G138900). En effet, grâce aux gènes avec lesquels ils sont coexprimés, il est possible de réunir les onze gènes à l'origine de ce sous-réseau. *AtSGR1*, coexprimé avec Potri.001G453000 (homologue d'*AtUMAMIT32*), lui-même coexprimé avec Potri.T151000 et Potri.T030600 (homologue d'*AtIBR3*) permet de rejoindre le groupe créé par *AtWAT1* et *AtIDD15* (Potri.010G101200). Il permet également, grâce à une protéine kinase (Potri.002G065100) de retrouver *AtANAC100* et donc le groupe dont il est membre. C'est également le cas pour *AtWRKY12* via une glutathione S-transferase (Potri.015G042000, homologue d'*AtGSTU4*). On note également que *AtSGR1* et *AtWRKY12* sont tous deux coexprimés avec Potri.011G040800 dont l'homologue code pour une hydrolase triphosphate. *AtWRKY12* est également coexprimé avec Potri.008G026400, homologue d'*AtCSLA9*, coexprimé avec un des homologues *AtIDD15* (Potri.008G140400). Le dernier homologue d'*AtIDD15*, Potri.015G033100, est également coexprimé avec trois gènes coexprimés avec *AtWRKY12* : Potri.017G083900 (dont l'homologue chez *Arabidopsis thaliana* code pour une pentatricopeptide repeat protein), Potri.006G048500 (dont l'homologue chez *Arabidopsis thaliana* code pour une glycosyltransférase de la famille 61) et Potri.002G147700 (dont l'homologue chez *Arabidopsis thaliana* code pour *AtBEN1*, gène impliqué dans la régulation du métabolisme des brassinostéroïdes). Enfin, cet homologue d'*AtIDD15* (Potri.015G033100) permet de rejoindre un groupe de gènes corrélés aux lignines présentes dans les rayons et construit par l'incorporation des gènes coexprimé avec *AtCPUORF7* (Potri.002G040600). En effet, deux gènes coexprimés avec *AtCPUORF7* (Potri.019G055200, homologue d'*AtCRT3*, et Potri.001G342300 codant pour une méthyltransférase dépendante de la S-adenosyl-L-méthionine) sont coexprimés avec Potri.011G079900 (gène codant pour une protéine transmembranaire), coexprimé avec *AtIDD15*.

Le sous-groupe M1.1 γ comporte douze gènes (fig. 25). Il permet, grâce à un nœud composé de quatre gènes coexprimés entre eux, de mettre en relation les gènes *AtCLE44* et *AtARF2*. En effet, deux gènes (Potri.018G135800, homologue d'*AtLRRAC1*, et Potri.018G111400, codant pour une alpha/beta hydrolase) sont coexprimés avec *AtCLE44* ainsi

que deux autres gènes (Potri.T058100, homologue d’*AtCBSX6*, et Potri.002G189400, codant pour une transducine), eux coexprimés avec *AtARF2*.

Enfin, le sous-groupe M1.1δ est établi sur la base du gènes *AtCLVI*. Ce gène est coexprimé avec dix gènes (fig. 25). Ce sous-groupe est composé de gènes induits dans les fibres et corrélés négativement aux lignines et aux hémicelluloses (6/11) ou positivement au groupe des DAWNs NA (5/11). Il est intéressant de noter que le seul gène corrélé négativement aux lignines présentes dans les rayons (Potri.014G102700) code pour un gène de la famille de cytochrome P450. Parmi les autres gènes, on retrouve notamment un régulateur de l’activité des protéine kinases, une protéine kinase (en plus d’*AtCLVI*) et une galactosyltransférase (*AtGALT3IA*).

6.1.2. Le sous-module M1.2

Les quatre gènes qui composent le sous-module M1.2 sont tous coexprimés entre eux et tous induits dans les fibres (fig. 25). Le gène permettant de créer ce sous-module (Potri.004G033000) est corrélé positivement à la cellulose et négativement aux lignines présentes dans les rayons. Son homologue chez *Arabidopsis thaliana* (AT1G24020) code pour la protéine *AtMLP423*¹. Elle est impliquée dans la voie de signalisation par l’acide abscissique et dans la réponse à l’attaque de pathogène (Plett et al., 2015). Ce gène est ici corrélé aux gènes Potri.012G083500 (homologue de AT5G63090, *AtLOB*²), Potri.002G098300 (homologue de AT1G22370, *AtUGT85A*³), Potri.005G156600 (homologue de AT4G33580, *AtBCA*⁴).

6.1.3. Le sous-module M1.3

Le sous module M1.3 est composé de trois gènes induits dans les rayons et corrélés positivement et uniquement aux lignines (fig. 25). Le gène permettant de créer ce sous-module, homologue au gène *AtABCB11*⁵ (AT1G02520), code pour un transporteur primaire de la famille des ABCB. Il est intéressant de noter que ce n’est pas la première fois que ce gène est associé aux lignines ou à la lignification. En effet, dans une analyse transcriptomique menée sur la hampe florale d’*Arabidopsis thaliana*, ce gène s’est montré coexprimé avec des gènes associés à la synthèse des monolignols (Ehlting et al., 2005). Les deux autres gènes présents dans le sous module M1.3 codent pour une protéine de liaison aux polysaccharides et à une oxidoreductase. La fonction de ces deux gènes n’a cependant pas été clairement établie.

¹ major latex protein-like

² Lateral organ boundaries

³ Uridine 5’-diphosphase glucuronosyltransférase

⁴ BETA CARBONIC ANHYDRASE

⁵ ATP binding cassette B

6.2. Le module M2

Parmi les 22 gènes présents dans le module M2, tous induits dans les rayons, vingt sont majoritairement corrélés positivement aux lignines présentes dans les rayons et deux négativement à la cellulose (**fig. 25A**). Ces deux gènes sont également corrélés positivement aux lignines présentes dans les rayons mais plus faiblement qu'à la cellulose. De même, onze des gènes corrélés positivement aux lignines présentes dans les rayons sont corrélés négativement, dans une moindre mesure, à la cellulose. Il est intéressant de noter que l'association à la cellulose est ici un raccourci qui est fait. En effet, les DAWNs auxquels sont corrélés ces gènes sont assignés, dans la littérature, à la cellulose et à certaines vibrations associées aux lignines. Parmi ces gènes, seuls les gènes Potri.001G270800 (homologue de AT1G12740, *AtCYP87A2*¹) et Potri.014G156600 (homologue de AT1G05065, *AtCLE20*) sont classés dans un terme GO enrichi (**fig. 25B**). En effet, le premier appartient aux groupes de processus biologiques 'métabolisme secondaire' et 'hormones', le second est supposé agir au niveau de la matrice extracellulaire. Parmi les autres gènes, on retrouve notamment quatre gènes de la famille des cytochrome P450, des familles 81 et 87, et trois protéine kinases de la famille LRR (**Table 3**). L'homologue d'*Arabidopsis thaliana* d'une des trois protéine kinases a été étudiée : CEPR2² (Yu et al., 2019; Zhang et al., 2021). Elle est impliquée dans la régulation du transport de l'acide abscissique. En effet, elle est capable de phosphoryler un transporteur d'acide abscissique, NRT1.2/NPF4.6, entraînant alors sa dégradation (Zhang et al., 2021). Elle est également capable de phosphoryler un récepteur de l'acide abscissique, PYL4, entraînant une fois encore sa dégradation (Yu et al., 2019). Tout comme les protéine kinases, les cytochromes P450 forment une large famille impliquée dans un grand nombre de processus, de la synthèse des lignines au catabolisme des hormones (Werck-Reichhart et al., 2002). Cependant, la fonction des familles 81 et 87 n'ont, jusqu'à présent, pas été élucidés.

6.3. Le module M3

Le module M3 regroupe 17 gènes. Parmi eux, 14 sont corrélés positivement majoritairement aux lignines présentes dans les rayons, un gène est corrélé négativement majoritairement à la cellulose (+ lignines) et deux ne sont corrélés à aucun DAWN (**fig. 25A**). On notera également que douze des gènes positivement corrélés aux lignines présentes dans les rayons sont également, dans une moindre mesure, négativement corrélés à la cellulose (+ lignines). De même, le gène majoritairement corrélé négativement à la cellulose est également,

¹ Cytochrome P450 87A2

² C-terminally encoded peptide receptor 2

dans une moindre mesure, positivement corrélé aux lignines présentes dans les rayons (**fig. 25A**). Parmi ces gènes, seuls trois font partie de catégories fonctionnelles enrichies (**fig. 25B**), toutes différentes :

- Potri.010G169400, homologue de AT1G69600 (*AtZFHD1*) et corrélé positivement aux lignines présentes dans les rayons et négativement à la cellulose, fait partie du groupe de processus biologiques ‘facteurs de transcription’ et code pour un facteur de transcription de la famille de zinc finger à homéodomaine.
- Potri.001G092700, homologue de AT2G19170 (*AtSLP3*) et corrélé positivement aux lignines présentes dans les rayons et négativement à la cellulose, est localisé dans région extracellulaire.
- Potri.001G182000, homologue de AT1G79900 (*AtBAC2*) et sans corrélation à aucun DAWN, fait partie du groupe ‘Transport’ et code pour une protéine transportant l’ornithine de la mitochondrie vers le cytosol.

Parmi les autres gènes, on recense notamment trois gènes codant pour des protéine kinases (**Table 3**).

Table 3 Liste des 251 DEG représentés dans les modules M1, M2 et M3

Gene_ID	DEG induced in...	Maximum correlated trait(s)	other correlated traits	BP enriched group(s)	CC enriched group(s)	Connected modules in the gene coexpression network	<i>Arabidopsis thaliana</i> orthologue	<i>Arabidopsis thaliana</i> functional name	<i>Arabidopsis thaliana</i> functional annotation
Potri.001G325100	Fibre	Cellulose	NS_H	TF, Wood	-	M1.1α	AT5G13180	AtVNI2	NAC domain containing protein 83
Potri.001G352100	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	T	-	M1.1α	AT4G18210	AtPUP10	purine permease 10
Potri.001G142500	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H	H	-	M1.1α	AT4G17870	AtPYR1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
Potri.018G068700	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	CW, TF	-	M1.1α	AT4G29230	AtANAC075	NAC domain containing protein 75
Potri.004G066200	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_H	-	-	M1.1α	AT1G16220	AtPP2C6	Protein phosphatase 2C family protein
Potri.005G188700	Fibre	Cellulose	NS_H	-	-	M1.1α	AT5G48940	AtRGI2	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein
Potri.007G063800	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H	-	-	M1.1α	AT4G35880	-	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Potri.015G131400	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H	-	-	M1.1α	AT5G51600	AtMAP65-3	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein
Potri.003G112200	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H	-	-	M1.1α	AT4G22580	-	Exostosin family protein
Potri.007G105000	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	TF, Wood	-	M1.1β	AT5G64530	AtXND1	xylem NAC domain 1
Potri.002G065100	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	TF	-	M1.1β	AT1G53050	-	Protein kinase superfamily protein
Potri.006G114200	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	TF	-	M1.1β	AT3G54220	AtSGR1	GRAS family transcription factor
Potri.015G020000	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	TF	-	M1.1β	AT5G61430	AtANAC100	NAC domain containing protein 100
Potri.001G453000	Fibre	Cellulose	NS_C, NA	T	-	M1.1β	AT3G30340	AtUMAMIT32	nodulin MtN21 / EamA-like transporter family protein
Potri.008G140400	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	H, TF	-	M1.1β	AT2G01940	AtHDD15	C2H2-like zinc finger protein
Potri.010G119900	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	H, TF	-	M1.1β	AT2G01200	AtIAA32	indole-3-acetic acid inducible 32
Potri.008G129400	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	H, T	-	M1.1β	AT1G70940	AtPIN3	Auxin efflux carrier family protein
Potri.018G009300	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	CW	-	M1.1β	AT4G31590	AtCSLC5	Cellulose-synthase-like C5
Potri.004G044900	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H, NA	-	MEC	M1.1β	AT1G28270	AtRALFL4	raif-like 4
Potri.007G015500	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	MEC	M1.1β	AT4G38970	AtFBA2	fructose-bisphosphate aldolase 2

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.007G048700	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	MEC	M1.1β	AT5G67270	ATEB1C	end binding protein 1C
Potri.009G167800	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	MEC	M1.1β	AT2G17230	AtEXL5	EXORDIUM like 5
Potri.005G071200	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	-	M1.1β	-	-	-
Potri.009G082300	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT2G14520	-	CBS domain-containing protein with a domain of unknown function (DUF21)
Potri.010G097300	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	-	-	-
Potri.010G104600	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT1G14780	-	MAC/Perforin domain-containing protein
Potri.010G123500	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT1G68290	AtENDO2	endonuclease 2
Potri.013G017900	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT3G05470	AtFH11	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein
Potri.015G103700	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT5G50900	-	ARM repeat superfamily protein
Potri.019G036500	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT4G38040	-	Exostosin family protein
Potri.T030600	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT3G06810	AtIBR3	acyl-CoA dehydrogenase-related
Potri.003G206000	Fibre	Cellulose, Fib-lignin	NS_C, NS_H, NA	-	MEC	M1.1β	AT5G12950	-	Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
Potri.010G099200	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, Fib-lignin, NS_C, NA	TF	-	M1.1β	AT2G02070	AtIDD5	indeterminate(ID)-domain 5
Potri.016G140500	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	T	-	M1.1β	AT3G08650	-	ZIP metal ion transporter family
Potri.015G033100	Fibre	Ray-lignin	NS_C, NA	H, TF	-	M1.1β	AT2G01940	AtIDD15	C2H2-like zinc finger protein
Potri.015G042000	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	H	-	M1.1β	AT2G29460	AtGSTU4	glutathione S-transferase tau 4
Potri.001G171900	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	CW	MEC	M1.1β	AT1G80170	-	Pectin lyase-like superfamily protein
Potri.001G342300	Fibre	Ray-lignin	NA	CW	MEC	M1.1β	AT5G14430	-	S-adenosyl-L-methionine- dependent methyltransferases superfamily protein

Potri.001G387000	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NA	-	-	M1.1β	-	-	-	hypothetical protein
Potri.007G006000	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT5G67640	-	-	hypothetical protein
Potri.012G113800	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT5G51160	-	-	Ankyrin repeat family protein
Potri.014G104900	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT3G61920	-	-	PADRE protein
Potri.010G241000	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	T	-	M1.1β	AT5G04770	AtCAT6	-	cationic amino acid transporter 6
Potri.010G101200	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	H, TF	-	M1.1β	AT2G01940	AtIDD15	-	C2H2-like zinc finger protein
Potri.002G147700	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	H	-	M1.1β	AT2G45400	AtBEN1	-	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
Potri.005G233600	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	CW, H, T	-	M1.1β	AT1G75500	AtWAT1	-	Walls Are Thin 1
Potri.008G026400	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	CW	-	M1.1β	AT5G03760	AtCSLA9	-	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
Potri.003G149000	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT1G31320	AtLBD4	-	LOB domain-containing protein 4
Potri.011G040800	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT5G45490	-	-	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
Potri.T138100	Fibre	NS_C, NA	-	TF	-	M1.1β	AT3G54220	AtSGR1	-	GRAS family transcription factor
Potri.010G223900	Fibre	NS_C, NA	-	-	-	M1.1β	AT5G04220	AtSYTC	-	Calcium-dependent lipid-binding (CalB domain) family protein
Potri.004G212600	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	Wood	-	M1.1β	AT2G28250	AtNCRK	-	Protein kinase superfamily protein
Potri.015G091900	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	TF	-	M1.1β	AT5G50360	AtAITS5	-	ABA-INDUCED TRANSCRIPTION REPRESSOR 5
Potri.001G044000	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H	-	-	M1.1β	AT1G73060	AtLPA3	-	Low PSII Accumulation 3
Potri.001G087100	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT4G24040	AtTRE1	-	trehalase 1
Potri.002G175300	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT2G46640	AtTAC1	-	Tiller Angle Control 1

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.009G133100	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT2G16700	AtADF5	actin depolymerizing factor 5
Potri.015G092200	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT1G67570	-	zinc finger CONSTANS-like protein (DUF3537)
Potri.016G097100	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT1G32700	-	PLATZ transcription factor family protein
Potri.016G143600	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT2G38670	AtPECT1	phosphorylethanolamine cytidyltransferase 1
Potri.003G201700	Ray	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT1G29050	AtTBL38	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 38
Potri.017G083900	Ray	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT2G63730	-	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
Potri.T151000	Ray	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT3G47570	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.002G054400	Ray	Cellulose, Ray-lignin	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT5G19160	AtTBL11	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 11
Potri.002G040600	Ray	Ray-lignin	NA	TF	-	M1.1β	AT2G31280	AtCPUORF7	conserved peptide upstream open reading frame 7
Potri.013G041000	Ray	Ray-lignin	NA	TF	-	M1.1β	AT4G02590	AtTUNE12	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Potri.002G033000	Ray	Ray-lignin	NA	CW, H	-	M1.1β	AT1G19630	AtCYP722A1	cytochrome P450, family 722, subfamily A, polypeptide 1
Potri.011G025400	Ray	Ray-lignin	Cellulose, NS_C, NA	CW	MEC	M1.1β	AT1G11580	AtPMEPCRA	methyltransferase PCR A
Potri.019G055200	Ray	Ray-lignin	NA	-	MEC	M1.1β	AT1G08450	AtCRT3	calreticulin 3
Potri.001G042500	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M1.1β	AT2G24130	-	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
Potri.002G092100	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT5G10080	-	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Potri.002G196900	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT4G02090	-	PADRE protein
Potri.005G077600	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT5G65110	AtACX2	acyl-CoA oxidase 2
Potri.006G048500	Ray	Ray-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	AT2G41640	-	Glycosyltransferase family 61 protein
Potri.006G103600	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M1.1β	AT3G51750	-	hypothetical protein
Potri.010G081300	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M1.1β	AT5G43810	AtAGO10	Stabilizer of iron transporter SufD / Polynucleotidyl transferase
Potri.011G079900	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT5G46295	-	transmembrane protein
Potri.013G010600	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT3G05725	-	Protein of unknown function (DUF3511)
Potri.014G125700	Ray	Ray-lignin	NA	-	-	M1.1β	AT2G47500	-	P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein with CH (Calponin Homology) domain

Potri.T039000	Ray	Ray-lignin	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	-	-	WRKY family transcription factor
Potri.002G138900	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	TF	-	M1.1β	AT2G44745	AtWRKY12	
Potri.002G018500	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NA	-	MEC	M1.1β	AT1G20160	AtSBT5.2	Subtilisin-like serine endopeptidase family protein
Potri.004G131200	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT1G06475	-	transmembrane protein
Potri.004G190000	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1β	-	-	-
Potri.004G190100	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT3G44830	-	Lecithin:cholesterol acyltransferase family protein
Potri.012G088300	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1β	AT5G50150	AtLOTR1	Protein of Unknown Function (DUF239)
Potri.018G021400	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	TF	-	M1.1γ	AT5G10970	-	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
Potri.001G461300	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1γ	AT1G30680	-	toprim domain-containing protein
Potri.018G114400	Fibre	Cellulose, Ray-lignin	Ray-lignin, NS_C, NA	-	-	M1.1γ	AT4G31020	-	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
Potri.003G163600	Fibre	Ray-lignin	Hemicelluloses_Lignins, NA	H, T, TF	-	M1.1γ	AT5G62000	AtARF2	auxin response factor 2
Potri.002G047400	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NA	-	-	M1.1γ	AT3G63390	-	-
Potri.002G189400	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NA	-	-	M1.1γ	AT4G01860	-	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
Potri.003G115400	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	-	-	M1.1γ	AT4G22740	-	glycine-rich protein
Potri.010G217600	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	-	-	M1.1γ	AT2G16880	-	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
Potri.T058100	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NA	-	-	M1.1γ	AT1G65320	AtCBSX6	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein
Potri.001G049700	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	Wood	MEC	M1.1γ	AT4G13195	AtCLE44	CLAVATA3/ESR-RELATED 44
Potri.003G197500	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	H, TF	-	M1.1γ	AT3G57040	AtRR9	response regulator 9

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.018G135800	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NA	-	-	M1.1v	AT3G14460	ATLRRAC1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
Potri.014G102700	Fibre	Ray-lignin	Hemicelluloses_Lignins, NA	-	-	M1.1b	AT2G46660	AtCYP78A6	cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 6
Potri.014G100900	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	TF	-	M1.1b	AT3G61850	AtDAG1	Dof-type zinc finger DNA-binding family protein
Potri.005G241500	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	H	-	M1.1b	AT1G75820	AtCLV1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
Potri.005G157800	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	-	M1.1b	AT5G65420	AtCYCD4;1	CYCLIN D4;1
Potri.006G190400	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	-	M1.1b	-	-	-
Potri.T088600	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	-	M1.1b	AT1G10155	AtPP2-A10	phloem protein 2-A10
Potri.001G450200	Fibre	NA	-	-	-	M1.1b	AT1G32930	AtGALT31A	Galactosyltransferase family protein
Potri.004G066300	Fibre	NA	-	-	-	M1.1b	AT1G48480	AtRKL1	receptor-like kinase 1
Potri.006G062900	Fibre	NA	-	-	-	M1.1b	AT3G18670	-	Ankyrin repeat family protein
Potri.007G058100	Fibre	NA	-	-	-	M1.1b	AT4G10890	-	DDE family endonuclease
Potri.014G151400	Fibre	NA	-	-	-	M1.1b	AT2G47980	AtSCC3	sister-chromatid cohesion protein 3
Potri.018G114500	Fibre	-	-	-	-	M1.1	AT2G15580	-	RING/U-box superfamily protein
Potri.007G047400	Fibre	Cellulose	NS_H	TF	-	M1.1	AT4G24240	AtWRKY7	WRKY DNA-binding protein 7
Potri.013G117600	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	TF	-	M1.1	AT3G56770	-	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Potri.018G151700	Fibre	Cellulose	NS_H	T	-	M1.1	AT3G13050	AtNiaP	Major facilitator superfamily protein
Potri.009G045900	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	H, TF	-	M1.1	AT5G60440	AtAGL62	AGAMOUS-like 62
Potri.013G028300	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NA	H	-	M1.1	AT3G21510	AtAHP1	histidine-containing phosphotransmitter 1
Potri.005G124000	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	CW, H	-	M1.1	AT3G50660	AtDWF4	Cytochrome P450 superfamily protein
Potri.005G184500	Fibre	Cellulose	-	CW	-	M1.1	AT2G34300	-	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
Potri.013G118700	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NA	CW	-	M1.1	AT5G17050	AtUGT78D2	UDP-glucosyl transferase 78D2
Potri.001G166900	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	-	M1.1	AT1G72510	-	Protein of unknown function (DUF1677)
Potri.002G076200	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NA	-	-	M1.1	AT1G21510	-	-
Potri.006G049500	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1	-	-	-

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.006G097500	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT5G01210	-	HXXXD-type acyl-transferase family protein
Potri.006G216200	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	M1.1	AT5G02750	AtSGR9	RING/U-box superfamily protein
Potri.007G051800	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	M1.1	AT5G67350	-	hypothetical protein
Potri.008G095000	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NS_H	-	M1.1	AT1G26480	AtGRF12	general regulatory factor 12
Potri.009G071800	Fibre	Cellulose	NA	-	M1.1	AT5G19420	-	Regulator of chromosome condensation (RCC1) family with FYVE zinc finger domain
Potri.009G099200	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H	-	M1.1	AT4G34120	AtLEJ1	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein
Potri.010G097200	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	-	M1.1	AT1G10850	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.015G003400	Fibre	Cellulose	NS_C, NS_H	-	M1.1	-	-	-
Potri.015G100300	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT1G69040	AtACR4	ACT domain repeat 4
Potri.018G096100	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	M1.1	AT5G57670	-	Protein kinase superfamily protein
Potri.018G126400	Fibre	Cellulose	Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT5G20250	AtDIN10	Raffinose synthase family protein
Potri.010G147700	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	TF	M1.1	AT5G49520	AtWRKY48	WRKY DNA-binding protein 48
Potri.001G068400	Fibre	Ray-lignin	NA	CW	M1.1	AT1G11680	AtCYP51A2	CYTOCHROME P450 51G1
Potri.001G053000	Fibre	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT1G04650	AtFLIP	FIDGETIN-LIKE-1 INTERACTING PROTEIN
Potri.001G088100	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NA	-	M1.1	AT3G49290	AtABIL2	ABL interactor-like protein 2
Potri.003G026700	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	-	M1.1	-	-	-
Potri.003G124300	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H, NA	-	M1.1	AT3G61230	AtPLIM2c	GATA type zinc finger transcription factor family protein
Potri.005G258600	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	M1.1	AT1G76570	AtLHCB7	Chlorophyll A-B binding family protein
Potri.008G072100	Fibre	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT5G07150	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.010G011700	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H	-	M1.1	AT5G49120	-	Protein of unknown function (DUF581)

**CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE**

Potri.T047200	Fibre	Ray-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins , NA	-	M1.1	AT5G55810	AtNMNAT	nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase
Potri.017G000400	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	TF	M1.1	AT2G44150	AtASHH3	histone-lysine N-methyltransferase ASHH3
Potri.002G112100	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	T	M1.1	AT5G49630	AtAAP6	amino acid permease 6
Potri.T109600	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NA	T	M1.1	AT4G32060	AtMICU	calcium-binding EF hand family protein
Potri.017G086300	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	H,TF	M1.1	AT5G15310	AtMYB16	myb domain protein 16
Potri.004G038100	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	CW	M1.1	AT5G08370	AtAGAL2	alpha-galactosidase 2
Potri.008G211500	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NA	CW	M1.1	AT3G16850	-	Pectin lyase-like superfamily protein
Potri.001G409900	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT5G54570	AtBGLU41	beta glucosidase 41
Potri.001G440300	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT4G20430	-	Subtilase family protein
Potri.T102500	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT1G28580	-	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
Potri.001G166800	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT1G19110	-	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain-related
Potri.002G126700	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Ray-lignin, NA	-	M1.1	AT2G26570	AtWEB1	Plant protein of unknown function (DUF827)
Potri.003G115100	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NA	-	M1.1	AT4G22730	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.004G069600	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT3G16520	AtUGT88A1	UDP-glucosyl transferase 88A1
Potri.005G116100	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, Fib-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	M1.1	AT2G36430	-	Plant protein of unknown function (DUF247)
Potri.006G237400	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT2G25790	AtSKM1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
Potri.007G040300	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT2G26560	AtPLA2A	phospholipase A 2A
Potri.008G022200	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT3G20930	-	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Potri.014G081400	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT1G01760	-	adenosine deaminases;RNA binding;RNA binding;adenosine deaminases
Potri.016G089200	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	NA	-	M1.1	AT3G09780	AtCRR1	CRINKLY4 related 1
Potri.017G030600	Fibre	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NA	-	M1.1	AT4G24220	AtVEP1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
Potri.014G108500	Fibre	NA	-	T	M1.1	AT3G30340	AtUMAMIT32	nodulin MtIN21 /EamA-like transporter family protein
Potri.004G052100	Fibre	NA	-	H	M1.1	AT2G34060	-	Peroxidase superfamily protein

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.018G113000	Fibre	NA	-	H	-	M1.1	AT5G51350	AtMOL1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein fucosyltransferase 13
Potri.013G111200	Fibre	NA	-	CW	-	M1.1	AT1G71990	AtFUT13	cellulose synthase-like D5
Potri.014G125100	Fibre	NA	-	CW	-	M1.1	AT1G02730	AtCSLD5	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
Potri.001G353400	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT1G29380	-	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
Potri.003G182000	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT4G27760	AtFEY3	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily protein
Potri.006G239800	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT1G67280	AtGLYI6	Protein of unknown function (DUF300)
Potri.011G044200	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT4G21570	-	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
Potri.014G110800	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT3G62040	-	Phototropic-responsive NPH3 family protein
Potri.014G133500	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT1G03010	-	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
Potri.017G100600	Fibre	NA	-	-	-	M1.1	AT5G15780	-	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8
Potri.005G143800	Fibre	NS_C, NS_H	-	-	-	M1.1	AT4G37370	AtCYP81D8	homeobox 3
Potri.017G081700	Fibre	NS_H	-	TF	-	M1.1	AT5G15150	AtHB3	sodium hydrogen exchanger 2
Potri.014G134900	Fibre	NS_H	-	T	-	M1.1	AT3G05030	AtNHX2	phytosulfokine 4 precursor
Potri.007G006800	Fibre	NS_H	-	-	MEC	M1.1	AT3G49780	AtPSK4	-
Potri.001G422000	Fibre	NS_H	-	-	-	M1.1	-	-	poly(A) binding protein 3
Potri.005G198500	Fibre	NS_H	-	-	-	M1.1	AT1G22760	AtPAB3	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
Potri.019G071000	Fibre	NS_H	-	-	-	M1.1	AT5G53390	AtFOP1	O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
Potri.T170200	Fibre	NS_H	-	-	-	M1.1	AT5G53390	AtFOP1	cation exchanger 2
Potri.011G166900	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	T	-	M1.1	AT3G13320	AtCAX2	cellulose synthase-like A02
Potri.004G189000	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, Ray-lignin, NS_C, NA	CW	-	M1.1	AT5G22740	AtCSLA2	-
Potri.001G140900	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NA	-	-	M1.1	AT4G17920	AtL29	RING/U-box superfamily protein
Potri.005G208800	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H	-	-	M1.1	AT4G02830	-	-
Potri.016G066600	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	-	M1.1	AT2G35880	AtTPX2	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.018G021600	Fibre	Fib-lignin	Cellulose, NS_C, NS_H	-	M1.1	AT4G31930	-	Mitochondrial glycoprotein family protein
Potri.006G278000	Ray	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	M1.1	AT4G31330	-	Protein of unknown function, DUF599
Potri.015G144200	Ray	Ray-lignin	NA	T	M1.1	AT5G23760	-	Copper transport protein family
Potri.012G070000	Ray	Ray-lignin	NA	CW	M1.1	AT1G74710	AtICS1	ADC synthase superfamily protein
Potri.007G011700	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT5G65530	AtRLCK VI_A3	Protein kinase superfamily protein
Potri.007G031100	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT4G36810	AtGGPS1	geranylgeranyl pyrophosphate synthase 1
Potri.009G042700	Ray	Ray-lignin	-	-	M1.1	-	-	-
Potri.009G092400	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT3G19540	AtBDR4	Protein of unknown function (DUF620)
Potri.010G015100	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	-	-	-
Potri.011G045900	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT1G11120	AtDEG23	CTTNBP 2 amino-terminal-like protein
Potri.011G129100	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT4G27280	AtCMI1	Calcium-binding EF-hand family protein
Potri.015G005700	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT5G03890	-	PADRE protein
Potri.T079800	Ray	Ray-lignin	NA	-	M1.1	AT2G22250	AtAAT	aspartate aminotransferase
Potri.003G195300	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	TF	M1.1	AT3G54390	-	sequence-specific DNA binding transcription factors
Potri.001G232000	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NA	-	M1.1	AT2G44290	AtLTPG13	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
Potri.007G139200	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	-	M1.1	AT4G28380	-	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
Potri.012G022300	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	-	M1.1	AT5G03890	-	PADRE protein
Potri.016G114900	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	-	M1.1	AT2G40070	AtBPP1	BASIC PROLINE-RICH PROTEIN 1
Potri.018G150000	Ray	Hemicelluloses_Lignins	Cellulose, NS_C, NA	-	M1.1	AT4G31040	AtDLDG1	CemA-like proton extrusion protein-related
Potri.004G029100	Ray	Fib-lignin	Cellulose, Hemicelluloses_Lignins, NS_C, NS_H, NA	TF	M1.1	AT1G61660	AtBHLH112	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Potri.004G033000	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NA	H	M1.2	AT1G24020	AtMLP423	MLP-like protein 423
Potri.005G156600	Fibre	Cellulose	Fib-lignin, Ray-lignin, NS_C, NS_H, NA	-	M1.2	AT4G33580	AtBCA5	beta carbonic anhydrase 5
Potri.012G083500	Fibre	Cellulose	Ray-lignin, NS_C, NA	-	M1.2	AT5G63090	AtLOB	Lateral organ boundaries (LOB) domain family protein
Potri.002G098300	Fibre	Fib-lignins	Cellulose, Ray-lignin, NS_C, NS_H	-	M1.2	AT1G22360	AtUGT85A2	UDP-glucosyl transferase 85A2

CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE

Potri.014G113000	Ray	Ray-lignin	-	H, T	-	M1.3	AT1G02520	AtABC11	P-glycoprotein 11
Potri.005G052400	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M1.3	AT1G60680	-	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
Potri.014G014100	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M1.3	AT1G10150	-	Carbohydrate-binding protein
Potri.006G132100	Ray	Cellulose_Lignin	Ray-lignin	-	-	M2	AT2G37050	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.014G021800	Ray	Cellulose_Lignin	Ray-lignin	-	-	M2	AT4G37360	AtCYP81D2	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 2
Potri.003G197400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	T	-	M2	AT3G54450	-	Major facilitator superfamily protein
Potri.001G270800	Ray	Ray-lignin	-	CW, H	-	M2	AT1G12740	AtCYP87A2	cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 2
Potri.014G156600	Ray	Ray-lignin	-	-	MEC	M2	AT1G05065	AtCLE20	CLAVATA3/ESR-RELATED 20
Potri.002G094900	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT1G35830	-	VQ motif-containing protein
Potri.002G249700	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT3G07420	AtNS2	asparaginyl-tRNA synthetase 2
Potri.002G260800	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	-	-	-
Potri.004G049000	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT4G18425	AtDMP4	Protein of unknown function (DUF679)
Potri.007G089500	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT1G15125	-	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
Potri.008G099100	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT1G64940	AtCYP89A6	cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 6
Potri.008G130500	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT1G23100	-	GroES-like family protein
Potri.014G021600	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT5G10610	AtCYP81K1	cytochrome P450, family 81, subfamily K, polypeptide 1
Potri.014G071100	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT2G45440	AtDHDPS2	dihydrodipicolinate synthase
Potri.017G008300	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT2G31800	-	Integrin-linked protein kinase family
Potri.017G084800	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT5G39670	AtCML46	Calcium-binding EF-hand family protein
Potri.018G014700	Ray	Ray-lignin	-	-	-	M2	AT5G10770	-	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Potri.019G069500	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT5G17680	-	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
Potri.019G078400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT1G72180	AtCEPR2	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
Potri.T013800	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT4G27220	-	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
Potri.T048200	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT3G47570	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein

**CHAPITRE II – ÉLABORATION D'UN RÉSEAU DE GÈNES ASSOCIÉ AUX PROPRIÉTÉS
CHIMIQUES DES PAROIS À L'ÉCHELLE CELLULAIRE**

Potri.T079400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M2	AT1G64940	AtCYP89A6	cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 6
Potri.001G182000	Ray	-	-	T	-	M3	AT1G79900	AtBAC2	Mitochondrial substrate carrier family protein
Potri.001G181900	Ray	-	-	-	-	M3	-	-	-
Potri.001G092700	Ray	Ray-lignin	-	-	MEC	M3	AT2G19170	AtSLP3	subtilisin-like serine protease 3
Potri.010G120000	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	-	-	-
Potri.016G101200	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT2G37730	-	Protein of unknown function (DUF604)
Potri.019G087800	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	-	-	-
Potri.016G009800	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT4G16460	-	-
Potri.017G106500	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT3G07040	AtRPS3	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
Potri.010G169400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	TF	-	M3	AT1G69600	AtZFH1	zinc finger homeodomain 1
Potri.017G107700	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	-	-	-
Potri.005G031300	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT3G47570	-	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
Potri.001G268000	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	-	-	-
Potri.011G028400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT4G05200	AtCRK25	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25
Potri.006G106400	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT2G38420	-	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
Potri.010G118300	Ray	Ray-lignin	Cellulose_Lignin	-	-	M3	AT1G66920	-	Protein kinase superfamily protein

DEG : gène différentiellement exprimé, BP : processus biologique, CC : compartiment cellulaire,

Vert : corrélation positive, violet : corrélation négative

Ray-lignin : DAWNs assignés aux lignines fortement absorbés dans les rayons, Fib-lignin : DAWNs assignés aux lignines fortement absorbés dans les fibres, NA : DAWN non assigné, NS_C : DAWNs non spécifiques (groupe C), NS_H : DAWNs non spécifiques (groupe H) TF : facteur de transcription, T : transport, H : hormone, Wood : xylogénèse, CW : biosynthèse des parois, MEC : matrice extracellulaire

III. Discussion, limites et perspectives

1. Composition chimique des parois

Par l'utilisation de l'imagerie hyperspectrale en ATR-FTIR, j'ai pu mettre en évidence de potentielles différences de composition et/ou d'organisation des parois secondaires des fibres et rayons. J'ai, par exemple, pu observer une absorbance plus forte des bandes associées aux hémicelluloses dans les rayons et aux bandes associées à la cellulose dans les fibres. J'ai, par ailleurs, pu mettre en évidence des différences de qualité des lignines entre ces deux types cellulaires. Les différences de composition chimique entre fibres et vaisseaux de bois sont en partie connues (Terashima et al., 1993; Donaldson et al., 2001). Cependant, peu d'études ont jusqu'à présent été réalisées sur les différences de composition des parois de fibres et de rayons. On notera notamment une étude réalisée par Gierlinger et Schwanninger (2006). Basée sur l'imagerie Raman, cette étude montre de fortes différences entre fibres et rayons de bois normal, notamment au niveau de la cellulose et de l'orientation de ses microfibrilles. En effet, la visualisation des bandes 3060-2780 et 1195-1026 cm^{-1} , représentatives des polysaccharides et, dans une moindre mesure, des lignines, montre une plus grande intensité dans les couches S2 des parois des fibres que dans celles des rayons. Les parois secondaires des fibres seraient donc plus riches en polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) que celles des rayons. L'analyse des bandes représentatives de la cellulose n'a pas permis de mettre en évidence des différences de teneur. En effet, l'étude des spectres moyens obtenus pour les couches S2 des parois de fibres et de rayons a identifié des différences d'intensité voire l'apparition de certaines bandes, toutes représentatives de la cellulose. Ainsi, la bande 2897 cm^{-1} , correspondant à des vibrations C-H perpendiculaires à l'axe du faisceau, est plus intense dans les parois de fibres que dans les parois de rayons. À l'inverse, la bande 1096 cm^{-1} , correspondant à des vibrations C-O-C parallèles à l'axe du faisceau, est plus intense dans les parois de rayons que dans celles des fibres et les bandes 1423 et 994 cm^{-1} n'apparaissent que dans les couches S2 des parois de rayons. Ces bandes sont donc majoritairement représentatives d'une différence d'orientation de microfibrilles de cellulose. Cependant, contrairement à notre étude, les deux types cellulaires sont étudiés sur des coupes transversales. Or, les fibres et les rayons ne sont pas orientés de la même manière dans le bois : les premières sont orientées longitudinalement alors que les seconds sont orientés radialement. Ainsi, observer les parois de ces cellules uniquement sur une coupe transversale peut induire un biais lorsqu'on compare les parois entre elles, ce qui est souligné par les auteurs. Les différences observées concernant l'orientation des microfibrilles de cellulose pourraient donc être artéfactuelles.

Plus récemment, Gorzsás et ses collaborateurs (2011) se sont également penchés sur la question en utilisant cette fois la microscopie FTIR. Ici, les auteurs ont pu mettre en évidence une plus forte proportion de polysaccharides dans les rayons ce qui valide, pour partie, la plus forte proportion d’hémicelluloses dans les rayons observée par imagerie ATR-FTIR. L’étude ayant également porté sur l’analyse de coupes transversales, il est possible que les différences observées soient à nouveau dues à des différences d’orientation des molécules. Par ailleurs, la résolution des images obtenues ne permet pas de distinguer avec précision les parois du contenu cellulaire. Les rayons ayant un rôle de stockage, il est alors possible que cette augmentation de la fraction polysaccharidique soit due à la présence de stocks d’amidon. Notre étude ayant porté sur des coupes transversales et longitudinales à forte résolution, nous devrions avoir échappé à ces écueils. Cependant, des validations croisées avec d’autres approches telle que l’imagerie Raman ou l’immunohistocalisation permettraient d’appuyer ces observations.

2. Cellulose synthase like : force et faiblesse de l’analyse intégrative

Cette étude a permis de mettre en évidence des gènes fortement corrélés aux données phénotypiques. Parmi eux se trouve notamment Potri.008G026400, présent dans le sous-groupe M1.1β et plus exprimé dans les fibres, dont la corrélation la plus forte est avec les DAWNs associés aux hémicelluloses et aux lignines (**Table 3**). Son gène homologue chez *Arabidopsis thaliana*, *AtCSLA9* code pour une glycosyltransférase impliquée dans la synthèse des glucomannanes présents dans les parois primaires et secondaires de la hampe florale. En effet, les mutants sous-exprimant *CLSA9* présentent une forte réduction de la quantité de glucomannanes (Goubet et al., 2009).

Un autre gène codant pour une protéine cellulose synthase-like a pu être mis en évidence : Potri.018G009300, homologue d’*AtCSLC5*, également présent dans le sous-groupe M1.1β et plus fortement exprimé dans les fibres. *AtCSLC5* est impliqué dans la synthèse des xyloglucanes (Kim et al., 2020). En effet, des triples, quadruples ou quintuples mutants *cslc* présentent une forte diminution de la quantité de xylose contenu dans leur paroi. Bien qu’impliqué dans la synthèse des xyloglucanes (Kim et al., 2020), ce gène ne présente aucune corrélation avec les hémicelluloses (**Table 3**). Sa corrélation la plus haute est établie avec un autre polysaccharide pariétal : la cellulose. Ce gène nous permet de toucher ici à la limite de la méthode. En effet, les groupes fonctionnels des composés pariétaux, d’autant plus des polysaccharides pariétaux, sont très proches les uns des autres. Les bandes considérées ici comme représentatives de la cellulose sont 1320-16 et 992-86 cm^{-1} . Elles correspondent respectivement à une vibration angulaire de type ‘rocking’ de CH_2 (Åkerholm et Salmén, 2001;

Schwanninger et al., 2004; Olsson et al., 2011) et à une vibration de valence de C-O (Schwanninger et al., 2004). Ces deux types de vibrations peuvent également avoir été présentes dans les hémicelluloses. Ainsi, l'assignation univoque d'une bande d'absorbance à un unique composé pariétal est complexe et une validation croisée par d'autres approches complémentaires comme l'imagerie Raman est primordiale afin de consolider les observations réalisées.

3. Transporteur à ATP-binding cassette : une nouvelle famille identifiée pour le transport des monolignols ?

Parmi les gènes corrélés aux lignines se trouvent notamment Potri.014G113000, plus exprimé dans les rayons et présent dans le sous-module M1.3. L'homologue de ce gène chez *Arabidopsis thaliana* (AT1G02520, *AtABCB11*) code pour un transporteur ABC¹ de la famille B. Un autre transporteur ABC de cette famille est identifié comme différentiellement exprimé et est présent dans le réseau de co-expression complet (fig. S2) : Potri.014G113000, homologue de AT2G47000 (*AtABCB19*) et lui aussi plus exprimé dans les rayons. Ces deux gènes codent pour des transporteurs de l'auxine (Geisler et Murphy, 2006; Kaneda et al., 2011). En effet, le transport polaire de l'auxine a été fortement réduit chez les mutants *abcb11* et *abcb19* d'*Arabidopsis thaliana*, ne représentant alors plus que 80% et 60% respectivement de celui de la lignée sauvage (Noh et al., 2001; Kaneda et al., 2011).

Par ailleurs, les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport actif de composés (Sibout et Höfte, 2012). Parmi eux, un transporteur ABC de la famille G, *AtABCG29*, est impliqué dans le transport de l'alcool *p*-coumarylique du cytoplasme à la paroi chez *Arabidopsis thaliana* (Alejandro et al., 2012). La possibilité que le transport de chaque monolignol soit assuré par un transporteur ABC spécifique n'est pas exclu (Sibout et Höfte, 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, *AtABCB11* a été identifié comme étant fortement exprimé dans les tissus en cours de lignification, notamment dans le xylème en développement (Kaneda et al., 2011). De même, il est fortement coexprimé avec les gènes associés à la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Ehlting et al., 2005). Ainsi, les transporteurs ABC de la famille B, notamment l'homologue d'*AtABCB11*, pourraient être associés à certains monolignols. Cependant, l'analyse du mutant *abcb11* d'*Arabidopsis thaliana* n'a montré aucune différence significative de lignification ou de structure du xylème (Kaneda et al., 2011). Ces résultats sont cependant fortement discutables. En effet, Kaneda et ses collaborateurs (2011) réalisent une coloration de Wiesner

¹ ATP binding cassette

pour seule analyse de composition en lignine. Cette coloration ne permet qu'une analyse visuelle dont l'interprétation doit être prise avec précaution. En effet, le phloroglucinol présent dans la réaction de Wiesner donnant une couleur rouge aux parois lignifiées peut également se lier à d'autres composés phénoliques des parois (Simon et al., 2018). De plus, si *ABCBI1* et/ou *ABCBI9* assurent le transport de certains monolignols, il est probable que cette coloration ne soit pas suffisante pour mettre en évidence une quelconque modification. Ainsi, des analyses plus poussées permettant la détection fine de modification des lignines, que ce soit en qualité ou en quantité, auraient été nécessaire afin d'exclure l'hypothèse que ce gène soit impliqué dans la biosynthèse des lignines.

Avant d'approfondir les analyses de ces gènes, il reste nécessaire de conforter les observations phénotypiques réalisées par imagerie ATR-FTIR par d'autres approches complémentaires. Si la corrélation entre ces gènes et les lignines se confirme, il serait alors intéressant d'étudier la teneur en lignines et la qualité de celles-ci dans les tiges de peupliers où l'expression de ces gènes a été supprimée par mutagenèse dirigée de type CRISPR-KO¹.

4. L'acide abscissique : régulateur de la formation du bois et des parois secondaires ?

Les hormones semblent jouer un rôle crucial dans la régulation de la formation du bois et des parois secondaires. Dans notre étude, plusieurs gènes de réponses aux hormones ont été mis en évidence, soit par étude GO, soit par étude du réseau de co-expression. En effet, l'analyse des termes GO a conduit à l'identification de douze termes impliqués dans la réponse, le transport, le catabolisme ou le métabolisme des hormones. Cette analyse nous a ainsi permis d'associer les fibres au métabolisme de l'auxine et à la signalisation par les gibbérellines ; les rayons étant plutôt associés à la biosynthèse et l'homéostasie des brassinostéroïdes. De même, l'analyse de réseaux nous a permis de mettre en évidence cinq gènes de réponse à l'auxine et deux de réponse aux cytokinines, tous étant plus exprimés dans les fibres. Il n'est pas étonnant d'avoir identifié des gènes de réponse à l'auxine, aux gibbérellines et aux cytokinines. En effet, ces trois hormones sont connues pour être impliquées dans la différenciation cellulaire et/ou le maintien des cellules cambiales (Kubo et al., 2005). Ces trois hormones influent également sur l'expression de facteurs de transcription centraux dans la formation des parois secondaires que sont *NST1*, *NST2*, *SND1* et *VND6-7*. L'analyse de réseau a permis de mettre en évidence deux gènes de réponse à l'acide abscissique : Potri.004G033000 (homologue d'*AtMLP423*) et

¹ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – knock out

Potri.015G091900 (homologue d'*AtAITR5*). La fonction des gènes MLP reste pour le moment assez floue. L'analyse réalisée a mis en évidence une co-expression forte avec les homologues d'*AtASL4/LOB* et d'*AtUGT85A2*. *AtASL4/LOB* est supposé avoir un rôle dans la détermination du devenir cellulaire (Shuai et al., 2002). Il est également impliqué dans la régulation de l'accumulation des brassinostéroïdes (Bell et al., 2012). En effet, le mutant *lob* d'*Arabidopsis thaliana* présente une accumulation de brassinostéroïdes. *AtUGT85A2* est, lui, fortement exprimé dans les tissus en division et jouerait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Woo et al., 2007). Ce gène, codant pour une UDP¹ glucuronosyltransférase, permet la glycosylation d'un grand nombre de substrats dont les flavonoïdes et certaines hormones comme l'auxine, les brassinostéroïdes, les cytokinines et l'acide salicylique (Dixon et Steele, 1999; Bowles, 2002; Goda et al., 2004; Bowles et al., 2005). Cette glycosylation permet d'augmenter leur solubilité et leur stockage (Jaeken, 2010). Les gènes *AITR* sont, eux, connus pour être des inhibiteurs de transcription en réponse à l'acide abscissique (Tian et al., 2017). Leur mutation chez *Arabidopsis thaliana* associée à une application d'acide abscissique exogène, entraîne une augmentation de la transcription de gènes codant pour des récepteurs d'acide abscissique *PYR/PYL/RCAR*² et des *PP2C*³. Parmi les gènes coexprimés avec *AITR5*, on retrouve notamment l'orthologue d'*AtPECT1* (Potri.016G143600) impliqué dans la régulation des divisions cellulaires (Li et al., 2017b). Plus récemment, *AtPECT1* a été proposé comme régulateur de la production de gibbérellines (Susila et al., 2021). Il est donc opportun de penser que les gènes *MLP423* et *AITR5* aient un rôle (i) dans la détermination du devenir cellulaire et (ii) dans la régulation hormonale.

Tout récemment, le rôle de l'acide abscissique dans la régulation de la formation des parois a été démontré (Liu et al., 2021). En effet, cette étude a montré, que la présence d'acide abscissique était nécessaire afin d'activer le facteur de transcription *NST1*, gène impliqué dans la formation des fibres et des parois secondaires (Zhong et Ye, 2014). Plusieurs étapes sont nécessaires à cette activation. Dans un premier temps, des *PP2C* se couplent aux protéines *PYR/PYL/RCAR* via l'acide abscissique, inhibant alors leur activité de phosphatase. Les *PP2C* sont connues pour être des régulateurs de l'activité des *SnRK2*⁴. Ce sont ces *SnRK2* qui vont alors pouvoir activer *NST1* par phosphorylation. Il est également possible que les *SnRK2* régulent d'autres gènes associés à la formation des parois. Il est intéressant de noter qu'un gène

¹ Uridine 5'-diphosphate

² Pyrabactin resistance1 / PYR1-like / regulatory components of aba receptors

³ protéine phosphatases de la famille 2C

⁴ Sucrose nonfermenting-Related Kinase 2

codant pour une PP2C est présent dans les réseaux étudiés : Potri.004G066200 (homologue d'*AtPP2C6*). Ce gène, induit dans les fibres, est directement coexprimé avec les homologues d'*AtVNI2* et *AtANAC075*, inhibiteurs de la différenciation en vaisseaux. Dans son voisinage direct se trouvent également une AP¹ et une MAP². Les AP ont récemment été caractérisées chez le peuplier (Cao et al., 2019). Elles pourraient avoir un rôle clef dans la formation des parois des fibres. En effet, l'AP coexprimé avec l'homologue d'*AtPP2C6*, *PtAP34*, présente les motifs SNBE³ et M46RE⁴ dans sa région promotrice (Cao et al., 2019). Ces motifs sont connus pour être présents en amont de gènes impliqués dans la formation des parois secondaires (Zhong et al., 2010; Kim et al., 2012). La MAP présente ici, *PtMAP65-9*, est l'homologue d'*AtMAP65-3*. Ce gène est connu pour être impliqué dans l'organisation des microtubules lors de la mitose et la cytokinèse (Müller et al., 2004; Caillaud et al., 2008).

Ces différents éléments laissent à penser que l'acide abscissique, par l'intermédiaire de *PtPP2C6* et *PtAITR5*, pourrait jouer un rôle dans la formation du bois et des parois secondaires, notamment de la cellulose et des lignines, en activant/inhibant des facteurs de transcription clefs dans ces processus (e.g. *VNI2*, *XND1* ou *ANAC075*).

5. Les miR165/166 : éléments centraux dans la régulation de la formation du bois ?

L'étude des réseaux de co-expression m'a permis de mettre en évidence des facteurs de transcription ayant potentiellement un rôle central dans la régulation de la formation du bois et/ou des parois secondaires. Parmi eux se trouve les gènes Potri.002G040600, homologue d'*AtCPUORF7* et Potri.006G114200, homologue d'*AtSCR*⁵/*AtSGRI*. *AtCPUORF7* est un facteur de transcription de la famille des bHLH⁶ dont la fonction est encore inconnue. Son paralogue, LONESOME HIGHWAY, est exprimé dans le méristème racinaire et serait impliqué dans les premières étapes du développement xylémien en réponse à l'auxine (Ohashi-Ito et al., 2013). *AtSCR* a été proposé comme gène régulant la coordination spatiale entre division et différenciation cellulaire des racines (Moubayidin et al., 2013). Cette coordination est assurée par la diminution de la perception des cytokinines et la production d'auxine.

¹ Aspartic protease

² Microtubule-associated protein

³ Secondary wall NAC binding element

⁴ MYB46-responsive cis-regulatory element

⁵ SCARECROW

⁶ Basic helix-loop-helix

Parmi les gènes coexprimé avec l'homologue d'*AtCPUORF7* se trouve notamment Potri.010G081300, homologue d'*AtAGO10* (AT5G43810). Ce gène code pour une endonucléase et séquestre miR165/166 afin de réguler leur activité (Zhu et al., 2011a). Il est intéressant de noter que, à l'inverse, la transcription de ces deux miR est induite par *AtSCR* (Carlsbecker et al., 2010). Dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*, la capacité des miR165/166 à être mobile entre les cellules permet alors d'établir un gradient de concentration associé à la structuration du xylème racinaire (Carlsbecker et al., 2010). Par ailleurs, ces deux miR sont des inhibiteurs des gènes *REVOLUTA* et *CORONA* impliqués dans la formation des parois secondaires et le développement du xylème (Du et Wang, 2015). *REVOLUTA* influe majoritairement sur la différenciation cellulaire et le maintien des cellules cambiales (Schrader et al., 2004b). Chez le peuplier, le gène pop*CORONA* est notamment supposé inhiber la formation des parois secondaires des fibres, en particulier leur lignification (Du et al., 2011). Cette inhibition se ferait notamment par la répression de certains facteurs de transcriptions spécifiques des fibres (e.g. *NST1*, *NST2*, *SND1*) impliqués dans la formation des parois secondaires (Du et Wang, 2015). Ainsi, la plus forte expression d'*AGO10* dans les rayons conduirait à une diminution de la quantité de miR165/166 fonctionnels et donc une augmentation de l'activité de *CORONA* et *REVOLUTA*. À l'inverse, l'activité de *REVOLUTA* et *CORONA* se verrait réduite dans les fibres. Cette réduction d'activité se traduirait alors par une augmentation de biosynthèse des parois.

AGO10 et *SCR* auraient alors un rôle essentiel dans la gestion de la temporalité de la formation des parois secondaires, notamment par son rôle dans la régulation de l'activité des miR165/166. Des analyses complémentaires portant notamment sur l'étude du transcriptome de rayons plus avancés dans leur développement permettraient de tester cette hypothèse. Le lien fonctionnel entre *CPUORF7*, *AGO10* et *SCR* serait également à valider, soit par l'étude des régions promotrices de ces gènes, soit par génétique inverse.

6. **WRKY12 : un chef d'orchestre ?**

L'étude de réseau a également permis d'identifier le gène Potri.002G138900. Il fait partie de la famille *WRKY*. Ce gène, près de huit fois plus exprimé dans les rayons, présente une forte homologie de séquence avec *AtWRKY12* (AT2G44745) et *PtrWKRY19* (POPTR_0014s04890) (Yang et al., 2016). Que ce soit chez *Arabidopsis thaliana* ou le peuplier, ces *WRKY* répriment d'autres facteurs de transcription impliqués dans la formation des parois ou des gènes impliqués directement dans la biosynthèse des composés pariétaux (Wang et al., 2010; Yang et al., 2016). *AtWRKY12* est notamment capable de se fixer sur le

promoteur du facteur de transcription *NST2*, impliqué dans la formation des parois secondaires des fibres, inhibant ainsi son expression (Wang et al., 2010).

Parmi les onze gènes directement coexprimés avec Potri.002G138900, il est intéressant de noter que sept d'entre eux sont préférentiellement exprimés dans les fibres et négativement corrélés à l'expression de ce facteur de transcription. Parmi eux, on retrouve notamment une glutathionne S-transférase (Potri.015G042000, homologue d'*AtGSTU4*), une cellulose synthase-like (Potri.008G026400, homologue d'*AtCSLA9*) et un gène impliqué dans la régulation du métabolisme des brassinostéroïdes (Potri.002G147700, homologue d'*AtBEN1*). *AtGSTU4* est un gène impliqué dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène et la sénescence (Balazadeh et al., 2011). *AtCSLA9* est impliqué dans la synthèse des glucomannanes (Goubet et al., 2009). Ce gène est par ailleurs directement régulé par *AtMYB46* (Kim et al., 2014b, 2014a), dont l'expression est, en partie, induite par *NST2*. Le lien entre *WRKY12* et *CSLA9* pourrait donc être fait par une cascade de régulation indirecte. Enfin, *AtBEN1* serait impliqué dans la régulation de la synthèse des brassinostéroïdes (Yuan et al., 2007). En effet, sa surexpression chez *Arabidopsis thaliana* conduit à une augmentation de l'expression de gènes de synthèse des brassinostéroïdes. Les brassinostéroïdes jouent un rôle clef dans la synthèse des composés pariétaux, notamment la cellulose (Xie et al., 2011; Sun et al., 2015). *AtBEN1* pourrait donc avoir un rôle de régulateur de la formation des parois.

Parmi les gènes positivement coexprimés avec l'homologue d'*AtWRKY12*, on retrouve notamment un gène de la famille des TBL (Potri.002G054400, homologue d'*AtTBL11*). La fonction des gènes TBL est encore peu connue. Certains gènes de cette famille, comme *TBL29*, jouent un rôle dans l'acétylation des xylanes, essentielle à l'intégrité des parois (Xiong et al., 2013). Deux autres gènes de cette famille, *TBR* et *TBL3*, sont, eux, impliqués dans la régulation de l'activité des PME, enzymes modifiant la structure des pectines (Bischoff et al., 2010). Ces deux protéines pourraient ne pas avoir de fonction catalytique. Elles ne feraient alors que se lier aux pectines, empêchant l'accessibilité de celles-ci aux PME. Dans ce cas, les TBL empêcheraient la dé-estérification des homogalacturonanes permettant alors la croissance intrusive des fibres (Siedlecka et al., 2008). Enfin, les protéines TBL pourraient également servir de pont entre les pectines et d'autres composés pariétaux (Bischoff et al., 2010). Au vu de ces hypothèses, il est probable que *TBL11* ait un rôle clef dans l'architecture et l'intégrité des parois végétales.

La relation établie entre *WRKY12* et *NST2*, facteur de transcription induit dans les fibres, son implication dans la voie de biosynthèse des composés pariétaux ainsi que les

éléments apportés par les gènes coexprimés avec lui sont autant d'éléments qui nous laissent à penser que *WRKY12* joue un rôle central dans la xylogénèse, la programmation de la mort cellulaire et la formation des parois secondaires.

IV. Conclusions

L'étude réalisée ici a permis d'identifier trois acteurs (l'acide abscissique, les miR165/166 et *WRKY12*) qui semblent avoir un rôle majeur dans la formation du bois et la mise en place des parois secondaires. Les mécanismes proposés ont été identifiés par l'étude de trois échantillons de rayons et de fibres. Afin d'éprouver la robustesse des hypothèses soulevées, il serait nécessaire d'observer la conservation des DEG identifiés et des réseaux établis dans la comparaison des fibres et rayons d'autres types de bois (*e.g.* bois de tension ou bois opposé) ou d'autres espèces de feuillus (*e.g.* eucalyptus ou chêne). Afin d'éprouver les hypothèses soulevées concernant la division cellulaire et la mort cellulaire programmée, il est nécessaire de prendre en considération la cinétique de différenciation cellulaire. Le développement récent du séquençage d'ARN sur cellule isolée ou noyau isolé (sc/snRNAseq) est une des méthodes qui le permettrait (*cf.* [épilogue](#)). De même, des études complémentaires, notamment par génétique réverse, restent nécessaires, d'une part, pour valider l'implication de *WRKY12* et des miR165/166 identifiés dans les différents mécanismes de formation du bois et, d'autre part, pour valider les hypothèses émises concernant l'implication du transporteur ABCB11 dans la lignification.

CHAPITRE III

Caractérisations physiologique, anatomique et physico-chimique de lignées transgéniques

L'étude de lignées transgéniques ou de mutants permet de comprendre la fonction des gènes *in planta*. L'unité dans laquelle j'ai réalisé ma thèse dispose d'une grande collection de peupliers dont l'expression de gènes impliqués, ou potentiellement impliqués, dans la formation des parois ou du bois a été altérée. Afin de sélectionner les lignées les plus pertinentes pour étudier la formation des parois secondaires des fibres de bois, j'ai, dans un premier temps, réalisé une analyse de la composition du bois de la collection de peuplier transgéniques par spectroscopie ATR-FTIR. Une analyse en composante principale couplée à une classification sur composantes principales m'a permis d'identifier dix-sept lignées dont les spectres d'absorbance diffèrent grandement de la lignée sauvage. Ces lignées ont, pour partie, été précédemment étudiées au niveau général (*e.g.* caractéristiques de croissance) et du tissu bois (*e.g.* anatomie du bois, étude grossière de la distribution des composés pariétaux, notamment des lignines, par coloration histologique). Ces observations m'ont alors permis de sélectionner trois lignées : $CAD^- \cdot CCR^- \cdot F5H^+$, CCR^- et $MYB156^+$. Le bois de ces lignées présente (i) des différences de composition chimique au vu de leurs spectres d'absorbance, (ii) une modification de son anatomie et (iii) des différences de composition des parois de certains types cellulaires. Les gènes *CAD* et *CCR* codent pour des enzymes impliquées dans les dernières étapes de la biosynthèse des monolignols. Des peupliers sous-exprimant le gène *CADI* montrent une réduction de 10% de leur teneur en lignines et une modification de leur qualité (Van Acker et al., 2017; Özpırcu et al., 2018). En effet, les lignines de ces peupliers présentent une forte incorporation d'aldéhyde et de dérivées d'hydroxycinnamate comme l'acide férulique ainsi qu'une diminution relative de la teneur en unité G. Des peupliers déficients en *CCR* présentent également une diminution de la teneur en lignine (Lepié et al., 2007; Van Acker et al., 2014b). La qualité des lignines est encore une fois impactée par la transformation. En effet, l'incorporation d'acides féruliques et sinapiques a été observée. La sous-expression de la *CCR* dans les lignées CCR^- et $CAD^- \cdot CCR^- \cdot F5H^+$, lignée dans laquelle la l'expression de la *CAD* a également été diminuée, devrait donc conduire à une modification de la qualité des lignines. Cette modification devrait être d'autant plus marquée dans la lignée $CAD^- \cdot CCR^- \cdot F5H^+$ qu'un autre gène impliqué dans la formation des lignines a été ciblé : la *F5H*. Ce gène est nécessaire à la production de monolignols de type S. En effet, on observe, chez des peuplier surexprimant la *F5H*, une augmentation de la quantité d'unité S et une légère diminution de la quantité totale de lignines (Franke et al., 2000). Ainsi, sa sur-expression dans la lignée $CAD^- \cdot CCR^- \cdot F5H^+$ devrait impacter la qualité des lignines avec, notamment, une augmentation des lignines de type S. Enfin, le gène *MYB156* code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de

la biosynthèse des parois (Lakhal, 2013). Bien que des peupliers sur-exprimant le gène MYB156 aient montré une diminution de l'expression de gènes associés à la formation des lignines et des polysaccharides pariétaux (Lakhal, 2013 ; Yang et al, 2017), les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation n'ont, jusqu'à présent, pas été totalement élucidés. Dans ce chapitre, je m'attacherai donc à une caractérisation plus fine, à l'échelle cellulaire, de ces trois lignées transgéniques :

Ce chapitre sera consacré à la caractérisation à l'échelle cellulaire des lignées CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺, CCR⁻ et MYB156⁺. Cette caractérisation passera (i) par l'étude de leur cinétique de croissance, (ii) par l'analyse de l'anatomie de leur bois et (iii) par l'identification des différences de composition physico-chimique des parois de leurs fibres et de leurs vaisseaux.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Les lignées transgéniques étudiées ont été produites dans le cadre de différents projets suivant le protocole décrit par Leplé et ses collaborateurs (1992) sur le clone INRA 717-1B4. Les trois lignées sélectionnées et la lignée sauvage ont été multipliées végétativement *in vitro* le 18 décembre 2018 et cultivées sept semaines sur milieu Murashige & Skoog en chambre de culture (STRADER, Verrières-en-Anjou, France), à 24°C et 17%HR avec un cycle jour-nuit de 16h-8h. Les plants multipliés ont alors été acclimatés le 11 février 2019 durant trois semaines dans une mini-serre désinfectée munie d'une nappe de drainage stérile. Brièvement, ils sont extraits délicatement de leur milieu puis installés dans des pots biodégradables contenant un substrat préalablement stérilisé (TS 3 FINE, KLASMANN-DEILMANN, Brème, Allemagne) auquel ont été ajouté 8 g/L de charbon actif (C4386, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA) et 2 g/L d'Osmocote Exact Standard (ISRAEL CHEMICALS, Tel-Aviv, Israël). Ils sont alors installés en mini-serre close et à hygrométrie saturée pendant une semaine. La porte de la mini-serre est alors ouverte progressivement la deuxième semaine tandis que, en troisième semaine le toit de la mini-serre est complètement retiré. Les plants ainsi acclimatés ont ensuite été empotés le 4 mars 2019 en pot rosier de 10 L dans le même substrat, sans charbon actif cette fois-ci, pour trois mois. Leur emplacement en serre s'est fait suivant une randomisation totale (fig. 27A). Afin d'éviter l'apparition de bois de tension, les plants ont été tuteurés et maintenus droits après un mois de culture grâce à un dispositif (fig. 27B) créé à ma demande par Jacky Despras et Jonathan Riant (UE0995 GBFor, INRAE Val de Loire). Cultivés en serre à hygrométrie et température contrôlée (44 %HR, 21°C), les plants ont été complémentés si

besoin en lumière afin d’atteindre une durée de jour de minimum 10 h. Ils ont également été arrosés au goutte à goutte avec une solution nutritive (Universol Blue 323, ISRAEL CHEMICALS, Tel-Aviv, Israël – concentration finale : 1.5g/L) à raison de 10 min/h. Afin de maximiser la croissance de la tige principale, les tiges axillaires ont été ôtées. Chaque semaine, j’ai réalisé des mesures de croissance en hauteur à compter de la date d’empotage. J’ai également suivi la croissance en diamètre de la tige principale à 10 cm de la base après un mois de culture. Le 6 juin 2019 ont été échantillonnés 30 cm de tige prélevés à la base pour des analyses histologiques et microphénotypiques, stockés par la suite à -20°C jusqu’à utilisation.

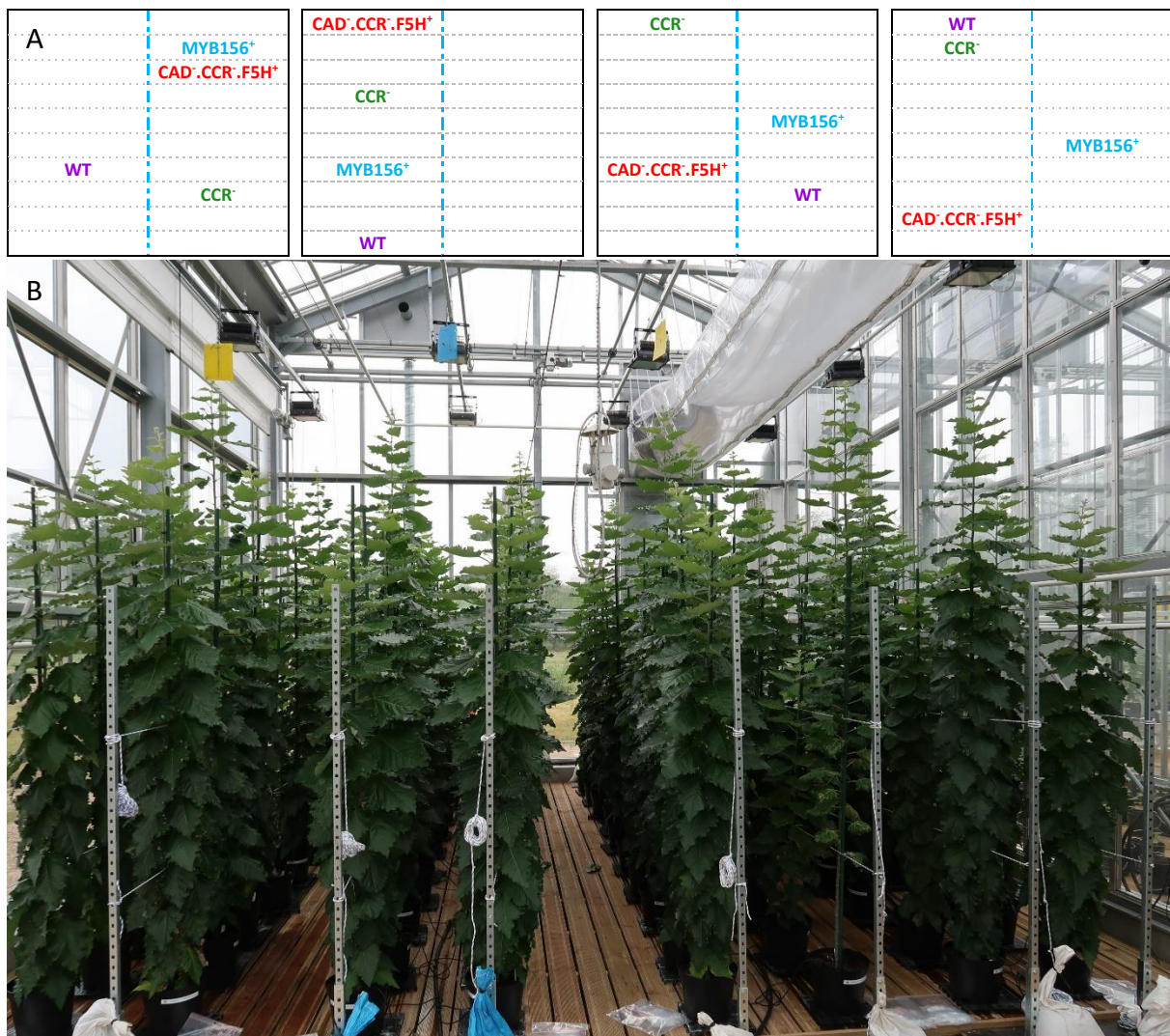


Figure 27 Dispositif expérimental du printemps 2019.

(A) Position des quatre lignées étudiées dans le dispositif expérimental du printemps 2019. (B) Image de la serre après deux mois de culture.

Chaque rectangle représente un bloc. Les lignes bleues verticales représentent le système d’arrosage.

2. Caractérisation histologique

Afin de caractériser la structure anatomique du bois des différentes lignées transgéniques, je me suis attaché à leur analyse histologique. Pour ce faire, j'ai réalisé des coupes transversales de 30 μm à l'aide du microtome rotatif RM2155 (LEICA, Wetzkar, Allemagne). Ces coupes ont ensuite été colorées au bleu Alcian (A3157, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA) et à la safranine (S2255, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA). Le bleu Alcian colore les polysaccharides, notamment la cellulose et les pectines et la safranine principalement les lignines. Ainsi, cette coloration fera apparaître en rouge les tissus fortement lignifiés et en bleu les tissus qui le sont moins. Le protocole de coloration est dérivé de celui décrit par Tolivia et Tolivia (1987). Brièvement, après lyse des contenus cellulaires (6 minutes dans un bain de javel à 2.4%), les coupes sont déshydratées progressivement à l'éthanol puis baignées 3.5 min dans de la safranine 1% (w/v), rincées à l'éthanol absolu, et enfin baignées 6 min dans du bleu Alcian 1% (w/v). Après un dernier rinçage à l'éthanol absolu, elles sont finalement montées entre lame et lamelle dans du baume du Canada (C1795, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA).

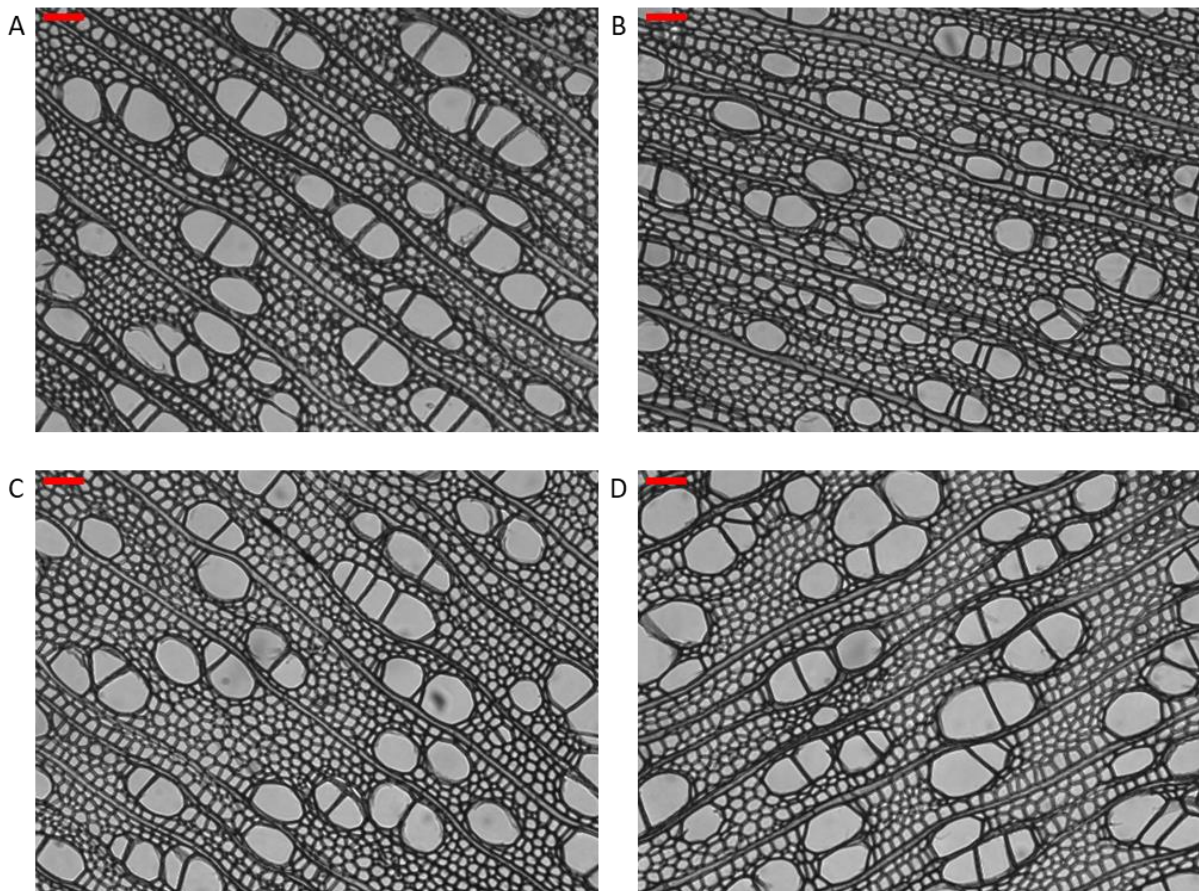


Figure 28 Images photoniques des quatre lignées étudiées.
Barre rouge : 50 μm . (A) WT, (B) *CAD::CCR::F5H⁺*, (C) *CCR*, (D) *MYB156⁺*.

Trois images par coupe colorée à environ 400 μm du cambium ont ensuite été réalisées à l'aide de l'objectif 20x du microscope inversé IX73 (OLYMPUS, Rungis, France) équipé d'une caméra XM10 monochrome. Les images noires et blanches (**fig. 28**) obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel FIJI (Schindelin et al., 2012). Le prétraitement des images réside principalement en l'application d'un filtre médian à cinq pixels et un seuillage à une borne. Afin de détecter automatiquement les différents types cellulaires, j'ai défini des seuils d'aire et de circularité. La circularité est calculée avec la formule suivante : $c = 4\pi \frac{A}{P^2}$ où c est la circularité, A l'aire du lumen et P le périmètre du lumen. Ainsi, les fibres sont définies comme ayant une aire de 8 à 200 μm^2 et une circularité allant de 0.4 à 1. Les vaisseaux présentent la même circularité mais une aire supérieure à 200 μm^2 . Enfin, les rayons sont caractérisés par une aire supérieure à 8 μm^2 et une circularité inférieure à 0.4. Ce traitement m'a permis d'obtenir des données pour vingt-deux paramètres anatomiques clés de l'anatomie du bois telles que la proportion de lumen (et donc de paroi), le nombre de cellules appartenant à chaque type cellulaire (et leur ratio par rapport au nombre total de cellules) ainsi que le périmètre moyen et la circularité moyenne de chaque type de cellule.

3. Microspectroscopie ATR-FTIR

La préparation des échantillons pour l'imagerie ATR-FTIR a été réalisée comme décrit précédemment (**Chapitre I** ; Cuello et al., 2020). Brièvement, j'ai réalisé une coupe de 20 μm séchée à l'éthanol entre deux lames par échantillon que j'ai ensuite placées dans l'imageur Spotlight 400 (PERKIN ELMER, Wellesley, USA). Trois images de 100 μm de côté par échantillon ont alors été acquises à une résolution spectrale de 4 cm^{-1} à raison de 16 scans par pixel. Les images obtenues ont ensuite été segmentées à l'aide de l'outil *PixelAnnotation* présenté précédemment (**Chapitre I**) afin d'assurer une bonne segmentation. J'ai ensuite réalisé une identification des DAWNs aux maxima locaux basée sur un test de rang : le test de Wilcoxon. L'assignation des DAWNs aux composés a été réalisée à l'aide de la **table S1**.

4. Analyses statistiques

Afin d'identifier les paramètres physiologiques et anatomiques significativement impactés dans les lignées transgéniques, j'ai réalisé une ANOVA de Kruskal-Wallis implémenté dans le package PMCMR (v. 4.3; Pohlert, 2014) avec le modèle suivant $y = \mu + L + \varepsilon$ où y représente la valeur réelle du paramètre pour un échantillon donné, μ la moyenne de ce paramètre sur l'ensemble de la population, L l'effet de la lignée sur le paramètre et ε la résiduelle. L'ANOVA de Kruskal-Wallis permet de déterminer si les échantillons proviennent

d'une même population ou si au moins un groupe d'échantillons (ici une lignée) s'en distingue. Lorsqu'au moins une lignée se distingue, on parle alors d'effet 'lignée' significatif. J'ai ensuite réalisé, pour les variables présentant un effet 'lignée' significatif, un test post-hoc de Conover lui aussi implémenté dans le package PMCMR. Ce test a pour objectif d'identifier la ou les lignées significativement différentes de la lignée sauvage. Les variables présentant un effet 'lignée' significatif ont ensuite été combinées. Trois analyses ont été menées sur ce jeu de données regroupant les variables physiologiques et anatomiques. Dans un premier temps, j'ai réalisé une analyse de corrélation entre les différentes variables à l'aide de la fonction `ChartCorrelation` implémentée dans le package `PerformanceAnalytics` (v. 2.0.4; Peterson et Carl, 2020). Afin d'identifier les lignées les plus contrastées par rapport à la lignée sauvage, j'ai également réalisé une analyse en composante principale (ACP) suivi d'une segmentation hiérarchique sur composante principale (HCPC). Ces analyses ont été menées à l'aide du package `FactoMineR` (v.2.4; Lê et al., 2008). Les représentations ont été réalisées à l'aide des fonctions implémentées dans le package `factoextra` (v. 1.0.7; Kassambara et Mundt, 2020). L'ensemble des analyses statistiques ont été menées sous R (v. 3.6.3; R Core Team, 2020).

II. Résultats

1. Descriptions anatomique et physiologique des quatre lignées après 3 mois de culture

1.1. Physiologie de croissance

Afin d'étudier l'impact de la transgénèse sur la physiologie de l'arbre, j'ai analysé la cinétique des croissances primaire et secondaire des quatre lignées en quatre réplicats biologiques. Alors que les courbes cinétiques semblent relativement homogènes au sein des lignées, deux plants de la lignée sauvage présentent une croissance anormale, tant en hauteur qu'en diamètre (**fig. 29**). Ces échantillons ont donc été ôtés pour la suite des analyses. On observe alors des différences importantes entre les trois lignées transgéniques et la lignée sauvage. La lignée MYB156⁺ présente des croissances secondaire et primaire accrues par rapport à la lignée sauvage. Cette augmentation de croissance apparaît significative après un mois de culture pour la croissance primaire et un mois et demi pour la croissance secondaire (**Table 4**). La différence avec la lignée sauvage n'a de cesse d'augmenter au cours de la période de croissance analysée. Des résultats similaires sont obtenus avec la lignée CCR⁻, les différences en croissance secondaire apparaissant cette fois-ci en même temps que les différences de croissance primaire (**Table 4**). Enfin, la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente une

diminution de la croissance primaire par rapport à la lignée sauvage, sans impact significatif sur sa croissance secondaire. Ce retard de croissance semble cependant avoir lieu plus tardivement dans la saison de croissance, après deux mois (Table 4). Par ailleurs, il est possible que l'absence de différence significative au niveau de la croissance secondaire soit due à un échantillon de la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présentant un diamètre supérieur à la lignée témoin.

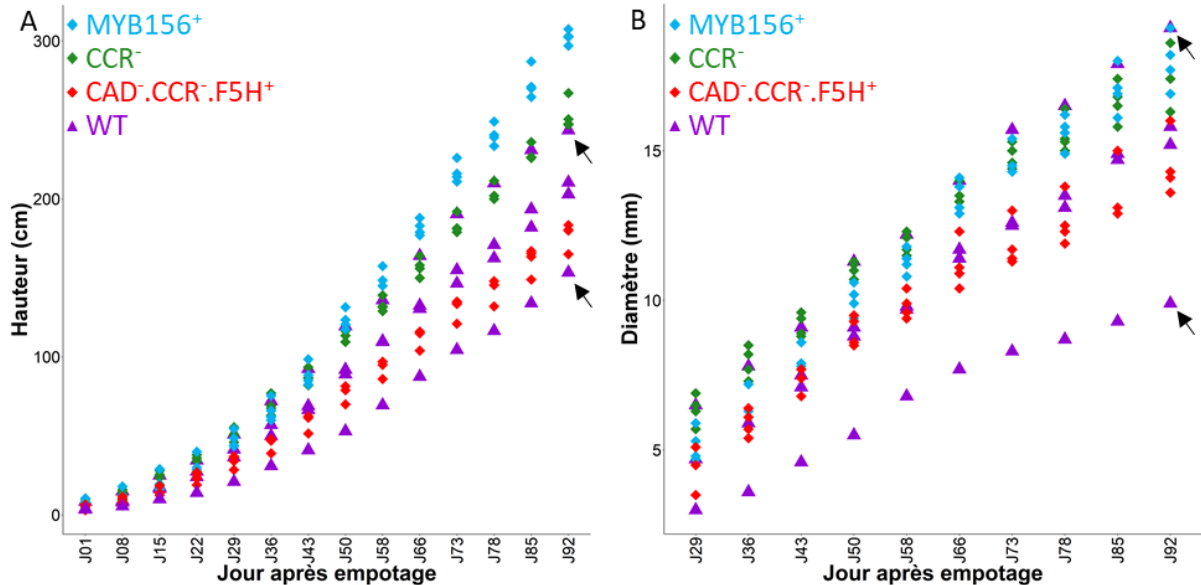


Figure 29 Cinétique de croissance primaire (A) et secondaire (B) des quatre lignées étudiées. Chaque point représente un réplica biologique. Flèches noires : échantillons aberrants.

Table 4 Évolution de la significativité de l'effet lignée et des différences entre chacune des trois lignées transgéniques et la lignée sauvage pour la croissance en hauteur et en diamètre.

	Hauteur				Diamètre			
	EL (1)	CAD ⁻ . CCR ⁻ . F5H ⁺ (\$))	CCR ⁻ (\$))	MYB156 ⁺ (\$))	EL (1)	CAD ⁻ . CCR ⁻ . F5H ⁺ (\$))	CCR ⁻ (\$))	MYB156 ⁺ (\$))
J01	0.11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
J08	0.09	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
J15	0.18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
J22	0.03*	0.47	0.03*	0.1	NA	NA	NA	NA
J29	0.02*	0.33	0.005**	0.03*	0.03*	0.8	0.006**	0.2
J36	0.01*	0.11	0.006**	0.04*	0.03*	1	0.006**	0.3
J43	0.02*	0.14	0.03*	0.02*	0.01*	1	7.10 ^{-5***}	0.005**
J50	0.009**	0.06	0.03*	7.10 ^{-4***}	0.01*	0.9	3.10 ^{-4***}	0.01*
J58	0.007**	0.02*	0.02*	5.10 ^{-5***}	0.01*	1	7.10 ^{-4***}	0.01*
J66	0.007**	0.02*	0.02*	6.10 ^{-5***}	0.02*	0.48	0.01*	0.02*
J73	0.007**	0.02*	0.02*	7.10 ^{-5***}	0.02*	0.48	0.02*	0.01*
J78	0.007**	0.02*	0.02*	5.10 ^{-5***}	0.02*	0.48	0.02*	0.01*
J85	0.007**	0.02*	0.02*	6.10 ^{-5***}	0.02*	0.46	0.02*	0.006**
J92	0.007**	0.02*	0.02*	7.10 ^{-4***}	0.02*	0.47	0.02*	0.008**

(1) effet lignée, (\$) comparaison à la lignée sauvage, 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*' 1, NA : non applicable.

1.2. Anatomie

Afin d'étudier les différences anatomiques induites par la transgénèse, j'ai analysé vingt-deux caractéristiques, allant de l'anatomie générale (*e.g.* proportion de paroi, nombre de cellules) aux caractéristiques propres de chaque type cellulaire (*e.g.* diamètre moyen, proportion, circularité). Je me suis focalisé ici sur l'analyse des types cellulaires présents dans le plan transversal (fibres et vaisseaux). J'ai alors pu identifier un effet lignée significatif pour l'ensemble des caractères étudiés (**Table S2**) à l'exception de la proportion de fibres (*p*-valeur de 0.08, **fig. 30B**) et du nombre de vaisseaux (*p*-valeur de 0.07, **fig. 31A**).

1.2.1. Anatomie de la lignée CCR⁻

La lignée CCR⁻ est celle qui présente le moins de différences significatives au niveau anatomique avec la lignée sauvage. Au niveau général, on note une augmentation du périmètre moyen des cellules, de l'aire et de la proportion de lumen (**fig. 30B-E**). A l'inverse, on observe une diminution de la proportion et de l'aire de paroi (**fig. 30A**). Les fibres présentent un diamètre moyen, un périmètre et une proportion plus grande dans la lignée CCR⁻ que dans la lignée sauvage (**fig. 31B-E**). Aucune différence significative n'a pu être relevée au niveau de l'anatomie des vaisseaux (**Table 4, fig. 32**).

1.2.2. Anatomie de la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺

Au niveau général, la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente des différences significatives pour le nombre de cellules, leur diamètre, périmètre et circularité moyens (**Table 4, fig. 30C-F**). Ainsi, cette lignée présente un nombre supérieur de cellules (**fig. 30C**) avec un périmètre moyen plus important. En revanche, leur circularité et diamètre moyen se trouve réduits. De telles caractéristiques sont caractéristiques de cellules ovales très allongées. L'ensemble des caractéristiques des fibres a été impacté (**Table S2**). Ainsi, la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente un plus grand nombre de fibres avec un diamètre et un périmètre moyen plus élevé (**fig. 31A,D,E**). En revanche, leur circularité s'en trouve diminué (**fig. 31F**). La proportion et la circularité moyenne des vaisseaux semblent ne pas avoir été impactées. En revanche, l'aire, le périmètre et diamètre moyen de ces cellules sont diminués dans la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ par rapport à la lignée sauvage.

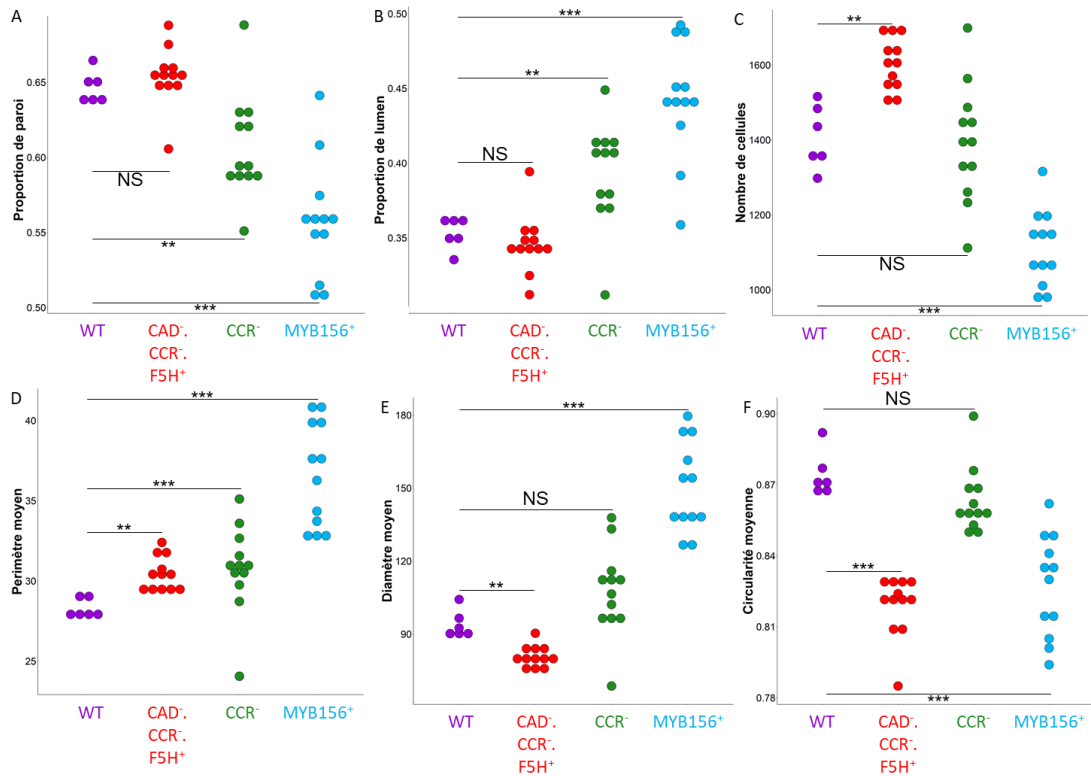


Figure 30 Caractéristiques anatomiques générales des quatre lignées étudiées.
*Significativité : 0 ****0.001 ***0.01 **0.05 NS' 1*

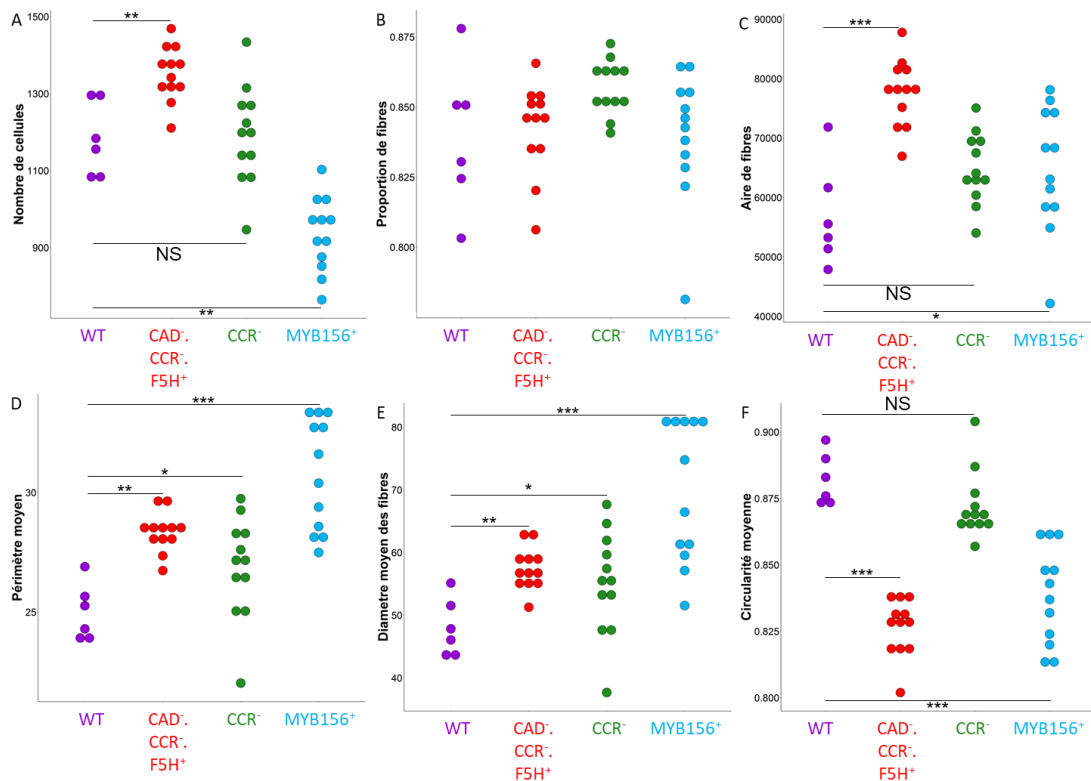


Figure 31 Caractéristiques anatomiques des fibres des quatre lignées étudiées.
*Significativité : 0 ****0.001 ***0.01 **0.05 NS' 1*

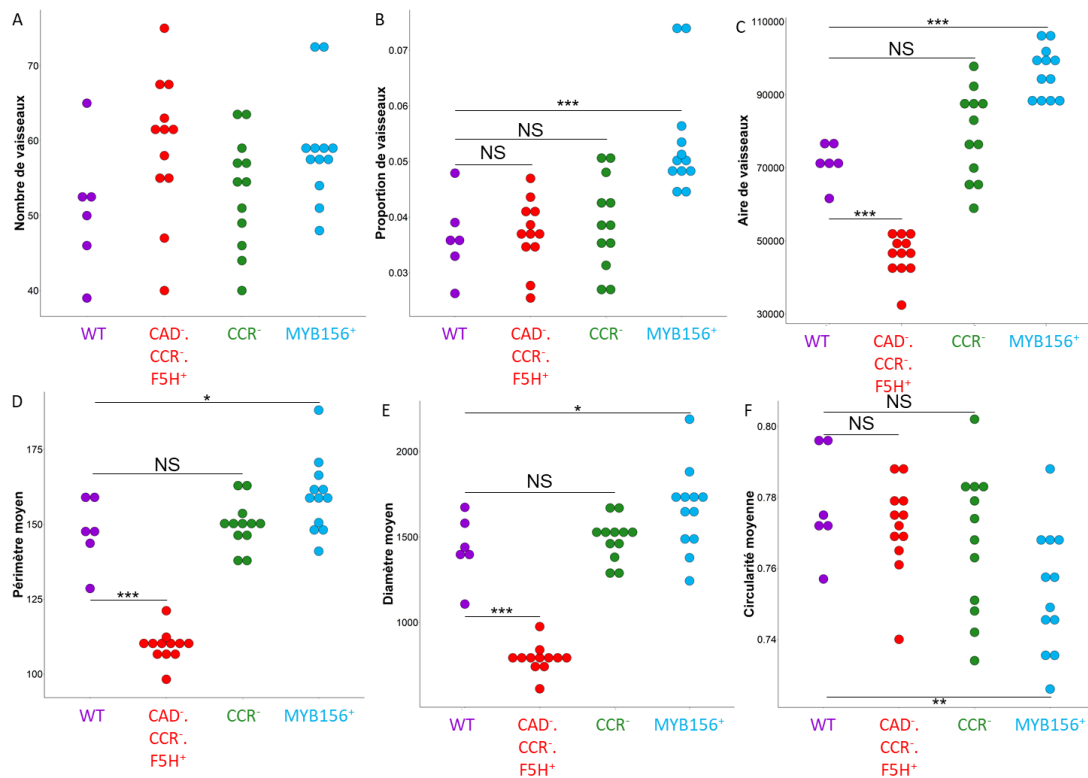


Figure 32 Caractéristiques anatomiques des vaisseaux des quatre lignées étudiées.
Significativité : 0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 'NS' 1

1.2.3. Anatomie de la lignée MYB156⁺

La lignée MYB156⁺ est, elle, significativement différente de la lignée sauvage pour l'ensemble des caractères présentant un effet lignée significatif. On observe notamment, au niveau général, une diminution du nombre de cellules (**fig. 30B**) et de leur circularité moyenne ainsi que de la proportion de paroi (**fig. 30A**). Le diamètre et périmètre moyen ainsi que la proportion de lumen sont, eux, augmentés. Les fibres, moins nombreuses que dans la lignée sauvage, présentent une augmentation de leur diamètre (**fig. 30D**) et périmètre moyen et une diminution de leur circularité moyenne. Enfin, les vaisseaux, plus denses que dans la lignée sauvage, présentent les mêmes variations que les fibres.

1.3. Identification des paramètres les plus discriminants

Afin d'identifier les paramètres discriminant le plus les lignées transgéniques de la lignée sauvage, j'ai réalisé une analyse en composantes principales suivie d'une classification hiérarchique sur composantes principales (**fig. 33**). Le premier axe, expliquant 63.5% de la variance, permet de séparer les lignées MYB156⁺ et CCR⁻ des lignées CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ et WT. Cette séparation est principalement réalisée par le diamètre et la hauteur finale d'une part et la proportion de paroi et le nombre de cellules d'autre part. Les caractéristiques anatomiques des fibres sont quant à elles représentées dans le deuxième axe de l'ACP, expliquant 17.4% de la

variance. On retrouve notamment la circularité des fibres d'une part et le diamètre moyen et la proportion d'aire de fibres d'autre part. Cet axe permet de distinguer les lignées CCR⁻ et WT des lignées CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ et MYB156⁺. On notera toute de même une grande variabilité des lignées CCR⁻ et MYB156⁺ sur cet axe. La classification hiérarchique sur composante principale permet d'identifier quatre groupes (fig. 33). Parmi eux, trois groupes sont composés uniquement des individus d'une même lignée : CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ (C1), WT (C2) ou MYB156⁺ (C4). Le groupe C3 comporte tous les individus CCR⁻ et quelques individus MYB156⁺. Ce mélange peut s'expliquer par la grande dispersion des individus observés notamment sur le deuxième axe de l'ACP.

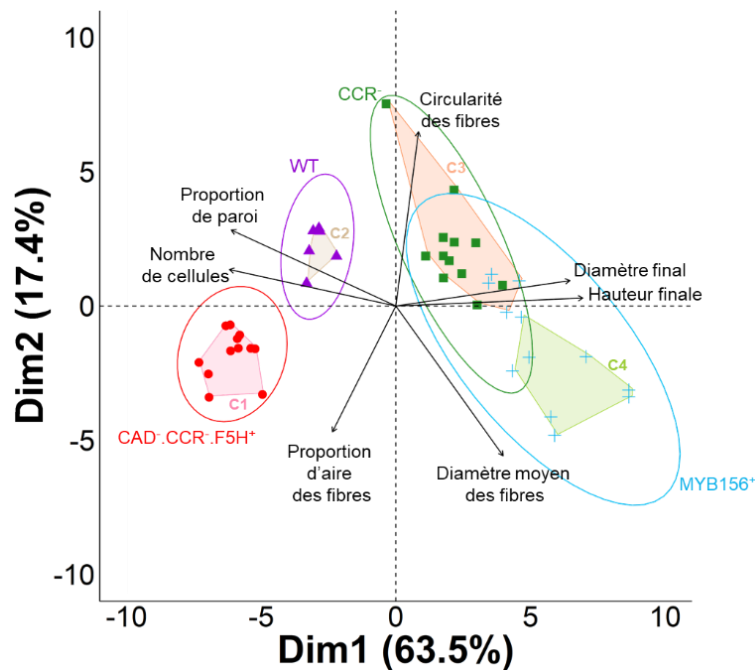


Figure 33 Projection des individus, de variables sélectionnées et des groupes obtenus par HCPC sur les deux premières composantes de l'ACP

Chaque point représente une image. C1-4 : groupes issus de la segmentation par HCPC. Les ellipses représentent 90% des individus dans le cas d'une distribution normale.

1.4. Quel lien entre anatomie et croissance ?

Une étude des corrélations entre données anatomiques et phénotypiques m'a permis d'identifier de potentielles relations fines entre anatomie du bois et croissance de l'arbre (fig. 34). On observe dans un premier temps une forte corrélation ($pcc^1 = 0.85$, p -valeur < 0.001) entre croissance primaire et secondaire sur les quatre lignées étudiées. Il ne semble donc pas qu'il y a de compromis entre croissance primaire et secondaire. Ces deux paramètres de croissance sont positivement corrélés au diamètre moyen des cellules ($pcc = 0.85$ [hauteur], $pcc = 0.73$ [Diamètre], p -valeur < 0.001) et à l'aire de vaisseaux ($pcc = 0.88$ [hauteur], $pcc = 0.72$

¹ Coefficient de corrélation de Pearson

[Diamètre], p -valeur < 0.001). À l'inverse, le nombre total de cellules ($pcc = -0.82$ [hauteur], $pcc = -0.74$ [Diamètre], p -valeur < 0.001) et la proportion de paroi ($pcc = -0.77$ [hauteur], $pcc = 0.63$ [Diamètre], p -valeur < 0.001) sont négativement corrélés à la hauteur et au diamètre final. Il semblerait donc que, à temps de culture équivalent, un arbre plus grand présente un diamètre plus important et un bois moins dense avec globalement moins de cellules, plus larges et plus de cellules de vaisseaux.

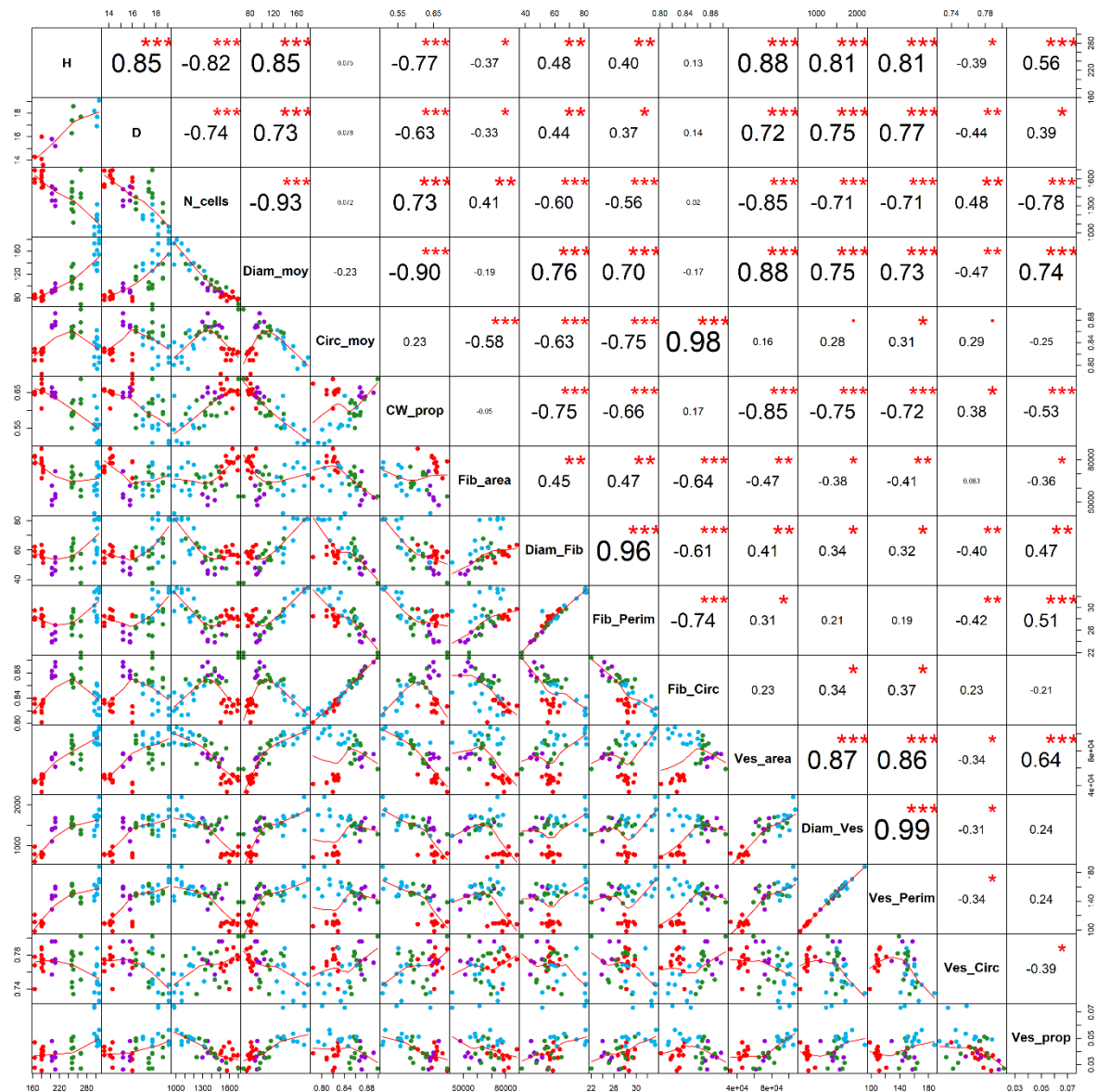


Figure 34 Graphique des corrélations entre les différents paramètres anatomiques, la hauteur et le diamètre final

Diagonale : paramètre, triangle du haut : coefficient de corrélation et significativité de la corrélation (0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '1'), triangle du bas : diagramme de dispersion avec courbe ajustée (rouge). Chaque point représente une image. Rouge : CAD.CCR.F5H⁺, vert : CCR, bleu : MYB156⁺, violet : WT.

H : hauteur finale, D : Diamètre final, N_cells : nombre total de cellules, Diam_moy : diamètre moyen des cellules, Circ_moy : circularité moyenne des cellules, CW_prop : proportion de paroi, Fib_area : aire de fibres, Diam_Fib : diamètre moyen des fibres, Fib_Perim : périmètre moyen des fibres, Fib_circ : circularité moyenne des fibres, Ves_area : aire de vaisseaux, Diam_Ves : diamètre moyen des vaisseaux, Ves_Perim : périmètre moyen des vaisseaux, Ves_circ : circularité moyenne des vaisseaux, Ves_prop : proportion de vaisseaux.

Par ailleurs, on observe une forte corrélation entre la proportion de paroi et le nombre total de cellules ($pcc = 0.73$, p -valeur < 0.001). La proportion de paroi est en revanche négativement corrélée au diamètre moyen des fibres ($pcc = -0.75$, p -valeur < 0.001) et à l'aire de vaisseaux ($pcc = -0.85$, p -valeur < 0.001). Étonnamment, il n'existe pas de corrélation entre aire de fibres et proportion de paroi ($pcc = -0.05$, p -valeur > 0.05). Enfin, on observe une corrélation négative forte entre diamètre moyen des fibres et circularité des fibres ($pcc = -0.61$, p -valeur < 0.001). La circularité des fibres est par ailleurs la plus corrélée à la circularité moyenne des cellules ($pcc = 0.98$, p -valeur < 0.001). Cela peut s'expliquer par la forte proportion de fibres dans le bois. Il est également intéressant de noter la faible corrélation existante entre les paramètres anatomiques des fibres et des vaisseaux, laissant suggérer des mécanismes de différenciation différents.

2. Identification des modifications des propriétés physico-chimiques des parois des trois lignées transgéniques sélectionnées.

Afin d'analyser les différences de composition des parois entre les lignées transgéniques et la lignée sauvage, j'ai réalisé une analyse par microscopie ATR-FTIR. Cette analyse ayant été réalisée dans le plan transversal, je n'ai analysé que la composition des parois de fibres et vaisseaux.

2.1. Modifications de la composition des parois de fibres

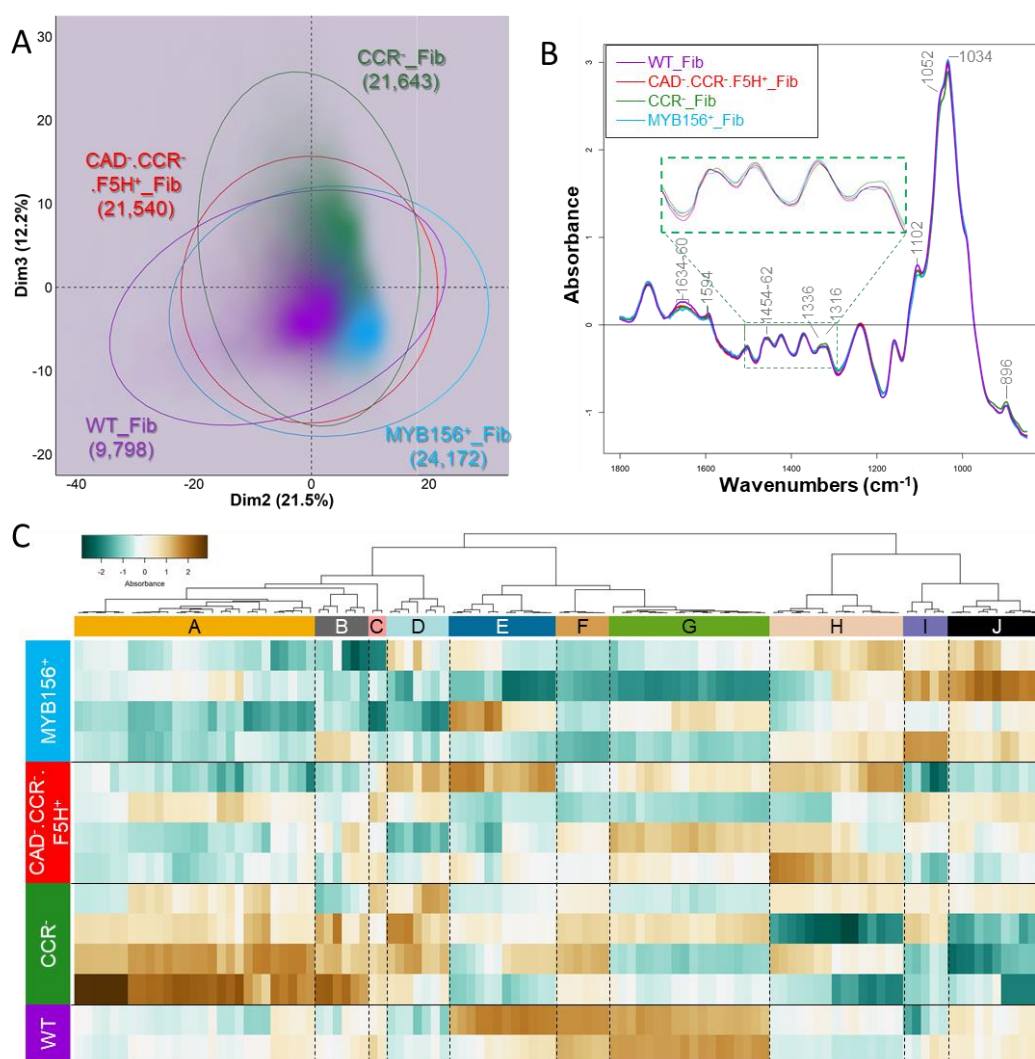
Une analyse en composantes principales menée sur les spectres de fibres des quatre lignées permet de distinguer légèrement les lignées MYB156⁺ et CCR⁻ des deux autres sur le plan représentant la deuxième et troisième composantes expliquant respectivement 21.5% et 12.2% de la variance (**fig. 35A**). Le premier axe, expliquant 34.3% de la variance, ne permet pas de discriminer les individus (**fig. S3**).

L'analyse des spectres moyens pour les quatre lignées ne laisse entrevoir que de faibles différences. En effet, les quatre lignées semblent présenter des spectres relativement similaires. On peut toutefois noter quelques différences marquantes. Ainsi, la lignée MYB156⁺ présente une diminution forte de l'absorbance à 1594¹ et 1102 cm⁻¹ ainsi que l'apparition d'une double bande marquée à 1660-34² cm⁻¹, là où les autres lignées ne semblent présenter qu'une seule bande d'absorbance (**fig. 35B**). Il semble donc que cette lignée présente une modification des lignines au niveau des fibres. Cette observation va dans le sens des observations anatomiques réalisées. En effet, on observe, en imagerie photonique couleur après coloration au bleu Alcian

¹ vibration du squelette aromatique des lignines (Faix, 1991)

² C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones (Faix, 1991)

– safranine, un défaut de coloration rouge (teinte prise par les lignines) au niveau des fibres et de certains rayons de la lignées MYB156⁺, et plus particulièrement au niveau de leur paroi secondaire (fig. 36). La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente un profil infrarouge très proche de la lignée sauvage (fig. 35B). On notera tout de même une diminution de l'absorbance de la bande 1660-34¹ cm⁻¹, synonyme ici encore d'une modification des lignines. Cette même bande diminue également dans la lignée CCR⁻. Cette lignée est également marquée par la diminution des bandes 1052² et 1034³ cm⁻¹, l'augmentation de l'absorbance aux bandes 1336⁴, 1316⁵ et 896⁶ cm⁻¹ ainsi que l'apparition d'une double bande bien marquée à 1462-54⁷ cm⁻¹ (fig. 35B). Il semble alors que cette lignée présente une diminution de la quantité de lignines et une augmentation de la cristallinité de la cellulose.



¹ C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones (Faix, 1991)

² C–O valence vibration, mainly from C3–O3H / C=O stretching vibration ; C=O stretching vibration (Harrington et al, 1964 ; Schwanninger et al, 2004)

³ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H (Schwanninger et al, 2004) ; aromatic C–H in-plane deformation, G > S ; plus C–O deformation, in primary alcohols ; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

⁴ OH in-plane bending / crystalline cellulose (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004)

⁵ crystalline cellulose / CH2 rocking vibration (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004 ; Olsson et al, 2011)

⁶ Anomere C-groups, C1-H deformation, ring valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁷ CH2 of pyran ring symmetric scissoring ; OH plane deformation vibration (Schwanninger et al, 2004) ; CH2 symmetric bending (xylose, arabinose) (Olsson et al., 2011) ; C–H deformations (Faix, 1991)

◀ **Figure 35** Différences physico-chimiques entre parois de fibres des différentes lignées étudiées.

(A) Graphique présentant la distribution des spectres sur les composantes 2 et 3 d'une analyse en composante principale. Turquoise : paroi de fibres de MYB156⁺, Vert : parois de fibres de CCR⁻, Rouge : parois de fibres de CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺, Violet : parois de fibres de WT. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point. (B) Spectre ATR-FTIR moyen. Turquoise : paroi de fibres de MYB156⁺, Vert : parois de fibres de CCR⁻, Rouge : parois de fibres de CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺, Violet : parois de fibres de WT. L'insertion représente un zoom de la région [1,500-1,300] cm⁻¹. (C) Carte de chaleur des nombres d'ondes différenciellement absorbés. Turquoise : paroi de fibres de MYB156⁺, Vert : parois de fibres de CCR⁻, Rouge : parois de fibres de CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺, Violet : parois de fibres de WT.

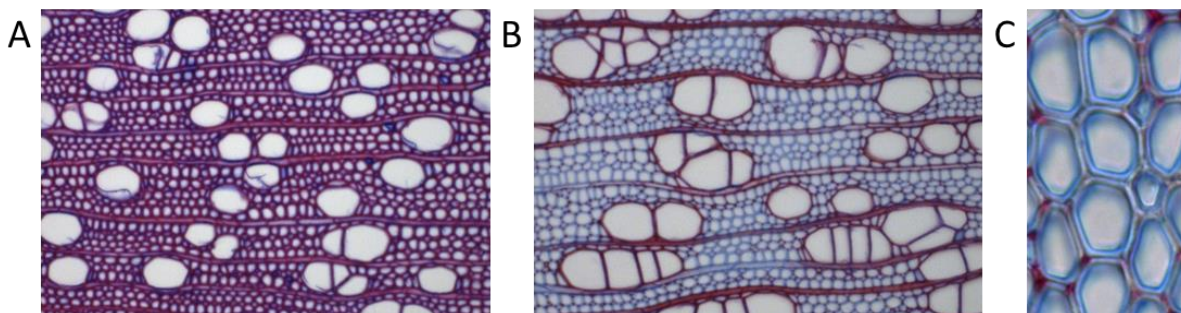


Figure 36 Images photoniques en couleur de la lignée sauvage (A) et MYB156⁺ (B-C)

Afin d'identifier plus précisément l'impact de la transgénèse sur la composition des parois de fibres, j'ai analysé les DAWNs présents aux maxima locaux (**fig. 35C**). Ainsi, j'ai pu mettre en évidence dix groupes de nombre d'ondes permettant de distinguer les lignées entre elles. La lignée CCR⁻ est marquée par une absorbance plus forte des groupes A à D et moins forte des groupes E à J par rapport à la lignée sauvage. La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ est caractérisée par une absorbance plus faible des groupes A et E à G et plus forte des groupes H et I par rapport à la lignée sauvage. La lignée MYB156⁺ présente, elle, une absorbance plus faible des groupes E à H et plus forte des groupes I et J par rapport à la lignée sauvage. Le groupe A rassemble les bandes 1454-50¹, 1428-18², 1336³-14⁴ et 902-892⁵ cm⁻¹. Il est donc représentatif de la cellulose cristalline, des lignines et d'hémicelluloses, notamment d'arabinoxylanes. Le groupe B est composé exclusivement de la bande 1514-04⁶ cm⁻¹ et représente donc les lignines potentiellement riches en unités G. Les bandes 1164-54⁷ cm⁻¹ et 1108-1098⁸ cm⁻¹, présentes dans le groupe E et plus absorbées dans le sauvage que dans toutes les lignées transgéniques, représentent majoritairement de la cellulose et des hémicelluloses.

¹ CH2 of pyran ring symmetric scissoring; OH plane deformation vibration (Schwanninger et al, 2004) ; CH2 symmetric bending (xylose, arabinose) (Olsson et al., 2011) ; C-H deformations (Faix, 1991)

² crystalline cellulose / C-OH bending ; COO- stretch ; aromatic skeletal vibrations combined with C-H in plane deformation (Marchessault et Liang, 1962 ; Faix, 1991 ; Åkerholm et Salmén, 2001 ; Åkerholm et al, 2004)

³ OH in-plane bending / crystalline cellulose (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004)

⁴ crystalline cellulose / CH2 rocking vibration (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004 ; Olsson et al, 2011)

⁵ Anomere C-groups, C1-H deformation, ring valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁶ aromatic skeletal vibrations; G>S (Faix, 1991)

⁷ C-O-C asymmetric valence vibration (Schwanninger et al, 2004 ; Olsson et al, 2011)

⁸ Ring asymmetric valence vibration (HistoChem)

Les lignines sont représentées dans les groupes F (1598-88¹ cm⁻¹) et G (1664-30² cm⁻¹). Bien qu'une bande typique des lignines soit présente dans le groupe H (1244-40³ cm⁻¹), ce groupe représente également les hémicelluloses par la présence des bandes 1740-26⁴ et 1238-32⁵ cm⁻¹. Le groupe I, représentant la bande 994-86⁶ cm⁻¹, reflète la quantité de cellulose. Enfin, les cluster C, composé de la bande 1460-58⁷ cm⁻¹, D, composé des bandes 1502-1498⁸ et 1466-64 et 1456⁹ cm⁻¹, et J, regroupant les bandes 1376-66⁹ et 1038-30⁴¹⁰ cm⁻¹, ne sont pas représentatifs d'un composé particulier.

Il est possible de déduire des différences plus fines pour ces différentes lignées. Ainsi, les parois des fibres de la lignée CCR⁻ présentent des modifications en qualité des hémicelluloses (absorbance plus forte du groupe A, composé de bandes spécifiques des arabinoxylanes et plus faible du groupe H). Les fibres de cette lignée semblent également présenter un enrichissement en lignines plutôt riches en unités G (groupe B) tout en présentant une diminution de la quantité globale de lignines (groupes F et G). Enfin, elles semblent présenter une cellulose plus cristalline que la lignée sauvage. La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente, elle aussi, des différences de composition physico-chimiques des parois des fibres par rapport à la lignée sauvage. On observe en effet un enrichissement des parois en cellulose (groupe I) et hémicellulose (groupe H) par rapport à la lignée sauvage. Grâce à la finesse des analyses en moyen infra-rouge, il est également possible de distinguer une diminution de la quantité de lignines, notamment des lignines riches en unités G (groupe A). Enfin, la lignée MYB156⁺ présente un enrichissement des parois de ses fibres en cellulose (groupe I) et une diminution de leur teneur en lignines (groupes F et G). La qualité des hémicelluloses semble également impactée par la transformation (absorbance plus faible du groupe E et plus forte du groupe H).

¹ vibration du squelette aromatique des lignines (Faix, 1991)

² C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones (Faix, 1991)

³ C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics (Sene et al, 1994)

⁴ C = O stretch carboxylic acid (Marchessault et Liang, 1962 ; Gou et al, 2008)

⁵ C-O stretch acetyl (Marchessault et Liang, 1962)

⁶ C-O valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁷ CH₂ of pyran ring symmetric scissoring; OH plane deformation vibration (Schwanninger et al, 2004) ; CH₂ symmetric bending (xylose, arabinose) (Olsson et al., 2011) ; C-H deformations (Faix, 1991)

⁸ aromatic skeletal vibrations (Olsson et al, 2011)

⁹ CH bending ; aliphatic C-H stretch in CH₃, not in OMe; phen. OH (Liang et Marchessault, 1959 ; Faix, 1991 ; Olsson et al, 2011)

¹⁰ C-O valence vibration, mainly from C3-O3H (Schwanninger et al, 2004) ; aromatic C-H in-plane deformation, G > S; plus C-O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

2.2. Modifications de la composition des parois de vaisseaux

Une analyse en composante principale menée sur les spectres de vaisseaux des quatre lignées permet de distinguer légèrement la lignée CCR⁻ des trois autres sur le plan représentant les deux premières composantes expliquant respectivement 43.8% et 17.9% de la variance (**fig. 37A**).

À première vue, les spectres moyens des vaisseaux ressemblent beaucoup aux spectres des fibres. En effet, les mêmes maxima locaux sont observés (**fig. 37B**). Il est cependant à noter que les spectres sont extrêmement bruités entre 1700 et 1500 cm⁻¹. La lignée CCR⁻ est celle présentant le plus de différences par rapport à la lignée sauvage. En effet, on remarque une diminution de l'absorbance des bandes 1660-34¹, 1238², 1102, 1052³ et 1035⁴ cm⁻¹. Les bandes 1336⁵, 1316⁶ et 896⁷ présentent, elles, une augmentation de l'absorbance dans les vaisseaux de CCR⁻. Enfin, alors que la lignée sauvage présente une double bande d'absorbance à 1736⁸ cm⁻¹, une seule est visible dans la lignée CCR⁻. À l'inverse, alors que la lignée sauvage ne semble présenter qu'une unique bande d'absorbance à 1506⁹ cm⁻¹, une double bande semble apparaître dans la lignée CCR⁻. Les lignées CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ et MYB156⁺ sont relativement proche de la lignée sauvage. On notera tout de même quelques petites différences. Ainsi, une diminution de l'absorbance est observée pour les deux lignées aux bandes 1238², 1102, 1052⁴ et 1034⁵ cm⁻¹. La bande 1736⁹ cm⁻¹ présente également des différences entre les deux lignées et la lignée sauvage. En effet, on y observe une diminution de l'absorbance pour la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ par rapport à la lignée sauvage et, à niveau d'absorbance équivalent, une disparition de la double bande au profit d'une unique bande dans la lignée MYB156⁺. Enfin, tout comme la lignée CCR⁻, la lignée MYB156⁺ présente une double bande d'absorbance à 1506¹⁰ cm⁻¹ avec une absorbance réduite par rapport à la lignée sauvage.

¹ C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones (Faix, 1991)

² C–O stretch acetyl (Marchessault et Liang, 1962)

³ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H / C=O stretching vibration ; C=O stretching vibration (Harrington et al, 1964 ; Schwanninger et al, 2004)

⁴ C–O valence vibration, mainly from C3–O3H (Schwanninger et al, 2004) ; aromatic C-H in-plane deformation, G > S; plus C-O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

⁵ OH in-plane bending / crystalline cellulose (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004)

⁶ crystalline cellulose / CH2 rocking vibration (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004 ; Olsson et al, 2011)

⁷ Anomere C-groups, C1-H deformation, ring valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁸ C = O stretch carboxylic acid (Marchessault et Liang, 1962 ; Gou et al, 2008)

⁹ aromatic skeletal vibrations; G>S (Faix, 1991)

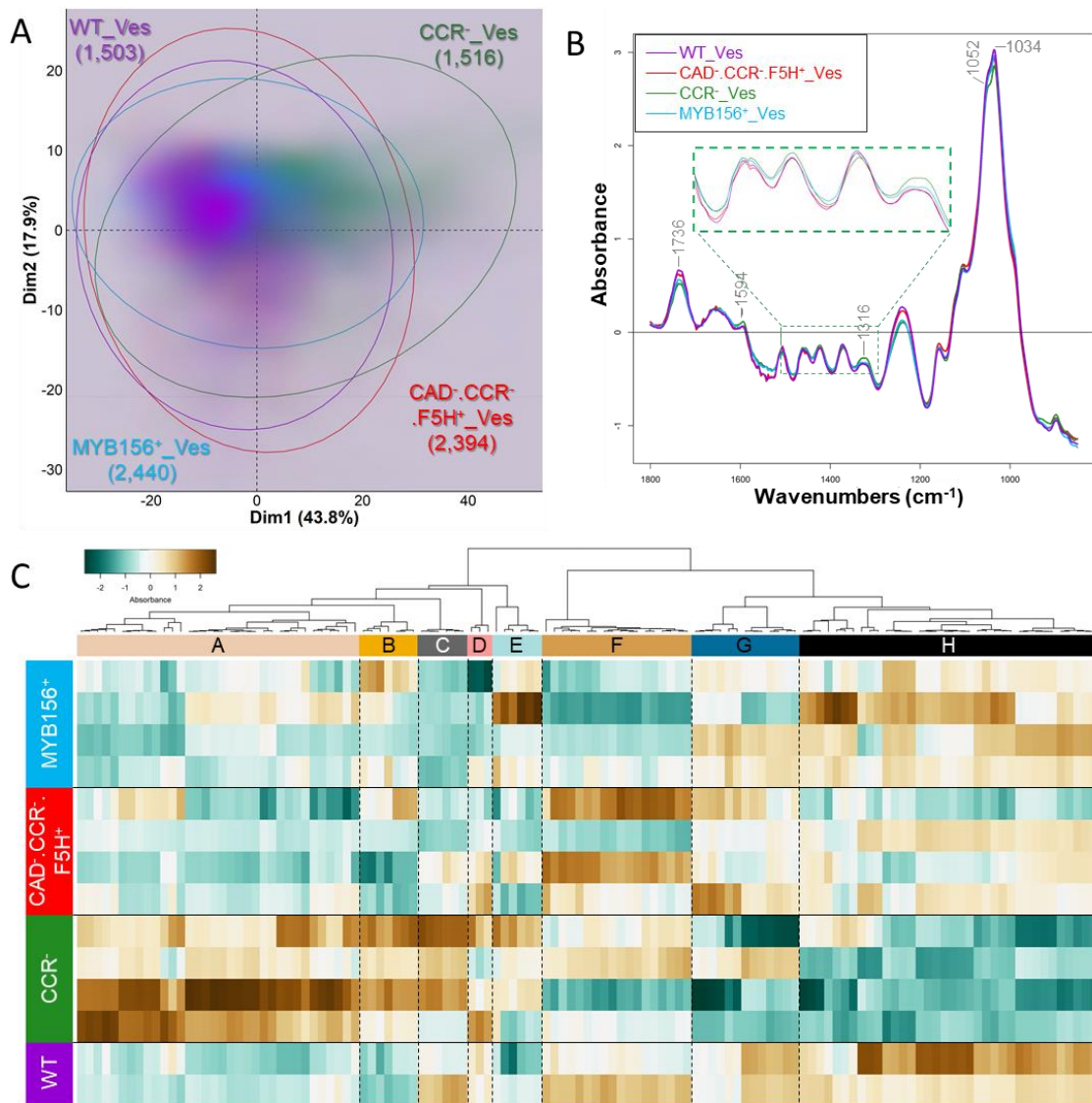


Figure 37 Différences physico-chimiques entre parois de vaisseaux des différentes lignées étudiées.

(A) Graphique présentant la distribution des spectres sur les deux premières composantes d'une analyse en composante principale. Turquoise : paroi de vaisseaux de MYB156⁺, Vert : parois de vaisseaux de CCR⁻, Rouge : parois de vaisseaux de CAD.CCR.F5H⁺, Violet : parois de vaisseaux de WT. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point. (B) Spectre ATR-FTIR moyen. Turquoise : paroi de vaisseaux de MYB156⁺, Vert : parois de vaisseaux de CCR⁻, Rouge : parois de vaisseaux de CAD.CCR.F5H⁺, Violet : parois de vaisseaux de WT. L'insertion représente un zoom de la région [1,500-1,300] cm⁻¹. (C) Carte de chaleur des nombres d'ondes différenciellement absorbés. Turquoise : paroi de vaisseaux de MYB156⁺, Vert : parois de vaisseaux de CCR⁻, Rouge : parois de vaisseaux de CAD.CCR.F5H⁺, Violet : parois de vaisseaux de WT.

Afin d'identifier plus précisément l'impact de la transgénèse sur la composition des parois de vaisseaux, j'ai analysé les DAWNs présents aux maxima locaux (fig. 37C). Ainsi, j'ai pu mettre en évidence huit groupes de nombre d'ondes permettant de distinguer les lignées entre elles. La lignée CCR⁻ présente les différences les plus tranchées. Ainsi, elle est marquée par une absorbance plus forte des groupes A à E et moins forte des groupes F à H par rapport à la lignée sauvage. La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ est caractérisée par une absorbance plus faible des groupes C et H par rapport à la lignée sauvage. Enfin, la lignée MYB156⁺ présente une absorbance plus faible des groupes C, D et F par rapport à la lignée sauvage. Le groupe A rassemble les bandes 1514-10¹, 1454-48², 1426-18³, 1334-14⁴, 900-892⁵ et 874-66 cm⁻¹. Il est donc représentatif de la cellulose cristalline et des lignines, notamment de type G. Les groupes B, composé des bandes 1502-1,498¹ et 1466-56² cm⁻¹, C, composé de la bande 1598-88¹ cm⁻¹, D, composé de la bande 1508-04¹ cm⁻¹, et F, composé de la bande 1664-30⁶ cm⁻¹, représentent plutôt les lignines, notamment riches en unités G pour le groupe D. La cellulose est, elle, représenté dans les groupes E, composé de la bande 994-86⁷ cm⁻¹, et G, composés des bandes 1162-52⁸ et 1110-1,098⁹ cm⁻¹. Enfin, tout comme le groupe A, le groupe H représente plusieurs composés dont les hémicelluloses et lignines sont majoritaires, notamment par la présence des bandes 1742-26¹⁰, 1376-64¹¹, 1246-28¹², 1,054-48¹³ et 1,038-30¹⁴ cm⁻¹.

Il est alors possible de déduire des différences fines pour ces différentes lignées. Ainsi, les parois des vaisseaux de la lignée CCR, les plus impactées par la transformation, présentent des modifications en qualité de la cellulose, celle-ci semblant, notamment, plus cristalline (absorbance plus forte des groupes A, composé de bandes spécifiques de la cellulose cristalline, et E et plus faible du groupe G) et des lignines, celles-ci semblant plus riches en lignines de type G (absorbance plus forte des groupes B à D et plus faible des groupes F et H). Enfin, elles semblent présenter une diminution de la quantité d'hémicelluloses. La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ présente, elle aussi, des différences de composition physico-chimiques des parois des vaisseaux

¹ aromatic skeletal vibrations (Faix, 1991)

² CH₂ of pyran ring symmetric scissoring; OH plane deformation vibration (Schwanninger et al, 2004) ; CH₂ symmetric bending (xylose, arabinose) (Olsson et al., 2011) ; C-H deformations (Faix, 1991)

³ crystalline cellulose / C-OH bending ; COO- stretch ; aromatic skeletal vibrations combined with C-H in plane deformation (Marchessault et Liang, 1962 ; Faix, 1991 ; Åkerholm et Salmén, 2001 ; Åkerholm et al, 2004)

⁴ OH in-plane bending / crystalline cellulose (Åkerholm et Salmén, 2001 ; Schwanninger et al, 2004)

⁵ Anomere C-groups, C1-H deformation, ring valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁶ C=O stretch in conjugated p-substituted aryl ketones (Faix, 1991)

⁷ C-O valence vibration (Schwanninger et al, 2004)

⁸ C-O-C asymmetric valence vibration (Schwanninger et al, 2004 ; Olsson et al, 2011)

⁹ Ring asymmetric valence vibration (HistoChem)

¹⁰ C = O stretch carboxylic acid (Marchessault et Liang, 1962 ; Gou et al, 2008)

¹¹ CH bending ; aliphatic C-H stretch in CH₃, not in OMe; phen. OH (Liang et Marchessault, 1959 ; Faix, 1991 ; Olsson et al, 2011)

¹² C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics (Sene et al, 1994)

¹³ C-O valence vibration, mainly from C3-O3H / C=O stretching vibration ; C=O stretching vibration (Harrington et al, 1964 ; Schwanninger et al, 2004)

¹⁴ C-O valence vibration, mainly from C3-O3H (Schwanninger et al, 2004) ; aromatic C-H in-plane deformation, G > S; plus C-O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated) (Faix, 1991)

par rapport à la lignée sauvage. On observe en effet une diminution de la quantité d'hémicelluloses (groupe H) et de lignines (groupes C et H) par rapport à la lignée sauvage, sans impact sur la cellulose. Enfin, la lignée MYB156⁺ présente une diminution de la teneur en lignines (groupes C, D et F), notamment de type G, sans impact sur la fraction polysaccharidique.

III. Discussion, limites et perspectives

1. Lignée CCR⁻

La lignée CCR⁻, dont l'expression du gène cinnamoyl coA reductase a été réduite par stratégie RNAi¹, présente un phénotype inhabituel. En effet, cette lignée est caractérisée par une augmentation de la croissance primaire et secondaire par rapport à la lignée sauvage. Or, les études menées sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Jones et al., 2001; Ruel et al., 2009) ou des transformants de peuplier (*P. tremula* x *P. alba*, Leplé et al., 2007) ont montré un retard de croissance, allant parfois jusqu'à 50%, dans les lignées sous-exprimant la CCR. Ces études ont également montré, en particulier chez *Arabidopsis thaliana*, un fort effet de la mutation sur la structure du xylème, en particulier des vaisseaux, et des parois secondaires le composant. Hormis une légère augmentation du diamètre des cellules et une diminution de l'épaisseur des parois, le xylème semble, sur la lignée étudiée, faiblement impacté dans sa structure. L'augmentation de la croissance primaire et secondaire de cette lignée pourrait alors être expliquée par une faible diminution de l'activité CCR et donc de la teneur en lignines. En effet, la biosynthèse des lignines est un procédé très énergivore. Ainsi, une faible production de lignines permettrait une meilleure croissance des plants, sans modification de l'anatomie du bois observé dans le cas d'une forte diminution de la quantité de lignines produites. Cette modification de croissance pourrait également être le résultat d'un effet du site d'insertion du transgène. Des analyses complémentaires portant notamment sur la quantification de l'expression de la CCR et des lignines sont donc nécessaires.

Bien que la structure du xylème ne soit pas impactée, nous avons pu mettre en évidence de fortes modifications des fractions polysaccharidiques et phénoliques. Nous observons, notamment, une modification de la qualité des hémicelluloses dans les fibres. Cette modification se présente notamment par l'augmentation de l'absorbance à 1462-54 cm⁻¹, bande notamment attribuée aux arabinoxylanes (Olsson et al., 2011). Les études menées sur

¹ ARN interférent

Arabidopsis thaliana et le peuplier ont bien montré une augmentation de la quantité de xylose (Jones et al., 2001; Leplé et al., 2007; Ruel et al., 2009). L'analyse de la fraction cellulosique des mutants d'*Arabidopsis thaliana* et des transformants de peuplier a mené à des résultats contraires. En effet, alors que les mutants *ccr* d'*A. thaliana* présentent une diminution de la quantité de cellulose (Jones et al., 2001; Ruel et al., 2009), les transformants de peuplier présentent, eux, une augmentation (Leplé et al., 2007). L'analyse réalisée ici n'a pas mis en évidence de différences en proportion de cellulose. Les proportions des différents composés pariétaux présentés dans l'article de Leplé et ses collaborateurs (2007) sont rapportées à la masse de résidu pariétal. Ainsi, il est possible que l'augmentation de la teneur en cellulose rapportée soit artéfactuelle et liée à la diminution des deux autres composés. L'absence de variation de la teneur en cellulose tant dans les fibres que dans les vaisseaux de la lignée CCR⁻ étudiée appuie cette hypothèse. Nous avons cependant pu remarquer une augmentation de la cristallinité de la cellulose. Dans leur étude, Ruel et ses collaborateurs (2009) ont montré une modification de l'orientation des microfibrilles de cellulose dans la couche S2 de la paroi secondaire. Ils n'ont cependant pas pu montrer de différences au niveau de la cristallinité de la cellulose. Le gène CCR n'étant pas directement impliqué dans la biosynthèse de la fraction polysaccharidique des parois, les modifications observées proviennent donc probablement d'un défaut de lignification entraînant une modification de l'ultrastructure des parois, comme le démontrent Ruel et ses collaborateurs (2009). Des analyses plus poussées permettant de valider les différences en cristallinité de la cellulose et portant sur la modification de l'ultrastructure des parois seront cependant nécessaires sur la lignée CCR⁻ étudiée ici afin de valider cette hypothèse.

Comme attendu, la fraction phénolique des parois a également été impactée par la transformation. En effet, nous avons observé une diminution de la quantité de lignines dans les fibres et une modification de la qualité de celles-ci aussi bien dans les fibres que dans les vaisseaux. La modification de la qualité des lignines est en accord avec les études réalisées chez *Arabidopsis thaliana* et le peuplier (Jones et al., 2001; Leplé et al., 2007; Ruel et al., 2009). Cependant, alors que Leplé et ses collaborateurs (2007) ont identifiés une diminution des lignines de type S dans les fibres, nous avons pu mettre en évidence une augmentation des lignines de type G dans les fibres et les vaisseaux. Cette augmentation des vibrations associées aux lignines de type G pourrait être liée à l'incorporation d'un monolignol inhabituel décrit par Leplé et ses collaborateurs (2007) intégré spécifiquement dans les lignines des plants sous-exprimant la CCR. En effet, ce monolignol est composé du cycle typique des unités G et d'une

chaîne latérale à deux carbones. La bande associée aux unités G mettant en vibration leur cycle aromatique, il est donc probable que cette augmentation en lignines de type G soit le reflet de l'incorporation de ce composé. Il est également important de noter que ce composé est particulièrement présent lors de l'incorporation d'acide férulique dans les lignines de peuplier déficients en CCR (Leplé et al., 2007; Ralph et al., 2007). L'acide férulique étant également un composé phénolique, il pourrait alors être en partie responsable de l'augmentation des vibrations associées aux lignines plutôt riches en unités G.

Au vu des résultats obtenus, la lignée CCR⁻ présente un fort intérêt pour l'étude de la formation des parois secondaires. En effet, hormis une éventuelle stimulation de l'expansion cellulaire, la modification qui eut lieu dans cette lignée n'a vraisemblablement que peu d'impact sur l'anatomie du bois. On y observe en revanche une forte répression de la formation des parois secondaires avec des effets différents sur chaque composant des parois et suivant les types cellulaires étudiés. Des études plus poussées sur la structure des parois telle que de la microscopie électronique à transmission ou leur composition telles que l'immunohistocalisation, de l'histochimie (coloration de Wiesner ou Mäule) ou des analyses biochimiques menées notamment sur des fibres microdisséquées permettront de valider les différences observées. Enfin, au vu des faibles modifications de croissance et d'anatomie, il serait nécessaire de valider l'impact de la transgénèse par qRT-PCR¹ afin de s'assurer que les différences observées soient liées à la répression du gène CCR.

2. Lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺

La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ est une lignée sans équivalent. En effet, il n'existe pas dans la littérature, que ce soit chez *Arabidopsis thaliana* ou le peuplier, de lignées transgéniques ou mutantes pour lesquels ces trois gènes auraient été ciblées. Il est donc difficile de se rapprocher des données existantes. Cependant, nous savons qu'il s'agit de trois gènes clefs dans la biosynthèse des lignines (cf. **introduction**). Ainsi, la sous-expression des gènes CAD² et CCR devrait conduire à une diminution de la quantité de lignines. La surexpression du gène F5H³, elle, devrait avoir un effet sur le ratio S/G.

Contrairement à la lignée CCR⁻, cette lignée présente une forte diminution de croissance primaire et secondaire par rapport à la lignée sauvage. Une étude réalisée chez *A. thaliana* a montré que les plants sous-exprimant simultanément la CAD et la CCR présentent

¹ quantitative retro-transcription polymerase chaine reaction

² cinnamyl alcool deshydrogénase

³ ferrulate 5-hydroxylase

un fort retard de croissance jusqu'à près de 88% (Thévenin et al., 2011). La lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ n'est pas aussi sévèrement atteinte. Ainsi, il est probable que la sous-expression des gènes CAD et CCR soit plus faible dans cette lignée que dans les mutants d'*Arabidopsis thaliana*.

Par ailleurs, Thévenin et ses collaborateurs (2011) ont également remarqué un très fort collapse du xylème chez le mutant *ccc*¹, plus fort encore que chez le simple mutant *ccr*. Aucun collapse n'a été observé dans les mutants *cad*. L'absence de collapse du xylème dans la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ peut alors être expliquée par une faible diminution de l'activité CCR, le construit utilisé étant le même que dans la lignée CCR⁻ discuté ci-dessus. L'épaississement des parois observées dans la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ n'est pas observé par Thévenin et ses collaborateurs (2011).

D'importantes modifications de la composition des parois ont également été observées. En effet, nous avons pu mettre en évidence un enrichissement des fibres en cellulose et hémicelluloses et une diminution de la quantité d'hémicelluloses dans les vaisseaux. Cette observation est contraire à celle réalisée sur le mutant *ccc* d'*Arabidopsis thaliana*, où une diminution de la fraction polysaccharidique est observable (Thévenin et al., 2011). Les gènes ciblés n'étant pas directement liés à la biosynthèse des composés polysaccharidiques, les modifications de cette fraction sont donc indirectes et probablement liées aux modifications de l'ultrastructure des parois. Ainsi, il n'est pas impossible que les épaisses parois dont sont composés les fibres de la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ soient enrichies en polysaccharides.

Les différences les plus importantes ont été observés sur la fraction phénolique des parois. En effet, comme attendu, nous avons mis en évidence une diminution globale des lignines et une modification de leur qualité, aussi bien dans les fibres que les vaisseaux. Il est intéressant de noter que la sous-expression des gènes CAD et CCR chez *Arabidopsis thaliana* a tendance à enrichir les lignines en unité G (Thévenin et al., 2011) et que la surexpression de la F5H a tendance à enrichir les lignines en unité S aussi bien chez *Arabidopsis thaliana* (Sibout et al., 2002) que chez le peuplier (Stewart et al., 2009; Weng et al., 2010; Lapierre et al., 2021). Il est alors probable que la combinaison de la sous-expression des gènes CAD et CCR et la surexpression du gène F5H induise une diminution globale de la quantité de lignines de type G tout en conservant un niveau équivalent de lignines de type S, comme nous l'avons observé, augmentant alors le ratio S/G.

Au vu des résultats obtenus, la lignée CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ semble présenter un fort intérêt pour l'étude de la formation du bois et des parois secondaires. En effet, cette lignée

¹ Mutant *cad c cad d ccr1*

présente un nombre plus important de cellules que la lignée sauvage. Il est donc plausible que des mécanismes de stimulation de la division cellulaire et de répression de leur expansion soient mis en place dans cette lignée. Les parois étant plus épaisses, ces mécanismes pourraient également stimuler le dépôt des parois secondaires tout en ayant un impact différent sur les trois composants majeurs des parois secondaires. En effet, alors que la synthèse de la cellulose semble stimulée, la formation des lignines, particulièrement des lignines de type Gs est réprimée. Enfin, la formation des hémicelluloses semble impactée de manière différente suivant le type cellulaire étudié. Des observations complémentaires permettant de valider ces résultats sont toutefois nécessaires. Cela pourrait passer, notamment, par une étude de la cinétique de division cellulaire en système de culture de cellule ou encore par la validation croisée des résultats obtenues par microscopie ATR-FTIR par d'autres méthodes d'analyses comme la microspectroscopie Raman ou UV.

3. Lignée MYB156⁺

Les premières analyses de la lignée MYB156⁺¹ réalisées dans le cadre de la thèse de Wassim Lakhal (2013) n'ont pas montré de différences de croissance que ce soit en hauteur ou en diamètre, contrairement aux résultats présentés ici. Cette différence est explicable par les conditions d'élevage. En effet, les échantillons analysés ici ont été cultivés dans les nouvelles serres du laboratoire d'ingénierie cellulaire de l'arbre (LICA, responsable opérationnel : Patrick Poursat, UE GBFor, INRAE Val de Loire) où les conditions d'élevage (température, hygrométrie, lumière et arrosage) étaient mieux maîtrisées que dans les anciennes serres. En revanche, une analyse menée par Yang et ses collaborateurs (2017) a montré une diminution du diamètre et de la hauteur de plants de peuplier surexprimant le gène *MYB156*. Il est cependant à noter que dans les lignées étudiées par Yang et ses collaborateurs (2017), l'ensemble des types cellulaires sont impactés par la transgénèse contrairement à la lignée MYB156⁺ étudiée ici et pour laquelle les vaisseaux restent fonctionnels. Le fort impact de la transformation sur la croissance des plants étudiés par Yang et ses collaborateurs (2017) complique grandement la comparaison des résultats.

Les analyses anatomiques réalisées par W. Lakhal (2013) sur la lignée MYB156⁺ ont également montré une hypolignification des parois secondaires des fibres et de certains rayons. Nous avons également pu mettre en évidence une forte diminution de la densité de paroi, résultant principalement d'une augmentation du diamètre des cellules. La proportion de fibres

¹ Se référer à la lignée 15

étant équivalente, il est probable que cette augmentation de diamètre soit associée à une diminution de l'épaisseur des parois. Des observations complémentaires de l'épaisseur des parois de la lignée MYB156⁺ étudiée permettrait de valider cette hypothèse.

Comme observé par W. Lakhal (2013), la composition des parois a été modifiée sous l'effet de la surexpression de *MYB156*. En effet, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la quantité et de la qualité des lignines dans les fibres et les vaisseaux, ainsi qu'une augmentation de la quantité de cellulose et une modification de la qualité des hémicelluloses dans les fibres. Les résultats obtenus sur la fraction phénolique sont en accord avec les analyses précédentes. En effet, une réduction de 15% des lignines a été observée dans la thèse de W. Lakhal (2013). Des analyses complémentaires (*e.g.* biochimie sur fibres microdisséquées, imagerie Raman) permettant d'étudier les modifications de la fraction polysaccharidique sont nécessaires.

Au vu des résultats obtenus, la lignée MYB156⁺ est la plus pertinente dans l'étude de la formation des parois secondaires des fibres de bois, et plus particulièrement dans l'étude de leur lignification. En effet, cette lignée est impactée à la fois dans des étapes clés de la formation du bois et dans la formation des parois secondaires principalement au niveau des fibres de bois. Elle présente une répression de l'activité de division cellulaire, de la différenciation notamment en fibres et du dépôt des parois secondaires ainsi qu'une stimulation de l'expansion cellulaire. La lignification semble également entièrement bloquée lors de la formation des parois secondaires, la paroi primaire et la lamelle moyenne semblant correctement lignifiées comme le révèle l'analyse histologique. Une validation par d'autres approches d'imagerie chimique serait tout de même nécessaire pour identifier les modifications de la fraction polysaccharidique. Enfin, une étude du transcriptome des fibres par microdissection par capture laser ou single-cell RNA-sequencing permettrait de lever le voile sur les mécanismes moléculaires associés à la modification de la xylogénèse et à l'hypolignification observées.

IV. Conclusions

La combinaison des études physiologiques, histologiques et microspectroscopiques m'a permis d'identifier la lignée MYB156⁺ comme étant la plus pertinente pour ma thèse. En effet, celle-ci présente (i) une croissance en hauteur très significativement supérieure au témoin, (ii) des parois secondaires hypolignifiées au niveau des fibres et de certains rayons, (iii) une augmentation de la fraction polysaccharidique dans les parois des fibres et (iv) une modification

de la qualité des lignines au niveau des fibres. Ainsi, cette lignée semble tout à propos dans l'étude de la cinétique de formation des parois secondaires des fibres de bois.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Mon travail de thèse avait pour objectif d'établir un modèle de formation des parois secondaires des fibres de bois en lien avec la mise en place des propriétés physico-chimiques du bois. Pour cela, j'ai développé une approche de microphénotypage permettant de caractériser la composition des parois à l'échelle de la cellule. Cette approche m'a permis de mettre en évidence des différences de composition au sein d'un type cellulaire entre différents types de bois (**chapitre I** et **chapitre III**) mais également entre types cellulaires au sein d'un même type de bois (**chapitre II**). Afin de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des parois secondaires des fibres de bois, j'ai associé une étude microtranscriptomique basée sur l'analyse par RNA-Seq de fibres et de rayons microdisséqués à ce phénotypage fin. Enfin, j'ai complété ces études par la caractérisation physiologique, anatomique et physico-chimique du bois de lignées transgéniques dont la composition chimique des parois de fibres a été impactée.

I. Critiques méthodologiques

L'analyse combinée de données transcriptomiques obtenues par RNA-Seq sur fibres et rayons microdisséqués à des données phénotypiques obtenues par microspectroscopie ATR-FTIR m'a permis de mettre en évidence un certain nombre d'acteurs moléculaires pouvant être impliqués dans les mécanismes de formation du bois (**chapitre II**). Il faut cependant relever que l'intégration de ces données s'est basée sur un postulat fort : le transcriptome analysé à une étape donnée de la différenciation conditionne, pour partie du moins, le phénotype final observé. En effet, les images ATR-FTIR analysées ont été acquises sur des cellules ayant totalement achevé leur différenciation, du moins pour les fibres. Les ARN ont, eux, été extraits à partir de cellules plus jeunes prélevées dans la zone d'élongation cellulaire et de dépôt des parois secondaires. Il est donc possible (i) qu'une partie des ARN prélevés n'ait aucun impact sur le phénotype final mais y soit corrélée et (ii) que des gènes clefs dans la formation des parois secondaires et de la lignification ne soient pas présents dans les échantillons d'ARN analysés car exprimés plus tardivement. Par ailleurs, les méthodologies employées afin d'acquérir ces données transcriptomiques et phénotypiques présentent des limites dont il faut avoir conscience pour l'interprétation biologique des résultats.

1. Analyse de la composition des parois à l'échelle cellulaire

La grande résolution de l'imagerie ATR-FTIR m'a permis d'obtenir des spectres représentatifs de la composition de chaque type cellulaire. Cependant, les parois végétales sont composées de molécules présentant des liaisons chimiques proches. En effet, les monomères

de lignines, par exemple, ne se distinguent que par le degré de méthylation du groupement phénol : les unités S étant O-méthylées en position 3 et 5 contrairement aux unités G ne portant qu'un seul groupement méthyle (Lewis et Yamamoto, 1990; Boerjan et al., 2003). Il est donc difficile d'identifier avec précision d'éventuelles différences de composition au sein des différentes macromolécules. Cette difficulté est bien visible dans l'étude de Faix (1991). Dans cette étude, certaines bandes sont plus fortement absorbées par les lignines de type G (e.g. 1515-1505 cm^{-1}) que les lignines de type S et inversement (e.g. 1605-1593 cm^{-1}). Ces bandes n'apparaissant pas spécifiquement pour l'une ou l'autre des lignines, elles ne sont pas spécifiques d'un type de monolignol. Une absorbance plus forte à ces nombres d'onde pourrait alors indiquer soit une plus grande quantité de lignines soit une augmentation de la proportion de l'un ou l'autre des monolignols dans ces lignines. La même observation peut être faite pour les polysaccharides pariétaux, notamment les hémicelluloses pour lesquelles il est difficile de distinguer les différentes familles. Par ailleurs, les publications utilisées afin d'assigner les DAWNs identifiés entre différents spectres se basent uniquement sur l'analyse spectrale de composés purs (e.g. Liang et Marchessault, 1959; Marchessault et Liang, 1962; Faix, 1991; Åkerholm et al., 2004). Ces analyses m'ont permis d'assigner une partie des DAWNs identifiés. Certains d'entre eux, dans les trois chapitres, n'ont cependant pas été répertoriés dans la littérature, regroupés sous l'appellation 'NA' dans le manuscrit. Il est donc possible que ceux-ci soient représentatifs des liaisons entre les différents composés pariétaux, qu'on ne met pas en évidence quand on travaille sur des composés purs ou fortement purifiés. Nous ne sommes pas non plus à l'abri que ces liaisons correspondent à un composé pariétal précis mais n'ayant pas été décrits jusqu'alors dans la littérature.

La difficulté d'assigner avec précision un DAWN à un composé pariétal rend alors primordial la validation des interprétations proposées, que ce soit entre types cellulaires au sein d'un même individu (**chapitre II**) ou au sein d'un même type cellulaire entre différents types de bois (**chapitre I** et **chapitre III**). Une voie à explorer consisterait à analyser la composition des parois par chimie humide. Dans mon cas, cette validation peut s'avérer très laborieuse. En effet, ces techniques d'analyses nécessitent une grande quantité de matériel de départ. Afin d'étudier avec précision la composition des parois à l'échelle cellulaire, chaque type cellulaire devra être microdisséqué et des centaines d'heures de microdissection seraient nécessaires pour obtenir la quantité de matériel requise. Ainsi, cette validation est irréalisable au vu des technologies disponibles actuellement.

Un suivi de dégradation enzymatique des composés pariétaux pourrait toutefois être envisagé. Il serait en effet possible d'analyser des images d'un même échantillon avant et après traitement

à la cellulase par exemple. Les bandes d'absorbance disparaissant ou diminuant pouvant alors être sans nul doute être associées à la cellulose. L'acquisition de spectres FTIR au cours d'une digestion enzymatique en chambre microfluidique a été réalisée sur des entre-nœuds de maïs (Devaux et al., 2018). Cette étude a notamment permis d'identifier des types cellulaires sensibles à la dégradation et d'autres non. Les types cellulaires étudiés dans ma thèse sont très fortement lignifiés. Les lignines protégeant les polysaccharides de la dégradation enzymatique (Whetten et al., 1998), il est probable que les digestions enzymatiques ne soient que peu efficaces et que les changements induits par ces digestions soient minimes et donc pas détectés dans les spectres finaux.

Il est donc nécessaire d'avoir recours à d'autres approches complémentaires à l'imagerie ATR-FTIR afin de multiplier les preuves. Parmi elles se trouve notamment l'imagerie Raman (Schrader, 1996). Les différents monolignols, leurs précurseurs ou leurs formes glycosylées sont très bien caractérisés dans les spectres Raman (*e.g.* Agarwal et Ralph, 2008; Bock et Gierlinger, 2019). Cependant, certaines bandes représentatives des composés pariétaux sont parfois mal détectées par cette approche. C'est le cas, par exemple, de la bande 1743 cm^{-1} représentative des hémicelluloses et des lignines (Gierlinger, 2018). La microscopie Raman se place donc comme complémentaire à la microscopie ATR-FTIR. La combinaison des microscopies FTIR et Raman a notamment permis d'identifier des différences fines de compositions des lignines (Özparpucu et al., 2018). En effet, cette étude, réalisée sur des peupliers transgéniques sous-exprimant la *CAD*, a mis en évidence une incorporation de sinapaldéhyde dans les lignines par la combinaison de spectres Raman, MIR, RMN¹ et une validation par GC-MS². La qualité des lignines peut également être analysée par imagerie UV³. En effet, une étude combinant imagerie en autofluorescence UV des lignines et déconvolution de spectres a permis de distinguer les parois riches en lignines de type G des parois riches en lignines de type S chez le peuplier et le pin (Donaldson, 2013). Enfin, l'immuno-histochimie peut être utilisée afin de conforter les observations réalisées et de gagner en précision sur les différences de composition, notamment en polysaccharides. En effet, un grand nombre d'anticorps spécifiques de certaines hémicelluloses, pectines ou protéoglycanes sont disponibles (Rydahl et al., 2018). Une étude réalisée sur le bois de tension de peuplier a, entre autres, mis en évidence la présence d'AGP et de RG-I dans la couche-G par cette approche

¹ résonance magnétique nucléaire

² Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

³ ultraviolet

(Guedes et al., 2017). Cependant, très peu d'anticorps ciblant spécifiquement les unités G ou S des lignines sont disponibles actuellement (Kiyoto et al., 2013; Simon et al., 2018).

2. Analyse du transcriptome à l'échelle cellulaire

Les données RNA-Seq étudiées ne donnent qu'une image partielle du transcriptome du xylème. En effet, les analyses ont été menées sur deux des trois types cellulaires majoritaires du bois de peuplier : les fibres et les rayons. Une étude a porté sur la comparaison du transcriptome des fibres et des vaisseaux de bois de peuplier (Shi et al., 2017a). Dans cet article, aucune image ne montrant les zones microdisséqués pour produire les banques ARN des fibres et des vaisseaux n'est disponible. Les vaisseaux subissant une mort rapide, il est difficile de les microdisséquer avec précision et donc d'obtenir un transcriptome fiable de ce type cellulaire. Par ailleurs, les données que nous avons analysées ne prennent pas en considération la dynamique de développement du xylème. En effet, les ARN sont extraits de plages de cellules présentes dans la zone d'expansion cellulaire et de dépôt des parois secondaires.

Afin de prendre en compte le gradient de différenciation du bois, il pourrait être envisagé de microdisséquer fibres et rayons à différents stades de développement. Les toutes premières étapes de différenciation, au stade initiales fusiformes et initiales radiales, ont été étudiées par macrodissection de ces deux types cellulaires sur des coupes longitudinales (Goué et al., 2008). La généralisation de cette analyse à tous les stades de différenciation permettrait d'étudier l'évolution du transcriptome des fibres au cours de leur formation, de leur expansion à leur mort cellulaire programmée en passant par le dépôt de leurs parois secondaires. Cette approche, fastidieuse, est cependant limitée par la capacité de l'expérimentateur de différencier ces différentes étapes sur une coupe transversale non colorée.

II. Enrichissement du modèle de formation des fibres de bois

Conscient de ces limites, j'ai néanmoins émis des hypothèses à partir des analyses réalisées pour mieux comprendre la formation du bois et plus particulièrement le développement des fibres. Le développement du xylème secondaire et des fibres peut être découpé en cinq grandes phases : maintien de l'intégrité cambiale et division des initiales cambiales, division des initiales fusiformes et différenciation en fibres, expansion cellulaire et croissance intrusive des fibres, formation des parois secondaires et mort cellulaire programmée. Les données transcriptomiques ne me donnant qu'une image partielle du processus de xylogénèse, j'ai concentré mes investigations sur les dernières étapes de formation des fibres de bois : la formation des parois secondaires et la mort cellulaire programmée.

1. SCR : un initiateur de la mise en place des parois secondaires des fibres ?

L'intégration des données phénotypiques et transcriptomiques a conduit à l'identification de deux gènes : Potri.010G081300 (homologue d'*AtAGO10*) et Potri.006G114200 (homologue d'*AtSCR*). Alors que le premier, codant pour une endonucléase, est plus fortement exprimé dans les rayons, c'est exclusivement dans les fibres qu'est détecté le second, codant pour un facteur de transcription de la famille GRAS. L'homologue d'*AtAGO10* est uniquement corrélé positivement aux lignines présentes dans les rayons. L'homologue de SCR est, lui, positivement corrélé à la cellulose, aux lignines présentes dans les fibres, et aux groupes de DAWNS NS_H et NA ainsi que négativement corrélé au groupe de DAWNS NS_C. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces deux gènes présentent des rôles antagonistes dans la régulation de deux microARN : les miR165/166. Les mutant *scr* d'*Arabidopsis thaliana* présentent une réduction de la quantité de miR165/166 détectés dans la pointe racinaire (Carlsbecker et al., 2010). En se couplant avec le gène *SHR*¹, *AtSCR* induit la transcription des miR165/166 (Carlsbecker et al., 2010; Sakaguchi et Watanabe, 2012). À l'inverse, les mutants *ago10* d'*Arabidopsis thaliana* présentent, eux, une quantité importante de miR165/166 dans le méristème apical (Zhu et al., 2011a). Dans cette étude, AGO10 a montré une grande affinité pour miR166. Plus récemment, une étude a montré que les miR165/166 liés à *AGO10* sont plus sensibles à la dégradation par SDN1² plaçant alors *AGO10* comme un promoteur de la dégradation des miR165/166 (Yu et al., 2017). Cela pourrait alors expliquer l'augmentation de la quantité de miR165/166 observée chez les mutants *ago10*.

Les microARN, dont miR165/166, sont de petits ARN d'une vingtaine de nucléotides agissant sur la stabilité des ARNm de leurs cibles. Les miR165/166 ont la capacité de dégrader les ARNm de facteurs de transcription de la famille HD-ZIP III (Tang et al., 2003; Mallory et al., 2004; Prigge et Clark, 2006). Parmi ces facteurs de transcription se trouvent deux gènes impliqués dans la formation du bois : REVOLUTA et CORONA (Emery et al., 2003; Ko et al., 2006; Robischon et al., 2011; Du et Wang, 2015). L'étude de peupliers transgéniques sur- ou sous-exprimant constitutivement *PRE*³ ou *PCN*⁴ a montré leur rôle fondamental dans le développement du bois (Du et al., 2011; Robischon et al., 2011). La surexpression de *PRE* chez le peuplier a conduit à des divisions périclines dans le parenchyme cortical et une discontinuité de l'activité cambiale (Robischon et al., 2011). *PRE* semble donc intervenir dans l'initiation

¹ SHORT ROOT

² Small RNA degrading nuclease 1

³ POPREVOLUTA, homologue de REVOLUTA

⁴ POPCORONA, homologue de CORONA

des divisions cambiales et la structuration des tissus vasculaires. La surexpression de *PCN* chez le peuplier a conduit à un retard de lignification du xylème (Du et al., 2011). Ce retard de lignification est par ailleurs associé à une diminution de l'expression des gènes associés à la biosynthèse des monolignols et leur polymérisation dans les peupliers surexprimant *PCN*. Ceux-ci présentent également une augmentation de l'expression de gènes associés à la synthèse des polysaccharides pariétaux, à la réponse à l'auxine et à l'oxydation des gibbérellines. Par ailleurs, chez les mutants *athb15¹* d'*Arabidopsis thaliana*, les expressions de *SND1* et *NST2*, maîtres régulateurs de la formation des parois secondaires des fibres, sont deux fois plus élevées (Du et al, 2015).

Les deux homologues de *REVOLUTA* et les deux homologues de *CORONA* sont présents dans les données transcriptomiques obtenues sur fibres et rayons microdisséqués. Étonnamment, bien qu'ils n'aient pas été détectés comme différentiellement exprimés entre fibres et rayons, les deux homologues de *PCN* se trouvent en moyenne deux fois plus exprimés dans les rayons que dans les fibres. Cette différence d'expression pourrait être due (i) à une différence de fonction de *PCN* entre les fibres et les rayons, (ii) à la différence de stade de différenciation entre fibres et rayons échantillonnés en cas de fonction identique, les fibres ayant démarré le dépôt de leurs parois secondaires ou (ii) à une plus grande quantité de miR165/166 dans les fibres conduisant à la répression de *PCN*. Cette deuxième hypothèse s'appuie sur l'expression exclusive des trois homologues de *SCR* dans les fibres qui stimulent la transcription des deux miR.

L'identification des homologues de *SCR* et *AGO10* associée au savoir existant m'a permis d'émettre l'hypothèse d'une régulation de la mise en place des parois secondaires par les miR165/166 via leur action sur *PCN*. *AGO10* empêche ces deux miR d'entrer dans le complexe RISC² et donc, indirectement, de dégrader les ARNm de *PCN*. À l'inverse, *SCR* est exclusivement exprimé dans les fibres et induit la transcription des miR165/166. Ainsi, *SCR* est proposé comme facteur induisant la mise en place des parois secondaires, tout du moins dans les fibres (fig. 38). Des analyses supplémentaires restent cependant nécessaires pour conforter cette hypothèse. En effet, celle-ci repose grandement sur la présence des miR165/166. Il est donc nécessaire, avant toute chose, de quantifier ces deux miR dans des échantillons similaires à ceux étudiés. Une étude de lignées de peuplier sous-exprimant *SCR* permettrait également d'éprouver cette hypothèse et d'établir un lien entre expression de *SCR* et formation des parois secondaires des fibres.

¹ NB : HB15 est un autre nom de *CORONA* chez *Arabidopsis thaliana*

² RNA-induced silencing complex

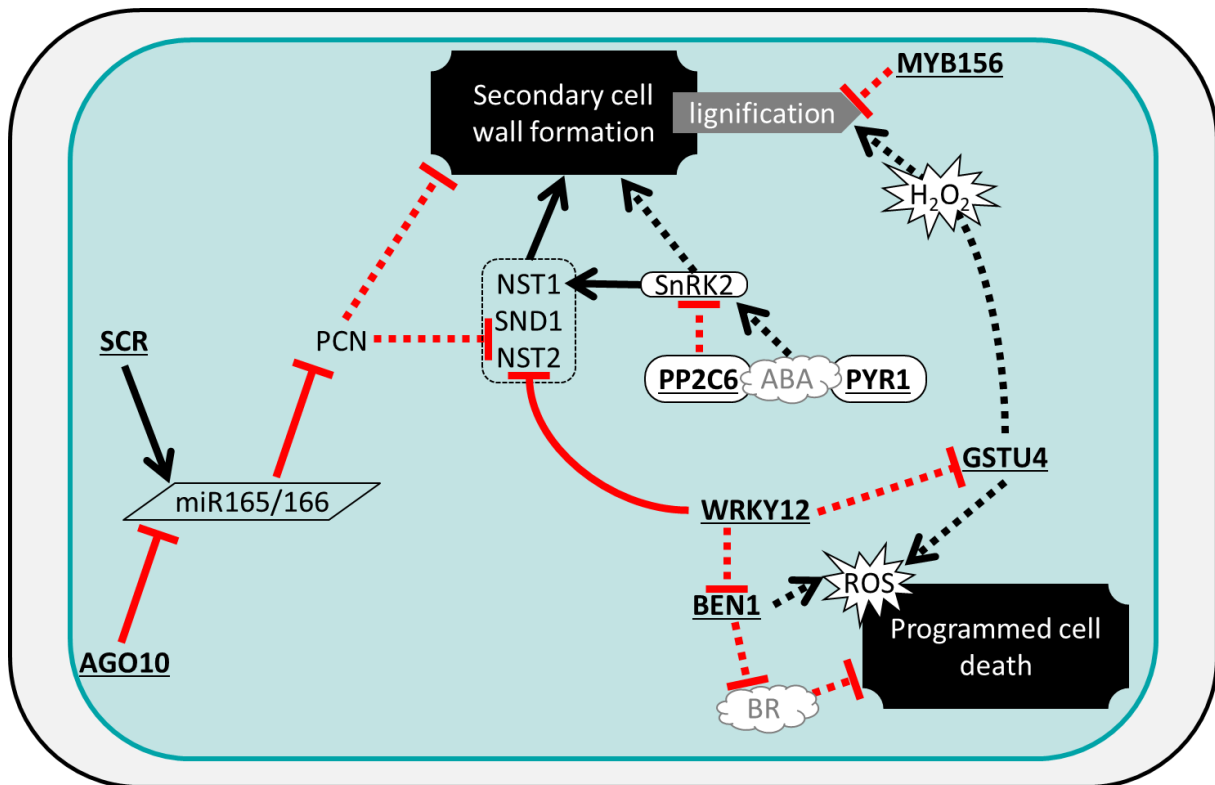


Figure 38 Apports au modèle de formation des fibres de bois chez le peuplier : formation des parois secondaires et mort cellulaire programmée

Gras souligné : gènes mis en évidence dans cette étude. Flèches plates rouges : diminution d'activité. Flèches pointues noires : augmentation d'activité. Flèches pointillées : interaction supposée

Parallélogramme : microARN, Ovale : récepteur, phosphatase ou kinases, Nuage : hormone.

SCR : SCARECROW, AGO10 : Argonaute10, miR : microARN, PCN : POPCORONA, NST : NAC secondary cell wall thickening 1-2, SND : secondary wall associated-NAC domain, GSTU4 : glutathione S-transférase Tau 4, BEN1 : BRI1-5 ENHANCED 1, SnRK2 : Sugar non fermenting 1-related protein kinase 2, PP2C : protein phosphatase 2C, PYR : PYRABACTIN RESISTANCE 1, ABA : acide abscissique, BR : brassinostéroïdes.

2. Acide abscissique : intermédiaire de la formation des parois secondaires des fibres ?

Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude a mis en évidence un lien entre les miR165/166 et l'homéostasie de l'acide abscissique (Yan et al., 2016). En effet, des lignées sous-exprimant ces deux miR présentent une augmentation de leur teneur en acide abscissique. Les études qu'ils ont menées ont permis d'identifier PHABULOSA comme intermédiaire de cette augmentation. En effet, ce gène, dont l'activité est inhibée par les miR165/166, stimule l'expression de *BGI* et active alors la biosynthèse de l'acide abscissique. Les deux homologues de PHABULOSA présentent des niveaux d'expression similaires dans les échantillons analysés, ne me permettant pas de suggérer un lien similaire.

En revanche, l'étude réalisée ici m'a permis de mettre en évidence le rôle potentiel de l'acide abscissique dans la régulation de la formation des parois secondaires. En effet, quatre gènes de réponse à cette hormone ont pu être identifiés par l'analyse de réseau. Parmi eux se trouvent une protéine phosphatase (*PP2C6*) et un récepteur d'acide abscissique (*PYR1*). Ces

deux gènes, présents dans le même sous module de co-expression, sont préférentiellement exprimés dans les fibres. Le récepteur d'acide abscissique PYR1 n'est d'ailleurs détecté que dans les fibres. Par ailleurs, ces deux gènes ont été corrélés positivement à la teneur en cellulose et en lignines des fibres suggérant un rôle dans la formation des parois secondaires.

Très récemment, une étude menée sur des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en acide abscissique endogène ou en protéine kinase de type SnRK2 a permis de mettre en évidence l'implication de ces deux gènes et de l'acide abscissique dans la mise en place des parois secondaires (Liu et al., 2021). En effet, cette étude montre, qu'en présence d'acide abscissique, les protéine kinases de type SnRK2 ne sont plus déphosphorylées par les PP2C et peuvent alors phosphoryler le facteur de transcription NST1, étape essentielle à son activation. L'inactivation des PP2C est réalisée par la formation d'un complexe avec les récepteurs de type PYR/PYL en présence d'acide abscissique. Par ailleurs, les triples mutants *snrk2* présentés dans l'étude de Liu et collaborateurs (2021) présentent une diminution de la teneur en cellulose, en lignines et en xylose, suggérant que SnRK2 régule d'autres gènes impliqués dans la formation des parois. Outre son rôle dans la formation des parois secondaires, l'acide abscissique joue également un rôle dans la différenciation des fibres. En effet, des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en acide abscissique présentent un retard de différenciation des fibres dans l'hypocotyle (Campbell et al., 2018).

L'identification de *PYR1* et *PP2C6* ainsi que leur corrélation au phénotype laisse à penser que la cascade de régulation PP2C-SnRK2 du gène *NST1* découverte récemment chez *Arabidopsis thaliana* existerait également chez le peuplier. Celle-ci influencerait alors la formation des parois secondaires (fig. 38). Il faut également noter que le récepteur PYR1 n'est pas détecté dans les rayons. Si cette absence n'est pas compensée par un autre récepteur, SnRK2 ne serait pas fonctionnel. Ainsi, la cascade de régulation PP2C-SnRK2 serait spécifique au développement des parois secondaires des fibres. Une étude plus approfondie passant notamment par l'analyse fonctionnelle de *PYR1* et/ou *PP2C6* permettrait de tester cette hypothèse.

3. Un facteur de transcription régissant les dernières étapes de la différenciation ?

Un facteur de transcription a été identifié comme central dans l'analyse de réseau : *WRKY12*. En effet, l'expression de ce gène, bien plus importante dans les rayons que dans les fibres, est corrélée à l'expression de dix gènes dont sept sont plus exprimés dans les fibres. Par ailleurs, l'intégration des données phénotypiques a montré que *WRKY12* est corrélé à

l'ensemble des composés, laissant sous-entendre un rôle majeur dans la formation des parois secondaires. Parmi les gènes coexprimés avec *WRKY12*, seul *CSLA9* est connu pour être impliqué dans la formation des parois secondaires puisqu'il code pour une β -mannane synthase impliquée dans la synthèse des glucomannanes (Goubet et al., 2009). En effet, *CSLA9* est directement induit par *MYB46* lui-même induit pour partie par *NST2* dont l'expression est inhibée par *WRKY12* (Wang et al., 2010). Parmi les autres gènes co-exprimés avec *WRKY12* se trouvent *GSTU4* et *BEN1*. Ces deux gènes pourraient être impliqués dans la mise en place de la mort cellulaire programmée. En effet, *GSTU4* est impliqué dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène (Balazadeh et al., 2011). Le peroxyde d'hydrogène est impliqué dans la formation des radicaux libres sur les monolignols, étape nécessaire à leur polymérisation et donc à la formation des lignines (Overney et al., 1998). Son rôle dans la mort cellulaire programmée a notamment été démontré chez *Arabidopsis thaliana* (Desikan et al., 1998), chez le tabac (Van Breusegem et al., 2001), chez *Aquilaria sinensis* (Liu et al., 2015) et chez *Populus trichocarpa* (Bagniewska-Zadworna et al., 2014). L'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont le peroxyde d'hydrogène initie la mort cellulaire. *BEN1* serait, lui, un inhibiteur des brassinostéroïdes (Yuan et al., 2007). Les brassinostéroïdes semblent également être impliqués dans la régulation de l'accumulation de ROS et de la mort cellulaire programmée. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, les doubles mutants *bak1 bkk1* n'étant plus capable de percevoir correctement cette hormone présentent une augmentation de l'accumulation de ROS et une augmentation de la mort cellulaire spontanée (He et al., 2007).

Au vu de ces éléments, *WRKY12* pourrait ne pas être qu'un élément inhibant *NST2*. En effet, il est possible que ce gène soit bien plus central et régule la formation des parois et la mise en place de la mort cellulaire programmée, dernières étapes de la différenciation cellulaire (**fig. 38**). Des analyses complémentaires sont cependant à effectuer afin d'appuyer cette hypothèse. En effet, il faudrait, dans un premier temps, valider ou non la relation transcriptionnelle entre *WRKY12* et ses cibles potentielles (*i.e.* les dix gènes auxquels son expression est corrélée). Pour cela, il faudrait détecter les éléments cis-régulateurs en amont des cibles potentielles et/ou de *WRKY12*. Cette identification pourrait être réalisée *in silico* notamment par la détection de motifs préférentiellement localisés (Bernard et al., 2010). Si des motifs permettant la fixation de *WRKY12* sont détectés, une validation de l'interaction *in vivo* devra être envisagée dans un second temps, par ChIP-Seq ou par étude de levures simple hybride.

4. MYB156 : répresseur fort de la lignification des parois secondaires ?

La caractérisation de lignées transgéniques menée dans le **chapitre III** m'a permis d'identifier une lignée présentant un phénotype très contrasté par rapport à la lignée sauvage : la lignée MYB156⁺, surexprimant le facteur de transcription *MYB156*. En effet, cette lignée présente notamment (i) des parois secondaires hypolignifiées uniquement au niveau des fibres et de certains rayons, (ii) une augmentation de la fraction polysaccharidique dans les parois des fibres, (iii) une modification de la qualité des lignines au niveau des fibres et (iv) peu à pas de modification de la composition des parois de vaisseaux. Par ailleurs, il est intéressant de noter que ce gène est détecté dans les données transcriptomiques analysées ici, sans différence d'expression entre fibres et rayons. Les cellules de fibres et de rayons échantillonnées n'ayant probablement pas débuté la lignification de leurs parois secondaires, il n'est pas étonnant de détecter ce gène si celui-ci est en effet un répresseur de la lignification. L'influence de *MYB156* sur les propriétés des parois a d'ores et déjà été étudié chez le peuplier (Lakhal, 2013; Yang et al., 2017a). Dans ces deux études, les peupliers surexprimant ce facteur de transcription présentent une diminution de la teneur en lignines de leur bois. Les mécanismes moléculaires sous-jacents et les cibles de ce facteur de transcription restent encore inconnus. Ces différents éléments donnent à penser que le facteur de transcription *MYB156* est impliqué dans la régulation de la lignification des parois secondaires des fibres et, éventuellement, des rayons (**fig. 38**). Cependant, afin de gagner en compréhension des mécanismes associés à ce facteur de transcription, il serait nécessaire de comparer le transcriptome des fibres de la lignée MYB156⁺ à celui de la lignée sauvage. Cette analyse devrait, notamment, permettre d'identifier les cibles potentielles de ce facteur de transcription impliquées, notamment, dans la lignification.

III. Perspectives

Ma thèse a permis de développer une approche intégrative permettant d'intégrer des données microtranscriptomiques et microphénotypiques. Ce développement a été mené sur trois échantillons de fibres et trois échantillons de rayon de bois normal. Des banques RNA-Seq de fibres et rayons de bois opposé et de tension ont également été produites en parallèle des échantillons de bois normal analysés. Il pourrait être intéressant, à court terme, de réaliser la même étude intégrative sur ces données afin de mettre en évidence d'éventuels processus conservés permettant de différencier les fibres des rayons. L'ajout des fibres de bois de tension dans cette étude permettrait également d'appuyer les corrélations réalisées entre expression de gènes et absorbance des bandes, les fibres de bois de tension présentant une forte signature

spectrale (**chapitre I**). Les processus identifiés permettront alors d'appuyer, de modifier ou de compléter le schéma proposé.

À moyen terme, il serait intéressant d'identifier des clones présentant une modification de l'expression des gènes présents dans le modèle proposé. Dans le cadre du projet ANR SYBIOPOP (2014-2018 ; coord. V. Segura), le transcriptome de 241 génotypes de *Populus nigra* cultivés en jardin commun à Orléans a été étudié (Chateigner et al., 2020). Différents paramètres phénotypiques ont également été mesurés, notamment la composition biochimique du bois (teneur en cellulose et en lignines ainsi que la qualité des lignines). Ainsi, il serait possible d'identifier des génotypes exprimant plus ou moins certains gènes d'intérêt (e.g. *WRKY12*) et d'analyser la corrélation entre l'expression de ces gènes et l'ensemble des phénotypes d'ores et déjà acquis

À moyen terme également, il serait intéressant de prendre en considération la cinétique de développement du bois dans le modèle établi. La microdissection des types cellulaires à différents stades de développement peut s'avérer fastidieuse et source d'erreur à l'échantillonnage. Ainsi, il serait préférable de réaliser cette analyse par une autre approche : le séquençage d'ARN sur cellules isolées, le scRNA-Seq. Cette approche est très prometteuse et permettrait d'avoir accès au transcriptome sur l'ensemble du processus de formation du bois. L'application du scRNA-Seq sur cellules végétales nécessite cependant l'obtention de protoplastes, cellules isolées sans parois végétale. Ainsi, le développement d'un protocole de préparation de protoplastes en vue d'une analyse scRNA-Seq a été initié durant ma thèse, que j'ai choisi de présenter dans le manuscrit de ma thèse, en épilogue.

EPILOGUE

**Vers une caractérisation dynamique du transcriptome
associé à la xylogénèse à l'échelle cellulaire**

Le peuplier présente un bois hétéroxylé, c'est-à-dire composé de différents types cellulaires assurant des fonctions précises (Plomion et al., 2001; Laurans et al., 2006; Déjardin et al., 2010) associées à des différences de composition biochimique des parois (Zhou et al., 2011). Au-delà de ces différences de fonction et de composition biochimique, chacun de ces types cellulaires présente un schéma de développement spécifique (Courtois-Moreau et al., 2009). En effet, alors que les cellules de rayon restent vivantes plusieurs années dans le bois, les cellules de fibres et de vaisseaux subissent, elles, une lyse cellulaire bien plus précoce. En outre, cette mort cellulaire programmée est plus rapide pour les cellules de vaisseaux. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à la formation du bois, il est donc essentiel d'avoir accès au transcriptome de chaque type cellulaire associé au gradient de différenciation du cambium au xylème mature. Plusieurs approches ont été développées pour tenter de répondre à cette problématique. Ainsi, des banques RNAseq ont été produites à partir de coupes longitudinales tangentielles cryosectionnées (Sundell et al., 2017). Cette méthode permet d'obtenir des informations sur les mécanismes moléculaires associés à la différenciation du cambium au xylème mature mais ne permet pas de prendre en compte la différenciation de chaque type cellulaire indépendamment. Ce frein peut être levé en échantillonnant spécifiquement des cellules de fibres, de rayons ou de vaisseaux par microdissection assistée par laser (**Chapitre II**; Blokhina et al., 2017; Shi et al., 2017). Cependant, il est ici très difficile de conserver le gradient de différenciation. Une technique émergente permet d'obtenir le transcriptome de chaque type cellulaire au cours de sa différenciation : le single-cell RNAseq (scRNA-Seq, Efroni et Birnbaum, 2016). Actuellement, le nombre de publications scientifiques portant sur le scRNA-seq appliqué au végétal est croissant (Efroni et Birnbaum, 2016; Birnbaum, 2018; Denyer et al., 2019; Ryu et al., 2019; Shulse et al., 2019; Turco et al., 2019; Zhang et al., 2019). Cette méthode a d'ores et déjà été appliquée à la racine d'*Arabidopsis thaliana* (Ryu et al., 2019; Turco et al., 2019) et a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés au développement de l'endoderme (Shulse et al., 2019) et à la différenciation entre la partie apicale et latérale de la coiffe radiculaire (Zhang et al., 2019). L'étude du transcriptome single-cell de mutants pour les pili racinaires chez *Arabidopsis thaliana* a montré également son efficacité (Ryu et al., 2019). La matrice extracellulaire reliant les cellules végétales les unes aux autres représente un obstacle majeur à l'emploi du scRNA-Seq sur des échantillons végétaux. En effet, le prérequis majeur à l'utilisation de cette approche est d'obtenir une solution de cellules isolées les unes des autres. Cette solution est obtenue, chez les végétaux, par la préparation de protoplastes, c'est-à-dire de cellules isolées sans parois. Cette

préparation se fait par digestion enzymatique de la paroi végétale (Cocking, 1960). Les parois cellulaires du bois sont composées de polysaccharides protégés de la dégradation chimique et microbienne par un composé polyphénolique : les lignines. La préparation de protoplastes de ce tissu est donc complexe. Dans cet épilogue, je présenterai la mise au point d'une méthode de préparation de protoplastes de bois. Cette méthode m'a permis de réaliser les premiers essais d'application du scRNA-Seq sur un peuplier sauvage et une lignée de peuplier transgénique, la lignée MYB156⁺. Présentant une hypolignification spécifiquement au niveau des fibres, cette lignée a été identifiée dans le **chapitre III** comme étant la plus pertinente dans l'étude de la formation des parois secondaires des fibres de bois et en particulier leur lignification.

I. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé a été produit comme décrit précédemment (**Chapitre III**). Brièvement, des plants de sept semaines multipliés *in vitro* ont été acclimatés en mini-serre durant trois semaines. Ils ont ensuite été empotés dans des pots de 10L et cultivés droits durant trois mois. Durant la phase de mise au point du protocole, des acclimations de six 717-1B4 sauvages ont été réalisées régulièrement, espacées de deux semaines entre février et mars 2019 afin d'avoir à disposition suffisamment de plants ayant l'âge souhaité (3 mois). Une fois le protocole établi, il a été appliqué aux échantillons témoins et transgéniques décrits au chapitre 3 afin de vérifier son efficacité sur les lignées transgéniques d'intérêt. Enfin, de nouveaux plants de MYB156⁺ et de la lignée sauvage ont été acclimatés en mai 2020 et cultivés trois mois pour réaliser l'essai de scRNAseq. Pour chaque préparation de protoplastes, une portion de tige de 30 cm a été prélevée à 90 cm de la base. Les portions de tige au niveau d'un nœud ont été retirées à l'aide d'une scie à ruban. Les entrenœuds ont ensuite été écorcés puis utilisés pour l'obtention de protoplastes.

2. Préparation des protoplastes

Lin et ses collaborateurs (2014) ont établi le seul protocole publié de préparation de protoplastes de xylème secondaire de *P. trichocarpa*. Brièvement, les entre-nœuds écorcés sont placés dans 40 mL d'une solution enzymatique contenant 1.5 % (p/v) de cellulase R-10 (C8001, DUCHEFA BIOCHEMIE, Haarlem, Pays-Bas) et 0.4 % (p/v) de macérozyme R-10 (M8002, DUCHEFA BIOCHEMIE, Haarlem, Pays-Bas). Ces enzymes sont diluées dans une solution contenant 20 mM MES à pH 5.7, 0.5 M de mannitol et 20 mM de KCl. Après 20 min

d'incubation à 24°C, les entrenœuds sont déplacés minutieusement dans 30 mL d'une solution de récupération appelée W5. Le W5 est une solution composée de 5mM de glucose, 2mM de MES à pH 5.7, 154 mM de NaCl, 125 mM de CaCl₂ et 5 mM de KCl. Une agitation manuelle légère des tubes durant 30 s permet alors la libération des protoplastes dans la solution. Les entrenœuds sont ensuite ôtés et la solution de protoplastes est filtrée à travers un filtre nylon avec une maille de 70 µm. Mes premiers essais ne m'ayant pas permis d'observer de protoplastes, j'ai ajouté une étape de centrifugation de la solution avant filtration. Cette centrifugation a été réalisée à 70 x g durant 10 min. La durée et la force de centrifugation a été établie sur la base d'un protocole existant au laboratoire et permettant la préparation de protoplastes de feuilles.

D'après Lin et ses collaborateurs (2014), ce protocole permet de récupérer les six premières rangées cellulaires du xylème en développement de plants de *P. trichocarpa* de six mois. Cependant, en pleine saison de croissance, les fibres de bois restent vivantes jusqu'à environ 650 µm du cambium (Courtois-Moreau et al., 2009) – soit environ quinze rangées cellulaires pour *P. trichocarpa*. Il est donc nécessaire d'adapter le protocole développé par Lin et ses collaborateurs (2014) afin d'obtenir l'ensemble des cellules en cours de différenciation. Par ailleurs, pour ne pas impacter leur transcriptome, il est essentiel que cette étape n'excède pas une heure (Chuveau et al., 2013; Ryu et al., 2019).

Dans le cadre du stage d'Alexandre Cordier (Master 1 'Biologie Végétale', Université d'Angers), nous avons testé différents paramètres afin d'améliorer (i) le nombre de rangées cellulaires digérées et (ii) la propreté (i.e. l'absence de débris) de la solution finale de protoplastes. Nous avons alors (i) modifié la composition du cocktail enzymatique en ajoutant 1.5% (p/v) de laccase (38426, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA) et 0.25mM de son cofacteur, le methylsyringate (S409448, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA) ; (ii) testé trois temps de digestion (20, 40 et 60 min) et (iii) utilisé deux protocoles de filtration, celui détaillé par Lin et ses collaborateurs (2014) et celui décrit par Ryu et ses collaborateurs (2019) pour la préparation de protoplastes à partir de pointes racinaires d'*Arabidopsis thaliana*. Ces deux protocoles diffèrent par le(s) tamis utilisé(s) et le nombre de filtration. En effet, les deux protocoles filtrent une première fois la solution à travers un tamis à 70 µm. Alors que Lin et ses collaborateurs (2014) ne suggèrent pas d'autres filtrations, Ryu et ses collaborateurs (2019) filtrent, eux, deux fois supplémentaires à l'aide d'un tamis à 40 µm. Ryu et ses collaborateurs (2019) appliquent également une centrifugation à 500 x g durant 10 min. Ce paramètre a donc également été testé.

L'essai de préparation des banques scRNA-Seq a été réalisé en collaboration avec la plateforme de transcriptomique de l'Institut des Sciences des Plantes Paris-Saclay (POPS, IPS2, Gif-sur-Yvette). 30 µL de la solution de protoplastes à une concentration ajustée entre 700 et 1 200 ϕ /µL ont été injectés dans une puce microfluidique Chromium (10X GENOMICS, Pleasanton, USA).

3. Observations histologiques

Afin d'identifier la condition optimale, un comptage minutieux de la quantité de protoplastes obtenus a été réalisé dans chaque condition à l'aide d'une cellule de Sedgewick-Rafter (10471, DUTSCHER, Brumath, France) sur le microscope inversé IX73 (OLYMPUS, Rungis, France). Pour chaque comptage, dix cases sont analysées puis moyennées. Une fois le protocole optimal obtenu, la viabilité des protoplastes a été mesurée par coloration au diacétate de fluorescéine (F7378, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA). Afin de s'assurer que les protoplastes obtenus n'aient pas de résidu de paroi, une coloration au calcofluor (18909, SIGMA-ALDRICH, Saint-Louis, USA) a également été réalisée.

Le nombre de couches cellulaires digérées a également été déterminé. Pour ce faire, des entrenœuds avant et après digestion ont été fixés puis inclus en résine LR White. Brièvement, après une nuit dans un tampon phosphate-citrate 0.1M à pH 6.8 contenant 4% de glutaraldéhyde et 0.5% de formaldéhyde puis deux rinçages dans du tampon phosphate-citrate seul, les échantillons ont progressivement été déshydratés dans de l'éthanol à concentration croissante jusqu'à 70%. Ils ont ensuite été placés en résine LR White polymérisée 54h à 56°C. Des coupes de 0.9 µm ont ensuite été réalisées à l'aide de l'ultramicrotome Ultracut R (Leica, WELTZAR, Allemagne) équipé d'un couteau diamant. Elles ont ensuite été colorées au bleu de méthylène-Azur II d'après le protocole décrit par Richardson et collaborateurs (1960). Les observations microscopiques ont par la suite été réalisées à l'aide d'un microscope DMR (Leica, WELTZAR, Allemagne) équipé d'un objectif 10x.

II. Résultats et discussion

1. Mise au point d'un protocole de préparation de protoplastes

Avant toute amélioration, je me suis assuré que le protocole établi sur *P. trichocarpa* était applicable sur le clone INRA 717-1B4 (*P. tremula* x *P. alba*). Sur les entrenœuds d'un échantillon de 60 cm de tige d'un plant de trois mois, 40 400 protoplastes, soit 673 par centimètre de tige, ont pu être isolés (fig. 39A). Ce protocole peut donc être appliqué sur le

clone INRA 717-1B4 et peut donc être utilisé comme base pour la préparation de protoplastes de xylème de ce dernier. La répétition de ce protocole sur les entrenœuds d'un échantillon de 30 cm de tige a conduit à des résultats similaires (fig. 39B, 20 min). Le premier paramètre à avoir été modifié est le temps de digestion. J'ai alors pu observer une forte influence de ce paramètre sur le nombre de protoplastes recueillis (fig. 39B). En effet, seize fois plus de protoplastes sont recueillis en doublant le temps de macération. Le nombre de protoplastes recueillis après 40 et 60 min de digestion est quasi-équivalent. Ainsi, afin de ne pas excéder l'heure, j'ai préféré une digestion de 40 min.

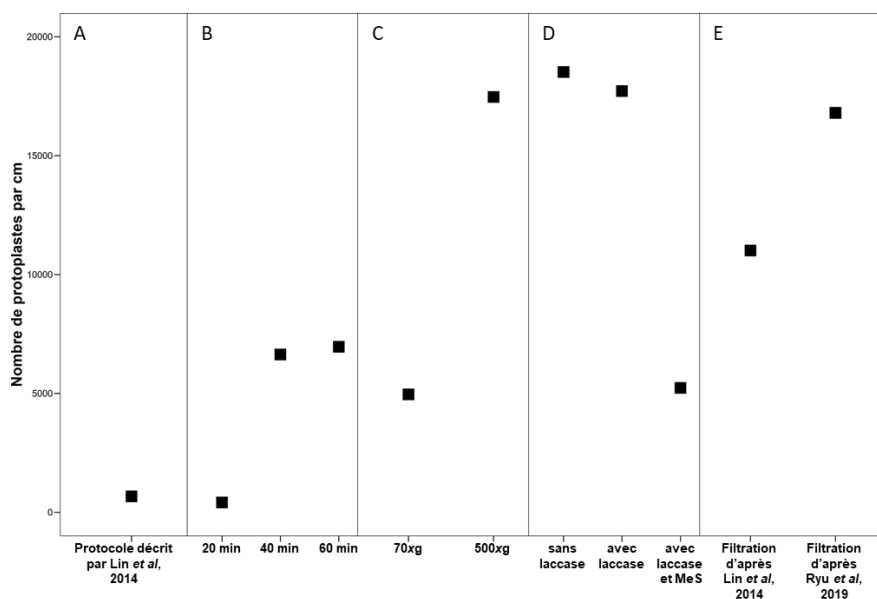


Figure 39 Influence des différents paramètres testés durant la phase de mise au point sur le nombre de protoplastes recueillis

Chaque point correspond à une préparation de protoplaste. Tous les protocoles ont été appliqués à des entrenœuds de 30 cm d'une tige principale de peuplier INRA 717-1B4 âgé de trois mois. MeS : méthylsyringate

(A) Nombre de protoplastes recueillis en appliquant le protocole décrit par Lin et collaborateurs (2014) incluant dix minutes de centrifugation à 70 x g. (B) Nombre de protoplastes recueillis en modifiant le temps de digestion sur la base du protocole appliqué en A. (C) Nombre de protoplastes recueillis en modifiant la force de centrifugation sur la base du protocole appliqué en A avec une durée de digestion de 40 min. (D) Nombre de protoplastes recueillis en modifiant la composition de la solution de digestion sur la base du protocole appliqué en C avec une centrifugation à 500 x g durant 10 min. (E) Nombre de protoplastes recueillis en modifiant la filtration sur la base du protocole appliqué en C avec une centrifugation à 500 x g durant 10 min.

Les laccases de champignons étant capable, dans certaines conditions, de dépolymériser les lignines, j'ai alors ajouté cette enzyme au cocktail enzymatique jusqu'alors composé uniquement d'enzymes dégradant les polysaccharides pariétaux. L'ajout de laccase ne semble pas avoir eu d'effet sur le nombre de protoplastes recueillis sans ajout de son cofacteur (fig. 39D). Dès lors que le méthylsyringate est présent dans la solution, on observe une forte diminution du nombre de protoplastes recueillis. Il est probable que le nombre de protoplastes isolés soit équivalent dans les trois préparations mais que le méthylsyringate ait un effet sur la viabilité des protoplastes conduisant à une diminution du nombre de protoplastes observés.

La centrifugation est également un paramètre important dans la préparation de protoplastes. En effet, si la force de centrifugation est trop faible, une grande part des protoplastes seront éliminés avec le surnageant. À l'inverse, si celle-ci est trop élevée, des débris auront tendance à se retrouver dans le culot. Ryu et ses collaborateurs (2019) utilisent une centrifugation à 500 x g durant 10 min, soit bien plus forte que celle utilisée jusqu'alors. L'application de ce paramètre a permis de tripler le nombre de protoplastes recueillis (fig. 39C). Le protocole de préparation de protoplastes établi par Ruy et ses collaborateurs (2019) sur la pointe racinaire d'*Arabidopsis thaliana* en vue d'un scRNA-Seq utilise une triple filtration : un premier passage à travers un tamis à 70 µm puis un double passage à travers un tamis à 40 µm. Étonnamment, cette triple filtration a permis de récupérer un plus grand nombre de protoplastes en comparaison à une unique filtration à 70 µm (fig. 39E). Cette préparation se distingue également par une nette diminution des débris.

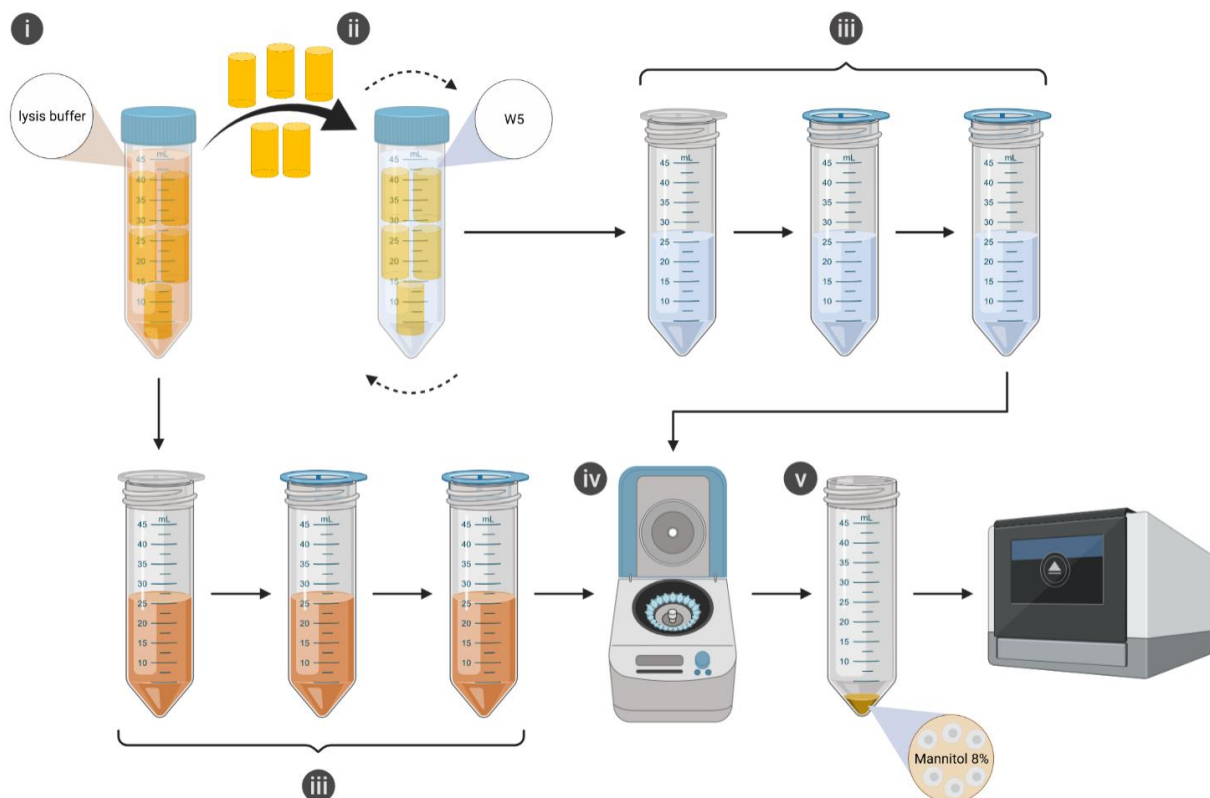


Figure 40 Protocole de préparation de protoplastes pour scRNA-Seq

(i) Incuber les entrenœuds durant 40 mn à 24°C et à l'obscurité dans un milieu de lyse composé de Cellulase R-10 et de Macérozyme R-10 ; (ii) Transférer minutieusement les entrenœuds dans une solution de W5 et placer 5 mn dans un agitateur orbital à 30 tours/mn ; (iii) Filtrer les solutions de digestion et de récupération à 70 µm puis deux fois à 40 µm ; (iv) Centrifuger 10 mn à 500 x g ; (v) Reprendre le culot dans une solution de mannitol à 12.7% et ajuster au goutte à goutte pour atteindre une concentration de mannitol à 8%. Lancer sans attendre la préparation des banques.

Les différents éléments testés m'ont permis d'établir un nouveau protocole permettant d'obtenir des protoplastes en quantité suffisante en un temps raisonnable (**fig. 40**). Les entrenœuds une fois écorcés sont placés dans 30 mL d'une solution de lyse contenant 1.5 % (p/v) de cellulase R-10, 0.4 % (p/v) de macérozyme R-10, 20 mM MES à pH 5.7, 0.5 M de mannitol et 20 mM de KCl. Après 40 min d'incubation à 24°C et à l'obscurité, les entrenœuds sont déplacés avec précaution à l'aide d'une pince dans 30 mL de W5. Ils sont alors placés dans un agitateur orbital durant 5 min à 30 tours / min. Cette étape permet la libération des protoplastes contenus dans le bois rendant le milieu trouble, gage d'une bonne efficacité. Les entrenœuds sont ensuite jetés. La solution de protoplastes est ensuite filtrée successivement à 70 µm et deux fois à 40 µm. Cette étape permet de se débarrasser de la plupart des débris. La solution de protoplastes est ensuite centrifugée, à température ambiante, à 500 x g pendant 10 min. Des protoplastes, probablement d'origine cambiale, ayant été observés dans le milieu de lyse, celui-ci est également filtré et centrifugé. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans une solution de mannitol 12.7% (p/v). Les deux culots sont ensuite mélangés. Pour finir, la concentration en mannitol est progressivement ajustée à 8% (p/v), limite maximale autorisée pour la suite. Cet ajustement est réalisé en ajoutant goutte à goutte le volume d'eau nécessaire. Il est nécessaire que cet ajustement soit progressif afin d'éviter un trop grand choc osmotique.

Sur la base de ce protocole, j'ai étudié le nombre de couches cellulaires digérées. Pour cela, j'ai comparé des coupes transversales de la tige d'un plant avant digestion (écorcée et non écorcée) à celles obtenues après digestion (**fig. 41**). On observe qu'à l'écorçage, la majeure partie de la zone cambiale reste solidaire du xylème (**fig. 41A-B**). Il est difficile de compter avec précision le nombre de rangée cellulaire digérée (**fig. 41B-C**). Nous remarquons tout de même que la zone digérée correspond à l'intégralité de la zone cambiale solidaire du xylème et une partie du xylème en développement. Par ailleurs, des contenus cellulaires sont observables bien au-delà de la zone digérée avec le protocole ci-dessus. Il ne permettrait donc pas d'obtenir l'intégralité des cellules, notamment des fibres, en cours de formation. Afin d'obtenir l'intégralité du gradient de différenciation cellulaire, il est possible d'avoir recours à une préparation de noyaux. Cette préparation nécessite cependant un nouvel effort de développement afin d'obtenir un protocole efficace.

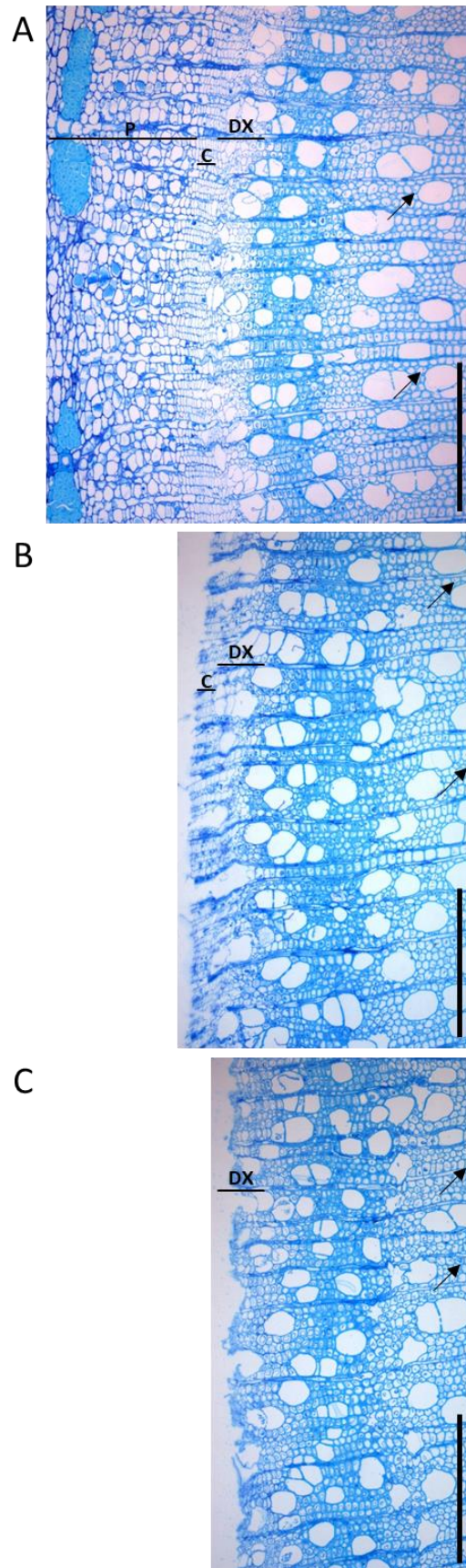


Figure 41 Coupes transversales des tiges non écorcées (A), écorcées (B) et après digestion (C). *P* : phloème, *C* : cambium, *DX* : xylème en développement. Barre d'échelle : 500 μ m. Les flèches indiquent des cellules éloignées du cambium dans lesquels un contenu cellulaire est observable.

2. Application du protocole établi aux lignées transgéniques étudiées dans le chapitre III

Dans le **chapitre III**, j'ai étudié trois lignées transgéniques présentant des phénotypes intéressants et dont l'étude transcriptomique pourrait permettre de gagner en compréhension des mécanismes moléculaires associés à la formation du bois. Les lignées CCR⁻, CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺ et MYB156⁺ présentent toutes trois des modifications de composition des parois. La lignée MYB156⁺ présenterait, en plus d'une hypolignification des parois secondaires de ses fibres, une diminution de l'activité cambiale. Afin d'envisager leur analyse par scRNA-Seq, j'ai appliqué le protocole de préparation de protoplastes aux échantillons analysés au **chapitre III**. Le nombre de protoplastes recueillis sur les trois lignées transgéniques est sensiblement équivalent à celui obtenu sur la lignée sauvage (**fig. 42A**). Cependant, une grande variabilité est observable au sein d'une même lignée, notamment au niveau de la lignée sauvage. Il est donc essentiel de réaliser un comptage minutieux des préparations de protoplastes avant chaque passage en cellule microfluidique.

D'après ses caractéristiques anatomiques et physiologiques ainsi que la composition des parois de ses fibres, la lignée MYB156⁺ est considérée comme étant la plus pertinente dans l'étude de la formation des parois secondaires des fibres de bois et en particulier leur lignification. Trois plants de cette lignée et de la lignée sauvage ont donc été utilisés pour essayer de produire des banques scRNA-Seq. Une grande variabilité entre les préparations de protoplastes a à nouveau pu être observée (**fig. 42B**). En effet, entre plus de 500 000 et près de 1 500 000 protoplastes ont pu être isolés sur la lignée sauvage et entre près de 1 300 000 et plus de 2 000 000 sur la lignée MYB156⁺. Dans toutes les préparations, la quantité de protoplastes recueillis est suffisante pour un passage en puce microfluidique, moyennant un équilibrage correct de la concentration en protoplastes. Par ailleurs, pour chaque préparation, près de 95% des protoplastes sont comptés comme viables après coloration au diacétate de fluorescéine (**fig. 42B-D**).

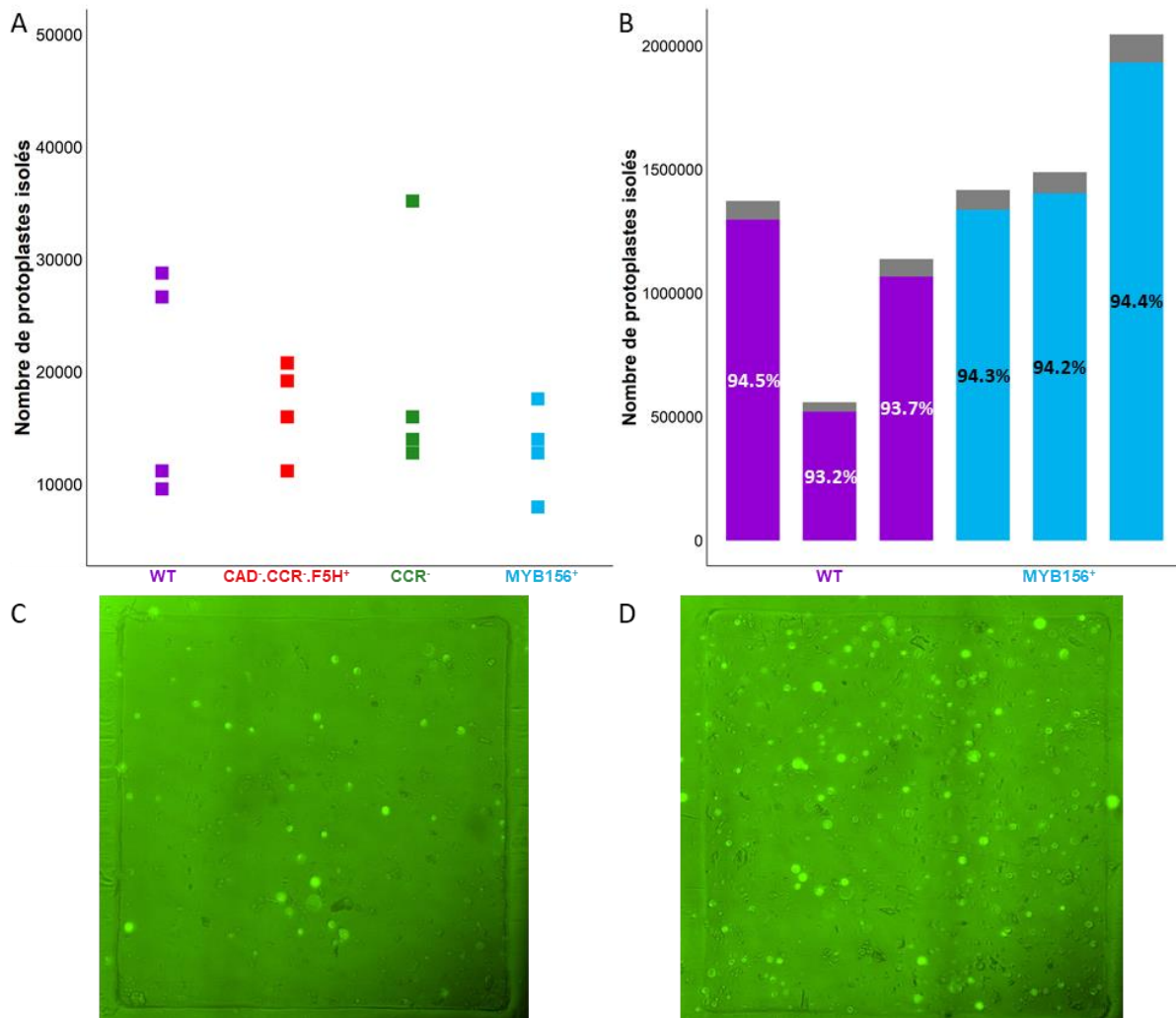


Figure 42 Application du protocole de préparation de protoplastes aux lignées transgéniques (A) Nombre de protoplastes isolés pour chaque lignée transgénique. Chaque point représente une préparation de protoplaste réalisée à partir de 30 cm de tige d'un arbre. (B) Nombre de protoplastes isolés sur la lignée sauvage et la lignée MYB156⁺ lors de l'essai de préparation des banques. Chaque barre représente une préparation de protoplaste. Les pourcentages indiqués représentent le pourcentage de protoplastes viables dans la préparation. Violet : nombre de protoplastes viables dans la lignée sauvage, Bleu : nombre de protoplastes viables dans la lignée MYB156⁺, Gris : nombre de protoplastes non viables. (C-D) Cellule de comptage d'une préparation de protoplastes de la lignée sauvage (C) et transgénique (D).

III. Limites et perspectives

1. scRNA-Seq de xylème secondaire : un premier essai

Une fois le protocole de préparation de protoplastes établi, nous avons réalisé, en collaboration avec la plateforme de transcriptomique de l'Institut des Sciences des Plantes Paris-Saclay (POPS, IPS2, Gif-sur-Yvette), le premier essai de scRNA-Seq sur xylème secondaire. Deux problèmes sont survenus. Le premier problème est apparu dès la récupération des émulsions après passage dans la puce microfluidique. En effet, alors qu'une émulsion correcte a pu être observée pour la lignée sauvage, seule une émulsion partielle a pu être récupérée pour la lignée MYB156⁺. Malgré ce problème, le protocole a tout de même été poursuivi jusqu'avant la préparation des banques. Après rétro-transcription, une trop faible quantité d'ADN (733 pg/μL) a été récupérée pour la lignée sauvage. Nous avons pensé, dans un premier temps, à un problème de lyse des protoplastes. Cela aurait pu être causé par une digestion incomplète de la paroi des protoplastes. Après coloration au calcofluor, aucune fluorescence n'a pu être observée sur les protoplastes (**fig. 43**). Nous avons donc écarté cette hypothèse et nous sommes rapprochés du service support de 10X Genomics. Celui-ci a émis plusieurs hypothèses. Parmi elle, on notera, pour l'échantillon MYB156⁺, un blocage possible des canaux microfluidiques soit par des débris, soit par des cellules présentant un diamètre supérieur à la taille des canaux. D'après les résultats obtenus au **chapitre III**, la lignée MYB156⁺ présente des cellules plus larges que la lignée sauvage. Cependant, les protoplastes recueillis ne semblent pas, à première vue (**fig. 42C-D**), présenter de différence de taille avec la lignée sauvage. Une analyse plus extensive du diamètre des protoplastes recueillis dans la lignée sauvage et la lignée transgénique reste toutefois nécessaire. Les autres hypothèses soulevées nécessitent, elles aussi, des analyses complémentaires. Un nouvel essai, en présence de personnel de 10X Genomics est prévu au printemps 2021 afin d'identifier les hypothèses les plus probables et d'obtenir le premier scRNA-Seq de xylème secondaire.

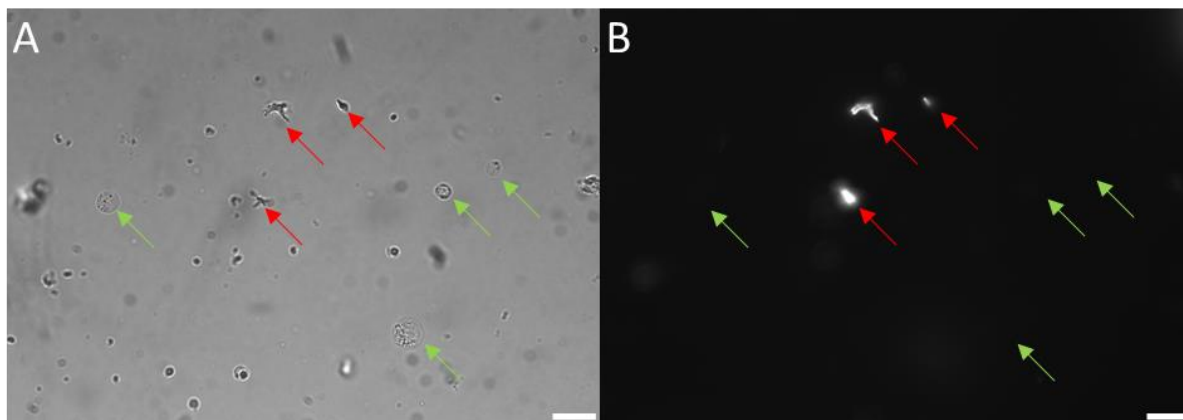


Figure 43 Vérification de l'absence de paroi sur les protoplastes isolés
(A) Image photonique, (B) image en fluorescence UV. Les flèches vertes indiquent les protoplastes, les flèches rouges des résidus pariétaux.

2. Vers une interprétation biologique des résultats futurs

Bien que le scRNA-Seq permette d'obtenir un transcriptome à l'échelle cellulaire, l'identité de ces cellules est perdue. Afin de permettre une interprétation biologique de ces données, plusieurs méthodes statistiques ont été développées pour permettre (i) d'identifier des groupes de cellules présentant un transcriptome similaire (*e.g.* SINCERA, SC3, seurat) et (ii) de reconstruire des pseudo-cinétiques de différenciation entre ces groupes (*e.g.* monocle, destiny, ouija) (Trapnell et al., 2014; Guo et al., 2015; Satija et al., 2015; Angerer et al., 2016; Campbell et Yau, 2016; Kiselev et al., 2017). Afin d'assigner un type cellulaire à chacun de ces groupes, il est nécessaire d'avoir recours à des gènes marqueurs. Idéalement, ceux-ci doivent être spécifiquement exprimés dans ce type cellulaire. Ces gènes marqueurs peuvent être identifiés directement sur les données scRNA-Seq ou sur la base de travaux publiés dans la littérature. Les données analysées au **chapitre II** sont donc précieuses et permettent d'identifier des gènes spécifiquement exprimés dans les fibres et les rayons (sans toutefois s'assurer de leur absence dans les autres types cellulaires du bois). En effet, dans mon analyse, j'ai pu mettre en évidence la spécificité de l'expression de *PtAGL12* dans les fibres. C'est également le cas pour les gènes Potri.002G018300 codant pour *PtCAD9*. Deux autres gènes, Potri.004G015300, codant pour une peroxydase et Potri.013G100800, codant pour une phosphorylase sont très fortement détectés dans les fibres et très peu dans les rayons. Les gènes uniquement exprimés dans les rayons sont rares et généralement faiblement exprimés. Les gènes Potri.002G138800, codant pour une protéine kinase, Potri.006G048500, codant pour *PtGT61* et Potri.002G138900, codant pour *PtWRKY12* sont très fortement détectés dans les rayons et plus faiblement dans les fibres. Sous réserve qu'ils soient détectés dans les données scRNA-Seq, ces sept gènes pourraient donc être utilisés comme marqueurs des fibres et rayons. Une recherche

bibliographique m'a également permis d'identifier des gènes spécifiquement exprimés dans les initiales cambiales et les cellules de vaisseaux. Ainsi, les gènes Potri.005G125800, codant pour *PtRHAM4-1* (Kim et al., 2019), Potri.014G025300, codant pour *PtWOX4* (Kim et al., 2019) et Potri.006G096600, codant pour *PtOPS-A* (Sundell et al., 2017) pourraient être des marqueurs des cellules cambiales. De même, Potri.004G207600, codant pour *PdXCP1* (Gui et al., 2020), Potri.002G154100, codant pour *PNAC021* (Shi et al., 2017a) et Potri.018G139300, codant pour l'homologue d'*AtWRKY11* (Shi et al., 2017a) pourraient être des marqueurs des cellules de vaisseaux.

La spécificité des gènes proposés ici comme marqueurs doit cependant être validée. Plusieurs approches sont possibles. Certaines ont été initiées lors de ma thèse pour les gènes identifiés grâce aux données du **chapitre II**. Une première approche consiste à fusionner le promoteur de ces gènes à la séquences codante d'un gène rapporteur comme la GFP¹ ou GUS². Pour cela, les promoteurs des gènes identifiés grâce aux données du **chapitre II** ont été clonés, exception faite de *PtAGL12*. Ils seront par la suite fusionnés avec la séquence codante de la GFP d'une part et la séquence codante de l'enzyme GUS d'autre part. Ces séquences Promoteur::Gène_rapporteur seront ensuite inséré par transgénèse dans le génome du clone INRA 717-1B4 comme décrit par Leplé et ses collaborateurs (1992). La spécificité d'expression de la GFP ou de l'enzyme GUS conférée par les séquences promotrices choisies permettra alors d'obtenir un indice supplémentaire de la spécificité des gènes choisis. En effet, si le gène est effectivement spécifiquement exprimé dans un type cellulaire donnée, alors la fluorescence de la GFP ou l'activité GUS sous contrôle du promoteur de ce gène ne devraient être détectées que dans ce type cellulaire.

Une seconde approche est basée sur l'hybridation *in situ*. L'objectif ici est d'identifier le(s) type(s) cellulaire(s) voire le(s) stade(s) de différenciation dans le(s)quel(s) est exprimé le gène par détection de son ARN. Cette méthode est très bien maîtrisée par la plateforme histocytologie et d'imagerie végétale (PHIV Site de Lavalette, CIRAD, Montpellier), notamment sur tissu ligneux. Dans le cadre d'un séjour doctoral au sein de cette plateforme, j'ai alors pu initier l'adaptation de ce protocole sur xylème secondaire de peuplier. Le premier défi a été de maintenir la coupe sur la lame. En effet, après déparaffinage, nous avons observé un fort décollement des coupes des lames utilisées. Ce problème a pu être résolu en suivant le protocole décrit par Mahoudeau (1888). Les résultats obtenus sur un gène fortement exprimé dans les

¹ green fluorescent protein

² β-glucuronidase

tissus en cours de lignification (Potri.009G095800 codant pour *PtCAD1*) sont très encourageants. Cependant, une forte hybridation aspécifique est présente, notamment sur les témoins négatifs. Une amélioration reste donc nécessaire afin de réduire ce bruit.

3. Limites de la méthode

L'analyse du transcriptome par single cell RNA-sequencing est une révolution récente qui permettra de mieux comprendre un grand nombre de mécanismes complexes, notamment en biologie du développement. L'application de cette méthode pour l'étude de la xylogénèse est, à mon sens, une évidence. Cette méthode présente tout de même d'importants points de vigilance. Parmi eux, on notera notamment l'obligation de préparer des protoplastes. Cette étape, essentielle et qui a fait l'objet d'un long processus de développement durant ma thèse, pourrait cependant influencer l'expression de gènes clefs, notamment associés à la formation des parois. Il sera donc primordial de comparer l'expression de ces gènes à des ARN extraits plus classiquement, notamment par qRT-PCR. La préparation de noyaux pouvant se faire sans préparation de protoplastes permettrait de prévenir ce risque. Cependant, cette préparation est tout aussi délicate et nécessite à son tour un gros effort de développement afin d'obtenir un protocole efficace.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'originalité de ma thèse réside dans le développement d'approches innovantes à l'échelle cellulaire afin de contourner la complexité du tissu bois. Ces approches visent à une caractérisation de la composition des parois et du transcriptome à l'échelle de la cellule. Ainsi, le développement de la microspectroscopie ATR-FTIR a permis une caractérisation fine des propriétés physico-chimiques des parois de différents types cellulaires dans différents types de bois. L'application du RNA-Seq sur îlots de cellules disséqués par capture laser a, elle, permis d'accéder au transcriptome des fibres et des rayons. L'intégration des données obtenues par ces deux approches m'a permis d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la formation des fibres de bois et la construction de leur paroi secondaire. Dans ce modèle enrichi, les facteurs de transcription *SCR* et *WRKY12* ainsi que l'acide abscissique seraient des acteurs clefs. Cependant, les résultats obtenus ne suffisent pas à eux seuls pour confirmer les mécanismes proposés. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires afin d'éprouver ce modèle et de gagner encore sur la compréhension des mécanismes associés au développement des fibres. Par ailleurs, la méthodologie développée permettant l'analyse phénotypique et transcriptomique ainsi que l'intégration de ces deux types de données à l'échelle cellulaire est facilement transférable à d'autres jeux de données. Ainsi, cette méthodologie appliquée à l'étude de la lignée *MYB156*⁺ devrait permettre de lever le voile sur le rôle du facteur de transcription *MYB156* dans la lignification.

RÉFÉRENCES

- Abramson, M., Shoseyov, O., et Shani, Z. (2010). Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production et processability. *Plant Science* 178, 61–72. doi:10.1016/j.plantsci.2009.11.003.
- Agarwal, U. P., et Ralph, S. A. (2008). Determination of ethylenic residues in wood et TMP of spruce by FT-Raman spectroscopy. *Holzforschung* 62. doi:10.1515/HF.2008.112.
- Agusti, J., Lichtenberger, R., Schwarz, M., Nehlin, L., et Greb, T. (2011). Characterization of Transcriptome Remodeling during Cambium Formation Identifies MOL1 et RUL1 As Opposing Regulators of Secondary Growth. *PLOS Genetics* 7, e1001312. doi:10.1371/journal.pgen.1001312.
- Akerholm, M., Hinterstoisser, B., et Salmén, L. (2004). Characterization of the crystalline structure of cellulose using static et dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 339, 569–578. doi:10.1016/j.carres.2003.11.012.
- Åkerholm, M., et Salmén, L. (2001). Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer* 42, 963–969. doi:10.1016/S0032-3861(00)00434-1.
- Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., et al. (2012). AtABC29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* 22, 1207–1212. doi:10.1016/j.cub.2012.04.064.
- Alexa, A., et Rahnenführer, J. (2019). *topGO: enrichment analysis for gene ontology*.
- Ali, S. M., Bonnier, F., Lambkin, H., Flynn, K., McDonagh, V., Healy, C., et al. (2013). A comparison of Raman, FTIR et ATR-FTIR micro spectroscopy for imaging human skin tissue sections. *Analytical Methods* 5, 2281–2291.
- Allison, G. G. (2011). “Application of Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy (FTIR) for Research into Biomass Feed-Stocks,” in *Fourier Transforms - New Analytical Approaches et FTIR Strategies* (InTech). doi:10.5772/15785.
- Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S. S., Carlis, J., et al. (1998). Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 9693–9698. doi:10.1073/pnas.95.16.9693.
- Aloni, R. (1979). Role of auxin et gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. *Plant Physiol.*, 609–614.
- Aloni, R. (1985). Plant growth method et composition.
- Aloni, R. (2001). Foliar abd axial aspects of vascular differentiation - hypothesis et evidence. *J. Plant Growth Regul.*, 22–34.
- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., et Delmer, D. P. (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase et its potential role in synthesis of cellulose et callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9353–9357. doi:10.1073/pnas.92.20.9353.
- Andersson, S.-I., Samuelson, O., Ishihara, M., et Shimizu, K. (1983). Structure of the reducing end-groups in spruce xylan. *Carbohydrate Research* 111, 283–288. doi:10.1016/0008-6215(83)88312-8.
- Andersson-Gunnerås, S., Hellgren, J. M., Bjorklund, S., Regan, S., Moritz, T., et Sundberg, B. (2003). Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. *The Plant Journal* 34, 339–349. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01727.x.
- Andersson-Gunnerås, S., Mellerowicz, E. J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P. M., et al. (2006). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts et metabolites identifies biochemical et developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant J.* 45, 144–165. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02584.x.
- Andrew Chan, K. L., et Kazarian, S. G. (2016). Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues et live cells. *Chemical Society Reviews* 45, 1850–1864. doi:10.1039/C5CS00515A.
- Angerer, P., Haghverdi, L., Büttner, M., Theis, F. J., Marr, C., et Buettner, F. (2016). *destiny*: diffusion maps for large-scale single-cell data in R. *Bioinformatics* 32, 1241–1243. doi:10.1093/bioinformatics/btv715.
- Anstead, J. A., Froelich, D. R., Knoblauch, M., et Thompson, G. A. (2012). Arabidopsis P-Protein Filament Formation Requires Both AtSEOR1 et AtSEOR2. *Plant et Cell Physiology* 53, 1033–1042. doi:10.1093/pcp/pcs046.
- Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A., et Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science* 12, 419–426. doi:10.1016/j.tplants.2007.08.003.
- Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., et al. (1998). Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* 279, 717–720. doi:10.1126/science.279.5351.717.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25–29. doi:10.1038/75556.
- Assenov, Y., Ramírez, F., Schelhorn, S.-E., Lengauer, T., et Albrecht, M. (2008). Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics* 24, 282–284. doi:10.1093/bioinformatics/btm554.
- Atmodjo, M. A., Hao, Z., et Mohnen, D. (2013). Evolving Views of Pectin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 64, 747–779. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105534.
- Atmodjo, M. A., Sakuragi, Y., Zhu, X., Burrell, A. J., Mohanty, S. S., Atwood, J. A., et al. (2011). Galacturonosyltransferase (GAUT)1 et GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic

- homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20225–20230. doi:10.1073/pnas.1112816108.
- Bagniewska-Zadworna, A., Arasimowicz-Jelonek, M., Smoliński, D. J., et Stelmasik, A. (2014). New insights into pioneer root xylem development: evidence obtained from *Populus trichocarpa* plants grown under field conditions. *Annals of Botany* 113, 1235–1247.
- Bailey, I. W. (1944). The development of vessels in Angiosperms et its significance in morphological research. *Am. J. Bot.* 31, 421–428.
- Baima, S., Nobili, F., Sessa, G., Lucchetti, S., Ruberti, I., et Morelli, G. (1995). The expression of the Athb-8 homeobox gene is restricted to provascular cells in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121, 4171–4182.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, A., Wisman, E., Altamura, M. M., Ruberti, I., et al. (2001). The Arabidopsis ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems. *Plant Physiology* 126, 643–655. doi:10.1104/pp.126.2.643.
- Baison, J., Vidalis, A., Zhou, L., Chen, Z., Li, Z., Sillanpää, M. J., et al. (2019). Genome-wide association study identified novel candidate loci affecting wood formation in Norway spruce. *The Plant Journal* 100, 83–100. doi:10.1111/tpj.14429.
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., et al. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc* 9, 1771–1791. doi:10.1038/nprot.2014.110.
- Balakshin, M., Capanema, E., Gracz, H., Chang, H., et Jameel, H. (2011). Quantification of lignin–carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta* 233, 1097–1110. doi:10.1007/s00425-011-1359-2.
- Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanor, M. I., Xue, G.-P., et al. (2011). ORS1, an H₂O₂-Responsive NAC Transcription Factor, Controls Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 4, 346–360. doi:10.1093/mp/ssp080.
- Baldy, A., Jacquemot, M.-P., Griveau, Y., Bauland, C., Reymond, M., et Mechin, V. (2017). Energy Values of Registered Corn Forage Hybrids in France over the Last 20 Years Rose in a Context of Maintained Yield Increase. *American Journal of Plant Sciences* 08, 1449–1461. doi:10.4236/ajps.2017.86099.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., et Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation et De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy* 43, 772–777. doi:10.1366/0003702894202201.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., et Lister, S. J. (1993). Correction to the Description of Standard Normal Variate (SNV) et De-Trend (DT) Transformations in *Practical Spectroscopy with Applications in Food et Beverage Analysis—2nd Edition*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 1, 185–186. doi:10.1255/jnirs.21.
- Barnett, J. R., et Bonham, V. A. (2004). Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. *Biological Reviews* 79, 461–472. doi:10.1017/S1464793103006377.
- Barratt, D. H. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., et al. (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13124–13129. doi:10.1073/pnas.0900689106.
- Baskin, T. I. (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: A review et a model. *Protoplasma* 215, 150–171. doi:10.1007/BF01280311.
- Basu, D., Liang, Y., Liu, X., Himmeldirk, K., Faik, A., Kieliszewski, M., et al. (2013). Functional Identification of a Hydroxyproline- O -galactosyltransferase Specific for Arabinogalactan Protein Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 10132–10143. doi:10.1074/jbc.M112.432609.
- Bdeir, R., Busov, V., Yordanov, Y., et Gailing, O. (2016). Gene dosage effects et signatures of purifying selection in lateral organ boundaries domain (LBD) genes LBD1 et LBD18. *Plant Systematics et Evolution* 302, 433–445.
- Bell, E. M., Lin, W. -c., Husbands, A. Y., Yu, L., Jaganatha, V., Jablonska, B., et al. (2012). *Arabidopsis* LATERAL ORGAN BOUNDARIES negatively regulates brassinosteroid accumulation to limit growth in organ boundaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 21146–21151. doi:10.1073/pnas.1210789109.
- Bernard, V., Lecharny, A., et Brunaud, V. (2010). Improved detection of motifs with preferential location in promoters. *Genome* 53, 739–752. doi:10.1139/G10-042.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., et al. (2011). Disruption of *LACCASE4* et *17* Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems. *The Plant Cell* 23, 1124–1137. doi:10.1105/tpc.110.082792.
- Bertrand, D., et Dufour, E. (2006). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Tec & Doc. Paris: Lavoisier.

- Bhargava, A., Ahad, A., Wang, S., Mansfield, S. D., Haughn, G. W., Douglas, C. J., et al. (2013). The interacting MYB75 et KNAT7 transcription factors modulate secondary cell wall deposition both in stems et seed coat in Arabidopsis. *Planta* 237, 1199–1211. doi:10.1007/s00425-012-1821-9.
- Biemlet, S., Tschiersch, H., et Sonnewald, U. (2004). Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis et photosynthesis in tobacco plants. *Plant Physiol.*, 254–265.
- Birnbaum, K. D. (2018). Power in Numbers: Single-Cell RNA-Seq Strategies to Dissect Complex Tissues. *Annual Review of Genetics* 52, 203–221. doi:10.1146/annurev-genet-120417-031247.
- Biro, R. L., Hunt, E. R., Erner, Y., et Jaffe, M. J. (1980). Thigmomorphogenesis: Changes in Cell Division et Elongation in the Internodes of Mechanically-perturbed or Ethrel-treated Bean Plants*. *Annals of Botany* 45, 655–664. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a085874.
- Bischoff, V., Selbig, J., et Scheible, W.-R. (2010). Involvement of TBL/DUF231 proteins into cell wall biology. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1057–1059. doi:10.4161/psb.5.8.12414.
- Biswal, A. K., Atmodjo, M. A., Pattathil, S., Amos, R. A., Yang, X., Winkeler, K., et al. (2018). Working towards recalcitrance mechanisms: increased xylan et homogalacturonan production by overexpression of GALacturonosylTransferase12 (GAUT12) causes increased recalcitrance et decreased growth in Populus. *Biotechnology for Biofuels* 11, 9. doi:10.1186/s13068-017-1002-y.
- Biswal, A. K., Hao, Z., Pattathil, S., Yang, X., Winkeler, K., Collins, C., et al. (2015). Downregulation of GAUT12 in Populus deltoides by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth et reduced xylan et pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnology for Biofuels* 8, 41. doi:10.1186/s13068-015-0218-y.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., et Sundberg, B. (2007). Cross-talk between gibberellin et auxin in development of Populus wood: Gibberellin stimulates polar auxin transport et has a common transcriptome with auxin. *Plant J.*, 499–511.
- Blokhina, O., Laitinen, T., Hatakeyama, Y., Delhomme, N., Paasela, T., Zhao, L., et al. (2019). Ray Parenchymal Cells Contribute to Lignification of Tracheids in Developing Xylem of Norway Spruce. *Plant Physiology* 181, 1552–1572. doi:10.1104/pp.19.00743.
- Blokhina, O., Valerio, C., Sokolowska, K., Zhao, L., Kärkönen, A., Niittylä, T., et al. (2017). Laser Capture Microdissection Protocol for Xylem Tissues of Woody Plants. *Front Plant Sci* 7. doi:10.3389/fpls.2016.01965.
- Bock, P., et Gierlinger, N. (2019). Infrared et Raman spectra of lignin substructures: Coniferyl alcohol, abietin, et coniferyl aldehyde. *Journal of Raman Spectroscopy*. doi:10.1002/jrs.5588.
- Boerjan, W., Ralph, J., et Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54, 519–546. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Bonawitz, N. D., et Chapple, C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu. Rev. Genet.* 44, 337–363. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163508.
- Boudet, A. M., Lapierre, C., et Grima-Pettenati, J. (1995). Biochemistry et Molecular Biology of Lignification. *The New Phytologist* 129, 203–236.
- Bowles, D. (2002). A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, Arabidopsis thaliana. *Biochemical Society Transactions* 30, 301–306. doi:10.1042/bst0300301.
- Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K., et Poppenberger, B. (2005). Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 254–263. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.007.
- Bradshaw, H. D., Ceulemans, R., Davis, J., et Stettler, R. (2000). Emerging Model Systems in Plant Biology: Poplar (Populus) as A Model Forest Tree. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 306–313. doi:10.1007/s003440000030.
- Braun, H. J. (1967). Entwicklung und Bau der Holzstrahlen unter dem Aspekt der Kontakt-Isolations-Differenzierung gegenüber dem Hydrosystem. I. Das Prinzip der Kontakt-Isolations-Differenzierung. *Holzforschung* 21, 33–37. doi:10.1515/hfsg.1967.21.2.33.
- Brett, C. T., et Waldron, K. W. (1990). *Physiology et Biochemistry of Plant Cell Walls*. Springer Netherlands doi:10.1007/978-94-010-9641-6.
- Bringmann, M., Landrein, B., Schudoma, C., Hamant, O., Hauser, M.-T., et Persson, S. (2012). Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule–cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in Plant Science* 17, 666–674. doi:10.1016/j.tplants.2012.06.003.
- Bromley, J. R., Busse-Wicher, M., Tryfona, T., Mortimer, J. C., Zhang, Z., Brown, D. M., et al. (2013). GUX1 et GUX2 glucuronyltransferases decorate distinct domains of glucuronoxylan with different substitution patterns. *The Plant Journal* 74, 423–434. doi:10.1111/tpj.12135.
- Brown, A. B., et Cormack, R. H. G. (1937). Stimulation of cambial activity locally in the region of application et at e distance in relation to a wound, by means of heterauxin. *Can. J. For. Res.*, 433–441.
- Brown, C. L., et Sommer, H. E. (1982). “Vegetative Propagation of Dicotyledonous Trees,” in *Tissue Culture in Forestry*, eds. J. M. Bonga et D. J. Durzan (Dordrecht: Springer Netherlands), 109–149. doi:10.1007/978-94-017-3538-4_5.

- Brown, D. M., Goubet, F., Wong, V. W., Goodacre, R., Stephens, E., Dupree, P., et al. (2007). Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *The Plant Journal* 52, 1154–1168. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03307.x.
- Brown, D. M., Zeef, L. A. H., Ellis, J., Goodacre, R., et Turner, S. R. (2005). Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling et reverse genetics. *Plant Cell* 17, 2281–2295. doi:10.1105/tpc.105.031542.
- Brown, D. M., Zhang, Z., Stephens, E., Dupree, P., et Turner, S. R. (2009). Characterization of IRX10 et IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 57, 732–746. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03729.x.
- Brunner, A. M., Busov, V. B., et Strauss, S. H. (2004). Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends in Plant Science* 9, 49–56. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.006.
- Busov, V. B., Brunner, A. M., Meilan, R., Filichkin, S., Ganio, L., Gandhi, S., et al. (2005). Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. *New Phytologist*, 9–18. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01412.x@10.1111/(ISSN)1469-8137.Plantenvironmentaladaptation.
- Butenko, M. A., Vie, A. K., Brembu, T., Aalen, R. B., et Bones, A. M. (2009). Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends in Plant Science* 14, 255–263. doi:10.1016/j.tplants.2009.02.002.
- Caillaud, M.-C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., et al. (2008). MAP65-3 Microtubule-Associated Protein Is Essential for Nematode-Induced Giant Cell Ontogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20, 423–437. doi:10.1105/tpc.107.057422.
- Camargo, E. L. O., Ployet, R., Cassan-Wang, H., Mounet, F., et Grima-Pettenati, J. (2019). “Chapter Seven - Digging in wood: New insights in the regulation of wood formation in tree species,” in *Advances in Botanical Research Molecular Physiology et Biotechnology of Trees.*, ed. F. M. Cánovas (Academic Press), 201–233. doi:10.1016/bs.abr.2018.11.007.
- Camefort, H. (1977). *Morphologie des végétaux vasculaires (Cytologie. Anatomie. Adaptations)*. 2e édition. Paris, France: Doin.
- Campbell, K. R., et Yau, C. (2016). A descriptive marker gene approach to single-cell pseudotime inference. *bioRxiv*. doi:10.1101/060442.
- Campbell, L., Etchells, J. P., Cooper, M., Kumar, M., et Turner, S. R. (2018). An essential role for abscisic acid in the regulation of xylem fibre differentiation. *Development* 145, dev161992. doi:10.1242/dev.161992.
- Cao, S., Guo, M., Wang, C., Xu, W., Shi, T., Tong, G., et al. (2019). Genome-wide characterization of aspartic protease (AP) gene family in Populus trichocarpa et identification of the potential PtAPs involved in wood formation. *BMC Plant Biology* 19. doi:10.1186/s12870-019-1865-0.
- Carballo-Meilan, A., Goodman, A. M., Baron, M. G., et Gonzalez-Rodriguez, J. (2014). A specific case in the classification of woods by FTIR et chemometric: discrimination of Fagales from Malpighiales. *Cellulose* 21, 261–273. doi:10.1007/s10570-013-0093-2.
- Carlquist, S. (1988). *Comparative Wood Anatomy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-662-21714-6.
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C. J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., et al. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465, 316–321. doi:10.1038/nature08977.
- Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., et al. (2001a). Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiol* 127, 551–565.
- Carpita, N., Tierney, M., et Campbell, M. (2001b). “Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture et dynamics,” in *Plant Cell Walls*, eds. N. C. Carpita, M. Campbell, et M. Tierney (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–5. doi:10.1007/978-94-010-0668-2_1.
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Brunetti, P., Petrocelli, V., Falasca, G., Ljung, K., et al. (2013). Auxin controls Arabidopsis anther dehiscence by regulating endothecium lignification et jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* 74, 411–422. doi:10.1111/tpj.12130.
- Chapillon, L. (2020). Reconnaissance de types cellulaires à partir d’images hyperspectrales : Comparaison de modèles statistiques.
- Chateigner, A., Lesage-Descauses, M.-C., Rogier, O., Jorge, V., Leplé, J.-C., Brunaud, V., et al. (2020). Gene expression predictions et networks in natural populations supports the omnigenic theory. *BMC Genomics* 21. doi:10.1186/s12864-020-06809-2.
- Chen, H., Wang, J. P., Liu, H., Li, H., Lin, Y.-C. J., Shi, R., et al. (2019). Hierarchical Transcription Factor et Chromatin Binding Network for Wood Formation in Populus trichocarpa. *The Plant Cell* 31, 602–626. doi:10.1105/tpc.18.00620.
- Chen, J., Chen, B., et Zhang, D. (2015a). Transcript profiling of Populus tomentosa genes in normal, tension, et opposite wood by RNA-seq. *BMC Genomics* 16, 164. doi:10.1186/s12864-015-1390-y.

- Chen, J., Quan, M., et Zhang, D. (2015b). Genome-wide identification of novel long non-coding RNAs in *Populus tomentosa* tension wood, opposite wood et normal wood xylem by RNA-seq. *Planta* 241, 125–143. doi:10.1007/s00425-014-2168-1.
- Chen, L., Carpita, N. C., Reiter, W. D., Wilson, R. H., Jeffries, C., et McCann, M. C. (1998). A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra. *Plant J.* 16, 385–392.
- Chen, S., Ling, Z., Zhang, X., Kim, Y. S., et Xu, F. (2018). Towards a multi-scale understanding of dilute hydrochloric acid et mild 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of poplar wood. *Industrial Crops et Products* 114, 123–131. doi:10.1016/j.indcrop.2018.02.007.
- Chiniquy, D., Varanasi, P., Oh, T., Harholt, J., Katnelson, J., Singh, S., et al. (2013). Three Novel Rice Genes Closely Related to the Arabidopsis IRX9, IRX9L, et IRX14 Genes et Their Roles in Xylan Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 4. doi:10.3389/fpls.2013.00083.
- Chun, Y. W. (1993). “Clonal propagation in non-aspen poplar hybrids,” in *Micropropagation of Woody Plants*, ed. M. R. Ahuja (Dordrecht: Springer Netherlands), 209–222. doi:10.1007/978-94-015-8116-5_13.
- Chuveau, M.-C., Granier, F., Pichon, O., Renou, J.-P., Gaudin, V., et Chuveau, Y. (2013). Characterization of the Early Events Leading to Totipotency in an Arabidopsis Protoplast Liquid Culture by Temporal Transcript Profiling. *The Plant Cell* 25, 2444–2463. doi:10.1105/tpc.113.109538.
- Clair, B., Gril, J., Di Renzo, F., Yamamoto, H., et Quignard, F. (2008). Characterization of a Gel in the Cell Wall To Elucidate the Paradoxical Shrinkage of Tension Wood. *Biomacromolecules* 9, 494–498. doi:10.1021/bm700987q.
- Cocking, E. C. (1960). A Method for the Isolation of Plant Protoplasts et Vacuoles. *Nature* 187, 962–963. doi:10.1038/187962a0.
- Cocuron, J.-C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A. P., Liepman, A. H., Keegstra, K., et al. (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a -1,4 glucan synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8550–8555. doi:10.1073/pnas.0703133104.
- Coleman, H. D., Yan, J., et Mansfield, S. D. (2009). Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production et altered cell wall ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13118–13123. doi:10.1073/pnas.0900188106.
- Cosgrove, D. J., et Jarvis, M. C. (2012). Comparative structure et biomechanics of plant primary et secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00204.
- Courtois-Moreau, C. L., Pesquet, E., Sjödin, A., Muñoz, L., Bollhöner, B., Kaneda, M., et al. (2009). A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem. *The Plant Journal* 58, 260–274. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03777.x.
- Cronk, Q. C. B. (2005). Plant eco-devo: the potential of poplar as a model organism. *New Phytologist* 166, 39–48. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01369.x.
- Crowell, E., Gonneau, M., Stierhof, Y.-D., Höfte, H., et Vernhettes, S. (2010). Regulated trafficking of cellulose synthases. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 700–705. doi:10.1016/j.pbi.2010.07.005.
- Cuello, C., Baldy, A., Brunaud, V., Joets, J., Delannoy, E., Jacquemot, M.-P., et al. (2019). A systems biology approach uncovers a gene co-expression network associated with cell wall degradability in maize. *PLOS ONE* 14, e0227011. doi:10.1371/journal.pone.0227011.
- Cuello, C., Marchand, P., Laurans, F., Grand-Perret, C., Lainé-Prade, V., Pilate, G., et al. (2020). ATR-FTIR Microspectroscopy Brings a Novel Insight Into the Study of Cell Wall Chemistry at the Cellular Level. *Front. Plant Sci.* 11. doi:10.3389/fpls.2020.00105.
- Dai, X., You, C., Chen, G., Li, X., Zhang, Q., et Wu, C. (2011). OsBC1L4 encodes a COBRA-like protein that affects cellulose synthesis in rice. *Plant Molecular Biology* 75, 333–345. doi:10.1007/s11103-011-9730-z.
- Daniel, G., Filonova, L., Kallas, Å. M., et Teeri, T. T. (2006). Morphological et chemical characterisation of the G-layer in tension wood fibres of *Populus tremula* et *Betula verrucosa*: Labelling with cellulose-binding module CBM1 Hj Cel7A et fluorescence et FE-SEM microscopy. *Holzforschung* 60, 618–624. doi:10.1515/HF.2006.104.
- Dayan, J., Schwarzkopf, M., Avni, A., et Aloni, R. (2010). Enhancing plant growth et fiber production by silencing GA 2-oxidase. *Plant Biotechnol. J.* 8, 423–435.
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T., Hedden, P., Fromm, H., et al. (2012). Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, et fiber differentiation in tobacco stems. *Plant Cell* 24, 66–79. doi:10.1105/tpc.111.093096.
- de Jager, S. M., Menges, M., Bauer, U.-M., et Murray, J. A. H. (2001). Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 et is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Molecular Biology* 47, 555–568. doi:10.1023/A:1011848528377.

- Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., et Leplé, J.-C. (2010). Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies* 333, 325–334. doi:10.1016/j.crv.2010.01.010.
- del Pozo, J. c., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., et Gutierrez, C. (2007). The E2FC-DPB Transcription Factor Controls Cell Division, Endoreplication et Lateral Root Formation in a SCFSKP2A- Dependent Manner. *Plant Signaling & Behavior* 2, 273–274. doi:10.4161/psb.2.4.3897.
- del Pozo, J. C., Boniotti, M. B., et Gutierrez, C. (2002). Arabidopsis E2Fc Functions in Cell Division et Is Degraded by the Ubiquitin-SCF^{AtSKP2} Pathway in Response to Light. *The Plant Cell* 14, 3057–3071. doi:10.1105/tpc.006791.
- del Pozo, J. C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., et Gutierrez, C. (2006). The Balance between Cell Division et Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCF^{SKP2A} Pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18, 2224–2235. doi:10.1105/tpc.105.039651.
- Delmer, D. P. (1999). CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annual Review of Plant Physiology et Plant Molecular Biology* 50, 245–276. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.245.
- Demura, T., et Fukuda, H. (1994). Novel vascular cell-specific genes whose expression is regulated temporally et spatially during vascular system development. *The Plant Cell* 6, 967–981. doi:10.1105/tpc.6.7.967.
- Demura, T., et Fukuda, H. (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci.* 12, 64–70. doi:10.1016/j.tplants.2006.12.006.
- Denancé, N., Ranocha, P., Martinez, Y., Sundberg, B., et Goffner, D. (2010). Light-regulated compensation of *wat1* (*walls are thin1*) growth et secondary cell wall phenotypes is auxin-independent. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1302–1304. doi:10.4161/psb.5.10.13103.
- Denis, E., Kbir, N., Mary, V., Claisse, G., Conde E Silva, N., Kreis, M., et al. (2017). WOX14 promotes bioactive gibberellin synthesis et vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 90, 560–572. doi:10.1111/tpj.13513.
- Denyer, T., Ma, X., Klesen, S., Scacchi, E., Nieselt, K., et Timmermans, M. C. P. (2019). Spatiotemporal Developmental Trajectories in the *Arabidopsis* Root Revealed Using High-Throughput Single-Cell RNA Sequencing. *Developmental Cell* 48, 840–852.e5. doi:10.1016/j.devcel.2019.02.022.
- Derbyshire, P., Ménard, D., Green, P., Saalbach, G., Buschmann, H., Lloyd, C. W., et al. (2015). Proteomic Analysis of Microtubule Interacting Proteins over the Course of Xylem Tracheary Element Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27, 2709–2726. doi:10.1105/tpc.15.00314.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, T. J., et Neill, J. S. (1998). Harpin et hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemical Journal* 330, 115–120. doi:10.1042/bj3300115.
- Devaux, M.-F., Jamme, F., André, W., Bouchet, B., Alvarado, C., Durand, S., et al. (2018). Synchrotron Time-Lapse Imaging of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis: Tracking Enzyme Localization by Protein Autofluorescence et Biochemical Modification of Cell Walls by Microfluidic Infrared Microspectroscopy. *Frontiers in Plant Science* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00200.
- Dickmann, D. I., et Kuzovkina, J. (2014). “Poplars et willows of the world, with emphasis on silviculturally important species,” in *Poplars et willows: trees for society et the environment*, eds. J. G. Isebrands et J. Richardson (Wallingford: CAB), 8–91. doi:10.1079/9781780641089.0008.
- Dievart, A. (2003). LRR-containing receptors regulating plant development et defense. *Development* 131, 251–261. doi:10.1242/dev.00998.
- Digby, J., et Wareing, P. F. (1966). The effect of applied growth hormones on cambial division et the differentiation of the cambial derivatives. *Ann. Bot.*, 539–548.
- Dillen, S. Y., Djomo, S. N., Al Afas, N., Vanbeveren, S., et Ceulemans, R. (2013). Biomass yield et energy balance of a short-rotation poplar coppice with multiple clones on degraded land during 16 years. *Biomass et Bioenergy* 56, 157–165. doi:10.1016/j.biombioe.2013.04.019.
- Dilokpimol, A., Poulsen, C., Vereb, G., Kaneko, S., Schulz, A., et Geshi, N. (2014). Galactosyltransferases from *Arabidopsis thaliana* in the biosynthesis of type II arabinogalactan: molecular interaction enhances enzyme activity. *BMC Plant Biology* 14, 90. doi:10.1186/1471-2229-14-90.
- Dixon, R. A., et Steele, C. L. (1999). Flavonoids et isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* 4, 394–400. doi:10.1016/S1360-1385(99)01471-5.
- Djerbi, S., Lindskog, M., Arvestad, L., Sterky, F., et Teeri, T. T. (2005). The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (CesA) genes. *Planta* 221, 739–746. doi:10.1007/s00425-005-1498-4.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
- Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., et Delmer, D. P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43, 1407–1420. doi:10.1093/pcp/pcf164.

- Doley, D., et Leyton, L. (1968). Effects of growth regulating substances et water potential on the development of secondary xylem in Douglas-fir. *New Phytologist*, 579–594.
- Donaldson, L. (2013). Softwood et Hardwood Lignin Fluorescence Spectra of Wood Cell Walls in Different Mounting Media. *IAWA Journal* 34, 3–19. doi:10.1163/22941932-00000002.
- Donaldson, L., Hague, J., et Snell, R. (2001). Lignin Distribution in Coppice Poplar, Linseed et Wheat Straw. *Holzforschung* 55. doi:10.1515/HF.2001.063.
- Douglas, C. J. (2017). “Populus as a Model Tree,” in *Comparative et Evolutionary Genomics of Angiosperm Trees* Plant Genetics et Genomics: Crops et Models., eds. A. Groover et Q. Cronk (Cham: Springer International Publishing), 61–84. doi:10.1007/7397_2016_12.
- Du, J., et Groover, A. (2010). Transcriptional Regulation of Secondary Growth et Wood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 17–27. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00901.x.
- Du, J., Mansfield, S. D., et Groover, A. T. (2009). The Populus homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant J.* 60, 1000–1014. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04017.x.
- Du, J., Miura, E., Robischon, M., Martinez, C., et Groover, A. (2011). The Populus Class III HD ZIP Transcription Factor POPCORONA Affects Cell Differentiation during Secondary Growth of Woody Stems. *PLOS ONE* 6, e17458. doi:10.1371/journal.pone.0017458.
- Du, Q., et Wang, H. (2015). The role of HD-ZIP III transcription factors et *miR165/166* in vascular development et secondary cell wall formation. *Plant Signaling & Behavior* 10, e1078955. doi:10.1080/15592324.2015.1078955.
- Du, S., et Yamamoto, F. (2003). Ethylene evolution changes in the stems of *Metasequoia glyptostroboides* et *Aesculus turbinata* seedlings in relation to gravity-induced reaction wood formation. *Trees* 17, 522–528. doi:10.1007/s00468-003-0275-x.
- Ebringerová, A. (2005). Structural Diversity et Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia* 232, 1–12. doi:10.1002/masy.200551401.
- Efroni, I., et Birnbaum, K. D. (2016). The potential of single-cell profiling in plants. *Genome Biology* 17. doi:10.1186/s13059-016-0931-2.
- Ehlting, J., Mattheus, N., Aeschliman, D. S., Li, E., Hamberger, B., Cullis, I. F., et al. (2005). Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis et transcriptional regulators of fiber differentiation: Global transcript profiling of stems. *The Plant Journal* 42, 618–640. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02403.x.
- Ellis, B., Jansson, S., Strauss, S. H., et Tuskan, G. A. (2010). “Why et How Populus Became a ‘Model Tree,’” in *Genetics et Genomics of Populus* Plant Genetics et Genomics: Crops et Models., eds. S. Jansson, R. Bhalariao, et A. Groover (New York, NY: Springer), 3–14. doi:10.1007/978-1-4419-1541-2_1.
- Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., et al. (2003). Radial Patterning of *Arabidopsis* Shoots by Class III HD-ZIP et KANADI Genes. *Current Biology* 13, 1768–1774. doi:10.1016/j.cub.2003.09.035.
- Endler, A., et Persson, S. (2011). Cellulose synthases et synthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 4, 199–211. doi:10.1093/mp/ssq079.
- Endo, H., Yamaguchi, M., Tamura, T., Nakano, Y., Nishikubo, N., Yoneda, A., et al. (2015). Multiple Classes of Transcription Factors Regulate the Expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a Master Switch of Xylem Vessel Differentiation. *Plant Cell Physiol* 56, 242–254. doi:10.1093/pcp/pcu134.
- Eriksson, M. E., Israelsson, M., Olsson, O., et Moritz, T. (2000). Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production et xylem fiber length. *Nature Biotechnology* 18, 784–788. doi:10.1038/77355.
- Escamez, S., Stael, S., Vainonen, J. P., Willems, P., Jin, H., Kimura, S., et al. (2019). Extracellular peptide Kratos restricts cell death during vascular development et stress in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 70, 2199–2210. doi:10.1093/jxb/erz021.
- Escamilla-Treviño, L. L., Chen, W., Card, M. L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., et Poulton, J. E. (2006). *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 et BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* 67, 1651–1660. doi:10.1016/j.phytochem.2006.05.022.
- Faik, A. (2010). Xylan Biosynthesis: News from the Grass. *Plant Physiology* 153, 396–402. doi:10.1104/pp.110.154237.
- Faik, A. (2013). “‘Plant Cell Wall Structure-Pretreatment’ the Critical Relationship in Biomass Conversion to Fermentable Sugars,” in *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*, ed. T. Gu (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–30. doi:10.1007/978-94-007-6052-3_1.
- Fairbrother, T. E., et Brink, G. E. (1990). Determination of cell wall carbohydrates in forages by near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science et Technology* 28, 293–302. doi:10.1016/0377-8401(90)90160-A.

- Faivre-Rampant, P., Zaina, G., Jorge, V., Giacomello, S., Segura, V., Scalabrin, S., et al. (2016). New resources for genetic studies in *Populus nigra*: genome-wide SNP discovery et development of a 12k Infinium array. *Molecular Ecology Resources* 16, 1023–1036. doi:10.1111/1755-0998.12513.
- Faix, O. (1991). Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* 45, 21–28. doi:10.1515/hfsg.1991.45.s1.21.
- Fernandes, A. N., Thomas, L. H., Altaner, C. M., Callow, P., Forsyth, V. T., Apperley, D. C., et al. (2011). Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E1195–E1203. doi:10.1073/pnas.1108942108.
- Fiers, M., Ku, K., et Liu, C. (2007). CLE peptide ligands et their roles in establishing meristems. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 39–43. doi:10.1016/j.pbi.2006.11.003.
- Fisher, K., et Turner, S. (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. *Current Biology* 17, 1061–1066. doi:10.1016/j.cub.2007.05.049.
- Franke, R., McMichael, C. M., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., et Chapple, C. (2000). Modified lignin in tobacco et poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *The Plant Journal* 22, 223–234. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00727.x.
- Freeman, J. S., Whittock, S. P., Potts, B. M., et Vaillancourt, R. E. (2009). QTL influencing growth et wood properties in *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics & Genomes* 5, 713–722. doi:10.1007/s11295-009-0222-0.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary Element Differentiation. *The Plant Cell*, 1147–1156. doi:10.1105/tpc.9.7.1147.
- Furches, A., Kainer, D., Weighill, D., Large, A., Jones, P., Walker, A. M., et al. (2019). Finding New Cell Wall Regulatory Genes in *Populus trichocarpa* Using Multiple Lines of Evidence. *Frontiers in Plant Science* 10. doi:10.3389/fpls.2019.01249.
- Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Merino, F., Cuello, J., Pedreño, M. A., et al. (2006). Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Letters* 580, 4311–4316. doi:10.1016/j.febslet.2006.06.088.
- Gardiner, J. C., Taylor, N. G., et Turner, S. R. (2003). Control of Cellulose Synthase Complex Localization in Developing Xylem. *The Plant Cell* 15, 1740–1748. doi:10.1105/tpc.012815.
- Gebreselassie, M. N., Ader, K., Boizot, N., Millier, F., Charpentier, J.-P., Alves, A., et al. (2017). Near-infrared spectroscopy enables the genetic analysis of chemical properties in a large set of wood samples from *Populus nigra* (L.) natural populations. *Industrial Crops et Products* 107, 159–171. doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.013.
- Geisler, M., et Murphy, A. S. (2006). The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* 580, 1094–1102. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.054.
- Geraldes, A., DiFazio, S. P., Slavov, G. T., Ranjan, P., Muchero, W., Hannemann, J., et al. (2013). A 34K SNP genotyping array for *Populus trichocarpa*: Design, application to the study of natural populations et transferability to other *Populus* species. *Molecular Ecology Resources* 13, 306–323. doi:10.1111/1755-0998.12056.
- Gerttula, S., Zinkgraf, M., Muday, G. K., Lewis, D. R., Ibatullin, F. M., Brumer, H., et al. (2015). Transcriptional et Hormonal Regulation of Gravitropism of Woody Stems in *Populus*. *The Plant Cell* 27, 2800–2813. doi:10.1105/tpc.15.00531.
- Geshi, N., Johansen, J. N., Dilokpimol, A., Rolland, A., Belcram, K., Verger, S., et al. (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, n/a-n/a. doi:10.1111/tbj.12281.
- Gierlinger, N. (2018). New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews* 53, 517–551. doi:10.1080/05704928.2017.1363052.
- Gierlinger, N., Goswami, L., Schmidt, M., Burgert, I., Coutand, C., Rogge, T., et al. (2008). In situ FT-IR microscopic study on enzymatic treatment of poplar wood cross-sections. *Biomacromolecules* 9, 2194–2201. doi:10.1021/bm800300b.
- Gierlinger, N., et Schwanninger, M. (2006a). Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. *Plant Physiology* 140, 1246–1254. doi:10.1104/pp.105.066993.
- Gierlinger, N., et Schwanninger, M. (2006b). Chemical Imaging of Poplar Wood Cell Walls by Confocal Raman Microscopy. *Plant Physiology* 140, 1246–1254. doi:10.1104/pp.105.066993.
- Gille, S., de Souza, A., Xiong, G., Benz, M., Cheng, K., Schultink, A., et al. (2011). *O*-Acetylation of *Arabidopsis* Hemicellulose Xyloglucan Requires *AXY4* or *AXY4L*, Proteins with a TBL et DUF231 Domain. *The Plant Cell* 23, 4041–4053. doi:10.1105/tpc.111.091728.
- Gille, S., Sharma, V., Baidoo, E. E. K., Keasling, J. D., Scheller, H. V., et Pauly, M. (2013). Arabinosylation of a Yariv-Precipitable Cell Wall Polymer Impacts Plant Growth as Exemplified by the *Arabidopsis* Glycosyltransferase Mutant ray1. *Molecular Plant* 6, 1369–1372. doi:10.1093/mp/sst029.

- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., et Yoshida, S. (2004). Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated et Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134, 1555–1573. doi:10.1104/pp.103.034736.
- Gonneau, M., Desprez, T., Guillot, A., Vernhettes, S., et Höfte, H. (2014). Catalytic Subunit Stoichiometry within the Cellulose Synthase Complex. *Plant Physiology* 166, 1709–1712. doi:10.1104/pp.114.250159.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., et al. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40, D1178–D1186. doi:10.1093/nar/gkr944.
- Gorshkova, T., Mokshina, N., Chernova, T., Ibragimova, N., Salnikov, V., Mikshina, P., et al. (2015). Aspen tension wood fibers contain β -(1→4)-galactans et acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls. *Plant Physiology*, pp.00690.2015. doi:10.1104/pp.15.00690.
- Gorzás, A., Stenlund, H., Persson, P., Trygg, J., et Sundberg, B. (2011). Cell-specific chemotyping et multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy et orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem: The chemical landscape of secondary xylem. *The Plant Journal* 66, 903–914. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04542.x.
- Goubet, F., Barton, C. J., Mortimer, J. C., Yu, X., Zhang, Z., Miles, G. P., et al. (2009). Cell wall glucomannan in Arabidopsis is synthesised by CSLA glycosyltransferases, et influences the progression of embryogenesis. *The Plant Journal* 60, 527–538. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03977.x.
- Goué, N., Lesage-Descauses, M.-C., Mellerowicz, E. J., Magel, E., Label, P., et Sundberg, B. (2008). Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray et fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. *New Phytologist* 180, 45–56. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02556.x.
- Groover, A. T. (2005). What genes make a tree a tree? *Trends in Plant Science* 10, 210–214. doi:10.1016/j.tplants.2005.03.001.
- Gruber, A., Strobl, S., Veit, B., et Oberhuber, W. (2010). Impact of drought on the temporal dynamics of wood formation in *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol* 30, 490–501. doi:10.1093/treephys/tpq003.
- Gu, Y., et Somerville, C. (2010). Cellulose synthase interacting protein: A new factor in cellulose synthesis. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1571–1574. doi:10.4161/psb.5.12.13621.
- Guedes, F. T. P., Laurans, F., Quemener, B., Assor, C., Lainé-Prade, V., Boizot, N., et al. (2017). Non-cellulosic polysaccharide distribution during G-layer formation in poplar tension wood fibers: abundance of rhamnogalacturonan I et arabinogalactan proteins but no evidence of xyloglucan. *Planta* 246, 857–878. doi:10.1007/s00425-017-2737-1.
- Gui, J., Lam, P. Y., Tobimatsu, Y., Sun, J., Huang, C., Cao, S., et al. (2020). Fibre-specific regulation of lignin biosynthesis improves biomass quality in *Populus*. *New Phytologist*. doi:10.1111/nph.16411.
- Guo, M., Wang, H., Potter, S. S., Whitsett, J. A., et Xu, Y. (2015). SINCERA: A Pipeline for Single-Cell RNA-Seq Profiling Analysis. *PLOS Computational Biology* 11, e1004575. doi:10.1371/journal.pcbi.1004575.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredes, A. R., Emons, A. M. C., et Ehrhardt, D. W. (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane et interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology* 11, 797–806. doi:10.1038/ncb1886.
- Haigler, C. H., et Brown, R. M. (1986). Transport of rosettes from the golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture. *Protoplasma* 134, 111–120. doi:10.1007/BF01275709.
- Hake, S., Smith, H. M. S., Holtan, H., Magnani, E., Mele, G., et Ramirez, J. (2004). THE ROLE OF *KNOX* GENES IN PLANT DEVELOPMENT. *Annual Review of Cell et Developmental Biology* 20, 125–151. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.031803.093824.
- Hao, Z., et Mohnen, D. (2014). A review of xylan et lignin biosynthesis: Foundation for studying Arabidopsis irregular xylem mutants with pleiotropic phenotypes. *Critical Reviews in Biochemistry et Molecular Biology* 49, 212–241. doi:10.3109/10409238.2014.889651.
- Hay, A., et Tsiantis, M. (2010). *KNOX* genes: versatile regulators of plant development et diversity. *Development* 137, 3153–3165. doi:10.1242/dev.030049.
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., et al. (2007). BAK1 et BKK1 Regulate Brassinosteroid-Dependent Growth et Brassinosteroid-Independent Cell-Death Pathways. *Current Biology* 17, 1109–1115. doi:10.1016/j.cub.2007.05.036.
- Heckmann, S., Lermontova, I., Berckmans, B., De Veylder, L., Bäumllein, H., et Schubert, I. (2011). The E2F transcription factor family regulates CENH3 expression in Arabidopsis thaliana: Regulation of AtCENH3 expression. *The Plant Journal* 68, 646–656. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04715.x.
- Hedenström, M., Wiklund-Lindström, S., Öman, T., Lu, F., Gerber, L., Schatz, P., et al. (2009). Identification of Lignin et Polysaccharide Modifications in *Populus* Wood by Chemometric Analysis of 2D NMR Spectra from Dissolved Cell Walls. *Molecular Plant* 2, 933–942. doi:10.1093/mp/ssp047.

- Held, M. A., Jiang, N., Basu, D., Showalter, A. M., et Faik, A. (2015). “Plant Cell Wall Polysaccharides: Structure et Biosynthesis,” in *Polysaccharides*, eds. K. G. Ramawat et J.-M. Mérillon (Cham: Springer International Publishing), 3–54. doi:10.1007/978-3-319-16298-0_73.
- Helin, K. (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development* 8, 28–35. doi:10.1016/S0959-437X(98)80058-0.
- Herrero, J., Esteban Carrasco, A., et Zapata, J. M. (2014). Arabidopsis thaliana peroxidases involved in lignin biosynthesis: In silico promoter analysis et hormonal regulation. *Plant Physiology et Biochemistry* 80, 192–202. doi:10.1016/j.plaphy.2014.03.027.
- Herrero, J., Fernández-Pérez, F., Yebra, T., Novo-Uzal, E., Pomar, F., Pedreño, M. Á., et al. (2013). Bioinformatic et functional characterization of the basic peroxidase 72 from Arabidopsis thaliana involved in lignin biosynthesis. *Planta* 237, 1599–1612. doi:10.1007/s00425-013-1865-5.
- Herth, W. (1983). Arrays of plasma-membrane rosettes? involved in cellulose microfibril formation of Spirogyra. *Planta* 159, 347–356. doi:10.1007/BF00393174.
- Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J., Andersson, A., Erlandsson, R., Blomqvist, K., et al. (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. *PNAS* 98, 14732–14737. doi:10.1073/pnas.261293398.
- Hess, T., et Sachs, T. (1972). The influence of a mature leaf on xylem differentiation. *New Phytol.*, 903–914.
- Higuchi, T. (1997). “Formation of Earlywood, Latewood, et Heartwood,” in *Biochemistry et Molecular Biology of Wood* Springer Series in Wood Science., ed. T. Higuchi (Berlin, Heidelberg: Springer), 291–307. doi:10.1007/978-3-642-60469-0_6.
- Hill, J. L., Hammudi, M. B., et Tien, M. (2014). The Arabidopsis Cellulose Synthase Complex: A Proposed Hexamer of CESA Trimers in an Equimolar Stoichiometry. *The Plant Cell* 26, 4834–4842. doi:10.1105/tpc.114.131193.
- Hirakawa, Y., Kondo, Y., et Fukuda, H. (2010a). Regulation of Vascular Development by CLE Peptide-receptor Systems. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 8–16. doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00904.x.
- Hirakawa, Y., Kondo, Y., et Fukuda, H. (2010b). TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 2618–2629. doi:10.1105/tpc.110.076083.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., et al. (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 15208–15213. doi:10.1073/pnas.0808444105.
- Hochholdinger, F., Wen, T.-J., Zimmermann, R., Chimot-Marolle, P., da Costa e Silva, O., Bruce, W., et al. (2008). The maize (*Zea mays* L.) roothairless3 gene encodes a putative GPI-anchored, monocot-specific, COBRA-like protein that significantly affects grain yield. *The Plant Journal* 54, 888–898. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03459.x.
- Höfte, H. H. (2013). L’amélioration des cultures dédiées à la production de biomasse lignocellulosique. *Innovations Agronomiques* 26, 17–23.
- Hosokawa, M., Suzuki, S., Umezawa, T., et Sato, Y. (2001). Progress of Lignification Mediated by Intercellular Transportation of Monolignols During Tracheary Element Differentiation of Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol* 42, 959–968. doi:10.1093/pcp/pce124.
- Howe, G. T., Hackett, W. P., Furnier, G. R., et Klevorn, R. E. (1995). Photoperiodic responses of a northern et southern ecotype of black cottonwood. *Physiologia Plantarum* 93, 695–708.
- Huang, J., Li, Y., Wang, Y., Chen, Y., Liu, M., Wang, Y., et al. (2017). A precise et consistent assay for major wall polymer features that distinctively determine biomass saccharification in transgenic rice by near-infrared spectroscopy. *Biotechnol Biofuels* 10, 294. doi:10.1186/s13068-017-0983-x.
- Hutchison, C. E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M. W., et al. (2006). The Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Proteins Are Redundant Positive Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell* 18, 3073–3087. doi:10.1105/tpc.106.045674.
- Iakimova, E. T., et Woltering, E. J. (2017). Xylogenesis in zinnia (*Zinnia elegans*) cell cultures: unravelling the regulatory steps in a complex developmental programmed cell death event. *Planta* 245, 681–705. doi:10.1007/s00425-017-2656-1.
- IAWA Committee (1989). “IAWA List of Microscopic Features for Hardwood Identification,” in IAWA Bulletin. (Leiden: E.A. Wheeler, P. Baas et P. Gasson), 219–332.
- Imamura, T., Watanabe, T., Kuwahara, M., et Koshijima, T. (1994). Ester linkages between lignin et glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes from *Fagus crenata*. *Phytochemistry* 37, 1165–1173. doi:10.1016/S0031-9422(00)89551-5.
- Immanen, J., Nieminen, K., Smolander, O.-P., Kojima, M., Alonso Serra, J., Koskinen, P., et al. (2016). Cytokinin et Auxin Display Distinct but Interconnected Distribution et Signaling Profiles to Stimulate Cambial Activity. *Current Biology* 26, 1990–1997. doi:10.1016/j.cub.2016.05.053.
- Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. *The EMBO Journal* 24, 657–662. doi:10.1038/sj.emboj.7600561.
- Ishii, T. (1997). Structure et fonctions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* 127, 111–127. doi:10.1016/S0168-9452(97)00130-1.

- Ishii, T., et Matsunaga, T. (1996). Isolation et characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydrate Research* 284, 1–9. doi:10.1016/0008-6215(96)00010-9.
- Israelsson, M., Sundberg, B., et Moritz, T. (2005). Tissue-specific localization of gibberellins et expression of gibberellin-biosynthetic et signaling genes in wood-forming tissues in aspen. *Plant J.* 44, 494–504. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02547.x.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., et al. (2006). Dodeca-CLE Peptides as Suppressors of Plant Stem Cell Differentiation. *Science* 313, 842–845. doi:10.1126/science.1128436.
- Iwasaki, T., et Shibaoka, H. (1991). Brassinosteroids Act as Regulators of Tracheary-Element Differentiation in Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant et Cell Physiology* 32, 1007–1014. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078163.
- Izydorczyk, M. S., et Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure et physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 28, 33–48. doi:10.1016/0144-8617(95)00077-1.
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation: Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1214, 190–198. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05840.x.
- Jansson, S., et Douglas, C. J. (2007). Populus: A Model System for Plant Biology. *Annual Review of Plant Biology* 58, 435–458. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103956.
- Jarvis, M. C. (2013). Cellulose biosynthesis: counting the chains. *Plant Physiol.* 163, 1485–1486. doi:10.1104/pp.113.231092.
- Jasinski, S., Lécureuil, A., Durandet, M., Bernard-Moulin, P., et Guerche, P. (2016). Arabidopsis Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Front Plant Sci* 7, 1682. doi:10.3389/fpls.2016.01682.
- Jeffries, T. W. (1991). “Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes,” in *Physiology of Biodegradative Microorganisms*, ed. C. Ratledge (Dordrecht: Springer Netherlands), 163–176. doi:10.1007/978-94-011-3452-1_7.
- Jensen, J. K., Johnson, N. R., et Wilkerson, C. G. (2014). *Arabidopsis thaliana* IRX10 et two related proteins from psyllium et *Physcomitrella patens* are xylan xylosyltransferases. *The Plant Journal* 80, 207–215. doi:10.1111/tj.12641.
- Johansson, M. H., et Samuelson, O. (1977). Reducing end groups in birch xylan et their alkaline-degradation. *Wood Science et Technology* 11, 251–263.
- Jones, B., Gunnerås, S. A., Petersson, S. V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., et al. (2010). Cytokinin Regulation of Auxin Synthesis in *Arabidopsis* Involves a Homeostatic Feedback Loop Regulated via Auxin et Cytokinin Signal Transduction. *The Plant Cell* 22, 2956–2969. doi:10.1105/tpc.110.074856.
- Jones, L., Ennos, A. R., et Turner, S. R. (2001). Cloning et characterization of irregular xylem4 (*irx4*): a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*: *IRX4* encodes cinnamoyl-CoA reductase. *The Plant Journal* 26, 205–216. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01021.x.
- Joseleau, J.-P., Imai, T., Kuroda, K., et Ruel, K. (2004). Detection in situ et characterization of lignin in the G - layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* 219, 338–345. doi:10.1007/s00425-004-1226-5.
- Joshi, C. P., Thammannagowda, S., Fujino, T., Gou, J.-Q., Avci, U., Haigler, C. H., et al. (2011). Perturbation of Wood Cellulose Synthesis Causes Pleiotropic Effects in Transgenic Aspen. *Molecular Plant* 4, 331–345. doi:10.1093/mp/ssq081.
- Jun, J. H., Fiume, E., et Fletcher, J. C. (2008). The CLE family of plant polypeptide signaling molecules. *Cellular et Molecular Life Sciences* 65, 743–755. doi:10.1007/s00018-007-7411-5.
- Jung, K. W., Kim, Y. Y., Yoo, K. S., Ok, S. H., Cui, M. H., Jeong, B.-C., et al. (2013). A Cystathionine-β-Synthase Domain-Containing Protein, CBSX2, Regulates Endothelial Secondary Cell Wall Thickening in Anther Development. *Plant et Cell Physiology* 54, 195–208. doi:10.1093/pcp/pcs166.
- Jung, K. W., Oh, S.-I., Kim, Y. Y., Yoo, K. S., Cui, M. H., et Shin, J. S. (2008). *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer factor 4 (*AHP4*) negatively regulates secondary wall thickening of the anther endothecium during flowering. *Mol Cells* 25, 294–300.
- Junghans, U., Langenfeld-Heyser, R., Polle, A., et Teichmann, T. (2004). Effect of Auxin Transport Inhibitors et Ethylene on the Wood Anatomy of Poplar. *Plant Biology* 6, 22–29. doi:10.1055/s-2003-44712.
- Kacurakova, M., et Wilson, R. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers* 44, 291–303. doi:10.1016/S0144-8617(00)00245-9.
- Kaldewey, H. (1984). “Transport et other modes of movement of hormones (mainly auxins),” in *Hormonal regulation of development II. Encyclopedia of plant physiology* (T.K. Scott), 80–148.
- Kaneda, M., Rensing, K. H., Wong, J. C. T., Banno, B., Mansfield, S. D., et Samuels, A. L. (2008). Tracking monolignols during wood development in lodgepole pine. *Plant Physiol.* 147, 1750–1760. doi:10.1104/pp.108.121533.

- Kaneda, M., Schuetz, M., Lin, B. S. P., Chanis, C., Hamberger, B., Western, T. L., et al. (2011). ABC transporters coordinately expressed during lignification of Arabidopsis stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *Journal of Experimental Botany* 62, 2063–2077. doi:10.1093/jxb/erq416.
- Kassambara, A., et Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract et Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K., et Ebinuma, H. (2000). Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *The Plant Journal* 22, 289–301. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00737.x.
- Kennedy, C. J., Cameron, G. J., Šturcová, A., Apperley, D. C., Altaner, C., Wess, T. J., et al. (2007). Microfibril diameter in celery collenchyma cellulose: X-ray scattering et NMR evidence. *Cellulose* 14, 235–246. doi:10.1007/s10570-007-9116-1.
- Keppler, B. D., et Showalter, A. M. (2010). IRX14 et IRX14-LIKE, Two Glycosyl Transferases Involved in Glucuronoxylan Biosynthesis et Drought Tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant* 3, 834–841. doi:10.1093/mp/ssq028.
- Kerstens, S., Decraemer, W. F., et Verbelen, J. P. (2001). Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. *Plant Physiol.* 127, 381–385.
- Kerstetter, R., Vollbrecht, E., Lowe, B., Veit, B., Yamaguchi, J., et Hake, S. (1994). Sequence analysis et expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. *The Plant Cell* 6, 1877–1887. doi:10.1105/tpc.6.12.1877.
- Kieliszewski, M. J., et Lamport, D. T. A. (1994). Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, et phylogeny. *The Plant Journal* 5, 157–172. doi:10.1046/j.1365-313X.1994.05020157.x.
- Kim, J., Jung, J.-H., Reyes, J. L., Kim, Y.-S., Kim, S.-Y., Chung, K.-S., et al. (2005). microRNA-directed cleavage of ATHB15 mRNA regulates vascular development in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J.* 42, 84–94. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02354.x.
- Kim, M.-H., Cho, J.-S., Jeon, H.-W., Sangsawang, K., Shim, D., Choi, Y.-I., et al. (2019). Wood Transcriptome Profiling Identifies Critical Pathway Genes of Secondary Wall Biosynthesis et Novel Regulators for Vascular Cambium Development in Populus. *Genes* 10, 690. doi:10.3390/genes10090690.
- Kim, M.-J., Kim, M., Lee, M. R., Park, S. K., et Kim, J. (2015). *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) 10* interacts with *SIDECAR POLLEN / LBD27* to control pollen development in Arabidopsis. *The Plant Journal* 81, 794–809. doi:10.1111/tpj.12767.
- Kim, S.-J., Chandrasekar, B., Rea, A. C., Danhof, L., Zemelis-Durfee, S., Thrower, N., et al. (2020). The synthesis of xyloglucan, an abundant plant cell wall polysaccharide, requires CSLC function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 20316–20324. doi:10.1073/pnas.2007245117.
- Kim, W.-C., Kim, J.-Y., Ko, J.-H., Kang, H., et Han, K.-H. (2014a). Identification of direct targets of transcription factor MYB46 provides insights into the transcriptional regulation of secondary wall biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 85, 589–599. doi:10.1007/s11103-014-0205-x.
- Kim, W.-C., Ko, J.-H., et Han, K.-H. (2012). Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis. *Plant Molecular Biology* 78, 489–501. doi:10.1007/s11103-012-9880-7.
- Kim, W.-C., Reza, I.-B., Kim, Y., Park, S., Thomashow, M. F., Keegstra, K., et al. (2014b). Transcription factors that directly regulate the expression of CSLA9 encoding mannan synthase in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* 84, 577–587. doi:10.1007/s11103-013-0154-9.
- Kinoshita, A., Nakamura, Y., Sasaki, E., Kyojuka, J., Fukuda, H., et Sawa, S. (2007). Gain-of-Function Phenotypes of Chemically Synthetic CLAVATA3/ESR-Related (CLE) Peptides in Arabidopsis thaliana et Oryza sativa. *Plant et Cell Physiology* 48, 1821–1825. doi:10.1093/pcp/pcm154.
- Kiselev, V. Y., Kirschner, K., Schaub, M. T., Andrews, T., Yiu, A., Chandra, T., et al. (2017). SC3: consensus clustering of single-cell RNA-seq data. *Nature Methods* 14, 483–486. doi:10.1038/nmeth.4236.
- Kiyoto, S., Yoshinaga, A., Tanaka, N., Wada, M., Kamitakahara, H., et Takabe, K. (2013). Immunolocalization of 8-5' et 8-8' linked structures of lignin in cell walls of Chamaecyparis obtusa using monoclonal antibodies. *Planta* 237, 705–715. doi:10.1007/s00425-012-1784-x.
- Kjellbom, P., Snogerup, L., Stohr, C., Reuzeau, C., McCabe, P. F., et Pennell, R. I. (1997). Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *The Plant Journal* 12, 1189–1196. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.12051189.x.
- Knoch, E., Dilokpimol, A., Tryfona, T., Poulsen, C. P., Xiong, G., Harholt, J., et al. (2013). A β -glucuronosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* involved in biosynthesis of type II arabinogalactan has a role in cell elongation during seedling growth. *The Plant Journal* 76, 1016–1029. doi:10.1111/tpj.12353.
- Ko, J.-H., Prassinis, C., et Han, K.-H. (2006). Developmental et seasonal expression of *PtaHB1*, a *Populus* gene encoding a class III HD-Zip protein, is closely associated with secondary growth et inversely correlated

- with the level of microRNA (*miR166*): *Rapid report. New Phytologist* 169, 469–478. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01623.x.
- Ko, J.-H., Yang, S. H., Park, A. H., Lerouxel, O., et Han, K.-H. (2007). ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*: ANAC012 suppresses xylary fiber formation. *The Plant Journal* 50, 1035–1048. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03109.x.
- Kollmann, F. F. P., et Côté, W. A. (1968). *Principles of Wood Science et Technology: I Solid Wood*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-642-87928-9.
- Kosugi, S., et Ohashi, Y. (2002). Interaction of the *Arabidopsis* E2F et DP Proteins Confers Their Concomitant Nuclear Translocation et Transactivation. *Plant Physiology* 128, 833–843. doi:10.1104/pp.010642.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., et al. (2005). Transcription switches for protoxylem et metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* 19, 1855–1860. doi:10.1101/gad.1331305.
- Kucukoglu, M., Chaabouni, S., Zheng, B., Mähönen, A. P., Helariutta, Y., et Nilsson, O. (2020). Peptide encoding *Populus* CLV3/ESR-RELATED 47 (PttCLE47) promotes cambial development et secondary xylem formation in hybrid aspen. *New Phytologist* 226, 75–85. doi:10.1111/nph.16331.
- Kucukoglu, M., Nilsson, J., Zheng, B., Chaabouni, S., et Nilsson, O. (2017). WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX4)-like genes regulate cambial cell division activity et secondary growth in *Populus* trees. *New Phytol.* 215, 642–657. doi:10.1111/nph.14631.
- Kulkarni, A. R., Peña, M. J., Avci, U., Mazumder, K., Urbanowicz, B. R., Pattathil, S., et al. (2012). The ability of land plants to synthesize glucuronoxylans predates the evolution of tracheophytes. *Glycobiology* 22, 439–451. doi:10.1093/glycob/cwr117.
- Kumar, M., Campbell, L., et Turner, S. (2016). Secondary cell walls: biosynthesis et manipulation. *J Exp Bot* 67, 515–531. doi:10.1093/jxb/erv533.
- Kutshera, U. (1994). The current status of acid-growth hypothesis. *New Phytologist*, 549–569.
- Lachaud, S., et Bonnemain, J. L. (1984). Seasonal variations in the polar-transport pathways et retention sites of [3H]indole-3-acetic acid in young branches of *Fagus sylvatica* L. *Planta* 161, 207–215.
- Lafarguette, F., Leplé, J.-C., Déjardin, A., Laurans, F., Costa, G., Lesage-Descauses, M.-C., et al. (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* 164, 107–121. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01175.x.
- Lairez, D., Cathala, B., Monties, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., et Gorrichon, L. (2005). Aggregation during Coniferyl Alcohol Polymerization in Pectin Solution: A Biomimetic Approach of the First Steps of Lignification. *Biomacromolecules* 6, 763–774. doi:10.1021/bm049390y.
- Lakhal, W. (2013). Etude fonctionnelle de trois facteurs de transcription impliqués dans la formation de la paroi secondaire chez le peuplier.
- Lane, D. R., Wiedemeier, A., Peng, L., Höfte, H., Vernhettes, S., Desprez, T., et al. (2001). Temperature-Sensitive Alleles of *RSW2* Link the KORRIGAN Endo-1,4-β-Glucanase to Cellulose Synthesis et Cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126, 278–288. doi:10.1104/pp.126.1.278.
- Lapierre, C., Sibout, R., Laurans, F., Lesage-Descauses, M.-C., Déjardin, A., et Pilate, G. (2021). The PMT-driven *p*-coumaroylation of poplar lignins impacts lignin structure et improves wood saccharification. *bioRxiv*. doi:https://doi.org/10.1101/2021.02.16.431462.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., et Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research* 137, 111–125. doi:10.1016/0008-6215(85)85153-3.
- Laurans, F., Déjardin, A., Leplé, J., et Pilate, G. (2006). Physiologie de la formation des parois de fibres de bois. *Revue des composites et des matériaux avancés* 16, 25–40. doi:10.3166/rcma.16.25-40.
- Lavia, P., et Jansen-Dürr, P. (1999). E2F target genes et cell-cycle checkpoint control. *BioEssays* 21, 221–230. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199903)21:3<221::AID-BIES6>3.0.CO;2-J.
- Le Bris, P., Mazel, J., Berthelet, S., Wang, Y., Meynard, D., Guiderdoni, E., et al. (2013). MiR397 overexpression, a strategy to engineer laccase activity et lignification in model plants et in crop plants et trees. in *The 13th Cell Wall Meeting : abstract book* (Nantes), 91.
- Lê, S., Josse, J., et Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- Lee, C., O'Neill, M. A., Tsumuraya, Y., Darvill, A. G., et Ye, Z.-H. (2007a). The irregular xylem9 Mutant is Deficient in Xylan Xylosyltransferase Activity. *Plant et Cell Physiology* 48, 1624–1634. doi:10.1093/pcp/pcm135.
- Lee, C., Teng, Q., Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2011). Molecular Dissection of Xylan Biosynthesis during Wood Formation in Poplar. *Molecular Plant* 4, 730–747. doi:10.1093/mp/ssr035.

- Lee, C., Teng, Q., Zhong, R., Yuan, Y., Haghghat, M., et Ye, Z.-H. (2012). Three Arabidopsis DUF579 Domain-Containing GXM Proteins are Methyltransferases Catalyzing 4-O-Methylation of Glucuronic Acid on Xylan. *Plant et Cell Physiology* 53, 1934–1949. doi:10.1093/pcp/pcs138.
- Lee, C., Zhong, R., Richardson, E. A., Himmelsbach, D. S., McPhail, B. T., et Ye, Z.-H. (2007b). The PARVUS Gene is Expressed in Cells Undergoing Secondary Wall Thickening et is Essential for Glucuronoxylan Biosynthesis. *Plant et Cell Physiology* 48, 1659–1672. doi:10.1093/pcp/pcm155.
- Lee, Y., et Voit, E. O. (2010). Mathematical modeling of monolignol biosynthesis in Populus xylem. *Mathematical Biosciences* 228, 78–89. doi:10.1016/j.mbs.2010.08.009.
- Legay, S., Sivadon, P., Blervacq, A.-S., Pavy, N., Baghdady, A., Tremblay, L., et al. (2010). EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis et poplar. *New Phytol.* 188, 774–786. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03432.x.
- Léplé, J. C., Brasileiro, A. C., Michel, M. F., Delmotte, F., et Jouanin, L. (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep.* 11, 137–141. doi:10.1007/BF00232166.
- Léplé, J.-C., Dauwe, R., Morreel, K., Storme, V., Lapierre, C., Pollet, B., et al. (2007). Downregulation of Cinnamoyl-Coenzyme A Reductase in Poplar: Multiple-Level Phenotyping Reveals Effects on Cell Wall Polymer Metabolism et Structure. *THE PLANT CELL ONLINE* 19, 3669–3691. doi:10.1105/tpc.107.054148.
- Lewis, N. G., et Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis et biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 455–496. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.002323.
- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M. C., Forneris, N., Savidge, R. A., et al. (2012a). The Class II KNOX gene KNAT7 negatively regulates secondary wall formation in Arabidopsis et is functionally conserved in Populus. *New Phytol.* 194, 102–115. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.04016.x.
- Li, H., Yang, Y., Wang, Z., Guo, X., Liu, F., Jiang, J., et al. (2016a). BpMADS12 gene role in lignin biosynthesis of *Betula platyphylla* Suk by transcriptome analysis. *Journal of Forestry Research* 27, 1111–1120. doi:10.1007/s11676-016-0229-y.
- Li, K., Wang, H., Hu, X., Ma, F., Wu, Y., Wang, Q., et al. (2017a). Genetic et Quantitative Trait Locus Analysis of Cell Wall Components et Forage Digestibility in the Zheng58 × HD568 Maize RIL Population at Anthesis Stage. *Front Plant Sci* 8, 1472. doi:10.3389/fpls.2017.01472.
- Li, Q., Lin, Y.-C., Sun, Y.-H., Song, J., Chen, H., Zhang, X.-H., et al. (2012b). Splice variant of the SND1 transcription factor is a dominant negative of SND1 members et their regulation in *Populus trichocarpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14699–14704. doi:10.1073/pnas.1212977109.
- Li, S., Lei, L., Somerville, C. R., et Gu, Y. (2012c). Cellulose synthase interactive protein 1 (CS11) links microtubules et cellulose synthase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 185–190. doi:10.1073/pnas.1118560109.
- Li, X., Weng, J.-K., et Chapple, C. (2008). Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.* 54, 569–581. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03457.x.
- Li, Y., Jin, F., Chao, Q., et Wang, B.-C. (2017b). Proteomics analysis reveals the molecular mechanism underlying the transition from primary to secondary growth of poplar. *Journal of Plant Physiology* 213, 1–15. doi:10.1016/j.jplph.2017.02.009.
- Li, Y., Qian, Q., Zhou, Y., Yan, M., Sun, L., Zhang, M., et al. (2003). BRITTLE CULMI, Which Encodes a COBRA-Like Protein, Affects the Mechanical Properties of Rice Plants. *The Plant Cell* 15, 2020–2031. doi:10.1105/tpc.011775.
- Li, Z., Omranian, N., Neumetzler, L., Wang, T., Herter, T., Usadel, B., et al. (2016b). A Transcriptional et Metabolic Framework for Secondary Wall Formation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 172, 1334–1351. doi:10.1104/pp.16.01100.
- Liang, C. Y., et Marchessault, R. H. (1959). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. Hydrogen bonds in native celluloses. *Journal of Polymer Science* 37, 385–395. doi:10.1002/pol.1959.1203713209.
- Lin, Y.-C. J., Chen, H., Li, Q., Li, W., Wang, J. P., Shi, R., et al. (2017). Reciprocal cross-regulation of VND et SND multigene TF families for wood formation in *Populus trichocarpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E9722–E9729. doi:10.1073/pnas.1714422114.
- Lin, Y.-C., Li, W., Chen, H., Li, Q., Sun, Y.-H., Shi, R., et al. (2014). A simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation. *Nature Protocols* 9, 2194–2205. doi:10.1038/nprot.2014.147.
- Little, C. H. A., et Bonga, J. M. (1974). Rest in cambium of *Abies balsamea*. *Canadian Journal of Botany* 52, 1723–1730.
- Little, C. H. A., et Pharis, R. P. (1995). “Hormonal Control of Radial et Longitudinal Growth in the Tree Stem,” in *Plant Stems* (Elsevier), 281–319. doi:10.1016/B978-012276460-8/50015-1.
- Little, C. H. A., et Savidge, R. A. (1987). “The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth,” in *Hormonal control of tree growth* (Dordrecht: Springer Netherlands), 137–170. doi:10.1007/978-94-017-1793-9.

- Liu, C., Yu, H., Rao, X., Li, L., et Dixon, R. A. (2021). Abscisic acid regulates secondary cell-wall formation et lignin deposition in *Arabidopsis thaliana* through phosphorylation of NST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2010911118. doi:10.1073/pnas.2010911118.
- Liu, C.-J., Miao, Y.-C., et Zhang, K.-W. (2011). Sequestration et transport of lignin monomeric precursors. *Molecules* 16, 710–727. doi:10.3390/molecules16010710.
- Liu, J., Xu, Y., Zhang, Z., et Wei, J. (2015). Hydrogen peroxide promotes programmed cell death et salicylic acid accumulation during the induced production of sesquiterpenes in cultured cell suspensions of *Aquilaria sinensis*. *Functional Plant Biology* 42, 337. doi:10.1071/FP14189.
- Liu, P.-L., Du, L., Huang, Y., Gao, S.-M., et Yu, M. (2017). Origin et diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC Evolutionary Biology* 17. doi:10.1186/s12862-017-0891-5.
- Liu, Y., You, S., Taylor-Teeples, M., Li, W. L., Schuetz, M., Brady, S. M., et al. (2014). BEL1-LIKE HOMEODOMAIN6 et KNOTTED ARABIDOPSIS THALIANA7 Interact et Regulate Secondary Cell Wall Formation via Repression of REVOLUTA. *The Plant Cell* 26, 4843–4861. doi:10.1105/tpc.114.128322.
- Love, J., Björklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjärvi, J., et Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *PNAS* 106, 5984–5989. doi:10.1073/pnas.0811660106.
- Love, M. I., Huber, W., et Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change et dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lu, S., Li, Q., Wei, H., Chang, M.-J., Tunlaya-Anukit, S., Kim, H., et al. (2013). Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *PNAS* 110, 10848–10853. doi:10.1073/pnas.1308936110.
- Mader, M., Paslier, M.-C. L., Bounon, R., Bérard, A., Rampant, P. F., Fladung, M., et al. (2016). Whole-genome draft assembly of *Populus tremula* x *P. alba* clone INRA 717-1B4. *Silvae Genetica* 65, 74–79. doi:10.1515/sg-2016-0019.
- Maheshwari, P., et Kovalchuk, I. (2016). Agrobacterium-Mediated Stable Genetic Transformation of *Populus angustifolia* et *Populus balsamifera*. *Front Plant Sci* 7, 296. doi:10.3389/fpls.2016.00296.
- Mähönen, A. P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M. S., Sussman, M. R., et al. (2006). Cytokinins Regulate a Bidirectional Phosphorelay Network in *Arabidopsis*. *Current Biology* 16, 1116–1122. doi:10.1016/j.cub.2006.04.030.
- Mahoudeau, P.-G. (1888). Procédé pour coller les coupes histologiques préparées à la paraffine. *Bulletins de la Société d'anthropologie de Paris* 11, 591–594. doi:10.3406/bmsap.1888.5395.
- Mallory, A. C., Reinhart, B. J., Jones-Rhoades, M. W., Tang, G., Zamore, P. D., Barton, M. K., et al. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal* 23, 3356–3364. doi:10.1038/sj.emboj.7600340.
- Manabe, Y., Verhertbruggen, Y., Gille, S., Harholt, J., Chong, S.-L., Pawar, P. M.-A., et al. (2013). Reduced Wall Acetylation Proteins Play Vital et Distinct Roles in Cell Wall O -Acetylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163, 1107–1117. doi:10.1104/pp.113.225193.
- Marchessault, R. H., et Liang, C. Y. (1962). The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans. *Journal of Polymer Science* 59, 357–378. doi:10.1002/pol.1962.1205916813.
- Marron, N., Bastien, C., Sabatti, M., Taylor, G., et Ceulemans, R. (2006). Plasticity of growth et sylleptic branchiness in two poplar families grown at three sites across Europe. *Tree Physiology* 26, 935–946. doi:10.1093/treephys/26.7.935.
- Martínez-Sanz, M., Pettolino, F., Flanagan, B., Gidley, M. J., et Gilbert, E. P. (2017). Structure of cellulose microfibrils in mature cotton fibres. *Carbohydr Polym* 175, 450–463. doi:10.1016/j.carbpol.2017.07.090.
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., et al. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20027–20031. doi:10.1073/pnas.0805619105.
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S., Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., et al. (2004). Occurrence of the Primary Cell Wall Polysaccharide Rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, et Bryophytes. Implications for the Evolution of Vascular Plants. *Plant Physiology* 134, 339–351. doi:10.1104/pp.103.030072.
- Mauriat, M., et Moritz, T. (2009). Analyses of GA20ox- et GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J.* 58, 989–1003. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03836.x.
- McCaig, B. C., Meagher, R. B., et Dean, J. F. D. (2005). Gene structure et molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221, 619–636. doi:10.1007/s00425-004-1472-6.

- McCann, M. C., Hammouri, M., Wilson, R., Belton, P., et Roberts, K. (1992). Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls. *Plant Physiology* 100, 1940–1947.
- Mccann, M., et Carpita, N. (2008). Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 314–320. doi:10.1016/j.pbi.2008.04.001.
- McCarthy, R. L., Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2009). MYB83 is a direct target of SND1 et acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50, 1950–1964. doi:10.1093/pcp/pcp139.
- McFarlane, H. E., Döring, A., et Persson, S. (2014). The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annual Review of Plant Biology* 65, 69–94. doi:10.1146/annurev-arplant-050213-040240.
- McNeil, M., Darvill, A. G., et Albersheim, P. (1980). Structure of Plant Cell Walls: X. RHAMNOGALACTURONAN I, A STRUCTURALLY COMPLEX PECTIC POLYSACCHARIDE IN THE WALLS OF SUSPENSION-CULTURED SYCAMORE CELLS. *Plant Physiology* 66, 1128–1134. doi:10.1104/pp.66.6.1128.
- Meineke, T., Manisseri, C., et Voigt, C. A. (2014). Phylogeny in Defining Model Plants for Lignocellulosic Ethanol Production: A Comparative Study of Brachypodium distachyon, Wheat, Maize, et Miscanthus x giganteus Leaf et Stem Biomass. *PLoS ONE* 9, e103580. doi:10.1371/journal.pone.0103580.
- Mellerowicz, E. J., Baucher, M., Sundberg, B., et Boerjan, W. (2001). Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol. Biol.* 47, 239–274.
- Mellerowicz, E., et Sundberg, B. (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics et their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 293–300. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.003.
- Mewalal, R., Mizrahi, E., Mansfield, S. D., et Myburg, A. A. (2014). Cell Wall-Related Proteins of Unknown Function: Missing Links in Plant Cell Wall Development. *Plant et Cell Physiology* 55, 1031–1043. doi:10.1093/pcp/pcu050.
- Miao, Y.-C., et Liu, C.-J. (2010). ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma et vacuolar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22728–22733. doi:10.1073/pnas.1007747108.
- Milioni, D., Sado, P.-E., Stacey, N. J., Domingo, C., Roberts, K., et McCann, M. C. (2001). Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the Zinnia mesophyll cell system. *Plant Molecular Biology* 47, 221–238. doi:10.1023/A:1010647902487.
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., et Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC transcription factors NST1 et NST2 of Arabidopsis regulate secondary wall thickenings et are required for anther dehiscence. *Plant Cell* 17, 2993–3006. doi:10.1105/tpc.105.036004.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure et biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 266–277. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Molano, M. L., Cortés, M. L., Ávila, P., Martens, S. D., et Muñoz, L. S. (2016). Near infrared spectroscopy (NIRS) calibration equations to predict nutritional quality parameters of tropical forages. *Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales* 4, 139–145. doi:10.17138/tgft(4)139-145.
- Mortimer, J. C., Miles, G. P., Brown, D. M., Zhang, Z., Segura, M. P., Weimar, T., et al. (2010). Absence of branches from xylan in Arabidopsis gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17409–17414. doi:10.1073/pnas.1005456107.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., Sozzani, R., Pacifici, E., Salvi, E., Terpstra, I., et al. (2013). Spatial Coordination between Stem Cell Activity et Cell Differentiation in the Root Meristem. *Developmental Cell* 26, 405–415. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.025.
- Müller, B. S. F., de Almeida Filho, J. E., Lima, B. M., Garcia, C. C., Missiaggia, A., Aguiar, A. M., et al. (2019). Independent et Joint- GWAS for growth traits in *Eucalyptus* by assembling genome-wide data for 3373 individuals across four breeding populations. *New Phytologist* 221, 818–833. doi:10.1111/nph.15449.
- Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P. J., et Hauser, M.-T. (2004). The Plant Microtubule-Associated Protein AtMAP65-3/PLE Is Essential for Cytokinetic Phragmoplast Function. *Current Biology* 14, 412–417. doi:10.1016/j.cub.2004.02.032.
- Mutwil, M., Debolt, S., et Persson, S. (2008). Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 252–257. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.007.
- Nakaba, S., Begum, S., Yamagishi, Y., Jin, H.-O., Kubo, T., et Funada, R. (2012). Differences in the timing of cell death, differentiation et function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*. *Trees* 26, 743–750. doi:10.1007/s00468-011-0640-0.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N. A., et Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* 6. doi:10.3389/fpls.2015.00288.

- Newman, R. H., Hill, S. J., et Harris, P. J. (2013). Wide-Angle X-Ray Scattering et Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Data Combined to Test Models for Cellulose Microfibrils in Mung Bean Cell Walls. *PLANT PHYSIOLOGY* 163, 1558–1567. doi:10.1104/pp.113.228262.
- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., et Höfte, H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta -D-glucanase is required for normal wall assembly et cell elongation in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 17, 5563–5576. doi:10.1093/emboj/17.19.5563.
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., et al. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *PNAS* 105, 20032–20037. doi:10.1073/pnas.0805617106.
- Nilsson, J., Karlberg, A., Antti, H., Lopez-Vernaza, M., Mellerowicz, E., Perrot-Rechenmann, C., et al. (2008). Dissecting the Molecular Basis of the Regulation of Wood Formation by Auxin in Hybrid Aspen. *The Plant Cell* 20, 843–855. doi:10.1105/tpc.107.055798.
- Nishikubo, N., Awano, T., Banasiak, A., Bourquin, V., Ibatullin, F., Funada, R., 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 et Cell Physiology* 48, 843–855. doi:10.1093/pcp/pcm055.
- Noh, B., Murphy, A. S., et Spalding, E. P. (2001). *Multidrug Resistance* -like Genes of Arabidopsis Required for Auxin Transport et Auxin-Mediated Development. *The Plant Cell* 13, 2441–2454. doi:10.1105/tpc.010350.
- Norberg, P. H., et Meier, H. (1966). Physical et Chemical Properties of the Gelatinous Layer in Tension Wood Fibres of Aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* 20, 174–178. doi:10.1515/hfsg.1966.20.6.174.
- Obudulu, O., Mähler, N., Skotare, T., Bygdell, J., Abreu, I. N., Ahnlund, M., et al. (2018). A multi-omics approach reveals function of Secretory Carrier-Associated Membrane Proteins in wood formation of Populus trees. *BMC Genomics* 19. doi:10.1186/s12864-017-4411-1.
- Oh, S. A., Park, K. S., Twell, D., et Park, S. K. (2010). The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing et orientation of asymmetric cell division: SCP, LBD27/ASL29, for microspore division asymmetry. *The Plant Journal* 64, 839–850. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04374.x.
- Oh, T. R., Kim, J. H., Cho, S. K., Ryu, M. Y., Yang, S. W., et Kim, W. T. (2017). AtAIRP2 E3 Ligase Affects ABA et High-Salinity Responses by Stimulating Its ATP1/SDIRIP1 Substrate Turnover. *Plant Physiology* 174, 2515–2531. doi:10.1104/pp.17.00467.
- Ohashi-Ito, K., et Fukuda, H. (2003). HD-zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium et xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.* 44, 1350–1358. doi:10.1093/pcp/pcg164.
- Ohashi-Ito, K., et Fukuda, H. (2010). Transcriptional regulation of vascular cell fates. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 670–676. doi:10.1016/j.pbi.2010.08.011.
- Ohashi-Ito, K., Matsukawa, M., et Fukuda, H. (2013). An Atypical bHLH Transcription Factor Regulates Early Xylem Development Downstream of Auxin. *Plant et Cell Physiology* 54, 398–405. doi:10.1093/pcp/pct013.
- Olsson, A.-M., Bjurhager, I., Gerber, L., Sundberg, B., et Salmén, L. (2011). Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal et tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. *Planta* 233, 1277–1286. doi:10.1007/s00425-011-1384-1.
- O'Neill, M. A., et York, W. S. (2003). “The Composition et Structure of Plant Primary Cell Walls,” in *The plant cell wall*, ed. J. A. Roberts (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 1–54. doi:10.1002/9781119312994.apr0067.
- Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., et al. (2003). Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* et *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* 10, 239–247. doi:10.1093/dnares/10.6.239.
- Overney, S., Tognolli, M., Simon, P., Greppin, H., et Penel, C. (1998). Peroxidases et hydrogen peroxide: Where, When, Why? *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 67, 89–98.
- Özparpucu, M., Gierlinger, N., Burgert, I., Van Acker, R., Vanholme, R., Boerjan, W., et al. (2018). The effect of altered lignin composition on mechanical properties of CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD) deficient poplars. *Planta* 247, 887–897. doi:10.1007/s00425-017-2828-z.
- Paredes, A. R., Somerville, C. R., et Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312, 1491–1495. doi:10.1126/science.1126551.
- Pear, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P., et Stalker, D. M. (1996). Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12637–12642. doi:10.1073/pnas.93.22.12637.

- Peña, M. J., Zhong, R., Zhou, G.-K., Richardson, E. A., O'Neill, M. A., Darvill, A. G., et al. (2007). *Arabidopsis irregular xylem8 et irregular xylem9* : Implications for the Complexity of Glucuronoxylan Biosynthesis. *The Plant Cell* 19, 549–563. doi:10.1105/tpc.106.049320.
- Persson, S., Paredes, A., Carroll, A., Palsdottir, H., Doblin, M., Poindexter, P., et al. (2007). Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 15566–15571. doi:10.1073/pnas.0706592104.
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G. P., et Somerville, C. R. (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 8633–8638. doi:10.1073/pnas.0503392102.
- Pesquet, E., Korolev, A. V., Calder, G., et Lloyd, C. W. (2010). The microtubule-associated protein AtMAP70-5 regulates secondary wall patterning in *Arabidopsis* wood cells. *Curr. Biol.* 20, 744–749. doi:10.1016/j.cub.2010.02.057.
- Pesquet, E., Zhang, B., Gorzsás, A., Puhakainen, T., Serk, H., Escamez, S., et al. (2013). Non-Cell-Autonomous Postmortem Lignification of Tracheary Elements in *Zinnia elegans*. *The Plant Cell* 25, 1314–1328. doi:10.1105/tpc.113.110593.
- Peterson, B. G., et Carl, P. (2020). *PerformanceAnalytics: Econometric Tools for Performance et Risk Analysis*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics>.
- Phelps, J. E., McGinnes Jr., E. A., Smoliński, M., Saniewski, M., et Pieniążek, J. (1977). A note on the formation of compression wood induced by morphactin-IT 3456 in Tuja shoots. *Wood Fiber*, 223–227.
- Phelps, J. E., Saniewski, M., Smoliński, M., Pieniążek, J., et McGinnes Jr., E. A. (1974). A note on the structure of morphactin-induced wood in two coniferous species. *Wood Fiber* 6, 13–17.
- Pilate, G., Déjardin, A., Laurans, F., et Leplé, J.-C. (2004). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation: Research review. *New Phytologist* 164, 63–72. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01176.x.
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leplé, J.-C., et al. (2002). Field et pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology* 20, 607–612. doi:10.1038/nbt0602-607.
- Piqueras, S., Füchtner, S., Rocha de Oliveira, R., Gómez-Sánchez, A., Jelavić, S., Keplinger, T., et al. (2020). Understanding the Formation of Heartwood in Larch Using Synchrotron Infrared Imaging Combined With Multivariate Analysis et Atomic Force Microscope Infrared Spectroscopy. *Frontiers in Plant Science* 10. doi:10.3389/fpls.2019.01701.
- Plett, J. M., Tisserant, E., Brun, A., Morin, E., Grigoriev, I. V., Kuo, A., et al. (2015). The Mutualist *Laccaria bicolor* Expresses a Core Gene Regulon During the Colonization of Diverse Host Plants et a Variable Regulon to Counteract Host-Specific Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 28, 261–273. doi:10.1094/MPMI-05-14-0129-FI.
- Plomion, C., Leprovost, G., et Stokes, A. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* 127, 1513–1523.
- Pohlert, T. (2014). *The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks package (PMCMR)*. Rpackage.
- Popescu, M.-C., Froidevaux, J., Navi, P., et Popescu, C.-M. (2013). Structural modifications of *Tilia cordata* wood during heat treatment investigated by FT-IR et 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 1033, 176–186. doi:10.1016/j.molstruc.2012.08.035.
- Prassinou, C., Ko, J.-H., Yang, J., et Han, K.-H. (2005). Transcriptome Profiling of Vertical Stem Segments Provides Insights into the Genetic Regulation of Secondary Growth in Hybrid Aspen Trees. *Plant et Cell Physiology* 46, 1213–1225. doi:10.1093/pcp/pci130.
- Prigge, M. J., et Clark, S. E. (2006). Evolution of the class III HD-Zip gene family in land plants. *Evolution* <html_ent glyph="@amp;" ascii="&"/> *Development* 8, 350–361. doi:10.1111/j.1525-142X.2006.00107.x.
- Puzey, J. R., Karger, A., Axtell, M., et Kramer, E. M. (2012). Deep Annotation of *Populus trichocarpa* microRNAs from Diverse Tissue Sets. *PLoS ONE* 7, e33034. doi:10.1371/journal.pone.0033034.
- Qin, W., Yin, Q., Chen, J., Zhao, X., Yue, F., He, J., et al. (2020). The class II KNOX transcription factors KNAT3 et KNAT7 synergistically regulate monolignol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 71, 5469–5483. doi:10.1093/jxb/eraa266.
- Qu, Y., Egelund, J., Gilson, P. R., Houghton, F., Gleeson, P. A., Schultz, C. J., et al. (2008). Identification of a novel group of putative *Arabidopsis thaliana* β -(1,3)-galactosyltransferases. *Plant Molecular Biology* 68, 43–59. doi:10.1007/s11103-008-9351-3.
- R Core Team (2020). *R: A language et environment for statistical computing*.
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., et Hardtke, C. S. (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates *Arabidopsis* Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell* 23, 1322–1336. doi:10.1105/tpc.111.084020.
- Ralph, J. (2010). Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* 9, 65–83. doi:10.1007/s11101-009-9141-9.

- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Lu, F., Kim, H., et al. (2004a). Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews* 3, 79–96. doi:10.1023/B:PHYT.0000047811.13837.fb.
- Ralph, J., Kim, H., Lu, F., Grabber, J. H., Leplé, J.-C., Berrio-Sierra, J., et al. (2007). Identification of the structure et origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency): Marker for ferulic acid incorporation into lignins. *The Plant Journal* 53, 368–379. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03345.x.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., et al. (2004b). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews* 3, 29–60. doi:10.1023/B:PHYT.0000047809.65444.a4.
- Ramachandran, P., Carlsbecker, A., et Etchells, J. P. (2017). Class III HD-ZIPs govern vascular cell fate: an HD view on patterning et differentiation. *J Exp Bot* 68, 55–69. doi:10.1093/jxb/erw370.
- Ranocha, P., Denancé, N., Vanholme, R., Freydier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., et al. (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of Medicago truncatula NODULIN21, is a tonoplast-localized protein required for secondary wall formation in fibers: Tonoplastic WAT1 et secondary wall formation. *The Plant Journal* 63, 469–483. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04256.x.
- Rasmussen, S., et Dixon, R. A. (1999). Transgene-Mediated et Elicitor-Induced Perturbation of Metabolic Channeling at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway. *The Plant Cell* 11, 1537–1551. doi:10.1105/tpc.11.8.1537.
- Rennie, E. A., Hansen, S. F., Baidoo, E. E. K., Hadi, M. Z., Keasling, J. D., et Scheller, H. V. (2012). Three Members of the Arabidopsis Glycosyltransferase Family 8 Are Xylan Glucuronosyltransferases. *Plant Physiol.* 159, 1408–1417. doi:10.1104/pp.112.200964.
- Rennie, E. A., et Scheller, H. V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 26, 100–107. doi:10.1016/j.copbio.2013.11.013.
- Richardson, K. C., Jarett, L., et Finke, E. H. (1960). Embedding in Epoxy Resins for Ultrathin Sectioning in Electron Microscopy. *Stain Technology* 35, 313–323. doi:10.3109/10520296009114754.
- Richmond, T. A., et Somerville, C. R. (2000). The Cellulose Synthase Superfamily. *Plant Physiology* 124, 495–498. doi:10.1104/pp.124.2.495.
- Robischon, M., Du, J., Miura, E., et Groover, A. (2011). The *Populus* Class III HD ZIP, *popREVOLUTA* , Influences Cambium Initiation et Patterning of Woody Stems. *Plant Physiology* 155, 1214–1225. doi:10.1104/pp.110.167007.
- Rogier, O., Chateigner, A., Amanzougarene, S., Lesage-Descauses, M.-C., Balzergue, S., Brunaud, V., et al. (2018). Accuracy of RNAseq based SNP discovery et genotyping in *Populus nigra*. *BMC Genomics* 19. doi:10.1186/s12864-018-5239-z.
- Ronneberger, O., Fischer, P., et Brox, T. (2015). “U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation,” in *Medical Image Computing et Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, eds. N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, et A. F. Frangi (Cham: Springer International Publishing), 234–241. doi:10.1007/978-3-319-24574-4_28.
- Ross, J. J., O’neill, D. P., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J., et Elliott, R. C. (2000). Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea: Auxin promotes gibberellin biosynthesis in pea. *The Plant Journal* 21, 547–552. doi:10.1046/j.1365-313x.2000.00702.x.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmelpach, R., Borner, G. H. H., Schindelman, G., et al. (2005). COBRA, an Arabidopsis Extracellular Glycosyl-Phosphatidyl Inositol-Anchored Protein, Specifically Controls Highly Anisotropic Expansion through Its Involvement in Cellulose Microfibril Orientation. *The Plant Cell* 17, 1749–1763. doi:10.1105/tpc.105.031732.
- Rubin, G., Tohge, T., Matsuda, F., Saito, K., et Scheible, W.-R. (2009). Members of the *LBD* Family of Transcription Factors Repress Anthocyanin Synthesis et Affect Additional Nitrogen Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21, 3567–3584. doi:10.1105/tpc.109.067041.
- Ruel, K., Berrio-Sierra, J., Derikvand, M. M., Pollet, B., Thévenin, J., Lapiere, C., et al. (2009). Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 184, 99–113. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02951.x.
- Rydahl, M. G., Hansen, A. R., Kračun, S. K., et Mravec, J. (2018). Report on the Current Inventory of the Toolbox for Plant Cell Wall Analysis: Proteinaceous et Small Molecular Probes. *Frontiers in Plant Science* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00581.
- Ryu, K. H., Huang, L., Kang, H. M., et Schiefelbein, J. (2019). Single-Cell RNA Sequencing Resolves Molecular Relationships Among Individual Plant Cells. *Plant Physiology* 179, 1444–1456. doi:10.1104/pp.18.01482.
- Sakaguchi, J., et Watanabe, Y. (2012). miR165/166 et the development of land plants: miR165/166 et land plant development. *Development, Growth & Differentiation* 54, 93–99. doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01318.x.

- Sampathkumar, A., Gutierrez, R., McFarlane, H. E., Bringmann, M., Lindeboom, J., Emons, A.-M., et al. (2013). Patterning et Lifetime of Plasma Membrane-Localized Cellulose Synthase Is Dependent on Actin Organization in Arabidopsis Interphase Cells. *Plant Physiology* 162, 675–688. doi:10.1104/pp.113.215277.
- Samuels, A., Rensing, K., Douglas, C., Mansfield, S., Dharmawardhana, D., et Ellis, B. (2002). Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216, 72–82. doi:10.1007/s00425-002-0884-4.
- Sánchez-Rodríguez, C., Bauer, S., Hématy, K., Saxe, F., Ibáñez, A. B., Vodermaier, V., et al. (2012). Chitinase-like1/pom-pom1 et its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 589–607. doi:10.1105/tpc.111.094672.
- Sanderson, M. A., Agblevor, F., Collins, M., et Johnson, D. K. (1996). Compositional analysis of biomass feedstocks by near infrared reflectance spectroscopy. *Biomass et Bioenergy* 11, 365–370. doi:10.1016/S0961-9534(96)00039-6.
- Sannigrahi, P., Ragauskas, A. J., et Tuskan, G. A. (2010). Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. *Biofuels, Bioproducts et Biorefining* 4, 209–226. doi:10.1002/bbb.206.
- Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F., et Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology* 33, 495–502. doi:10.1038/nbt.3192.
- Sato, S., Kato, T., Kakegawa, K., Ishii, T., Liu, Y.-G., Awano, T., et al. (2001). Role of the Putative Membrane-Bound Endo-1,4-β-Glucanase KORRIGAN in Cell Elongation et Cellulose Synthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant et Cell Physiology* 42, 251–263. doi:10.1093/pcp/pce045.
- Savitzky, A., et Golay, M. J. E. (1964). Smoothing et Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry* 36, 1627–1639. doi:10.1021/ac60214a047.
- Sayols, S. (2020). *rrvgo: a Bioconductor package to reduce et visualize Gene Ontology terms*.
- Scheible, W.-R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., et Somerville, C. (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben et thiazolidinone herbicides in Arabidopsis *Ixr1* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 10079–10084. doi:10.1073/pnas.191361598.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbyshire, P., et al. (2001). COBRA encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized et necessary for oriented cell expansion in Arabidopsis. *Genes & Development* 15, 1115–1127. doi:10.1101/gad.879101.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F., Jürgens, G., et Laux, T. (2000). The Stem Cell Population of Arabidopsis Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the CLAVATA et WUSCHEL Genes. *Cell* 100, 635–644. doi:10.1016/S0092-8674(00)80700-X.
- Schrader, B. (1996). *Infrared et Raman Spectroscopy - Methods et Application*. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/bbpc.19961000733> [Accessed March 5, 2021].
- Schrader, J. (2003). Developmental biology of wood formation - finding regulatory factors through functional genomics.
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M., et al. (2004a). A High-Resolution Transcript Profile across the Wood-Forming Meristem of Poplar Identifies Potential Regulators of Cambial Stem Cell Identity. *The Plant Cell* 16, 2278–2292. doi:10.1105/tpc.104.024190.
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M., et al. (2004b). A High-Resolution Transcript Profile across the Wood-Forming Meristem of Poplar Identifies Potential Regulators of Cambial Stem Cell Identity. *The Plant Cell* 16, 2278–2292. doi:10.1105/tpc.104.024190.
- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R. A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., et al. (2014). Laccases Direct Lignification in the Discrete Secondary Cell Wall Domains of Protoxylem. *PLANT PHYSIOLOGY* 166, 798–807. doi:10.1104/pp.114.245597.
- Schwanninger, M., Rodrigues, J. C., Pereira, H., et Hinterstoisser, B. (2004). Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood et cellulose. *Vibrational Spectroscopy* 36, 23–40. doi:10.1016/j.vibspec.2004.02.003.
- Sédillot, B. (2017). Récolte de bois et production de sciages en 2016. Ministère de l’agriculture et de l’alimentation Available at: <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/cd242bssef.pdf>.
- Sehr, E. M., Agusti, J., Lehner, R., Farmer, E. E., Schwarz, M., et Greb, T. (2010). Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signalling in cambium formation: JA signalling promotes secondary growth. *The Plant Journal* 63, 811–822. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04283.x.
- Serikawa, K. A., Martinez-Laborda, A., Kim, H.-S., et Zambryski, P. C. (1997). Localization of expression of KNAT3, a class 2 knotted1-like gene. *The Plant Journal* 11, 853–861. doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11040853.x.

- Seyfferth, C., Wessels, B., Jokipii-Lukkari, S., Sundberg, B., Delhomme, N., Felten, J., et al. (2018). Ethylene-Related Gene Expression Networks in Wood Formation. *Frontiers in Plant Science* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00272.
- Shannon, P. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* 13, 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.
- Shi, R., Wang, J. P., Lin, Y.-C., Li, Q., Sun, Y.-H., Chen, H., et al. (2017a). Tissue et cell-type co-expression networks of transcription factors et wood component genes in *Populus trichocarpa*. *Planta* 245, 927–938. doi:10.1007/s00425-016-2640-1.
- Shi, R., Wang, J. P., Lin, Y.-C., Li, Q., Sun, Y.-H., Chen, H., et al. (2017b). Tissue et cell-type co-expression networks of transcription factors et wood component genes in *Populus trichocarpa*. *Planta* 245, 927–938. doi:10.1007/s00425-016-2640-1.
- Shigeto, J., Itoh, Y., Hirao, S., Ohira, K., Fujita, K., et Tsutsumi, Y. (2015). Simultaneously disrupting *AtPrx2*, *AtPrx25* et *AtPrx71* alters lignin content et structure in *Arabidopsis* stem: Lignin alteration by simultaneous disruption of *AtPrx* genes. *Journal of Integrative Plant Biology* 57, 349–356. doi:10.1111/jipb.12334.
- Showalter, A. M. (1993). Structure et function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5, 9–23. doi:10.1105/tpc.5.1.9.
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G., et Springer, P. S. (2002). The *Lateral Organ Boundaries* Gene Defines a Novel, Plant-Specific Gene Family. *Plant Physiology* 129, 747–761. doi:10.1104/pp.010926.
- Shulse, C. N., Cole, B. J., Ciobanu, D., Lin, J., Yoshinaga, Y., Gouran, M., et al. (2019). High-Throughput Single-Cell Transcriptome Profiling of Plant Cell Types. *Cell Reports* 27, 2241–2247.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.054.
- Sibout, R., Baucher, M., Gatineau, M., Van Doorselaere, J., Mila, I., Pollet, B., et al. (2002). Expression of a poplar cDNA encoding a ferulate-5-hydroxylase/coniferaldehyde 5-hydroxylase increases S lignin deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology et Biochemistry* 40, 1087–1096. doi:10.1016/S0981-9428(02)01474-2.
- Sibout, R., et Höfte, H. (2012). Plant cell biology: the ABC of monolignol transport. *Curr. Biol.* 22, R533–535. doi:10.1016/j.cub.2012.05.005.
- Siedlecka, A., Wiklund, S., Péronne, M.-A., Micheli, F., Lesniewska, J., Sethson, I., et al. (2008). Pectin methyl esterase inhibits intrusive et symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiol.* 146, 554–565. doi:10.1104/pp.107.111963.
- Šimášková, M., O'Brien, J. A., Khan, M., Van Noorden, G., Ötvös, K., Vieten, A., et al. (2015). Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nature Communications* 6. doi:10.1038/ncomms9717.
- Simon, C., Lion, C., Biot, C., Gierlinger, N., et Hawkins, S. (2018). “Lignification et advances in lignin imaging in plant cell walls,” in *Annual Plant Review online*, ed. J. A. Roberts (Chichester: John Wiley & Sons, Ltd), 1–32.
- Smith, R. A., Schuetz, M., Karlen, S. D., Bird, D., Tokunaga, N., Sato, Y., et al. (2017). Defining the Diverse Cell Populations Contributing to Lignification in *Arabidopsis* Stems. *Plant Physiology* 174, 1028–1036. doi:10.1104/pp.17.00434.
- Smith, R. A., Schuetz, M., Roach, M., Mansfield, S. D., Ellis, B., et Samuels, L. (2013). Neighboring Parenchyma Cells Contribute to *Arabidopsis* Xylem Lignification, while Lignification of Interfascicular Fibers Is Cell Autonomous. *The Plant Cell* 25, 3988–3999. doi:10.1105/tpc.113.117176.
- Smoliński, M., Pleniasek, J., et Saniewski, M. (1973). Induction of compression-like wood by morphactin in vertically growing shoots of *Pinus sylvestris* L. *Proc. Inst. Sadow. Skierniewice. Ser. E* 3, 553–558.
- Smoliński, M., Saniewski, M., et Pleniasek, J. (1972). Effect of morphactin IT 3456 on cambial activity et wood differentiation in *Picea excelsa*. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* 20, 431–435.
- Song, D., Shen, J., et Li, L. (2010). Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation. *New Phytologist* 187, 777–790. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03315.x.
- Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y., et Chua, N.-H. (2008). *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30* et *ASL20/LBD18* Regulate Tracheary Element Differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 3359–3373. doi:10.1105/tpc.108.061796.
- Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C., et Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems. *Current Biology* 19, 909–914. doi:10.1016/j.cub.2009.03.060.
- Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., et al. (1998). Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *PNAS* 95, 13330–13335. doi:10.1073/pnas.95.22.13330.
- Sterling, J. D., Atmodjo, M. A., Inwood, S. E., Kumar Kolli, V. S., Quigley, H. F., Hahn, M. G., et al. (2006). Functional identification of an *Arabidopsis* pectin biosynthetic homogalacturonan

- galacturonosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5236–5241. doi:10.1073/pnas.0600120103.
- Stettler, R. F., Fenn, R. C., Heilman, P. E., et Stanton, B. J. (1988). *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* hybrids for short rotation culture: variation patterns et 4-year field performance. *Can. J. For. Res.*, 745–753.
- Stewart, J. J., Akiyama, T., Chapple, C., Ralph, J., et Mansfield, S. D. (2009). The Effects on Lignin Structure of Overexpression of Ferulate 5-Hydroxylase in Hybrid Poplar ¹. *Plant Physiology* 150, 621–635. doi:10.1104/pp.109.137059.
- Stracke, R., Werber, M., et Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 447–456. doi:10.1016/S1369-5266(00)00199-0.
- Suer, S., Agusti, J., Sanchez, P., Schwarz, M., et Greb, T. (2011). WOXA Imparts Auxin Responsiveness to Cambium Cells in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 3247–3259. doi:10.1105/tpc.111.087874.
- Sun, Y., Fan, X.-Y., Cao, D.-M., Tang, W., He, K., Zhu, J.-Y., et al. (2010). Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 19, 765–777. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.010.
- Sun, Y., Veerabomma, S., Fokar, M., Abidi, N., Hequet, E., Payton, P., et al. (2015). Brassinosteroid signaling affects secondary cell wall deposition in cotton fibers. *Industrial Crops et Products* 65, 334–342. doi:10.1016/j.indcrop.2014.11.028.
- Sundberg, B., Tuominen, H., et Little, C. H. A. (1994). Effects of the indole-3-acetic acid (IAA) transport inhibitors N-1-naphthylphthalamic acid et morphactin on endogenous IAA dynamics in relation to compression wood formation in 1-year-old *Pinus sylvestris* (L.) shoots. *Plant Physiology* 106, 469–476.
- Sundberg, B., Uggla, C., et Tuominen, H. (2000). “Cambial growth et auxin gradients,” in *Cell et Molecular Biology of Wood Formation* (Oxford: Savidge, R.A. Barnett, J.R. et Napier, R.).
- Sundell, D., Street, N. R., Kumar, M., Mellerowicz, E. J., Kucukoglu, M., Johnsson, C., et al. (2017). AspWood: High-Spatial-Resolution Transcriptome Profiles Reveal Uncharacterized Modularity of Wood Formation in *Populus tremula*. *The Plant Cell* 29, 1585–1604. doi:10.1105/tpc.17.00153.
- Susila, H., Nasim, Z., Gawarecka, K., Jung, J.-Y., Jin, S., Youn, G., et al. (2021). PHOSPHORYLETHANOLAMINE CYTIDYLTRANSFERASE 1 modulates flowering in a florigen-independent manner by regulating *SVP*. *Development* 148, dev193870. doi:10.1242/dev.193870.
- Szyjanowicz, P. M. J., McKinnon, I., Taylor, N. G., Gardiner, J., Jarvis, M. C., et Turner, S. R. (2004). The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrikan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 37, 730–740. doi:10.1111/j.1365-313X.2003.02000.x.
- Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., et al. (2013). An *Arabidopsis* Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin et Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *The Plant Cell* 25, 270–287. doi:10.1105/tpc.112.107334.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., et al. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6, 377–382. doi:10.1038/nmeth.1315.
- Tang, W., Luo, X., Nelson, A., Collver, H., et Kinken, K. (2003). Functional Genomics of Wood Quality et Properties. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 1, 263–278. doi:10.1016/S1672-0229(03)01032-5.
- Tang, X., Zhuang, Y., Qi, G., Wang, D., Liu, H., Wang, K., et al. (2015). Poplar PdMYB221 is involved in the direct et indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Sci Rep* 5, 1–14. doi:10.1038/srep12240.
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S.-H., et al. (2008). An *AGAMOUS* -Related MADS-Box Gene, *XAL1* (*AGL12*), Regulates Root Meristem Cell Proliferation et Flowering Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146, 1182–1192. doi:10.1104/pp.107.108647.
- Taylor, G. (2002). *Populus: Arabidopsis for Forestry. Do We Need a Model Tree?* *Annals of Botany* 90, 681–689. doi:10.1093/aob/mcf255.
- Taylor, N. G., Howells, R. M., Huttly, A. K., Vickers, K., et Turner, S. R. (2003). Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 1450–1455. doi:10.1073/pnas.0337628100.
- Taylor, N. G., Scheible, W.-R., Cutler, S., Somerville, C. R., et Turner, S. R. (1999). The *irregular xylem3* Locus of *Arabidopsis* Encodes a Cellulose Synthase Required for Secondary Cell Wall Synthesis. *The Plant Cell* 11, 769–779. doi:10.1105/tpc.11.5.769.
- Taylor-Teeples, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., et al. (2015a). An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517, 571–575. doi:10.1038/nature14099.
- Taylor-Teeples, M., Lin, L., de Lucas, M., Turco, G., Toal, T. W., Gaudinier, A., et al. (2015b). An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517, 571–575. doi:10.1038/nature14099.

- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F., et Takabe, K. (1993). “Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall,” in *Forage Cell Wall Structure et Digestibility* (Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America), 247–270. doi:10.2134/1993.foragecellwall.c10.
- Thatcher, L. F., Powell, J. J., Aitken, E. A. B., Kazan, K., et Manners, J. M. (2012). The Lateral Organ Boundaries Domain Transcription Factor LBD20 Functions in Fusarium Wilt Susceptibility et Jasmonate Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 160, 407–418. doi:10.1104/pp.112.199067.
- Thévenin, J., Pollet, B., Letarnek, B., Saulnier, L., Gissot, L., Maia-Grondard, A., et al. (2011). The Simultaneous Repression of CCR et CAD, Two Enzymes of the Lignin Biosynthetic Pathway, Results in Sterility et Dwarfism in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant* 4, 70–82. doi:10.1093/mp/ssq045.
- Thomas, L. H., Forsyth, V. T., Šturcová, A., Kennedy, C. J., May, R. P., Altaner, C. M., et al. (2013). Structure of Cellulose Microfibrils in Primary Cell Walls from Collenchyma. *Plant Physiology* 161, 465–476. doi:10.1104/pp.112.206359.
- Tian, H., Chen, S., Yang, W., Wang, T., Zheng, K., Wang, Y., et al. (2017). A novel family of transcription factors conserved in angiosperms is required for ABA signalling. *Plant, Cell & Environment* 40, 2958–2971. doi:10.1111/pce.13058.
- Timell, T. E. (1964). “Wood Hemicelluloses: Part I,” in *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Elsevier), 247–302. doi:10.1016/S0096-5332(08)60284-2.
- Timell, T. E. (1986). *Compression wood in gymnosperms*. Place of publication not identified: Springer.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., et Simon, P. (2002). Analysis et expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. *Gene* 288, 129–138. doi:10.1016/S0378-1119(02)00465-1.
- Tokunaga, N., Sakakibara, N., Umezawa, T., Ito, Y., Fukuda, H., et Sato, Y. (2005). Involvement of Extracellular Dilignols in Lignification During Tracheary Element Differentiation of Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant et Cell Physiology* 46, 224–232. doi:10.1093/pcp/pci017.
- Tolivia, D., et Tolivia, J. (1987). Fasga: A new polychromatic method for simultaneous et differential staining of plant tissues. *Journal of Microscopy* 148, 113–117. doi:10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., et al. (2014). The dynamics et regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature Biotechnology* 32, 381–386. doi:10.1038/nbt.2859.
- Tsuyama, T., Kawai, R., Shitan, N., Matoh, T., Sugiyama, J., Yoshinaga, A., et al. (2013). Proton-Dependent Coniferin Transport, a Common Major Transport Event in Differentiating Xylem Tissue of Woody Plants. *Plant Physiology* 162, 918–926. doi:10.1104/pp.113.214957.
- Tsuyama, T., et Takabe, K. (2014). Distribution of lignin et lignin precursors in differentiating xylem of Japanese cypress et poplar. *Journal of Wood Science* 60, 353–361. doi:10.1007/s10086-014-1417-z.
- Tuominen, H., Puech, L., Fink, S., et Sundberg, B. (1997). A Radial Concentration Gradient of Indole-3-Acetic Acid Is Related to Secondary Xylem Development in Hybrid Aspen. *Plant Physiology* 115, 577–585. doi:10.1104/pp.115.2.577.
- Turco, G. M., Rodriguez-Medina, J., Siebert, S., Han, D., Valderrama-Gómez, M. Á., Vahldick, H., et al. (2019). Molecular Mechanisms Driving Switch Behavior in Xylem Cell Differentiation. *Cell Reports* 28, 342–351.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.06.041.
- Turner, S., et Kumar, M. (2018). Cellulose synthase complex organization et cellulose microfibril structure. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 376. doi:10.1098/rsta.2017.0048.
- Turner, S. R., et Somerville, C. R. (1997). Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *The Plant Cell* 9, 689–701. doi:10.1105/tpc.9.5.689.
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596–1604. doi:10.1126/science.1128691.
- Uggla, C., Moritz, T., Sandberg, G., et Sundberg, B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *PNAS* 93, 9282–9286. doi:10.1073/pnas.93.17.9282.
- Urbanowicz, B. R., Pena, M. J., Ratnaparkhe, S., Avci, U., Backe, J., Steet, H. F., et al. (2012). 4-O-methylation of glucuronic acid in Arabidopsis glucuronoxylan is catalyzed by a domain of unknown function family 579 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14253–14258. doi:10.1073/pnas.1208097109.
- Vahala, J., Felten, J., Love, J., Gorzsás, A., Gerber, L., Lamminmäki, A., et al. (2013). A genome-wide screen for ethylene-induced ethylene response factors (ERFs) in hybrid aspen stem identifies ERF genes that modify stem growth et wood properties. *New Phytol.* 200, 511–522. doi:10.1111/nph.12386.
- Vain, T., Crowell, E. F., Timpano, H., Biot, E., Desprez, T., Mansoori, N., et al. (2014). The Cellulase KORRIGAN Is Part of the Cellulose Synthase Complex. *Plant Physiology* 165, 1521–1532. doi:10.1104/pp.114.241216.

- Van Acker, R., Déjardin, A., Desmet, S., Hoengenaert, L., Vanholme, R., Morreel, K., et al. (2017). Different Routes for Conifer- et Sinapaldehyde et Higher Saccharification upon Deficiency in the Dehydrogenase CAD1. *Plant Physiology* 175, 1018–1039. doi:10.1104/pp.17.00834.
- Van Acker, R., Leple, J.-C., Aerts, D., Storme, V., Goeminne, G., Ivens, B., et al. (2014a). Improved saccharification et ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 845–850. doi:10.1073/pnas.1321673111.
- Van Acker, R., Leple, J.-C., Aerts, D., Storme, V., Goeminne, G., Ivens, B., et al. (2014b). Improved saccharification et ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 845–850. doi:10.1073/pnas.1321673111.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., et Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161, 405–414. doi:10.1016/S0168-9452(01)00452-6.
- van Parijs, F. R. D., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., et Merks, R. M. H. (2010). Modeling lignin polymerization. I. Simulation model of dehydrogenation polymers. *Plant Physiol.* 153, 1332–1344. doi:10.1104/pp.110.154468.
- Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., et al. (2013). Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. *Science* 341, 1103–1106. doi:10.1126/science.1241602.
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., et Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis et its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 56, 230–239. doi:10.1016/j.copbio.2019.02.018.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., et Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis et Structure. *Plant Physiology* 153, 895–905. doi:10.1104/pp.110.155119.
- Veylder, L. D., Joubès, J., et Inzé, D. (2003). Plant cell cycle transitions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 536–543. doi:10.1016/j.pbi.2003.09.001.
- Wang, C.-Y., Zhang, S., Yu, Y., Luo, Y.-C., Liu, Q., Ju, C., et al. (2014). MiR397b regulates both lignin content et seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal* 12, 1132–1142. doi:10.1111/pbi.12222.
- Wang, H., Avci, U., Nakashima, J., Hahn, M. G., Chen, F., et Dixon, R. A. (2010). Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation et increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 22338–22343. doi:10.1073/pnas.1016436107.
- Wang, J. P., Chuang, L., Loziuk, P. L., Chen, H., Lin, Y.-C., Shi, R., et al. (2015). Phosphorylation is an on/off switch for 5-hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase activity in poplar monolignol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 8481–8486. doi:10.1073/pnas.1510473112.
- Wang, J. P., Matthews, M. L., Williams, C. M., Shi, R., Yang, C., Tunlaya-Anukit, S., et al. (2018). Improving wood properties for wood utilization through multi-omics integration in lignin biosynthesis. *Nature Communications* 9. doi:10.1038/s41467-018-03863-z.
- Wang, S., Yamaguchi, M., Grienberger, E., Martone, P. T., Samuels, A. L., et Mansfield, S. D. (2020). The Class II KNOX genes *KNAT3* et *KNAT7* work cooperatively to influence deposition of secondary cell walls that provide mechanical support to Arabidopsis stems. *The Plant Journal* 101, 293–309. doi:10.1111/tbj.14541.
- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., et al. (2020). *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*.
- Warren, F. J., Perston, B. B., Galindez-Najera, S. P., Edwards, C. H., Powell, P. O., Mandalari, G., et al. (2015). Infrared microspectroscopic imaging of plant tissues: spectral visualization of *Triticum aestivum* kernel and *Arabidopsis* leaf microstructure. *The Plant Journal* 84, 634–646. doi:10.1111/tbj.13031.
- Watanabe, Y., Meents, M. J., McDonnell, L. M., Barkwill, S., Sampathkumar, A., Cartwright, H. N., et al. (2015). Visualization of cellulose synthases in *Arabidopsis* secondary cell walls. *Science* 350, 198–203. doi:10.1126/science.aac7446.
- Weighill, D., Jones, P., Shah, M., Ranjan, P., Muchero, W., Schmutz, J., et al. (2018). Pleiotropic et Epistatic Network-Based Discovery: Integrated Networks for Target Gene Discovery. *Frontiers in Energy Research* 6. doi:10.3389/fenrg.2018.00030.
- Weng, J.-K., Mo, H., et Chapple, C. (2010). Over-expression of F5H in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin et disruption of pollen wall formation: Lignin modification leads to male sterility. *The Plant Journal* 64, 898–911. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04391.x.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S., et Paquette, S. (2002). Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book* 1, e0028. doi:10.1199/tab.0028.

- Wessels, B., Seyfferth, C., Escamez, S., Vain, T., Antos, K., Vahala, J., et al. (2019). An AP2/ERF transcription factor ERF139 coordinates xylem cell expansion et secondary cell wall deposition. *New Phytologist* 224, 1585–1599. doi:10.1111/nph.15960.
- Westermark, U. (1982). Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical ?a possible lignification reaction in wood. *Wood Science et Technology* 16, 71–78. doi:10.1007/BF00351376.
- Whetten, R., et Sederoff, R. (1995). Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell*, 1001–1013. doi:10.1105/tpc.7.7.1001.
- Whetten, R. W., MacKay, J. J., et Sederoff, R. R. (1998). RECENT ADVANCES IN UNDERSTANDING LIGNIN BIOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 585–609. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.585.
- Wickham, H. (2011). ggplot2: ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 3, 180–185. doi:10.1002/wics.147.
- Wightman, R., et Turner, S. (2010). Trafficking of the cellulose synthase complex in developing xylem vessels. *Biochemical Society Transactions* 38, 755–760. doi:10.1042/BST0380755.
- Wightman, R., et Turner, S. R. (2008). The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. *The Plant Journal* 54, 794–805. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03444.x.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N. J., et Campbell, M. M. (2009). Expansion et diversification of the Populus R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol.* 149, 981–993. doi:10.1104/pp.108.132795.
- Wilson, B. F., et Howard, R. A. (1968). A computer model for cambial activity. *Forest Science* 14, 77–90.
- Wolbang, C. M., Chandler, P. M., Smith, J. J., et Ross, J. J. (2004). Auxin from the Developing Inflorescence Is Required for the Biosynthesis of Active Gibberellins in Barley Stems. *Plant Physiology* 134, 769–776. doi:10.1104/pp.103.030460.
- Wolbang, C. M., et Ross, J. J. (2001). Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta* 214, 153–157. doi:10.1007/s004250100663.
- Woo, H.-H., Jeong, B. R., Hirsch, A. M., et Hawes, M. C. (2007). Characterization of Arabidopsis AtUGT85A et AtGUS gene families et their expression in rapidly dividing tissues. *Genomics* 90, 143–153. doi:10.1016/j.ygeno.2007.03.014.
- Wu, A.-M., Hörnblad, E., Voxeur, A., Gerber, L., Rihouey, C., Lerouge, P., et al. (2010a). Analysis of the Arabidopsis *IRX9 / IRX9 - L* et *IRX14 / IRX14 - L* Pairs of Glycosyltransferase Genes Reveals Critical Contributions to Biosynthesis of the Hemicellulose Glucuronoxylan. *Plant Physiology* 153, 542–554. doi:10.1104/pp.110.154971.
- Wu, Y., Williams, M., Bernard, S., Driouich, A., Showalter, A. M., et Faik, A. (2010b). Functional Identification of Two Nonredundant Arabidopsis $\alpha(1,2)$ Fucosyltransferases Specific to Arabinogalactan Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 285, 13638–13645. doi:10.1074/jbc.M110.102715.
- Xi, W., Song, D., Sun, J., Shen, J., et Li, L. (2017). Formation of wood secondary cell wall may involve two type cellulose synthase complexes in Populus. *Plant Mol. Biol.* 93, 419–429. doi:10.1007/s11103-016-0570-8.
- Xie, L., Yang, C., et Wang, X. (2011). Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62, 4495–4506. doi:10.1093/jxb/err164.
- Xiong, G., Cheng, K., et Pauly, M. (2013). Xylan O-Acetylation Impacts Xylem Development et Enzymatic Recalcitrance as Indicated by the Arabidopsis Mutant *tbl29*. *Molecular Plant* 6, 1373–1375. doi:10.1093/mp/sst014.
- Xu, C., Shen, Y., He, F., Fu, X., Yu, H., Lu, W., et al. (2019). Auxin-mediated Aux/IAA-ARF-HB signaling cascade regulates secondary xylem development in Populus. *New Phytologist* 222, 752–767. doi:10.1111/nph.15658.
- Xue, L.-J., Alabady, M. S., Mohebbi, M., et Tsai, C.-J. (2015). Exploiting genome variation to improve next-generation sequencing data analysis et genome editing efficiency in Populus tremula \times alba 717-1B4. *Tree Genetics & Genomes* 11. doi:10.1007/s11295-015-0907-5.
- Yamaguchi, K., Itoh, T., et Shimaji, K. (1980). Compression wood induced by 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA) an IAA transport inhibitor. *Wood Sci. Technol.*, 181–185.
- Yamaguchi, K., Shimaji, K., et Itoh, T. (1983). Simultaneous inhibition et induction of compression wood formation by morphactin in artificially inclined stems of Japanese larch (*Larix Ivptolepis* Gordon). *Wood Sci. Technol.*, 81–89.
- Yamaguchi, M., Goué, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J. C., et al. (2010a). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 et VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System. *Plant Physiology* 153, 906–914. doi:10.1104/pp.110.154013.
- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., et Demura, T. (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel

- formation: Direct target genes of VND7. *The Plant Journal* 66, 579–590. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04514.x.
- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., et al. (2010b). VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22, 1249–1263. doi:10.1105/tpc.108.064048.
- Yamamoto, R., Demura, T., et Fukuda, H. (1997). Brassinosteroids Induce Entry into the Final Stage of Tracheary Element Differentiation in Cultured Zinnia Cells. *Plant et Cell Physiology* 38, 980–983. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029262.
- Yamamoto, R., Fujioka, S., Demura, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., et Fukuda, H. (2001). Brassinosteroid Levels Increase Drastically Prior to Morphogenesis of Tracheary Elements. *Plant Physiology* 125, 556–563. doi:10.1104/pp.125.2.556.
- Yan, J., Zhao, C., Zhou, J., Yang, Y., Wang, P., Zhu, X., et al. (2016). The miR165/166 Mediated Regulatory Module Plays Critical Roles in ABA Homeostasis et Response in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 12, e1006416. doi:10.1371/journal.pgen.1006416.
- Yang, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Vizcay Barrena, G., et Wilson, Z. A. (2007). *Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35* Regulates Secondary Thickening in the Endothecium et Is Essential for Anther Dehiscence. *The Plant Cell* 19, 534–548. doi:10.1105/tpc.106.046391.
- Yang, L., Zhao, X., Ran, L., Li, C., Fan, D., et Luo, K. (2017a). PtoMYB156 is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism et secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Scientific Reports* 7. doi:10.1038/srep41209.
- Yang, L., Zhao, X., Yang, F., Fan, D., Jiang, Y., et Luo, K. (2016). PtrWRKY19, a novel WRKY transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*. *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep18643.
- Yang, S., Zhu, G., Wang, C., Chen, L., Song, Y., et Wang, J. (2017b). Regulation of secondary xylem formation in young hybrid poplars by modifying the expression levels of the PtaGLIMa gene. *Molecular Breeding* 37. doi:10.1007/s11032-017-0724-7.
- Yang, Z., Nie, G., Pan, L., Zhang, Y., Huang, L., Ma, X., et al. (2017c). Development et validation of near-infrared spectroscopy for the prediction of forage quality parameters in *Lolium multiflorum*. *PeerJ* 5. doi:10.7717/peerj.3867.
- Yordanov, Y. S., Regan, S., et Busov, V. (2010). Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *Populus*. *Plant Cell* 22, 3662–3677. doi:10.1105/tpc.110.078634.
- York, W. S., et O'Neill, M. A. (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis — which end is up? *Current Opinion in Plant Biology* 11, 258–265. doi:10.1016/j.pbi.2008.02.007.
- Yu, Y., Ji, L., Le, B. H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., et al. (2017). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 et SDN2 exonucleases in *Arabidopsis*. *PLOS Biology* 15, e2001272. doi:10.1371/journal.pbio.2001272.
- Yu, Z., Zhang, D., Xu, Y., Jin, S., Zhang, L., Zhang, S., et al. (2019). CEPR2 phosphorylates et accelerates the degradation of PYR/PYLs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 70, 5457–5469. doi:10.1093/jxb/erz302.
- Yuan, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Matsumoto, S., Gou, X., He, K., et al. (2007). *BEN1*, a gene encoding a dihydroflavonol 4-reductase (DFR)-like protein, regulates the levels of brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*: Novel brassinosteroid metabolic gene *BEN1*. *The Plant Journal* 51, 220–233. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03129.x.
- Yuan, Y., Teng, Q., Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2013). The *Arabidopsis* DUF231 Domain-Containing Protein ESK1 Mediates 2-O- et 3-O-Acetylation of Xylosyl Residues in Xylan. *Plant et Cell Physiology* 54, 1186–1199. doi:10.1093/pcp/pct070.
- Zhang, B., Sztojka, B., Escamez, S., Vanholme, R., Hedenström, M., Wang, Y., et al. (2020). PIRIN2 suppresses S-type lignin accumulation in a noncell-autonomous manner in *Arabidopsis* xylem elements. *New Phytologist* 225, 1923–1935. doi:10.1111/nph.16271.
- Zhang, D., Zhang, Z., et Yang, K. (2006). QTL analysis of growth et wood chemical content traits in an interspecific backcross family of white poplar (*Populus tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa*. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 2015–2023. doi:10.1139/x06-103.
- Zhang, G. F., et Staehelin, L. A. (1992). Functional Compartmentation of the Golgi Apparatus of Plant Cells: Immunocytochemical Analysis of High-Pressure Frozen- et Freeze-Substituted Sycamore Maple Suspension Culture Cells. *Plant Physiology* 99, 1070–1083. doi:10.1104/pp.99.3.1070.
- Zhang, H., Cui, F., Wu, Y., Lou, L., Liu, L., Tian, M., et al. (2015). The RING Finger Ubiquitin E3 Ligase SDIR1 Targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for Degradation to Modulate the Salt Stress Response et ABA Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27, 214–227. doi:10.1105/tpc.114.134163.

- Zhang, J., Nieminen, K., Serra, J. A. A., et Helariutta, Y. (2014). The formation of wood et its control. *Current Opinion in Plant Biology* 17, 56–63. doi:10.1016/j.pbi.2013.11.003.
- Zhang, L., Yu, Z., Xu, Y., Yu, M., Ren, Y., Zhang, S., et al. (2021). Regulation of the stability et ABA import activity of NRT1.2/NPF4.6 by CEPR2-mediated phosphorylation in Arabidopsis. *Molecular Plant*. doi:10.1016/j.molp.2021.01.009.
- Zhang, T.-Q., Xu, Z.-G., Shang, G.-D., et Wang, J.-W. (2019). A Single-Cell RNA Sequencing Profiles the Developmental Landscape of Arabidopsis Root. *Molecular Plant* 12, 648–660. doi:10.1016/j.molp.2019.04.004.
- Zhang, X., Dominguez, P. G., Kumar, M., Bygdell, J., Miroshnichenko, S., Sundberg, B., et al. (2018). Cellulose Synthase Stoichiometry in Aspen Differs from Arabidopsis et Norway Spruce. *Plant Physiology* 177, 1096–1107. doi:10.1104/pp.18.00394.
- Zhao, C., Avci, U., Grant, E. H., Haigler, C. H., et Beers, E. P. (2007). XND1, a member of the NAC domain family in Arabidopsis thaliana, negatively regulates lignocellulose synthesis et programmed cell death in xylem: XND1 blocks tracheary element differentiation. *The Plant Journal* 53, 425–436. doi:10.1111/j.1365-3113X.2007.03350.x.
- Zhao, C., Craig, J. C., Petzold, H. E., Dickerman, A. W., et Beers, E. P. (2005). The Xylem et Phloem Transcriptomes from Secondary Tissues of the Arabidopsis Root-Hypocotyl. *Plant Physiology* 138, 803–818. doi:10.1104/pp.105.060202.
- Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., et al. (2013). LACCASE Is Necessary et Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 3976–3987. doi:10.1105/tpc.113.117770.
- Zhao, Y., Sun, J., Xu, P., Zhang, R., et Li, L. (2014). Intron-Mediated Alternative Splicing of WOOD-ASSOCIATED NAC TRANSCRIPTION FACTOR1B Regulates Cell Wall Thickening during Fiber Development in *Populus* Species. *Plant Physiology* 164, 765–776. doi:10.1104/pp.113.231134.
- Zheng, L., Chen, Y., Ding, D., Zhou, Y., Ding, L., Wei, J., et al. (2019). Endoplasmic reticulum-localized UBC34 interaction with lignin repressors MYB221 et MYB156 regulates the transactivity of the transcription factors in *Populus tomentosa*. *BMC Plant Biol.* 19, 97. doi:10.1186/s12870-019-1697-y.
- Zhong, R., Kays, S. J., Schroeder, B. P., et Ye, Z.-H. (2002). Mutation of a Chitinase-Like Gene Causes Ectopic Deposition of Lignin, Aberrant Cell Shapes, et Overproduction of Ethylene. *The Plant Cell* 14, 165–179. doi:10.1105/tpc.010278.
- Zhong, R., Lee, C., et Ye, Z.-H. (2010). Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in Arabidopsis. *Mol Plant* 3, 1087–1103. doi:10.1093/mp/ssq062.
- Zhong, R., McCarthy, R. L., Haghghat, M., et Ye, Z.-H. (2013). The Poplar MYB Master Switches Bind to the SMRE Site et Activate the Secondary Wall Biosynthetic Program during Wood Formation. *PLOS ONE* 8, e69219. doi:10.1371/journal.pone.0069219.
- Zhong, R., McCarthy, R. L., Lee, C., et Ye, Z.-H. (2011). Dissection of the Transcriptional Program Regulating Secondary Wall Biosynthesis during Wood Formation in Poplar. *PLANT PHYSIOLOGY* 157, 1452–1468. doi:10.1104/pp.111.181354.
- Zhong, R., Richardson, E. A., et Ye, Z.-H. (2007). The MYB46 Transcription Factor Is a Direct Target of SND1 et Regulates Secondary Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 2776–2792. doi:10.1105/tpc.107.053678.
- Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2007). Regulation of cell wall biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 564–572. doi:10.1016/j.pbi.2007.09.001.
- Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2009). Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior* 4, 1028–1034. doi:10.4161/psb.4.11.9875.
- Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2012). MYB46 et MYB83 bind to the SMRE sites et directly activate a suite of transcription factors et secondary wall biosynthetic genes. *Plant Cell Physiol.* 53, 368–380. doi:10.1093/pcp/pcr185.
- Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2014). Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. *Plant Science* 229, 193–207. doi:10.1016/j.plantsci.2014.09.009.
- Zhong, R., et Ye, Z.-H. (2015). Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition et Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiol* 56, 195–214. doi:10.1093/pcp/pcu140.
- Zhou, C., Li, Q., Chiang, V. L., Lucia, L. A., et Griffis, D. P. (2011). Chemical et Spatial Differentiation of Syringyl et Guaiacyl Lignins in Poplar Wood via Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 7020–7026. doi:10.1021/ac200903y.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L. W., et al. (2011a). Arabidopsis Argonaute10 Specifically Sequesters miR166/165 to Regulate Shoot Apical Meristem Development. *Cell* 145, 242–256. doi:10.1016/j.cell.2011.03.024.

- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., et al. (2011b). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate et ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12539–12544. doi:10.1073/pnas.1103959108.
- Zinkgraf, M., Liu, L., Groover, A., et Filkov, V. (2017). Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytologist* 214, 1464–1478. doi:10.1111/nph.14492.
- Zufa, L. (1971). A rapid method for vegetative propagation of aspens et their hybrids. *The Forestry Chronicle* 47, 36–39. doi:10.5558/tfc47036-1.

Tables et figures supplémentaires

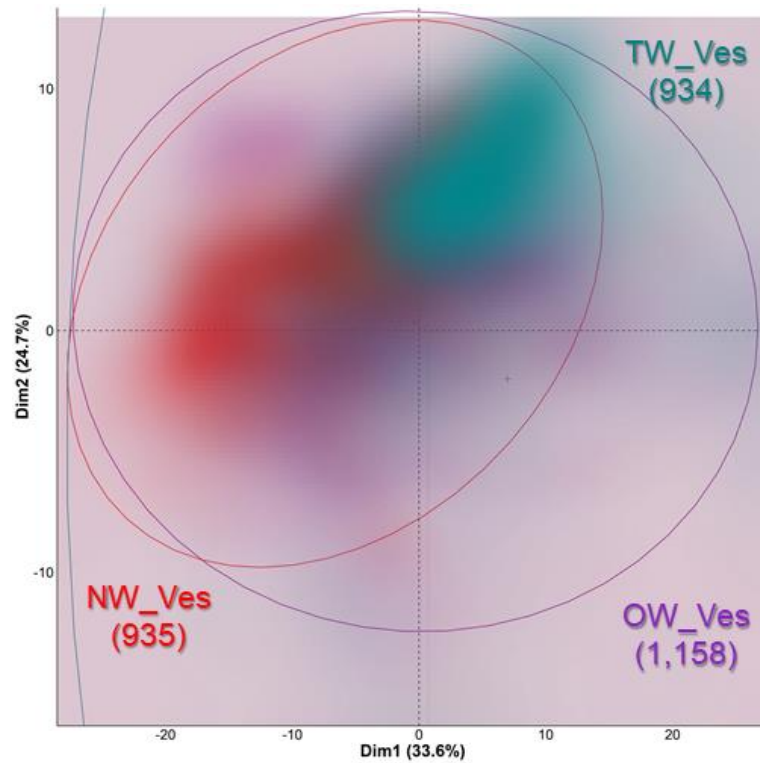


Figure S1 Projection sur les deux premiers axes d'une analyse en composantes principales des spectres correspondant aux parois de vaisseaux de bois normal, de bois opposé et de bois de tension

Turquoise : parois de vaisseaux de bois de tension, Rouge : parois de vaisseaux de bois normal, Violet : parois de vaisseaux de bois opposé. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. L'ellipse de TW_Ves est hors champ. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point.

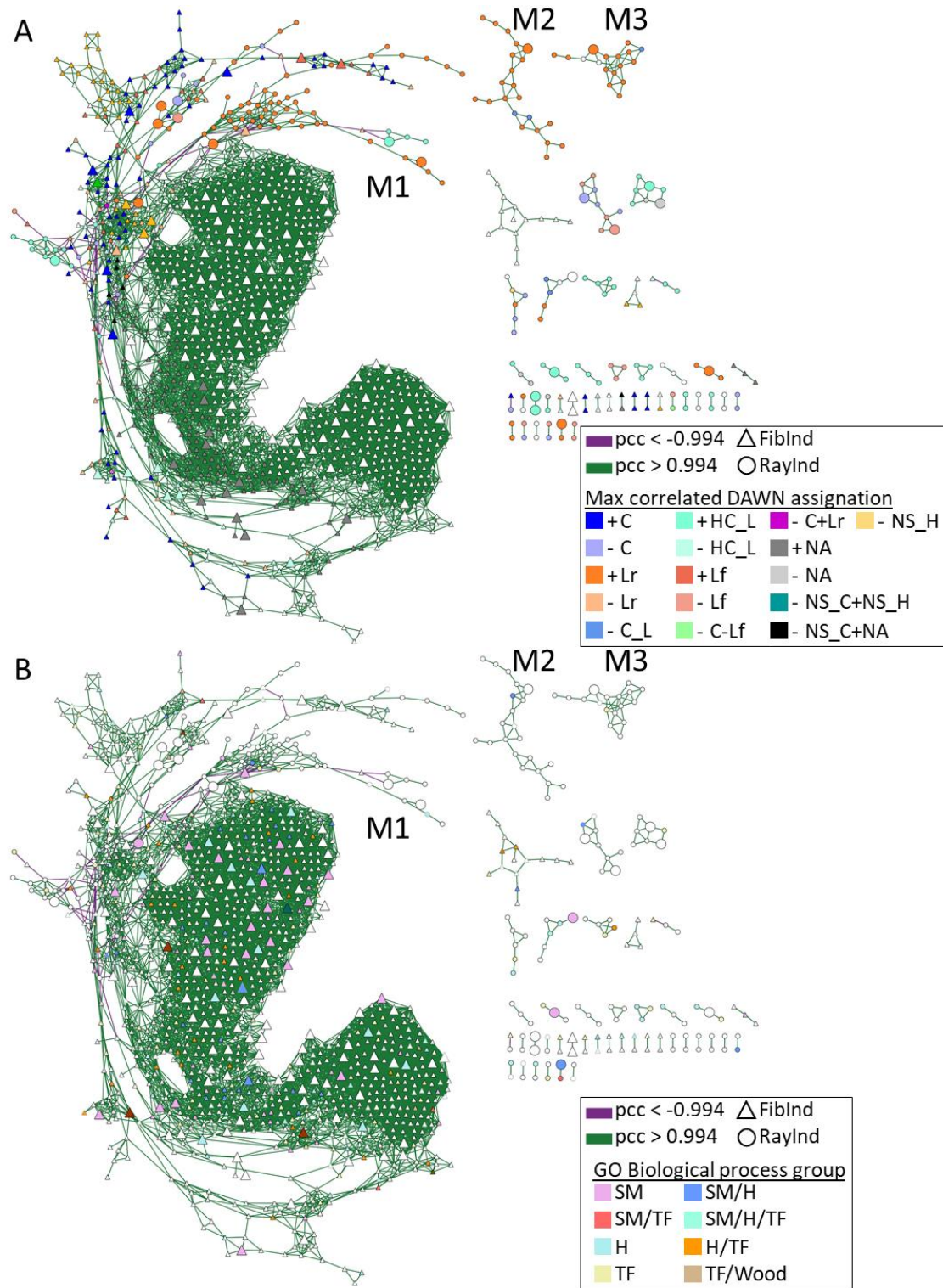


Figure S2 Réseau de co-expression complet des DEG identifiés entre fibres et rayons.

pcc: coefficient de corrélation de Pearson, *FibInd*: DEG induit dans les fibres, *RayInd*: DEG induit dans les rayons. Les gros nœuds représentent les gènes appartenant au groupe de CC 'matrice extracellulaire'. Les pointillés représentent les sous-modules M1.1a-δ. (A) Les nœuds sont colorés suivant le groupe de DAWNs dont la corrélation est maximale (hors NA, NS_C et NS_H). + : corrélation positive, - : corrélation négative. C : cellulose, C_L : cellulose et lignines, HC_L : hémicelluloses et lignines, Lr : lignines présentes dans les rayons, Lf : lignines présentes dans les fibres, Bordure bleue : corrélation négative aux DAWNs associés à la cellulose, Bordure orange : corrélation positive aux DAWNs associés aux lignines fortement absorbées dans les rayons. (B) Les nœuds sont colorés suivant le(s) groupe(s) de BP enrichi(s) dont ils font partie. SM : métabolisme secondaire, TF : facteurs de transcription, H : hormones (métabolisme, réponse, transport, homéostasie, synthèse), Wood : formation du xylème

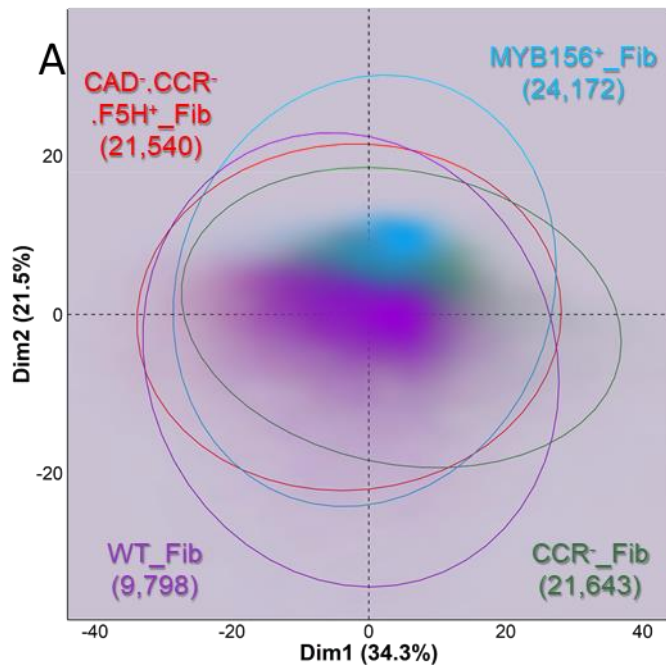


Figure S3 Distribution des spectres de fibres des trois lignées transgéniques et de la lignée sauvage sur les deux premières composantes d'une analyse en composante principale.

Turquoise : paroi de fibres de MYB156⁺, Vert : paroi de fibres de CCR⁻, Rouge : paroi de fibres de CAD⁻.CCR⁻.F5H⁺, Violet : paroi de fibres de WT. Les ellipses représentent 90% des spectres dans le cas d'une distribution normale. Les nombres entre parenthèses représentent le nombre de pixels assignés à la catégorie. L'intensité de couleur représente la densité de point.

Table S1 Assignation des bandes d'absorbance utilisée dans le manuscrit

Bande (cm ⁻¹)	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines	Protéines	Ref.
1742 – 1730		C = O stretch carboxylic acid			[5, 9]
1738 – 1709			C=O stretch in unconjugated ketone, carbonyl et in ester groups (frequently of carbohydrate origin)		[4]
1675 – 1655			C=O stretch in conjugated p- substituted aryl ketones		[4]
1605 – 1593			aromatic skeletal vibration		[4]
1550				Amide II: N-H deformation +stretching contribution from C-N stretching	[3, 12, 13]
1515 – 1500			aromatic skeletal vibrations; G>S		[4]
1490	CH2 scissoring cellobiose				[7]
1470 – 1452	CH2 of pyran ring symmetric scissoring; OH plane deformation vibration	CH2 symmetric bending (xylose, arabinose)	C-H deformations		[4, 11, 12]
1430 – 1421	crystalline cellulose / C–OH bending	COO- stretch	aromatic skeletal vibrations combined with C-H in plane deformation		[1, 2, 4, 9]
1374 – 1365	CH bending	CH bending	aliphatic C-H stretch in CH3, not in OMe; phen. OH		[4, 8, 10]
1364 – 1335	OH in-plane bending / crystalline cellulose (1335 cm-1)				[1, 11]
1330 – 1324			S ring plus G ring condensed; (i.e. G ring substituted in pos. 5)		[4]
1318 – 1312	crystalline cellulose / CH2 rocking vibration				[1, 10, 11]
1282 – 1277	CH - deformation				[11]

1260 – 1240			C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics	[12]
1239 – 1225		C–O stretch acetyl		[9]
1235 – 1225	OH plane deformation, also COOH			[10,12]
1230 – 1221			C-C plus C-O plus C=O stretch; G condensed > G etherified	[4]
1205 – 1200	OH in-plane deformation	OH in-plane deformation	C-O-H deformation et C-O + stretching of phenolics	[6, 10, 11, 12]
1162 – 1125	C–O–C asymmetric valence vibration	C–O–C asymmetric valence vibration		[10, 11]
1127 – 1126			aromatic C-H in- plane deformation; typical for S units	[4]
1120 – 1115	Asymmetric in-phase ring stretching, C–C et C–O stretching			[11]
1110 – 1107	Ring asymmetric valence vibration			[14]
1056 – 1050	C–O valence vibration, mainly from C3–O3H / C=O stretching vibration	C=O stretching vibration		[6, 11]
1040 – 1030	C–O valence vibration, mainly from C3–O3H		aromatic C-H in- plane deformation, G > S; plus C-O deformation, in primary alcohols; plus C=O stretch (unconjugated)	[4, 11]
996 – 985	C–O valence vibration			[11]
925 – 915			C-H out-of-plane; aromatic	[4]
897 – 892	Anomere C-groups, C1-H deformation, ring valence vibration			[11]

[1] Åkerholm, M., et Salmén, L. (2001). Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. *Polymer* 42, 963–969. doi:10.1016/S0032-3861(00)00434-1.

[2] Åkerholm, M., Hinterstoisser, B., et Salmén, L. (2004). Characterization of the crystalline structure of cellulose using static et dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 339, 569–578. doi:10.1016/j.carres.2003.11.012.

[3] Carpita, N. C., Defernez, M., Findlay, K., Wells, B., Shoue, D. A., Catchpole, G., et al. (2001). Cell Wall Architecture of the Elongating Maize Coleoptile. *Plant Physiol* 127, 551–565.

- [4] Faix, O. (1991). Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* 45, 21–28. doi:10.1515/hfsg.1991.45.s1.21.
- [5] Gou, J.-Y., Park, S., Yu, X.-H., Miller, L. M., et Liu, C.-J. (2008). Compositional characterization et imaging of “wall-bound” acylesters of *Populus trichocarpa* reveal differential accumulation of acyl molecules in normal et reactive woods. *Planta* 229, 15–24. doi:10.1007/s00425-008-0799-9.
- [6] Harrington, K. J., Higgins, H. G., et Michell, A. J. (1964). Infrared Spectra of *Eucalyptus regnans* F. Muell. et *Pinus radiata* D. Don. *Holzforschung* 18, 108–113. doi:10.1515/hfsg.1964.18.4.108.
- [7] Kačuráková, M., Belton, P. S., Wilson, R. H., Hirsch, J., et Ebringerová, A. (1998). Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides. *Journal of the Science of Food et Agriculture* 77, 38–44. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199805)77:1<38::AID-JSFA999>3.0.CO;2-5.
- [8] Liang, C. Y., et Marchessault, R. H. (1959). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. II. Native celluloses in the region from 640 to 1700 cm.⁻¹. *Journal of Polymer Science* 39, 269–278. doi:10.1002/pol.1959.1203913521.
- [9] Marchessault, R. H., et Liang, C. Y. (1962). The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans. *Journal of Polymer Science* 59, 357–378. doi:10.1002/pol.1962.1205916813.
- [10] Olsson, A.-M., Bjurhager, I., Gerber, L., Sundberg, B., et Salmén, L. (2011). Ultra-structural organisation of cell wall polymers in normal et tension wood of aspen revealed by polarisation FTIR microspectroscopy. *Planta* 233, 1277–1286. doi:10.1007/s00425-011-1384-1.
- [11] Schwanninger, M., Rodrigues, J. C., Pereira, H., et Hinterstoisser, B. (2004). Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood et cellulose. *Vibrational Spectroscopy* 36, 23–40. doi:10.1016/j.vibspec.2004.02.003.
- [12] Sene, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H., et Grinter, R. (1994). Fourier-Transform Raman et Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (An Investigation of Five Higher Plant Cell Walls et Their Components). *Plant Physiol.* 106, 1623–1631.
- [13] Wang, Y., Yao, X., et Parthasarathy, R. (2009). Characterization of Interfacial Chemistry of Adhesive/Dentin Bond Using FTIR Chemical Imaging With Univariate et Multivariate Data Processing. *J Biomed Mater Res A* 91, 251–262. doi:10.1002/jbm.a.32249.
- [14] HistoChem database ; Durand, S., Papineau, P., Robert, P., Devaux, M.F., Guillon, F. (2019) HISTOCHEM: a database of reference spectra for plant cell wall polymers.

Table S2 Significativité de l'effet lignée et des différences entre chacune des trois lignées transgéniques et la lignée sauvage pour les vingt-deux paramètres anatomiques analysés.

		EL ⁽¹⁾	CAD ⁻ CCR ⁻ F5H ⁺ (\$)	CCR ⁻ (\$)	MYB156 ⁺ (\$)
Anatomie générale	Nombre de cellules	1.10 ^{-6***}	3.10 ^{-4**}	0.91	3.10 ^{-5***}
	Diamètre moyen	3.10 ^{-7***}	0.001**	0.05	7.10 ^{-8***}
	Périmètre moyen	2.10 ^{-6***}	0.001**	7.10 ^{-5***}	6.10 ^{-11***}
	Circularité moyenne	2.10 ^{-6***}	2.10 ^{-9***}	0.07	8.10 ^{-8***}
	Proportion de lumen	6.10 ^{-6***}	0.29	0.005**	3.10 ^{-6***}
	Aire de lumen	6.10 ^{-6***}	0.35	0.004**	2.10 ^{-6***}
	Proportion de paroi	6.10 ^{-6***}	0.28	0.005**	3.10 ^{-6***}
Anatomie des fibres	Aire de paroi	6.10 ^{-6***}	0.28	0.005**	3.10 ^{-6***}
	Nombre de fibres	2.10 ^{-6***}	4.10 ^{-4**}	0.78	3.10 ^{-4**}
	Aire de fibres	1.10 ^{-4**}	3.10 ^{-6***}	0.07	0.047*
	Diamètre moyen	2.10 ^{-4***}	0.003**	0.01*	2.10 ^{-6***}
	Périmètre moyen	4.10 ^{-5***}	1.10 ^{-4**}	0.03*	2.10 ^{-7***}
	Circularité moyenne	8.10 ^{-7***}	1.10 ^{-10***}	0.07	2.10 ^{-8***}
	Proportion d'aire	01.10 ^{-4**}	3.10 ^{-6***}	0.04*	0.047*
Anatomie des vaisseaux	Proportion de fibres	0.08	NA	NA	NA
	Nombre de vaisseaux	0.07	NA	NA	NA
	Aire de vaisseaux	2.10 ^{-7***}	2.10 ^{-5***}	0.13	6.10 ^{-7***}
	Diamètre moyen	4.10 ^{-6***}	5.10 ^{-5***}	0.52	0.02*
	Périmètre moyen	5.10 ^{-6***}	5.10 ^{-5***}	0.56	0.03*
	Circularité moyenne	0.03*	0.54	0.27	0.009**
	Proportion d'aire	2.10 ^{-7***}	1.10 ^{-5***}	0.13	6.10 ^{-7***}
Proportion de vaisseaux	2.10 ^{-4**}	0.79	0.34	6.10 ^{-5***}	

(1) effet lignée, (\$) comparaison à la lignée sauvage, NA : non applicable,
0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 1.

Clément CUELLO

Vers l'élaboration d'un modèle de construction des parois secondaires des fibres de bois chez le peuplier

Résumé :

Les arbres atteignent des hauteurs et des durées de vie considérables grâce aux propriétés remarquables de leur bois. En effet, le bois remplit trois fonctions principales : (i) la conduction de la sève brute de la racine au houppier, (ii) le soutien mécanique de la masse toujours en augmentation de l'arbre en croissance et (iii) le stockage de réserves temporaires, capitales pour la pérennité de l'arbre. Chez les angiospermes, les vaisseaux, les fibres et les rayons parenchymateux sont, respectivement, affiliés à ces fonctions. Chacune de ces cellules possède son propre schéma de développement. Par ailleurs, la composition et la structure des parois de ces cellules varient considérablement en fonction des stades de développement et des conditions environnementales. Cette complexité représente donc un frein à l'étude des mécanismes moléculaires de la formation du bois. Cette difficulté peut être contournée par le développement d'approches à l'échelle cellulaire.

La thèse présentée ici vise à une caractérisation du développement des fibres, plus particulièrement de leurs parois secondaires, par le déploiement d'outils de caractérisation à l'échelle cellulaire et d'une analyse intégrative à cette échelle. Le développement d'une méthode de caractérisation des parois à l'échelle cellulaire, l'imagerie hyperspectrale en ATR-FTIR, a permis une analyse fine des différences entre types cellulaires au sein d'un arbre et entre types de bois pour un même type cellulaire. L'étude de données transcriptomiques obtenues par RNA-Seq de fibres et rayons microdisséqués a, elle, permis d'identifier des différences transcriptionnelles entre ces deux types cellulaires. La combinaison de ces deux résultats a permis d'identifier des acteurs semblant majeurs dans le développement des fibres de bois.

Ce travail de thèse ouvre donc des perspectives de recherche permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à la formation des fibres de bois.

Mots clés : peuplier, xylogénèse, biologie intégrative, RNA-Seq, microspectroscopie, parois secondaires végétales, lignification

Towards the development of a model of secondary cell wall formation of wood fibre in poplar

Summary:

Trees are able to grow high et survive many years thanks to their wood properties. Wood delivers three major functions in trees: (i) water conduction, (ii) mechanical support et (iii) nutrient storage. In Angiosperm trees, vessels, fibers et parenchyma rays are respectively assigned to these functions, each of them following their own development scheme. Cell wall composition et structure varies greatly depending on cell type, developmental stage et environmental conditions. This complexity therefore represents a hindrance to study the molecular mechanisms of wood formation. However, this can be circumvented by the development of cell-specific approaches.

This work aims at characterizing fiber development, focusing on their secondary cell wall, developing cell-specific methods et integrative analysis at the cell level.

Development of ATR-FTIR hyperspectral imaging enabled to finely characterize differences in cell wall composition between cell types in a tree et within cell types in different types of wood. Transcriptomics data obtained by RNA-Seq of microdissected fibers et rays gave rise to major differences in the transcriptome of these two cell types. Combining both kind of result led to the identification of key players in fibers development.

Hence, this work opens up new research hypothesis, which could lead to a better understanding of the molecular mechanisms underlying wood fiber development, including from a dynamic perspective.

Keywords: poplar, wood formation, integrative biology, RNA-Seq, microspectroscopy, plant secondary cell wall, lignification

INRAE, ONF, UMR0588 'Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt' (BioForA)