



**Laboratoire de Chimie
des Substances Naturelles**



Ecole Doctorale Science – Technologie – Santé
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Thèse N° [58-2009]

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Sciences-Santé

Spécialité : Physiologie végétale

*Contribution à l'étude du rôle des xylanes et des xyloglucanes fucosylés
au cours de la formation du bois.*

Application à la formation du bois de tension chez le peuplier.

Par

Raphaël DECOU

Thèse dirigée par Guy COSTA et Sabine LHERNOULD

Soutenue le 30 octobre 2009 devant le jury composé de :

Présidente	Mme Patricia DREVET ROECKEL, Professeur des Universités, Clermond-Ferrand
Rapporteurs	M. Gilles PILATE, Directeur de Recherche INRA, Orléans M. Jean-Louis JULIEN, Professeur des Universités, Clermond-Ferrand
Examineurs	Mme Sabine LHERNOULD, Maître de Conférences, Limoges M. Guy COSTA, Maître de Conférences HDR, Limoges
Invitée	Mme Pierrette FLEURAT-LESSARD, Chargée de Recherche CNRS, Poitiers

RESUME

La xylogénèse conduit entre autres à la formation de fibres et de vaisseaux impliquant une cascade d'évènements dont notamment la mise en place d'une paroi secondaire. Cependant, sous les effets de contraintes environnementales (vent, pente), une nouvelle architecture de cette paroi est observée. Celle-ci va influencer directement sur les propriétés mécaniques et la qualité du bois. Afin de restaurer la verticalité de leur tige, les angiospermes ligneuses développent en effet un bois particulier appelé le « bois de tension » qui se caractérise par la formation d'une strate atypique : la « couche gélatineuse ». Par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire chez le peuplier hybride (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4), et afin de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ce bois, nous avons cherché à isoler et caractériser deux groupes d'enzymes –des $\beta(1,4)$ -xylosidases et des $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases- impliqués dans le réarrangement et la biosynthèse des xylanes et xyloglucanes respectivement. Deux de ces enzymes, PtaBXL1 et PtaFUT1, apparaissent ainsi sous-exprimées spécifiquement dans la zone de bois de tension. En parallèle, nous avons développé un modèle d'étude *in vitro* de formation du bois de tension dans le but de réaliser un état des lieux par immunohistochimie et diverses colorations des différents polymères pouvant être impliqués dans la formation et les propriétés mécaniques de ce bois particulier. Des AGPs et des RG-I ont ainsi été trouvés au sein de la couche G, ce qui suggère leur participation au développement des forces de tension dans le redressement des tiges.

ABSTRACT

Xylogenesis leads among others to the formation of fibers and vessels which involves a cascade of events including the establishment of a secondary wall. However, under the effects of environmental constraints (wind, slope), a new architecture of this wall is observed. This last one will directly affect the mechanical properties and wood quality. In order to reinstate verticality of their stems, the woody angiosperms develop a particular wood called “tension wood” which is characterized by the formation of an atypical layer : the “gelatinous layer”. By techniques of biochemistry and molecular biology on the hybrid poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4), and in order to highlight some molecular mechanisms involved in the formation of this wood, we have sought to isolate and characterize two groups of enzymes - $\beta(1,4)$ -xylosidases and $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferases- involved in the rearrangement and the biosynthesis of xylans and xyloglucans respectively. Two of these enzymes, PtaBXL1 and PtaFUT1, appear down-regulated specifically in tension wood. In parallel, we developed a study model *in vitro* of formation of tension wood in order to carry out an inventory by immunohistochemistry and various staining of the different polymers that may be involved in the formation and mechanical properties of this particular wood. Also, AGPs and RG-I has been found in G layer, which suggests their participation in the development of tension forces in straightening of stems.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par la région Limousin et le Fond Social Européen. Il a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (UPRES EA 1069). Je tiens donc à remercier toutes les personnes ayant contribué de près comme de loin à la réalisation de ce travail de thèse.

Je souhaite dans un premier temps remercier le Directeur du laboratoire, Monsieur le Professeur Pierre KRAUSZ, pour m'y avoir accueilli.

J'adresse également tous mes remerciements aux lecteurs attentifs de ce manuscrit, Monsieur Gilles PILATE, Directeur de Recherche au sein de l'Unité de Recherche Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières de l'INRA d'Orléans et Monsieur Jean-Louis JULIEN, Professeur au sein de l'UMR -A 547 PLAF, Equipe Contraintes mécaniques et activité des zones en croissance de l'Université Blaise Pascal à Clermond-Ferrand, qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie également Madame DREVET ROECKEL, Professeur au sein de la même UMR que celle citée précédemment, qui a accepté de présider ce jury. Je remercie également Madame Pierrette FLEURAT-LESSARD, Chargé de Recherche au sein de l'UMR-FRE 3091 «PhyMoTS» Physiologie Moléculaire du Transport des Sucres chez les Végétaux de l'Université de Poitiers-CNRS, qui a accepté de participer au jury en tant qu'invitée.

Merci à Sabine LHERNOULD et Guy COSTA pour m'avoir permis de réaliser ce projet doctoral et pour m'avoir encadré durant celui-ci. Je vous remercie sincèrement pour votre aide et vos conseils tant au niveau expérimental que lors de la rédaction de ce manuscrit. Je tiens aussi à vous faire part de ma reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ma thèse et pour l'aide apportée à mes activités d'enseignement... activités que j'ai eu plaisir à découvrir en tant qu'ATER bien que ce ne soit pas toujours facile face aux étudiants dans les disciplines végétales.

Je ne pourrai oublier de remercier Pierrette FLEURAT-LESSARD et Florence THIBAUT de l'unité FRE3091 « Physiologie moléculaire du transport des sucres chez les végétaux » de l'Université de Poitiers pour leur aide précieuse, leurs conseils, leur disponibilité et leur gentillesse. Je n'oublierai pas non plus de citer Audrey ABOT pour son aide, son soutien, sa réelle franchise et son humour. Le congrès de Tours fût un moment fort sympathique et mes déplacements à

Poitiers furent toujours aussi enrichissants qu'agréables. Merci également aux personnels du SIMIS à Poitiers pour leur contribution en microscopie.

Mes remerciements vont aussi à Anabelle DEJARDIN, Nadège MILLET, Marie-Claude LESAGE-DESCAUSES et Jean-Charles LEPLÉ de l'Unité de Recherche « Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières » de l'INRA d'Orléans pour leur accueil, leurs conseils et leur contribution entre autre à la réalisation de la transgénèse végétale du peuplier.

J'exprime également ma reconnaissance aux personnels de l'UMR 1061 INRA « Génétique Moléculaire Animale » de l'Université de Limoges et spécialement à Fabrice DUPUY, Lionel FORESTIER et Aymeric AUDFRAY pour leur accueil, leur sympathie et pour m'avoir permis de réaliser des expérimentations au sein de leur laboratoire.

J'adresse mes remerciements à Renaud LEONARD du Département de chimie de l'Université des Ressources Naturelles et des Sciences de la Vie Appliquée de Vienne (Autriche) pour les analyses en spectrométrie de masse, l'aide à la réalisation de la transformation génétique du tabac ainsi que tous autres conseils utiles à l'avancement de mon projet de recherche.

Merci encore à Pierre CARLES du Service commun de Microscopie de Limoges qui m'a initié au MEB et au MET et qui a pu m'aider lors de réglages fastidieux. Je remercie également Michel CARLUE pour ses précieux conseils en microscopie et pour le temps qu'il m'a accordé lors de mes premiers essais de coupes à l'ultramicrotome.

Je ne saurai non plus oublier Caroline LE MORVAN pour m'avoir appris la culture cellulaire animale et la technique de transfection. Son approche pédagogique et sa rigueur scientifique m'ont fait apprécier d'autant plus cette partie de mon travail. Je ne pourrai cependant pas limiter cette « collaboration » à une activité professionnelle. Je la remercie donc pour son amitié et son humour qui ont rendu encore plus agréable la vie au laboratoire. Je tiens également à rassembler sous ce dernier point Olga NARDOU, Jean-Claude FAGE, Valérie MAGLIULO, Florence DROUILLARD et Sandrine VERDEAUX pour leur bonne humeur et leur sympathie.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe du LCSN tant chimistes, biochimistes que biologistes pour toutes les occasions où nous nous sommes consultés et avons travaillé ensemble ou lors de réunions « moins professionnelles ». Je ne prends cependant pas le risque de tous les citer afin de ne pas en oublier.

Je tiens spécialement à remercier Stéphanie, Fred, Pascal, Chris, Mathilde, Cédric, Loïc, Carmen et mes collègues géologues pour leur aide, leur soutien et leur amitié.

Finalement, je ne pourrai finir ces remerciements sans un grand merci à mes parents, grands-parents, frères, mon petit neveu et sa maman ainsi que mes amis. Je leur suis très reconnaissant pour leur soutien et leurs encouragements durant toutes ces années.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	: degré celsius
A	: Adénine
<i>A. thaliana</i>	: <i>Arabidopsis thaliana</i>
ABRC	: Arabidopsis biological resource center
Ac	: Anticorps
ACC oxidase	: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase
ADN (g ou c)	: Acide désoxyribonucléique (génomique ou codant)
Ag	: Antigène
AGP	: Arabinogalactane protéine
AGX	: Arabinoglucuronoxylane
AIA	: Acide indole-3-acétique
AMF	: Angle des microfibrilles
AmpR	: résistance à l'ampicilline
Ara	: Arabinose
ARN(t, r ou m)	: Acide ribonucléique (de transfert, ribosomique ou messenger)
AS	: Anti-sens
ATCC	: American type culture collection
AtFUT	: Fucosyltransférase d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	: Adénosine triphosphate
BET	: Bromure d'éthidium
BLAST	: Basic local alignment search tool
BO	: Bois opposé
BSA	: Albumine sérique bovine
BT	: Bois tendu
C	: Cytosine
CBM	: Carbohydrate binding module
CDART	: Conserved domain architecture retrieval tool
CMV	: Cytomegalovirus humain
CNRS	: Centre national de la recherche scientifique
CT	: Coupe transversale
db	: double brin
ddNTP	: Didésoxyribonucléoside triphosphate
DIG-dUTP	: Digoxygénine - désoxyuridine triphosphate
DLM	: Déformation longitudinale de maturation
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNase I	: Désoxyribonucléase I
dNTP	: Désoxyribonucléotide triphosphate
DO	: Densité optique
DTT	: Dithiothréitol

EBI	: European bioinformatics institute
EDTA	: acide éthylène diamine tétra acétique
EMBL	: European molecular biology laboratory
FE-SEM	: Field emission scanning electron microscopy
FITC	: Fluorescéine isothiocyanate
FT	: Facteur de transcription
Fuc	: Fucose
g	: unité de force
G	: Gaïacyle
GA	: Gibbérelline
Gal	: Galactose
GalA	: Acide galacturonique
GAX	: Glucuronoarabinoxylane
GDP-Fuc	: Guanosine diphosphate-fucose
GFP	: Green fluorescent protein
GH	: Glycosylhydrolase
Glc	: Glucose
GlcA	: Acide glucuronique
GT	: Glycosyltransférase
GX	: Glucuronoxylane
H	: Unités <i>p</i> -hydroxyphényl
h	: heure
HCl	: Acide chlorhydrique
HG	: Homogalacturonane
HRGP	: Hydroxyproline rich glycoprotein
HygR	: résistance à l'hygromycine
Ig	: Immunoglobuline
INRA	: Institut national de la recherche agronomique
IPTG	: IsoPropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JGI	: Joint genome institute
KmR	: résistance à la kanamycine
LacZ	: gène codant la β -galactosidase
LB	: Luria bertani
M	: Molaire (mol/L)
MEB	: Microscopie électronique à balayage
MeGlcA	: acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique
MET	: Microscopie électronique à transmission
MgCl ₂	: Chlorure de magnésium
MGX	: 4-O-méthylglucuronoxylane
min	: Minute
miRNA	: microRNA
MOPS	: Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
MP	: Microscopie photonique
MS	: Murashige et Skoog (milieu)
NaCl	: Chlorure de sodium
NaOH	: Hydroxyde de sodium

NBT/BCIP	: Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
NPK	: Azote, Phosphore, Potassium
ONPG	: 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside
PBS	: Phosphate buffer saline (tampon phosphate salin)
PCR	: Polymerase chain reaction
PEG	: Polyéthylèneglycol
pH	: potentiel d'Hydrogène
pmoles	: picomoles
PtaFUT	: Fucosyltransférase de <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i>
RGI	: Rhamnogalacturonane I
RGII	: Rhamnogalacturonane II
Rha	: Rhamnose
RNAi	: ARN interférent
RNase H	: Ribonucléase H
rpm	: rotations par minute
RT	: Reverse transcription
S	: Sens
sb	: simple brin
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
sec	: seconde
SpnR	: résistance à la spectinomycine
SSC	: Sodium saline citrate
T	: Thymine
TAE	: Tris-acétate-EDTA
TAIR	: The Arabidopsis information resource
Taq	: <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	: Tris-borate-EDTA
TDZ	: Thidiazuron
Tm	: Temperature melting
UV	: Ultra-violet
V	: Volt
v/v	: volume/volume
w/v	: weight/volume (poids/volume)
XEH	: Xyloglucane endo- β -(1-4)-glucanase hydrolase
XET	: Xyloglucane endo-transglycosylase
X-Gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
XG	: Xyloglucane
XTH	: Xyloglucane endotransglucosylase/hydrolase
Xyl	: Xylose

TABLE DES MATIERES

Résumé	3
Remerciements	5
Liste des abréviations	9
Table des matières.....	15
Liste des tableaux & figures	25
INTRODUCTION GENERALE.....	33
Avant-propos.....	35
Bois <i>vs</i> Bois de tension	41
I. Mécanique du bois normal et origine(s) des contraintes de croissance	41
1. Lignine, cellulose ou les deux ?	45
2. Pression de turgescence	47
II. Mécanique du bois de tension	49
1. Problèmes liés au bois de tension.....	49
2. Induction du bois de tension	49
a) Théories.....	51
b) Mécanismes physiologiques et moléculaires	53
3. Particularités du bois de tension	63
4. Rôles des constituants de la couche G –Théories récentes.....	67
III. Modifications anatomiques du bois de tension	71
1. Les facteurs discriminants.....	71
2. La couche G : autre facteur discriminant du bois de tension ?	73
IV. Paroi secondaire et couche G	81
1. Les lignines.....	81
2. Les protéines.....	83
a) Les arabinogalactanes-protéines (AGPs)	83
b) Les expansines	85
c) Les extensines.....	87
d) Xyloglucane endo-transglycosidase (XET).....	87
3. Les polysaccharides pariétaux.....	89
a) Les pectines.....	89
b) La cellulose	89
c) Les hémicelluloses	91
Objectifs de la thèse	95

RESULTATS	99
Partie I : Applications de la microscopie à l'étude du bois de tension	101
I. Introduction.....	101
II. Résultats	103
1. Coloration du bois de tension chez le peuplier.....	103
2. Immunohistochimie du bois de tension chez le peuplier	107
a) Marquage des protéines	107
b) Marquage des polysaccharides pariétaux	111
III. Conclusion.....	117
Partie II : Les xylanes	119
I. Introduction.....	119
1. Structure des xylanes	119
a) Les glucuronoxylanes.....	121
b) Les arabinoglucuronoxylanes et les glucuronoarabinoxylanes.....	121
2. Métabolisme des xylanes.....	123
a) Biosynthèse.....	123
b) Dégradation des xylanes.....	125
II. Résultats : rôle des β -D-xylosidases lors de la formation de la paroi secondaire	127
III. Conclusion.....	151
Partie III : Les xyloglucanes.....	153
I. Introduction.....	153
1. Structure des xyloglucanes	153
a) Les XGs de type XXXG.....	155
b) XGs de type XXGG	157
c) Structures atypiques.....	159
d) O-acétylation	159
2. Métabolisme des XGs.....	161
a) Biosynthèse.....	161
b) Dégradation des XGs.....	167
II. Résultats : rôle des α (1,2)-FucTs lors de la formation de la paroi secondaire.	171
1. Identification et caractérisation des gènes codant des α (1,2)-FucTs.....	171
Figure 66 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences peptidiques des domaines XG FTases des PtaFUT, AtFUT, PsFUT1 et de celles d'autres	182
2. Profil d'expression des gènes <i>PtaFUT</i>	185
a) ... par RT-PCR.....	185
b) ... par transgénèse.....	187
3. Activité de la protéine PtaFUT1.....	189
a) En cellules COS-7.....	189
a) Chez le tabac	193

4. Rôle de la fucosylation des XGs lors de la formation du bois	195
III. Conclusion.....	197
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 205
 MATERIELS & METHODES	 215
I. Matériel biologique et culture.....	217
1. Organismes végétaux.....	217
a) Espèces	217
b) Cultures	217
2. Bactéries.....	219
a) Souches.....	219
b) Cultures	219
3. Cellules animales	221
a) Souche	221
b) Culture	221
4. Plasmides	221
II. Bioinformatique	223
III. Techniques usuelles de biologie moléculaire	225
1. Préparation des acides nucléiques.....	225
a) Extraction des acides nucléiques	225
b) Aspects quantitatif et qualitatif des acides nucléiques	227
c) Séparation électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose	229
d) Extraction et purification d'ADN sur gel d'agarose	229
e) Précipitation et purification de l'ADN d'une solution aqueuse	231
f) Digestions enzymatiques.....	231
g) Extraction et purification de plasmides	231
h) Séquençage de l'ADN par électrophorèse capillaire	233
2. Génération d'ADNc par Reverse Transcriptase (RT)	235
a) Principe	235
b) Méthode	237
3. Amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)	237
a) Principe	237
b) Méthode	237
4. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative	241
5. Hybridation moléculaire sur membrane.....	241
a) Transfert d'ADN _g sur membrane de nylon.....	241
b) Génération d'une sonde froide marquée à la digoxigénine	243
c) Hybridation de la sonde	243
d) Immuno-détection et révélation	243
6. Clonage de fragments d'ADN en vue de leur séquençage	245
a) Principe	245

b) Méthode	245
7. Clonage d'ADN en vecteurs d'expression à sites multiples de ligature.....	247
a) Principe	247
b) Méthode	247
IV. Expression de protéines recombinantes en systèmes hétérologues.....	251
1. Expression d' <i>AtFUT1</i> et des <i>PtaFUT</i> en cellules COS-7	251
a) Clonage en vecteur d'expression pour cellules de Mammifères.....	251
b) Transfection des cellules COS-7	251
c) Décollement des cellules COS-7	253
d) Dosages des activités enzymatiques	255
2. Expression d' <i>AtFUT1</i> et des <i>PtaFUT</i> chez le tabac	257
a) Construction des vecteurs d'expression	257
b) Transformation d' <i>A. tumefaciens</i> par électroporation.....	259
c) Transformation du tabac	261
d) Extraction des protéines produites	261
e) Dosage des activités enzymatiques	261
V. Modifications génétiques du peuplier	263
1. Principe.....	263
2. Méthode.....	265
a) Surexpression d' <i>AtFUT1</i> chez le peuplier	267
b) Sous-expression de <i>PtaFUT1</i> chez le peuplier par RNAi	267
c) Localisation de l'expression des gènes <i>PtaFUT</i> chez le peuplier	269
VI. Microscopie.....	271
1. Microscopie photonique.....	271
a) Préparation des échantillons.....	271
a) Colorations	271
2. Microscopie photonique à fluorescence	275
a) Préparation des échantillons.....	275
b) Immuno-fluorescence.....	277
3. Microscopie électronique à balayage (MEB)	277
a) Préparation des échantillons.....	277
b) Observation	279
4. Microscopie électronique à transmission (MET).....	279
a) Préparation des échantillons.....	279
b) Immuno-marquage à l'or et observation	279
 NOUVEAU CHAPITRE DE THESE	 283
I. Cadre de la thèse	287
1. Contexte.....	287
2. Projet de thèse.....	289
II. Gestion de projet	291

1. Conduite de projet.....	291
2. Coût du projet.....	295
III. Compétences acquises.....	297
1. Développement et mise au point de protocoles, collaborations techniques.....	297
2. Stratégies, risques et collaborations scientifiques	297
3. Encadrements	299
4. Gestion du matériel, des réactifs, de la sécurité et des organismes vivants	299
5. Valorisation des résultats	301
IV. Conclusion.....	303
1. Bilan du projet de thèse.....	303
2. Projet professionnel	303
 ANNEXES.....	 307
 <i>Annexe 1.....</i>	 <i>309</i>
<i>Annexe 2.....</i>	<i>311</i>
<i>Annexe 3.....</i>	<i>313</i>
<i>Annexe 4.....</i>	<i>315</i>
<i>Annexe 5.....</i>	<i>317</i>
<i>Annexe 6.....</i>	<i>319</i>
<i>Annexe 7.....</i>	<i>323</i>
 BIBLIOGRAPHIE	 325

LISTE DES TABLEAUX & FIGURES

Figure 1 : Photographie de kapokier (<i>Ceiba pentandra</i>).....	34
Figure 2 : Section d'une branche de <i>Viburnum odoratissimum</i> var. <i>awabuki</i> (angiosperme).....	34
Figure 3: A: Représentation schématique de la distribution du bois de tension et du bois de compression dans une section transversale de tige inclinée.....	36
Figure 4 : Reconstitution schématique des deux mécanismes hypothétiques expliquant des déformations longitudinales de maturation.....	44
Figure 5 : Evolution chez l'eucalyptus (ne présentant pas de fibres G) du taux de lignines de Klason (A) et de l'AMF (B) en fonction des Déformations Résiduelles Longitudinales de Maturation (DRLM).	44
Figure 6 : Conséquences du bois de tension après abattage.....	48
Figure 7 : Représentation schématique de la distribution des zones de bois de tension dans une boucle formée après une inclinaison à 360° d'une jeune tige de saule.....	50
Figure 8 : Mise en évidence de la pesanteur sur la formation du bois de tension.	50
Figure 9 : Mise en évidence de la croissance excentrée au sein du tronc.....	54
Figure 10 : Analyse par Northern blot de l'expression de gènes codant des facteurs de transcription (répresseurs) de la voie de transduction de l'auxine (<i>PttIAA</i>) suivant l'application d'un stimulus gravitationnel.	56
Figure 11 : A : Représentation schématique des deux types de courbure observée lors du séchage d'éprouvettes de peuplier.	62
Figure 12 : Représentation graphique des valeurs d'excentricité de la moelle (en %) suivant le degré d'inclinaison appliqué aux plants de peuplier euraméricain.....	64
Figure 13 : Représentation schématique du modèle proposé par Clair <i>et al.</i> (2006b).....	66
Figure 14 : Modèle de l'attachement de la couche G à la couche S2.....	68
Figure 15 : Modèle de développement du stress élastique dans les fibres G du bois de tension.....	68
Figure 16 : Représentation schématique de la déformation des cellules contenant des fibrilles de cellulose inextensibles dans leur paroi durant le gonflement.	70
Figure 17 : Comparaison de la porosité entre bois normal et bois tendu sur coupes transversales de peuplier euraméricain et de l'aulne glutineux.	70
Figure 18 : Représentation graphique de la proportion des différents éléments suivant le type de bois.	72
Tableau 1: Divergences anatomiques entre bois tendu et bois opposé chez le peuplier euraméricain (<i>Populus euramericana</i>).	72
Figure 19 : Photos de la paroi secondaire atypique du bois de tension observée chez <i>Laetia procera</i>	74
Figure 20 : Mise en évidence de la cohésion entre la couche gélatineuse et le reste de la paroi.....	76
Figure 21 : Mise en évidence de la présence de lignine dans la couche G.	82

Figure 22 : Micrographies de la paroi cellulaire des bois opposé et tendu de peuplier après immunomarquage des AGP par JIM14.	84
Figure 23 : Représentations graphiques du niveau d'expression des gènes codant des expansines par comparaison de la fréquence des Expressed Sequences Tag (ESTs) issus de différentes banques.....	84
Figure 24 : Mise en évidence par immunomarquage à l'or et microscopie électronique à transmission (MET) de la présence de (1,4)- β -D-galactane entre les couches S2 et G du bois de tension de peuplier.	86
Figure 25 : Mise en évidence de la cellulose cristalline par immunofluorescence avec l'anticorps CBM1 _{HfCel7A} sur coupes transversales de tiges de peuplier.	88
Figure 26 : Micrographies de l'ultrastructure de la couche G au niveau des fibres du bois de peuplier.	88
Figure 27 : Représentation schématique de la disposition et de l'angle des microfibrilles de cellulose au sein des fibres de bois tendu (face supérieure) et opposé (face inférieure).	90
Tableau 2 : Composition en glucides neutres de la couche G de peuplier isolée par sonication.....	90
Figure 28 : Mise en évidence par immunofluorescence avec l'Ac CCRC-M1 de la présence de xyloglucanes fucosylés dans la couche G de bois de tension de peuplier.....	92
Figure 29 : Représentation schématique de la physiologie intégrée du développement aériens des arbres et positionnement des acteurs moléculaires ciblés par l'étude dans ce contexte développemental (application au bois de tension).	96
Figure 30 : Mise en évidence des différentes structures anatomiques identifiables sur coupes transversales (CT) de tiges de peuplier <i>in vitro</i>	100
Figure 31 : Montage micrographique de coupes transversales d'une tige courbée de peuplier <i>in vitro</i> âgée de 3 mois et colorée au fasma.	102
Figure 32, A et B : Observations microscopiques (MP) comparées des zones de bois tendu entre peuplier <i>in vitro</i> âgée de 3 mois et peuplier de la serre âgé de 2 ans, respectivement.	102
Figure 33 : Observations en MP du bois de tension coloré au phloroglucine chlorhydrique ou au colorant de Maüle.	104
Figure 34 : Visualisation de quelques micrographies témoins de vitro-plants de peuplier (3 mois) observés en microscopie à fluorescence (A, B et C) et au MET (D et E).	106
Figure 35 : Marquage des AGPs sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	108
Figure 36 : Marquage des extensines sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	110
Figure 37 : Marquage des HGs sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	110
Figure 38 : Marquage des RG-I sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	112
Figure 39 : Marquage de la cellulose cristalline sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	112
Figure 40 : Marquage des XGs sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	114
Figure 41 : Marquage des xylanes sur vitro-plants de peuplier (3 mois).	116
Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus par immunodetection sur CT de tige de peuplier <i>in vitro</i> (<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> , clone INRA 717-1-B4).	118
Figure 42 : Structure du 4-O-méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX) de bois de peuplier.	120
Figure 43 : Structure de la séquence présente à l'extrémité réductrice des GXs.	120
Figure 44 : Représentation schématique des liaisons possibles s'opérant entre les xylanes et la lignine au sein de la paroi secondaire.	120

Figure 45 : Structure partielle d'un arabino-(4-O-méthylglucurono)xylane des bois de résineux	122
Figure 46 : Structure d'un glucuronoarabinoxylane de bois de gymnosperme (GAX).	122
Figure 47: Représentation schématique des chaînes latérales G et X des XGs.....	152
Figure 48: Représentation schématique des substitutions mono-, di- ou tri-saccharidiques des XGs généralement observées chez les végétaux.	154
Figure 49: Représentation schématique des chaînes latérales L et F des XGs.....	154
Figure 50: Représentation schématique de la chaîne latérale J des XGs.	156
Figure 51: Représentation schématique de la chaîne latérale S des XGs.	156
Figure 52: Représentation schématique de la chaîne latérale T des XGs.	156
Figure 53: Représentation schématique des chaînes latérales A, B et C des XGs de sycomore.	158
Figure 54: Mise en évidence de la localisation de la synthèse des XGs au sein de l'appareil de Golgi.	160
Figure 55: Représentation schématique de l'architecture des GTs.	160
Figure 56 : Structure schématique des nucléotides-sucres.	162
Figure 57 : Comparaison des structures des XGs retrouvés chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	164
Figure 58 : Localisation de l'activité XET dans le xylème en différenciation de tige de peuplier.....	170
Figure 59 : Représentation schématique de la séquence génomique des gènes <i>PtaFUT</i>	174
Figure 60 : Détermination du nombre de copies des gènes <i>PtaFUTg</i> chez le peuplier hybride par Southern blot suivant une révélation par colorimétrie.	176
Figure 61 : Détermination du nombre de copies des gènes <i>PtaFUTg</i> chez le peuplier hybride par Southern blot suivant une révélation par chémiluminescence.....	176
Figure 62 : Illustration schématique de l'alignement des séquences génomiques des <i>PtaFUT</i>	178
Figure 63 : Position au sein du génome de <i>P. trichocarpa</i> des gènes <i>PtFUT</i> identifiés par bioinformatique.	178
Tableau 4 : Comparaison des protéines PtaFUT suivant différentes caractéristiques prédites.....	180
Figure 64 : Pourcentage d'identité/forte similarité entre toutes les séquences peptidiques pleine longueur de la famille des PtaFUT, AtFUT1 et PsFUT1.....	180
Figure 65 : Localisation des domaines XGs fucosyltransférases (rouge) retrouvés chez les PtaFUT en comparaison de ceux identifiés chez d'autres plantes..	182
Figure 66 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences peptidiques des domaines XG FTases des PtaFUT, AtFUT, PsFUT1 et de celles d'autres végétaux.....	182
Figure 67 : Représentation schématique des motifs peptidiques communs entre XG-FucT et l'ensemble des $\alpha(1,2)$ -FucTs (bactéries, invertébré, vertébrés) et $\alpha(1,6)$ -FucTs (bactéries NodZ).	184
Figure 68 : Analyse du profil d'expression des gènes PtaFUT par RT-PCR.	184
Figure 69 : Photographies des explants de peuplier ayant été transformés <i>via Agrobacterium tumefaciens</i> avec la construction <i>PtaFUT1(1000pb)::pORE-R3</i>	186
Figure 70 : Représentation graphique de l'activité β -galactosidase exprimée en cellules COS-7 suivant différents paramètres de transfection.	188
Figure 71 : Représentation graphique de l'activité β -galactosidase exprimée en cellules COS-7 suivant différents paramètres de lyse cellulaire..	190
Figure 72 : Représentation graphique des activités β -galactosidase et XG $\alpha(1,2)$ -FucT exprimées en cellules COS-7.	190
Figure 73 : Spectre de masse	192

Figure 74 : Représentation graphique des activités β -galactosidase et XG $\alpha(1,2)$ -FucT exprimées en cellules COS-7.	
Tableau 5 : Caractéristiques des vecteurs utilisés dans les différentes expérimentations de l'étude.	220
Tableau 6 : Caractéristiques des enzymes de restriction utilisées lors de l'étude.	230
Figure 75 : Représentation schématique du principe de séquençage.	232
Figure 76 : Représentation schématique du dispositif de transfert passif de l'ADN sur membrane de nylon. ...	240
Figure 77 : Structure chimique de la digoxigénine et de la DIG-dUTP.	242
Figure 78 : Principe de la réaction du kit « CDP-Star, ready-to-use ».	242
Figure 79 : Carte du vecteur pGEM®-T Easy Vector.	244
Figure 80 : Carte du vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO.	250
Figure 81 : Représentation schématique du vecteur p21GT.	256
Figure 82 : Présentation des principales étapes de la technique d'agro-infiltration du tabac.	260
Figure 83 : Principe d'infection d'une cellule végétale par <i>A. tumefaciens</i>	262
Figure 84 : Représentation schématique des principales étapes de transformation génétique d'une plante par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	264
Figure 85 : Carte du vecteur pDONR221.	266
Figure 86 : Carte du vecteur pMDC32 et représentation schématique de la cassette du vecteur.	266
Figure 87 : Représentation schématique du principe de l'ARN interférent.	268
Figure 88 : Représentations schématiques du vecteur intermédiaire pSK-int contenant l'intron et de la construction pX7-RNAi inducible par l'estradiol.	268
Figure 89 : Structure chimique du bleu de toluidine.	272
Figure 90 : Structure chimique de la safranine.	272
Figure 91 : Structure chimique du bleu alcian.	272
Figure 92 : Structure chimique de la phloroglucine.	274
Tableau 7 : Caractéristiques des différents anticorps utilisés.	275
Tableau 8 : Composition des solutions mères utilisées pour la culture du peuplier.	309
Tableau 9 : Composition des milieux de culture du peuplier utilisés à la fois pour la micropopagation (MS _{1/2}) et la transgénèse (M1, M2, M3, MS30).	311
Tableau 10: Séquences des amorces utilisées pour la PCR.	3179

INTRODUCTION GENERALE



Figure 1 : Photographie de kapokier (*Ceiba pentandra*) mettant en évidence les racines-contreforts permettant une meilleure assise de l'arbre et une meilleure résistance à la flexion.

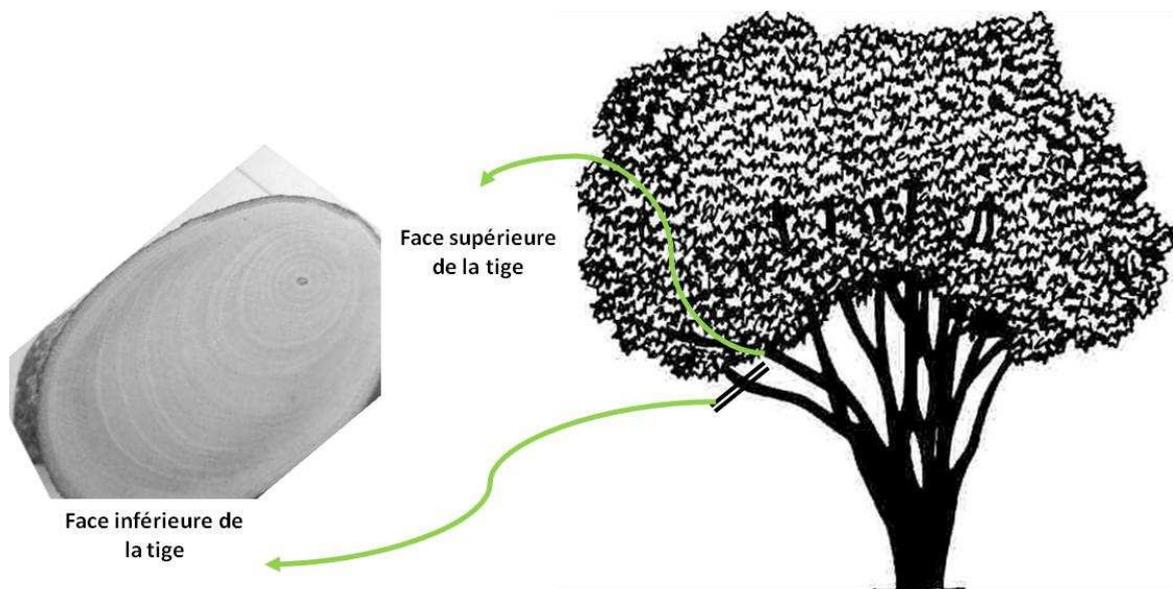


Figure 2 : Section d'une branche de *Viburnum odoratissimum* var. *awabuki* (angiosperme) montrant l'excentricité de la moelle qui ressemble à celle observée chez les gymnospermes (d'après Wang *et al.*, 2009).

Avant-propos

Les arbres se différencient des autres végétaux par la présence du bois. Celui-ci, par ses fonctions de soutien et de résistance mécanique, leur permet un développement en hauteur. Il favorise ainsi la domination vis-à-vis des espèces environnantes de moindre taille, excepté certaines fougères présentant un tronc ligneux. Ainsi, la stratégie des arbres pourrait être de développer un tronc massif et surdimensionné par rapport au poids du houppier pour faire face et résister aux aléas de la nature (Fournier *et al.*, 2003 cité par Gril, 2006). Malgré les contraintes mécaniques induites par la croissance en hauteur (stabilité, résistance mécanique au poids, etc), c'est la croissance axiale qui a été favorisée au dépend de la croissance radiale. Plusieurs types d'adaptations, morphologiques, anatomiques et/ou physiologiques, ont permis aux ligneux de s'élever au dessus de la strate herbacée puis arbustive: (i) la formation de racines-contreforts qui apparaît dans la famille des Bombacacées et dont l'exemple remarquable est le kapokier ou fromager (*Ceiba pentandra*; Fig. 1) et (ii) les systèmes mécaniques actifs de compensation des charges et de réorientation dans l'espace des axes. Ces systèmes, opérant de manière synergique, sont étroitement liés à la croissance. Ils sont impliqués dans (i) le dimensionnement de la structure mécanique des tiges (hauteur et diamètre, enracinement) suivant le processus de thigmomorphogenèse ou (ii) dans le redressement des structures déstabilisées mécaniquement *via* l'élaboration d'un bois particulier : le bois de réaction. Sous ce terme, deux bois distincts sont décrits en fonction de leur localisation dans les tiges: le bois de tension (BT) que l'on retrouve de façon majoritaire chez les angiospermes ligneuses et le bois de compression qui est présent chez les gymnospermes (Onaka, 1949).

Ces deux stratégies adaptatives, bois de tension et bois de compression, semblent avoir évoluées de façon indépendante. Toutefois, plusieurs études ont rapporté qu'un bois similaire au bois de compression pouvait se rencontrer chez des angiospermes ligneuses. C'est le cas notamment du buis (*Buxus microphylla* et *Buxus sempervirens*) où la croissance est plus forte sur la face inférieure de la tige. Le genre *Buxus* est ainsi considéré comme ayant adopté une voie évolutive différente pour le développement de son bois de réaction (Yoshizawa *et al.*, 1993 ; Baillères *et al.*, 1997). Récemment, une étude réalisée chez la viorne odorante (*Viburnum odoratissimum* var. *awabuki*) a démontré que le centre des branches est excentré de la même manière que chez les gymnospermes (Wang *et al.*, 2009, Fig. 2). Il est en de même chez

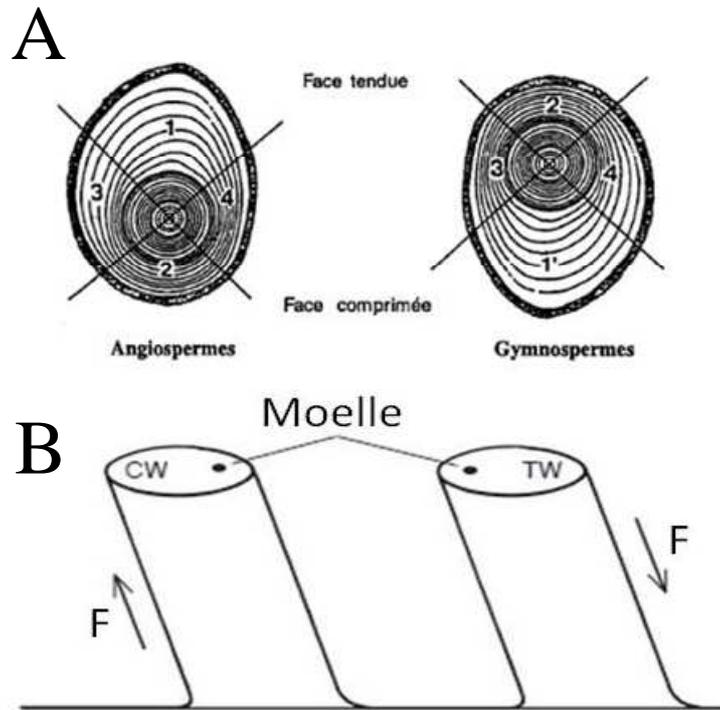


Figure 3: A: Représentation schématique de la distribution du bois de tension et du bois de compression dans une section transversale de tige inclinée. 1 : Bois de tension. 1' : Bois de compression. 2 : Bois opposé. 3 et 4 : Bois normal (d'après Chanson, 1989). B: Représentation schématique des forces (F) induites par les stress de croissance pour maintenir la position appropriée du tronc ou des branches. CW : Bois de compression. TW : Bois de tension (d'après Bamber, 2001)

l'arbre à l'écorce de Winter (*Pseudowintera colorata* (Raoul) Dandy) mais il n'y a cependant chez cette espèce ni bois de tension, ni bois de compression (Kučera and Philipson, 1978 ; Meylan, 1981). Finalement, au hasard des expérimentations, des valeurs de compression ont plusieurs fois été observées dans le bois opposé (BO) des angiospermes présentant déjà de fortes précontraintes de tension sur la face supérieure du bois incliné. Ceci était généralement considéré comme des erreurs expérimentales. Pourtant, il apparaît depuis peu que ces valeurs ne correspondent pas à des artéfacts de mesures chez le châtaignier (*Castanea sativa* Mill.), le manil (*Symphonia globulifera* L.f.) et le peuplier (*Populus euramericana* Guinier) mais elles constituent réellement une stratégie de ces arbres visant à produire un bois opposé en légère précontrainte de compression, facilitant d'autant plus le redressement. Le cumul de ces deux types de réactions au sein d'une zone de courbure chez un même arbre semble ainsi la meilleure adaptation pour optimiser la réactivité biomécanique (Clair *et al.*, 2006a).

De toutes ces observations, il en résulte néanmoins que le bois de réaction correspond dans tous les cas au développement d'une asymétrie sur un côté de la tige. Les conifères produisent alors un bois dit « de compression » sur la face externe de la zone de courbure (zone nécessitant un allongement plus important et qui pousse le côté opposé par gonflement du bois), tandis que les angiospermes produisent communément un bois dit « de tension » sur la face interne de la zone de courbure (zone nécessitant un raccourcissement par rapport au côté opposé et qui « tire » celui-ci par retrait du bois ; Onaka, 1949 ; Timell 1986 ; Nishikubo *et al.*, 2007 ; Fig. 3 A et B). Ces deux types de bois sont regroupés sous le terme de bois de « réaction ». En plus de leur localisation différente au sein des tiges, ces bois possèdent leurs propres caractéristiques anatomiques. Le bois de compression est matérialisé par des trachéides arrondies plus courtes avec d'importants méats cellulaires, des parois épaisses formées uniquement des couches S1 et S2. Celles-ci sont hautement lignifiées avec une forte proportion d'unités *p*-hydroxyphényl (H), contiennent moins de cellulose un angle des microfibrilles (AMF) très ouvert (>40°) et des épaissements spiralés sur la face externe de la couche S2 (Low, 1964 cité par Baillères *et al.*, 1995 ; Du et Yamamoto, 2007). Le bois de tension est quant à lui formé de fibres dont la partie la plus externe de la paroi secondaire est lignifiée tandis que la partie la plus interne l'est pauvrement. Cette dernière, nommée couche gélatineuse ou couche G (Wardrop et Dadswell, 1955), est presque exclusivement composée de cellulose cristalline dont l'AMF est très faible voire presque parallèle à l'axe longitudinal des fibres (Norberg et Meier, 1966 ; Baillères *et al.*, 1995 ; Chaffey, 2000 ; Daniel *et al.*, 2006).

Ainsi, d'après les connaissances acquises sur les différents aspects de formation du bois de réaction, il est proposé une synthèse bibliographique abordant exclusivement la formation du bois de tension. La confrontation du bois de tension avec le bois normal est aussi introduite pour permettre à la fois une meilleure compréhension des changements s'opérant au sein de ce bois atypique ainsi que la complexité des mécanismes physiques et biochimiques s'établissant au cours de son élaboration.

Bois vs Bois de tension

Le bois est un tissu complexe, initié par une assise génératrice le cambium. Sa genèse et sa maturation nécessitent la différenciation des cellules méristématiques en plusieurs types cellulaires possédant soit une paroi primaire (parenchymes), soit une paroi secondaire (vaisseaux de xylème, fibres ligneuses), mais également tendent à la déformation des cellules dans le sens longitudinal encore appelée Déformation Longitudinale de Maturation ou DLM. Cette dernière permet d'expliquer les efforts internes importants supportés par le bois des arbres sur pied, généralement appelés «contraintes de croissance» (Baillères *et al.*, 1995).

Dans le cas du bois de tension, qui correspond à une modification du bois normal en réponse à des contraintes naturelles ou artificielles (Fisher et Stevenson, 1981), cette affirmation se révèle particulièrement exacte. En effet, les cellules de ce bois particulier sont produites en réponse aux stimuli environnementaux. Chez les espèces végétales présentant ce type de modification, le bois nouvellement créé se courbe pour développer une réponse appropriée au champ gravitationnel et pour maintenir une orientation optimale de l'arbre (Jourez, 1997a et b). Ce processus apparaît notamment lorsque le végétal se développe sur un terrain en pente ou subit les contraintes dues au vent. Sous l'effet de la plagiotropie et de l'héliotropie, cela se produit aussi en permanence dans les branches des angiospermes où ce bois contrecarre l'augmentation du poids de celles-ci en régulant ainsi leur angle de croissance. C'est pourquoi ce bois atypique peut être défini comme un bois intervenant dans le rétablissement de la verticalité et se développant lorsqu'un renforcement mécanique est nécessaire. Il apparaît donc comme essentiel pour façonner l'architecture de l'arbre permettant par la même occasion d'optimiser l'exposition des feuilles à la lumière (Mellerowicz *et al.*, 2008).

I. Mécanique du bois normal et origine(s) des contraintes de croissance

La croissance est une contrainte mécanique en elle-même. En effet, une faible courbure initiale devrait être amplifiée par la croissance car celle-ci augmente le propre poids de l'arbre et par conséquent les charges subies par la zone de fléchissement (Fournier *et al.*, 2006). De plus, durant la différenciation, chaque type cellulaire du bois subit des changements anatomiques qui affectent leur forme et leur taille (Pilate *et al.*, 2004b). C'est surtout le cas en

fin de différenciation lors de la mise en place de la paroi secondaire épaisse et lignifiée où le bois tend à se déformer (Archer, 1986 ; Fournier et Guitard, 1994). Ainsi, dans un bois normal, les cellules xylémiennes sont constamment soumises à un stress mécanique qui est probablement requis pour maintenir la structure cambiale (Brown, 1964). En effet, durant ce processus de maturation, les fibres tendent à se contracter d'environ 0,1% (Baillères *et al.*, 1995), à s'étendre latéralement de 3 à 6% sur un plan radial et de 6 à 12% sur un plan tangentiel (Skaar, 1988). Cependant, cette contraction est restreinte par les cellules du bois précédemment formées. Ainsi, les cellules néoformées, en cours de différenciation, génèrent une résistance à la traction longitudinale tandis que l'obstruction de l'expansion latérale des cellules voisines conduit à un stress de compression tangentiel (Fournier *et al.*, 1994). La paroi des cellules de la couche périphérique est donc mise en tension (dans la direction longitudinale du fil du bois), qui elle-même est équilibrée par la compression s'établissant dans les cellules plus anciennes. Ces stress de croissance correspondent ainsi à des stress mécaniques survenant dans les tissus durant la croissance et la différenciation. Ils vont augmenter pendant la maturation des cellules du bois conduisant ainsi à la formation de forces de traction longitudinale à la surface des tiges (Hejnowicz, 1997 ; Plomion *et al.*, 2001). A l'échelle de la croissance de la section entière d'un tronc, ce phénomène provoque un gradient d'état mécanique entre le centre et la périphérie : le très jeune bois périphérique est soumis à sa tension initiale alors que le bois plus ancien du centre, initialement tendu lors de sa formation, se retrouve de moins en moins tendu, puis de plus en plus comprimé. Le matériau bois est dit précontraint (Jaouen, 2007). Ces efforts importants, généralement appelés «déformations de maturation ou contraintes de croissance ou de traction», ne s'expriment que très peu dans l'arbre sur pied du fait que le bois périphérique nouvellement formé et lignifié, adhère fortement au duramen. Cependant, ces contraintes internes supportées par l'arbre tout au long de sa vie restent en mémoire jusqu'à leur libération lors de l'abattage et la transformation de l'arbre (Baillères *et al.*, 1995).

Pour comprendre et définir l'origine des forces se propageant au sein de l'arbre, plusieurs théories ont été proposées au cours des 40 dernières années. Celles-ci, soutenues par certains et non validées par d'autres, ont permis d'améliorer les connaissances sur ce sujet, sans toutefois avoir réussi à dégager un modèle majoritaire, reconnu par tous.

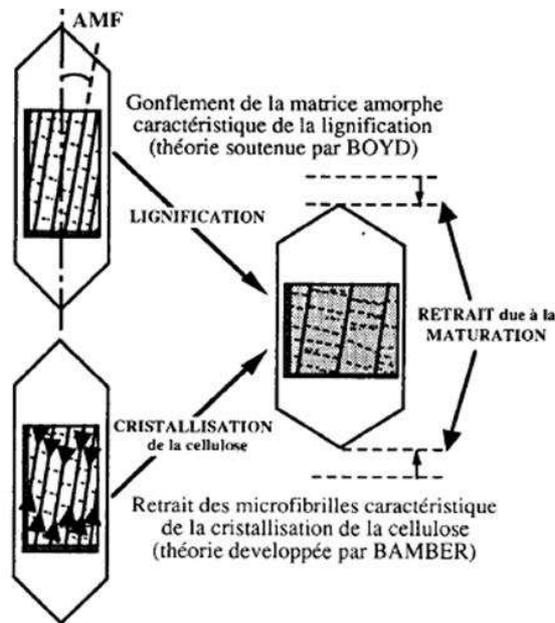


Figure 4 : Reconstitution schématique des deux mécanismes hypothétiques expliquant des déformations longitudinales de maturation proposés par Boyd (1972) et Bamber (1979). Le premier propose un rôle prépondérant de la lignification lors de ce processus. Le second mentionne plutôt le rôle de la cristallisation de la cellulose (d'après Baillères *et al.*, 1995).

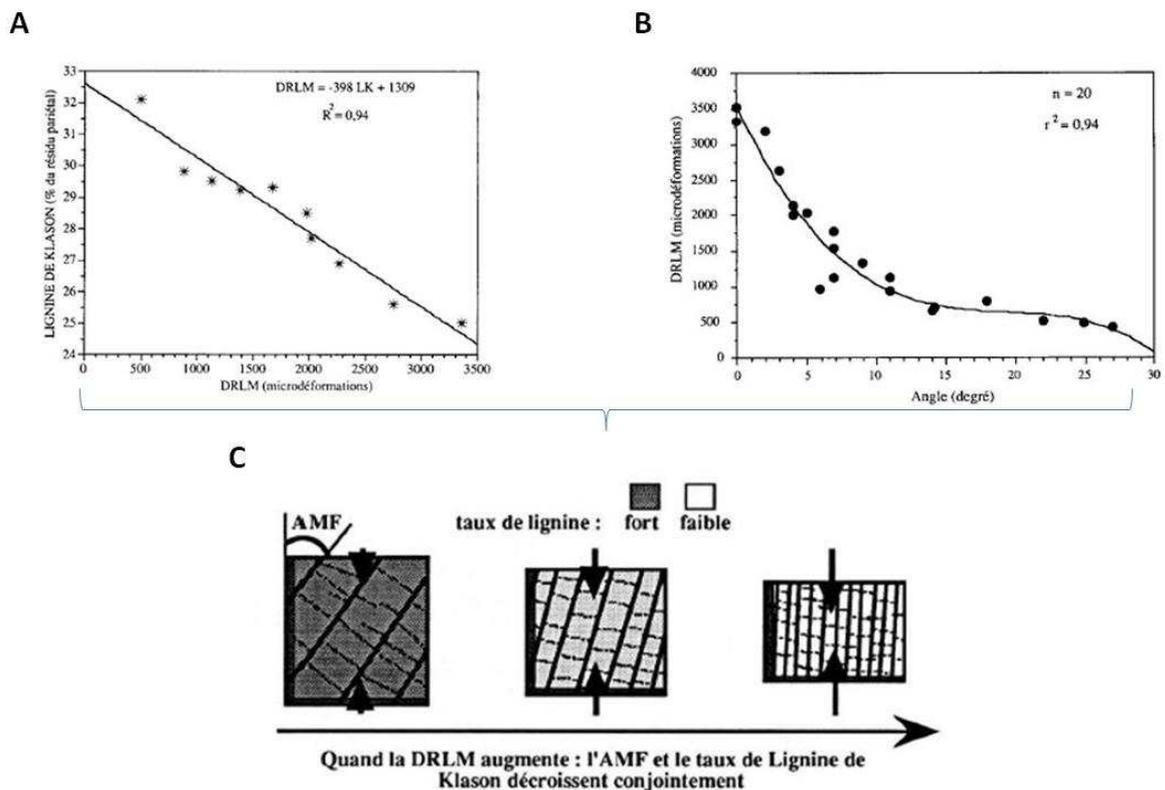


Figure 5 : Evolution chez l'eucalyptus (ne présentant pas de fibres G) du taux de lignines de Klason (A) et de l'AMF (B) en fonction des Déformations Résiduelles Longitudinales de Maturation (DRLM). Une représentation schématique de ces résultats est proposée en C : lorsque l'AMF diminue, par rapport à l'axe de la cellule, d'une part le gonflement de la matrice se manifeste moins et d'autre part le retrait des microfibrilles s'exprime davantage ; il s'ensuit une augmentation du retrait de maturation axial (d'après Baillères *et al.*, 1995).

1. Lignine, cellulose ou les deux ?

La première, nommée « the lignin swelling hypothesis » (Boyd, 1972, 1985), avait pour origine l'incrustation irréversible et la polymérisation instantanée des parois secondaires par la lignine au niveau des espaces libres du réseau de microfibrilles de cellulose et de la matrice lignine-hémicellulose. Les espaces pariétaux à combler étant limités, il se produit ainsi un gonflement latéral des fibres du bois qui engendre une contraction longitudinale (Fig. 4). Cette dernière était proposée comme la résultante de l'agencement en spirale des microfibrilles de cellulose de la couche S2. Bamber (1979, 2001) propose quant à lui « the cellulose tension hypothesis » qui donne un rôle prépondérant de la nature contractile de la cellulose cristalline lors de ces processus de contraintes. Une contraction axiale devait alors se produire mais les cellules environnantes l'en empêchant, de larges stress de tension étaient générés au sein du réseau de microfibrilles (Fig. 4). La lignine, quant à elle, est un ciment de la paroi secondaire qui lie les microfibrilles de cellulose entre-elles ainsi que les cellules du bois en une masse cohésive. Chez le bois de compression notamment, la forte teneur en lignine du côté inférieur de la tige aurait pour unique but de participer à la propagation des forces à travers le bois tout en augmentant sa résistance à la compression. Le dépôt de lignine ne semble pas corrélé avec la contrainte longitudinale pour Okuyama *et al.* (1994) et agirait comme un inhibiteur pour stopper la cristallisation sans fin de la cellulose, réduisant ainsi sa propriété contractile (Wardrop, 1965). Des travaux sur diverses espèces ligneuses ne présentant pas de fibres gélatineuses ont pu aussi conforter le rôle important des microfibrilles de cellulose dans la genèse de ces contraintes, car un angle réduit des microfibrilles, une forte cristallinité, ainsi qu'un taux d' α -cellulose élevé profitent à une contraction longitudinale plus grande (Okuyama *et al.*, 1994).

Chacune de ces deux hypothèses ne peut expliquer qu'un seul type de stress (tension ou compression), d'où « l'hypothèse unifiée » proposée par Okuyama *et al.* (1994). Cette hypothèse, reprise et discutée par Yamamoto (1998), a permis de conclure que les contraintes de croissance sont issues d'une coexistence des deux processus proposés par Boyd et Bamber (1972, 1979 respectivement). Il en résulte de plus que l'AMF est un des plus importants facteurs qui conditionne les stress de croissance de la paroi. D'après ce modèle, les stress de croissance longitudinaux diminuent lorsque l'AMF ou la teneur en lignine augmentent avec la cristallisation de la cellulose (Fig. 5). Les résultats obtenus sur des fibres de bois isolées non contraintes par des cellules voisines montrent ainsi qu'un AMF supérieur à 30° induit une

expansion et un AMF inférieur à 30° conduit à une déformation contractile. Cependant, bien que l'AMF et la teneur en lignine soient corrélés aux stress de croissance longitudinaux, il n'est pas possible de discriminer lequel de ces deux facteurs est responsable des variations de ces stress (Baillères *et al.*, 1995). Ces mêmes auteurs observent de plus un autre paramètre pouvant être lié à ces déformations. En effet, chez l'eucalyptus, la teneur de l'un des monolignols constituant le polymère de lignine (unité Gaiïcyle, G) est négativement corrélée avec les Déformations Résiduelles Longitudinales de Maturation (DRLM). Il en résulte un rapport S (unité Syringyle)/G évoluant de 1,47 à 1,96 suivant l'augmentation des DRLM. Un retard de lignification dans les bois à fortes DRLM pourrait donc être à l'origine de ce résultat.

Ainsi, la détermination des facteurs les plus influents sur la mécanique du bois restent encore à ce jour un sujet controversé. Mais de récentes études, notamment sur le bois de tension présentant une couche G, apportent des données supplémentaires sur le degré d'implication de la cellulose lors des stress de croissance.

2. Pression de turgescence

Une dernière théorie propose que l'origine du développement des contraintes de croissance fait référence à un mécanisme physique associé aux déformations diurnes et lié aux variations journalières de pression de turgescence (Okuyama *et al.*, 1994). Ces variations, induites par la périodicité de l'activité photosynthétique, sont connues comme étant le moteur de l'élongation de la paroi primaire. Elles induisent des changements dimensionnels cellulaires au niveau du xylème et de la partie interne de l'écorce des arbres et génèrent ainsi des déformations diurnes correspondant à des changements périodiques du diamètre de la tige (Alméras *et al.*, 2006). Ceci a notamment été vérifié par des variations de pression de turgescence induites expérimentalement par une irrigation différentielle chez le cèdre du Japon (*Cryptomeria japonica* D. Don). Cette étude a montré en effet que la nutrition hydrique influait sur la morphogénèse des trachéides (Abe et Nakai, 1999). Ainsi, la théorie développée à partir de ces résultats suggère que la matrice hémicellulose-lignine déposée de manière irréversible durant la nuit est comprimée par le raccourcissement des cellules le jour (augmentation de la pression de turgescence induisant une compression longitudinale). A l'inverse, la cellulose cristallisant pendant le jour devenait sous tension la nuit à cause de l'allongement des cellules. La répétition de ce processus induit alors une accumulation des

A



B



Figure 6 : Conséquences du bois de tension après abattage. A : Fentes observées à l'abattage (source : <http://www.fao.org>). B : Lamelles de peuplier présentant un aspect pelucheux dû à la forte teneur en bois de tension (d'après Jourez, 1997a).

stress de tension dans le sens longitudinal et des stress de compression dans le sens transversal de la tige (revu par Pilate *et al.*, 2004b). Cependant, il semblerait que cette hypothèse soit controversée. En effet, Alméras *et al.* (2006) ont pu démontrer qu'en l'absence de variations de pression de turgescence la génération de stress de maturation longitudinaux se produit quand même. Il en résulte que les déformations diurnes ne sont pas directement impliquées dans l'établissement de ces stress de maturation.

II. Mécanique du bois de tension

1. Problèmes liés au bois de tension

Bien que le bois de réaction soit un atout majeur pour la survie de l'arbre et qu'il constitue une stratégie performante permettant à la plante de s'adapter et de se développer harmonieusement dans son environnement, la formation d'un tel bois n'est pas sans conséquences technologiques et économiques. En effet, dans le cas d'arbres ayant développé des proportions importantes de bois de tension, les efforts internes de croissance emmagasinés tout au long de leur vie vont se manifester instantanément par des déformations lors de leur transformation. Celles-ci, dépendantes et proportionnelles à la distribution et à la teneur en bois de tension (Grzeskowiak *et al.*, 1996 ; Jourez, 1997a), vont apparaître sous formes de fentes en demi-lune et d'éclatements à l'abattage (Fig. 6A), de courbures ou torsions des débits au sciage et au séchage. De plus, l'état de surface des planches peut présenter un aspect pelucheux (Fig. 6 B) ainsi que des couleurs particulières (Kubler, 1987). Dans des cas extrêmes, le bois n'est utilisable que pour la trituration ou le chauffage et son utilisation pour l'industrie papetière produit une pâte de mauvaise qualité (Fang *et al.*, 2008b).

Ainsi, la compréhension des mécanismes régulant les propriétés des tissus lignifiés est d'un intérêt technologique important. Cela permettra aux forestiers de développer des moyens d'action pour améliorer les potentialités de ces bois : amélioration génétique et sylvicole, tri et classement des bois abattus (Baillères *et al.*, 1995).

2. Induction du bois de tension

Le bois de tension se retrouve dans presque toutes les parties de la plante (tronc, branches et même racines ; Zimmermann *et al.*, 1968) mais avec une distribution pouvant

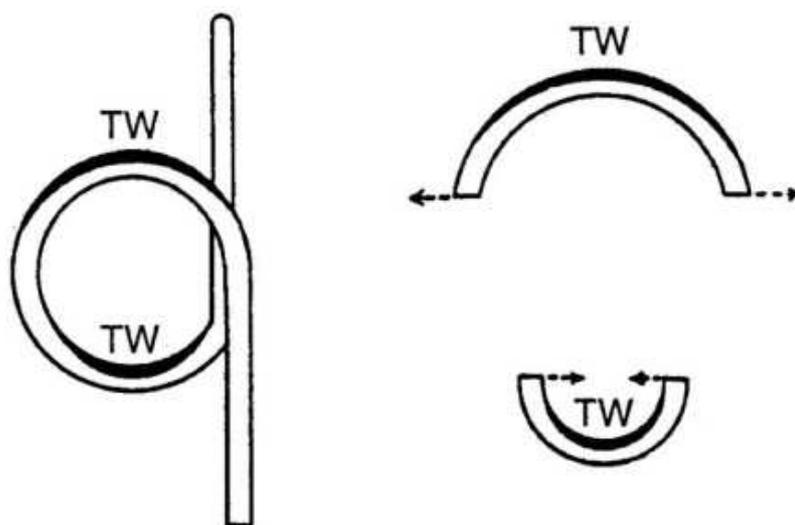


Figure 7 : Représentation schématique de la distribution des zones de bois de tension dans une boucle formée après une inclinaison à 360° d'une jeune tige de saule (d'après Robards, 1965). Cette expérience montre que l'excentricité de la moelle et la production de fibres G sont directement corrélées à l'orientation de la tige sans pouvoir cependant déterminer s'ils sont interdépendants ou s'ils dérivent du même stimulus. La pesanteur est cependant considérée ainsi comme le principal facteur de formation du bois de tension. TW : bois de tension.

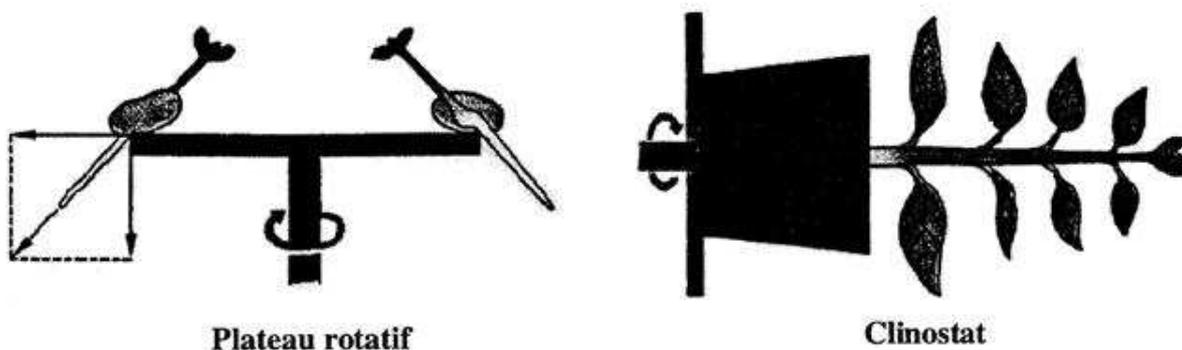


Figure 8 : Mise en évidence de la pesanteur sur la formation du bois de tension. A : L'expérience montre que les plantes soumises à la force centrifuge se courbent vers l'axe de rotation en développant un tissu qui ressemble au bois de réaction. B : L'expérience est réalisée à l'aide d'un clinostat qui a pour effet d'annuler la pesanteur. La tige se développe horizontalement suivant l'axe de rotation sans chercher à se redresser verticalement comme cela aurait été le cas sans rotation (figure extraite de Jourez, 1997b).

dépendre de la hauteur, de l'orientation, de l'inclinaison ou de la courbure de l'axe et du déséquilibre du houppier (Jourez, 1997a). Cependant, les exemples variés de la littérature sur la distribution de ce bois ne permettent pas de définir catégoriquement une localisation exacte. Pourtant, l'absence d'un schéma clairement établi à ce sujet laisse tout de même supposer que la formation du bois de tension n'est pas un processus anarchique et qu'un centre d'intégration plus ou moins sensible au sein du végétal (certainement au niveau du cambium) détecte les modifications de paramètres externes ou internes (Jourez, 1997b). En effet, ce type de processus implique l'existence de mécanismes de perception des signaux environnementaux, de transduction du signal au sein de l'organisme et de la réponse appropriée au stimulus détecté (Salisbury, 1993).

a) Théories

Plusieurs théories ont été proposées au fur et à mesure de l'apport de nouvelles données sur le bois de tension, notamment grâce à de nouvelles approches expérimentales. Une publication de Jourez (1997b) retrace clairement certaines d'entre-elles. Il est ainsi mentionné que la première théorie établissait la formation du bois de tension en réponse aux contraintes de tension se développant au niveau de la face supérieure. Cependant, celle-ci ne pouvant expliquer la formation du bois de compression, elle a laissé place à une nouvelle théorie donnant un rôle indirect mais prépondérant au champ gravitationnel (Fig. 7 et 8). Ce paramètre est supposé, en effet, agir sur la répartition des phytohormones et autres régulateurs de croissance. Bien que la gravité semble influencer sur la formation du bois de tension, cela ne permet pas d'expliquer ce type de bois dans des tiges droites et verticales. Ainsi, dans une nouvelle théorie, il a été proposé que la gravité ne soit pas le facteur déterminant. Il s'agirait, en fait, d'une recherche d'un équilibre permanent de l'arbre permettant de satisfaire à des conditions environnementales comme le phototropisme par exemple. Le bois de réaction se formerait alors dans les zones permettant de restaurer la position originelle ou la plus adéquate. La dernière théorie rapportée dans la publication de Jourez (1997b) implique quant à elle les modifications pariétales s'opérant au sein des fibres du bois de tension et qui seraient responsables de la génération de contraintes internes de croissance. La dissymétrie entre le bois tendu et le bois opposé entraînerait alors une dissymétrie des contraintes qui seraient alors elles-mêmes à l'origine des mouvements d'orientation des tiges et des branches. Cependant, le rôle de la pesanteur n'en est pas moins diminué et demeure toujours un stimulus responsable de la répartition dissymétrique des régulateurs de croissance et ainsi de la

formation du bois de tension. Il reste toutefois à noter que des insectes et des champignons induisent occasionnellement la formation de bois de réaction ce qui suggère que ce bois particulier peut être généré en l'absence de stimulus gravitationnel, de compression ou de tension (Du et Yamamoto, 2007).

b) Mécanismes physiologiques et moléculaires

Les végétaux possèdent des mécanismes de perception et de régulation de leur orientation ainsi que des processus moteurs pour en corriger les défauts qui diffèrent selon le type de plante. Dans le cas des ligneux, les processus moteurs font appel à la croissance radiale et aux précontraintes dues à la maturation cellulaire, en complément de la croissance différentielle observée sur les axes n'ayant que de la croissance primaire (Cosgrove, 1997). Cette dernière ne permettrait que la réorientation à très court terme des parties apicales non lignifiées (Jaouen, 2007).

Concernant le gravitropisme, trois phases distinctes sont développées : (i) la phase de perception du stimulus par la plante, (ii) la phase de transduction du signal entre les sites de perception et les sites de réponses au stimulus, et (iii) la phase de réaction qui induit la courbure de l'axe. Ainsi, plusieurs paramètres semblent influencer et participer à la formation du bois de tension.

i. Les paramètres du stimulus

Plusieurs paramètres inhérents au stimulus gravitationnel sont apparemment impliqués dans la réponse des arbres. En effet, les variations de durée de celui-ci (inclinaison de 30° par rapport à la verticale) semblent importantes comme le montre les différentes réactions du peuplier euraméricain (*Populus euramericana*) : un temps compris entre 24 et 48 heures est nécessaire pour que les jeunes plants perçoivent la modification de leur état d'équilibre et se mettent à former du bois de tension. En revanche, après un temps de latence de 48 heures, la formation de fibres gélatineuses est déjà observée sur la face supérieure des tiges. De plus, l'augmentation de la durée du stimulus a des répercussions sur le nombre de fibres gélatineuses et sur l'angle d'ouverture de l'arc de bois de tension. Il est aussi évalué que le redressement des jeunes plants est effectif après une durée de stimulus comprise entre 4 et 8 jours (Jourez et Avella-Shaw, 2003). Outre la durée du stimulus, une approche quasi-similaire mais faisant varier l'intensité du stimulus (inclinaison des plants par rapport à la verticale de 0, 5, 10, 20 et 30°), suggère que l'allongement des pousses ainsi que l'angle de l'arc de bois de tension, ne



Figure 9 : Mise en évidence de la croissance excentrée au sein du tronc visible par la position de la moelle après traitement par une gibbérelline (la localisation de l'application de GA_3 est représentée par un astérisque; d'après Funada *et al.*, 2008). Barre d'échelle : 1 cm.

sont pas affectés par ce paramètre. En revanche, le redressement de l'axe, la quantité de fibres gélatineuses, la croissance secondaire, l'excentricité de la moelle, sont corrélés positivement à l'intensité du stimulus et répondent quantitativement à l'inclinaison (Jourez *et al.*, 2003).

ii. Les hormones

Beaucoup d'études font état du rôle des hormones comme régulateurs et inducteurs de ce processus. L'interaction entre celles-ci avec d'autres composés pourrait jouer un important rôle dans la régulation de la formation de ce bois (Du et Yamamoto, 2007). Cependant, les résultats expérimentaux obtenus apparaissent souvent controversés, notamment du fait de l'application d'hormones exogènes sur des plantes dont la balance hormonale interne finale n'est pas connue (Mellerowicz *et al.*, 2001).

Dans le cas des gibbérellines (GAs), hormones essentielles à la croissance cambiale (Björklund *et al.*, 2007), l'application durant deux mois de GA₃ sur le tronc vertical d'angiospermes ligneuses (*Fraxinus mandshurica* var. *japonica* âgé de 5 ans, *Quercus mongolica* var. *grosseserrata* de 10 ans, *Kalopanax pictus* de 4 ans et *Populus sieboldii* de 3 ans) en l'absence de contraintes de croissance (pas de stimulus gravitationnel), entraîne la formation d'une croissance excentrée de la moelle (Fig. 9) et la formation de dépôts pariétaux secondaires présentant des aspects structuraux similaires à la couche G (peu de lignine, AMF réduit, épaissement en largeur ; Funada *et al.*, 2008). En revanche, l'application d'un inhibiteur de la biosynthèse de GAs, l'uniconazole-P, réduit la formation du bois de tension au sein de jeunes pousses de marronnier du Japon (*Aesculus turbinata*) inclinée à 45° pendant 10 semaines (Du *et al.*, 2004). Finalement, il a été démontré sur des tiges de frêne (*Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim.) que GA₃ et GA₄ affectent le gravitropisme et la formation du bois de tension mais favorisent plus le développement du bois que la différenciation de la couche G des fibres (Jiang *et al.*, 2008). Ces mêmes auteurs suggèrent que le développement de la couche G pourrait être régulé par d'autres hormones *via* un rôle indirect de la GA₃ et de la GA₄ plutôt que par un effet direct des GAs.

Aussi, le gravitropisme négatif des tiges placées à l'horizontale ne dépendrait pas uniquement de la formation de la couche G mais aussi de l'augmentation quantitative du xylème. En effet, l'application d'uniconazole-P empêche la courbure des tiges initialement positionnées à l'horizontale et réduit la quantité de xylème produite sans affecter la formation de la couche G. Des résultats similaires ont été observés après application de gibbérelline sur des pousses verticales d'érable rouge, *Acer rubrum* (Cronshaw et Morey, 1968).

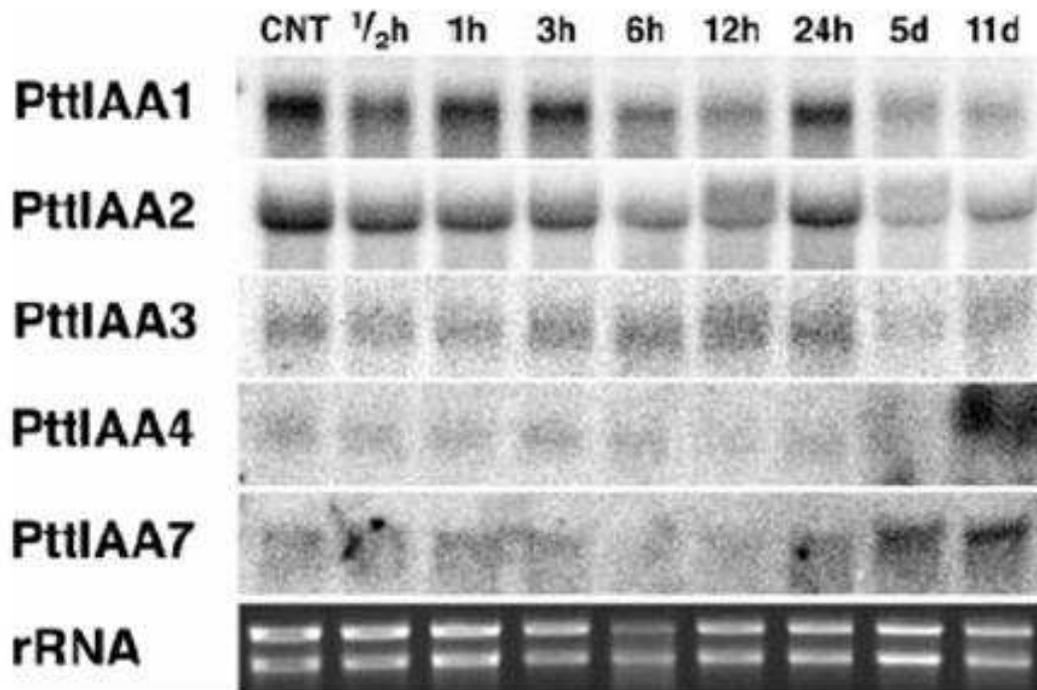


Figure 10 : Analyse par Northern blot de l'expression de gènes codant des facteurs de transcription (répresseurs) de la voie de transduction de l'auxine (*PttIAA*) suivant l'application d'un stimulus gravitationnel (inclinaison à 45° du tronc d'un tremble hybride (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*)). La transcription des gènes est altérée suite au stimulus mais les niveaux d'expression sont variables entre les gènes (d'après Moyle *et al.*, 2002).

Outre cette hormone, l'auxine est aussi considérée comme un facteur clef dans la formation du bois, mais son rôle n'est pas définitivement établi. Par exemple, chez des peupliers transgéniques dont le métabolisme de l'auxine est modifié, la formation du bois paraît altérée notamment par la réduction de la taille des vaisseaux ainsi que par l'augmentation de leur densité et des changements dans le développement des rayons ligneux (Tuominen *et al.*, 1995). Le bois de tension, quant à lui, est supposé se développer en réponse à un gradient interne d'auxine au sein de la tige. Dans le bois incliné des angiospermes, plusieurs études ont en effet suggéré que la carence en acide indole-3-acétique (AIA) sur la face supérieure des tiges induit la différenciation des fibres G (Little et Savidge, 1987 ; Aloni, 1991 ; Little et Pharis, 1995). Cependant, des travaux récents ont démontré que la formation du bois de tension n'était liée à aucune altération de la balance hormonale endogène de l'auxine chez le tremble (*Populus tremula* ; Hellgren *et al.*, 2004). Néanmoins, l'expression de quelques gènes de la famille des *Aux/LAA* (*PttLAA1-PttLAA8*) est altérée après gravistimulation des tiges de tremble hybride (*P. tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) soit par des mécanismes transcriptionnels (Moyle *et al.*, 2002 ; Fig. 10) soit par des mécanismes post-transcriptionnels (Gray *et al.*, 2001 ; Tiwari *et al.*, 2001). Ces gènes codent des facteurs de transcription (répresseurs) de la voie de transduction de l'auxine parmi lesquels certains sont exprimés dans les cellules du xylème secondaire. Ainsi, l'auxine pourrait réguler le développement du xylème secondaire en changeant la stabilité de ces facteurs de transcription. Ces résultats restent toutefois en accord avec l'existence d'interactions entre l'auxine et un signal induisant le bois de tension, comme proposé par Hellgren *et al.*, (2004). De plus, suivant l'étude réalisée par Nilsson *et al.* (2008) sur tremble hybride transgénique surexprimant le gène muté *PttLAA3* (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*), une diminution de l'activité cambiale est observée au niveau des initiales cambiales. En effet, la fréquence des divisions périclines est significativement réduite tandis que celle des divisions anticlines apparaît moins affectée chez ces plants transgéniques. La longueur et la largeur de fibres et vaisseaux du bois apparaissent elles aussi réduites. Ces résultats montrent ainsi l'importance du rôle de l'auxine dans la régulation de la division et l'élongation des cellules du xylème secondaire.

L'éthylène, composé volatile produit pendant la formation du bois et influençant le développement de celui-ci lorsqu'il est appliqué de manière exogène, jouerait un rôle dans la mise en place du bois de tension. En effet, le gène codant la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, responsable de la production d'éthylène, est fortement induit durant la formation du bois de tension chez le tremble hybride (*P. tremula* L. x *P. tremuloides* Michx. ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2003). Une accumulation d'éthylène est ainsi suggérée au

niveau de la face supérieure du bois incliné. Il en est de même chez le marronnier du Japon (*Aesculus turbinata*) où le taux d'éthylène augmente fortement dans la zone de bois tendu en réponse à l'inclinaison du tronc (Du et Yamamoto, 2003). Très récemment, Love *et al.* (2009) ont démontré à partir de trembles hybrides transgéniques (*P. tremula L.* x *P. tremuloides*) que l'éthylène stimule la division cambiale en agissant sur des récepteurs spécifiques.

Finalement, plusieurs études montrent la synergie d'action des hormones ou de leurs interactions. Par exemple, les effets exogènes de GA₃ et d'AIA sont considérés d'une grande importance pour la régulation de la production des fibres G chez les pousses d'*Aesculus turbinata* (Du *et al.*, 2004). Grâce à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et combinée à des analyses transcriptomiques (puce à ADN de peuplier), l'application chez le tremble hybride (*P. tremula L.* x *P. tremuloides*) des hormones GA₄ et AIA au niveau de l'apex décapité a permis de mettre en évidence que GA interagit avec l'auxine et stimule le transport polaire de celle-ci (Björklund *et al.*, 2007). Il apparaît de plus que ces hormones partagent l'expression commune de certains gènes dont beaucoup sont impliqués dans la croissance cellulaire. Cependant, aucune donnée concernant l'action synergique de ces hormones lors de la formation du bois de tension n'est proposée lors de cette étude.

iii. *Microtubules, « molécules de liaison » et facteurs de transcription (FTs)*

D'après les résultats de Katz *et al.* (2000) et Ingber (2003a et 2003b), cités par Baluska *et al.* (2003), des protéines de liaison fixées aux domaines d'adhésion de la membrane plasmique détectent les déformations de la matrice extracellulaire par mécanoperception. Une cascade de transduction associant des molécules liées au cytosquelette pourrait alors être impliquée dans le processus de modification des propriétés mécaniques de la paroi. Dans les fibres G, les microtubules étant disposées suivant l'axe longitudinal des cellules et se présentant parallèlement aux microfibrilles de cellulose (Chaffey *et al.*, 2002), il se peut que des molécules spécifiques régissent ces orientations. En effet, des études basées sur la paroi cellulaire de mutants d'*Arabidopsis* indiquent que deux protéines, une katanine et une kinésine, sont probablement impliquées dans l'orientation des microfibrilles de cellulose *via* le contrôle des microtubules (Burk et Ye, 2002 ; Zhong *et al.*, 2002). Aussi, de manière intéressante, la seconde classe d'hormones impliquée dans la formation du BT (les gibbérellines) semble agir sur l'organisation des microtubules en modulant le niveau d'expression de katanine (Bouquin *et al.*, 2003). Plusieurs molécules de liaison ont donc été

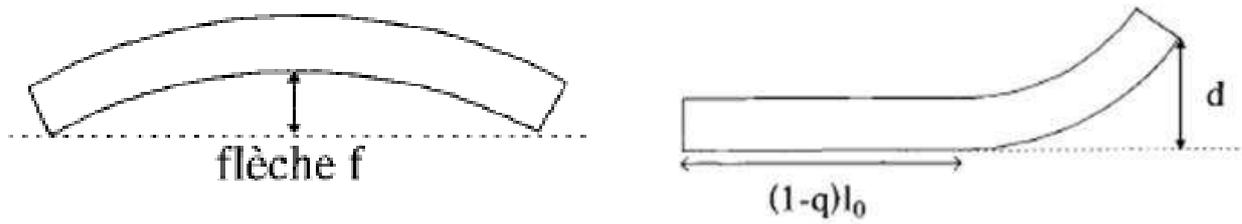
proposées : les intégrines (protéines de la membrane plasmique associant la paroi au cytosquelette), les « wall-associated-kinases » (WAKs), les « cellulose synthases » et les AGPs (Kohorn, 2000, 2001 ; Baluska *et al.*, 2003). Chez les plantes, les intégrines putatives sont supposées participer à la voie de signalisation du gravitropisme (Katembe *et al.*, 1997).

Hormis ces molécules de liaison, la perturbation de l'orientation des tiges serait aussi détectée dans la cellule par des statolithes dont la sédimentation provoquerait une réaction de mécanoperception en activant des canaux ioniques de la membrane plasmique et/ou des membranes intracellulaires. Il en résulterait une augmentation transitoire en ions dans le cytoplasme induisant des cascades de transduction du signal (Blancaflor et Masson, 2003). Plusieurs auteurs ont aussi montré que la courbure locale induite par la gravité serait le signal perçu par les végétaux au lieu de l'inclinaison globale (Meskauskas *et al.*, 1999 ; Coutand *et al.*, 2003, cités par Jaouen, 2007).

A toutes ces molécules de transductions s'ajoutent une multitude de facteurs de transcription (FTs) qui pourraient être impliqués dans la répression ou l'activation de gènes participant à la formation du bois de tension lors du processus de redressement des plantes. Beaucoup de ces FTs, isolés préalablement chez *Arabidopsis*, jouent un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la paroi secondaire. Parmi eux, sont notamment retrouvés les MYBs (Myeloblastosis), les LIMs, les NACs (Secondary wall-associated NAC Domain protein : SND ; NAC Secondary wall-Thickening promoting factor : NST ; Vascular-related NAC Domain : VND ; Mitsuda *et al.*, 2007 ; Zhong *et al.*, 2007a et b, 2008). Pour les *PttMYB21a* chez le tremble hybride (*P. tremula x P. tremuloides*), une surexpression transitoire dans le bois de tension est détectée entre 30 minutes et 3 heures après l'inclinaison de plant à 45°. Ces FTs induiraient la répression de la biosynthèse de lignine (Karpinska *et al.*, 2004). Il apparaît ainsi que la biosynthèse de ces FTs soit précoce suite à la perception du stimulus. Grâce aux études de transcriptomiques, l'identification de nouveaux acteurs moléculaires impliqués lors de la formation du bois et du bois de réaction sera ainsi facilitée comme le prouvent des travaux déjà réalisés (Déjardin *et al.*, 2004 ; Paux *et al.*, 2005 ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006 ; Tuskan *et al.*, 2006).

Finalement, la découverte récente de microRNAs (miRNAs) surexprimés dans le bois de tension de peuplier (*P. trichocarpa*) suite à un stress mécanique (courbure) complète le panel de régulateurs des gènes (Lu *et al.*, 2005). Pour exemple, ptr-miR408 est fortement surexprimé dans le BT où il aurait pour rôle de diminuer la teneur en lignine des fibres. Plus encore que l'action d'un seul de ces miRNAs, les auteurs suggèrent qu'une cascade de ces miRNAs modulerait le développement de certaines cellules.

A



B

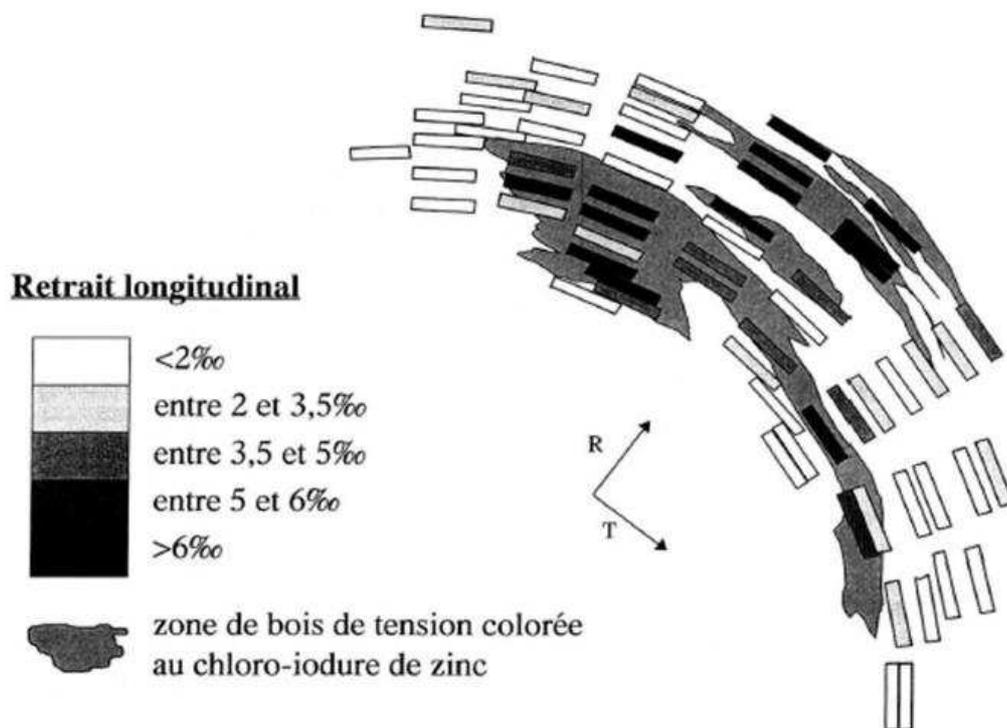


Figure 11 : A : Représentation schématique des deux types de courbure observés lors du séchage d'éprouvettes de peuplier et du type de mesure réalisée pour analyser les propriétés mécaniques du bois. Dans le schéma du dessus, la flèche (f) est mesurée ; dans celui du dessous, la mesure est effectuée sur la partie non déformée $(1-q)l_0$ (où l_0 est la longueur de l'éprouvette humide) et au niveau de l'écartement (d) avec une surface plane. B : Cartographie (plan transversal) du retrait longitudinal observé chez le peuplier présentant du bois de tension. La mise en évidence de ce bois est réalisée à l'aide de la coloration au chloro-iodure de zinc. Ce résultat montre que la répartition du retrait respecte bien celle de la nature du bois : un bois normal présente un retrait longitudinal plus faible. Les plus fortes valeurs de retrait sont obtenues à la frontière entre les zones tendue et normale (d'après Grzeskowiak *et al.*, 1996).

3. Particularités du bois de tension

Dans le cas particulier du bois de tension, outre une densité supérieure à celui du bois normal, celui-ci a été de nombreuses fois associé aux fortes valeurs de déformations longitudinales de maturation (Grzeskowiak *et al.*, 1996). En effet, les contraintes de traction se développent fortement au sein des fibres du bois de tension (jusqu'à 70 MPa ; Okuyama *et al.*, 1994) comparé au bois normal et au bois opposé. La mesure des déformations à la surface des tiges de certaines angiospermes indique un stress de traction 10 fois plus important au niveau du bois de réaction : environ 300 microdéformations ($\mu\text{m}/\text{m}$) dans le bois normal contre environ 3000 microdéformations dans le bois tendu (Clair *et al.*, 2006b). La distribution particulière de ce bois atypique au sein du végétal va ainsi induire une dissymétrie dans la répartition des contraintes de croissance. Ainsi, lors de stress de traction longitudinaux irréguliers sur le pourtour de la tige, une différence structurale entre le bois de réaction et le bois opposé est créée conduisant à la formation d'un moment de courbure : la face la plus tendue «tire» sur l'autre et fléchit donc la tige entière (Fournier *et al.*, 1994 ; Bamber, 2001 ; Alméras *et al.*, 2005 ; Clair *et al.*, 2006b). De plus, l'amplitude de courbure pour contrecarrer l'inclinaison de la tige dépend aussi de la surface et de la position de la région tendue (Yoshida *et al.*, 2000). Cependant, il a été observé que les DRLM mesurées au niveau des bois de tension sont sous-estimées pour deux raisons : (i) la pièce de bois au niveau de laquelle le rétrécissement est mesuré n'est pas complètement déconnectée du reste du tronc (Coutand *et al.*, 2004) et (ii) les bois juvéniles sont des matériaux viscoélastiques induisant un relâchement des stress initiaux de manière diffuse dans le temps ; ceux-ci pouvant totalement être relâchés après une longue période ou un traitement hygrothermique accélérateur du processus (Gril et Thibaut, 1994).

Au moment du séchage d'éprouvettes parallélépipédiques de peuplier euraméricain (*Populus euramericana* cv I.214), il est possible de visualiser et de mesurer ce type de déformations résiduelles de maturation (Fig. 11 A et B). Des résultats ont ainsi montré que le retrait longitudinal pouvait atteindre 5,6% pour le bois de tension contre 1,7% pour le bois normal (Grzeskowiak *et al.*, 1996). Par comparaison des contraintes de traction générées au niveau de la zone de bois tendu de deux angiospermes (le cerisier du Japon « *Prunus spachiana* » et le tulipier de Virginie « *Liriodendron tulipifera* »), il a été montré que celles-ci sont positivement corrélées avec le degré d'inclinaison des tiges, jusqu'à une valeur seuil de 20°. Au delà de cette valeur, aucune variation supplémentaire n'est détectée et il apparaît souvent que des inclinaisons extrêmes (de l'ordre de 45°) présentent des stress de croissance de

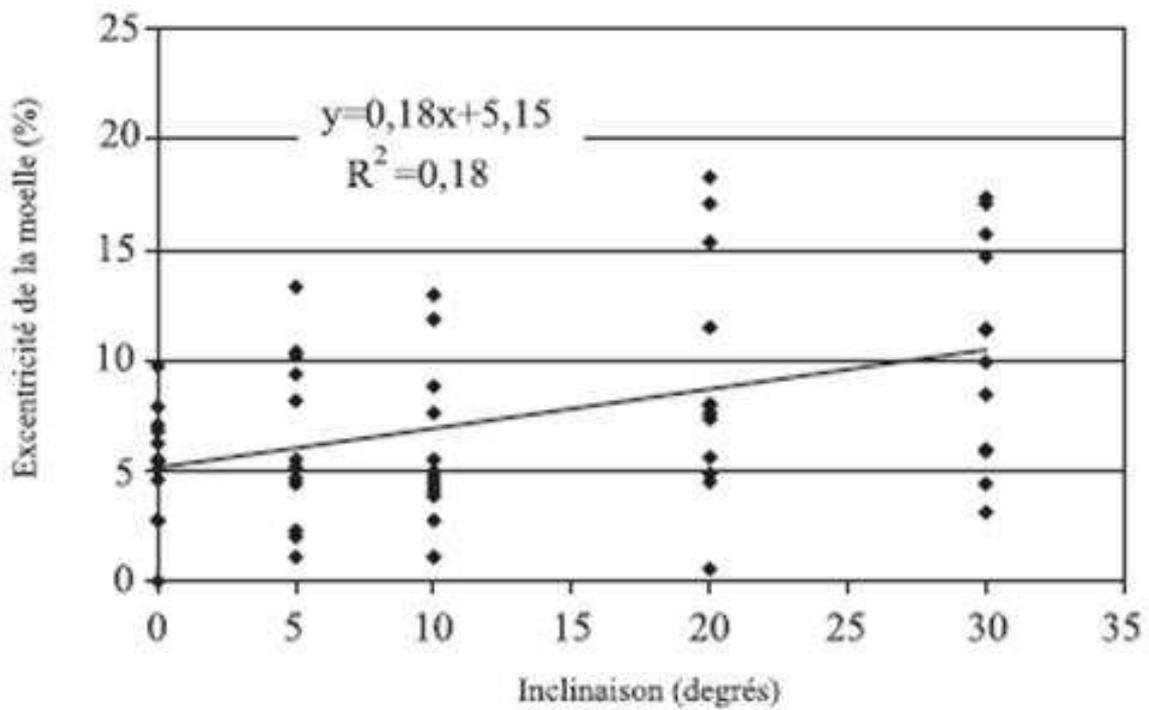


Figure 12 : Représentation graphique des valeurs d'excentricité de la moelle (en %) suivant le degré d'inclinaison appliqué aux plants de peuplier euraméricain (d'après Jourez *et al.*, 2003). Ce résultat montre clairement la corrélation positive entre ces deux paramètres.

moindre amplitude. Ainsi, si les stress de croissance sont insuffisants pour rétablir l'orientation optimale, une pousse latérale (pousse épïcormique) prendra le relais en devenant l'axe principal (Yoshida *et al.*, 2000). En revanche, pour Jourez *et al.* (2003) et Robards (1966), la réaction de la plante est d'autant plus importante qu'elle a été écartée de sa position naturelle d'équilibre comme le suggère l'augmentation de la proportion de bois de tension suivant des angles d'inclinaison variant respectivement jusqu'à 30° et 120°.

Une autre caractéristique observée chez ce bois particulier est l'excentricité de la moelle due à une croissance de la zone cambiale plus forte du côté tendu que du côté opposé (Jourez *et al.*, 2001 ; Pilate *et al.*, 2004b). Cette excentricité est définie comme la distance qui sépare le centre géométrique de la moelle du centre géométrique de la section de la tige (Timell, 1986). Chez le peuplier euraméricain, elle est identifiée comme proportionnelle à l'inclinaison des tiges et peut atteindre jusqu'à plus de 10% pour une inclinaison de 30° des plants (Fig. 12 ; Jourez *et al.*, 2003). Ceci permet d'autant plus la formation d'un moment de courbure (Fisher et Mueller, 1983 ; Jourez *et al.*, 2003) et pourrait théoriquement suffire au processus de réorientation, sans la formation de bois de tension. Cependant, cela n'est que très rarement observé seul (Fisher et Marler, 2006) et bien que l'inclinaison de la tige stimule cette croissance « déséquilibrée » entre les deux faces (opposée et tendue), les stress de croissance restent les principaux facteurs de retour à la verticalité (Yoshida *et al.*, 2000). Jourez *et al.* (2003) précisent de plus que l'excentricité et le bois de tension s'orientent suivant la direction du stimulus mais que le coefficient de corrélation partielle entre ces deux paramètres n'est pas significatif. Ces observations indiquent alors que l'excentricité et le bois de tension s'orientent suivant le même stimulus gravitationnel (inclinaison) tout en étant indépendant l'un de l'autre.

Ainsi, bien que les aspects mécaniques du bois de tension permettent de mieux appréhender sa formation, il reste beaucoup de paramètres à explorer notamment aux niveaux microscopique et biochimique. En effet, l'ultrastructure de ce bois présente de multiples divergences avec le bois normal suggérant des caractéristiques essentielles responsables de l'établissement d'un tel bois. Cependant, en l'état actuel des recherches sur le bois de tension, beaucoup de résultats contradictoires ne permettent pas d'identifier clairement le ou les facteur(s) clé(s) conduisant à la formation de ce bois atypique. Ceci est d'autant plus difficile qu'il existe beaucoup de dissemblances morphologiques entre plusieurs espèces ligneuses développant du bois de tension, notamment au niveau de la paroi secondaire. C'est pourquoi, l'ultrastructure du bois de tension est présentée dans la partie suivante, avec une considération particulière portée sur les caractéristiques pariétales et leurs rôles dans la mécanique de ce bois.

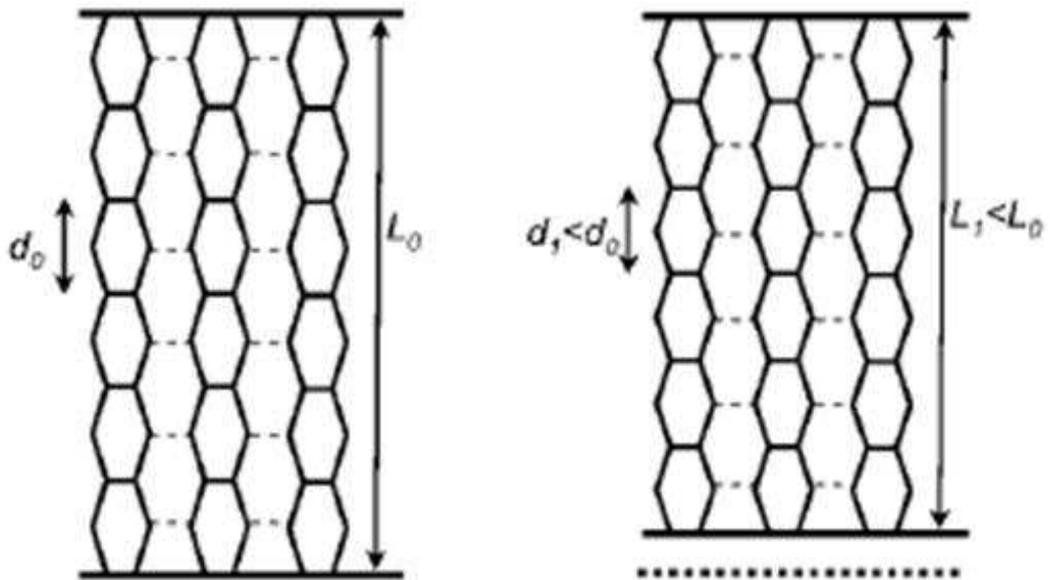


Figure 13 : Représentation schématique du modèle proposé par Clair *et al.* (2006b). Les microfibrilles de cellulose se contractent après relâchement du stress de tension dû à un plus faible espacement de mailles de la cellulose. L : longueur longitudinale d'une microfibrille de cellulose ; d : longueur d'une maille.

4. Rôles des constituants de la couche G – Théories récentes

De nouvelles théories et de nouveaux modèles ont été proposés pour expliquer la genèse des forces permettant la création du moment de courbure dans les tiges des arbres inclinés. Yoshida *et al.* (2002b) constatent chez le tulipier de Virginie (*Liriodendron tulipifera*) l'absence de couche G mais la présence d'une strate S2 qui lui est similaire au niveau de la disposition des microfibrilles de cellulose et de la teneur en lignine. Ils concluent, d'après les mesures de déformations observées au cours de la maturation, que la diminution de la teneur en lignine et l'augmentation de la teneur en microfibrilles de cellulose parallèles à l'axe des fibres dans la paroi secondaire est nécessaire pour produire un fort stress de croissance élastique.

Pilate *et al.* (2004b) suggèrent que l'angle des microfibrilles de cellulose dans la couche G étant toujours parallèle à l'axe longitudinal des fibres, cela contribue probablement aux propriétés mécaniques spécifiques du bois de tension. Par une approche cristallographique, Clair *et al.* (2006b) ont démontré pour la première fois *in situ* que la cellulose cristalline se contracte après relâchement du stress de tension au sein du bois tendu ce qui étaye ainsi l'hypothèse d'une tension induite au sein des microfibrilles de cellulose lors de la maturation. Cette propriété des microfibrilles a été révélée par le fait que le maillage de ces dernières est plus espacé lors d'une contrainte de tension qu'après relâchement (Clair *et al.*, 2006b ; Fig. 13). Le mécanisme par lequel les forces de tension se développent au sein de la trame cellulosique est encore à déterminer, mais il pourrait trouver son origine dans le processus de cristallisation des microfibrilles de cellulose. En effet, Davidson *et al.* (2004) montrent que les différences du maillage de la cellulose entre espèces sont liées à la taille des cristaux de cellulose. Cette dernière serait due à des différences de liaisons hydrogènes entre les chaînes de cellulose localisées à l'intérieur et à la surface des microfibrilles.

Suivant cette même idée, le développement de forces de traction au sein du bois de tension serait lié à la couche G et aux propriétés des microfibrilles de cellulose (Mellerowicz *et al.*, 2008). Cependant, pour ces auteurs, une question se pose : « comment la cohésion de la cellulose est-elle maintenue dans la couche G et entre la couche G et le tissu? ». Ils proposent donc un rôle essentiel des xyloglucanes (XGs) et de l'activité xyloglucane endo-transglycosylase (XET) dans l'induction du stress de maturation et de la courbure des tiges par le bois de tension. Le stress de maturation et/ou la courbure des tiges seraient ainsi développés en premier lieu au sein des microfibrilles de cellulose et serait ensuite transmis à la couche G puis au tissu par les XGs liant les couches S2 et G. Les xyloglucane endotransglucosylases/

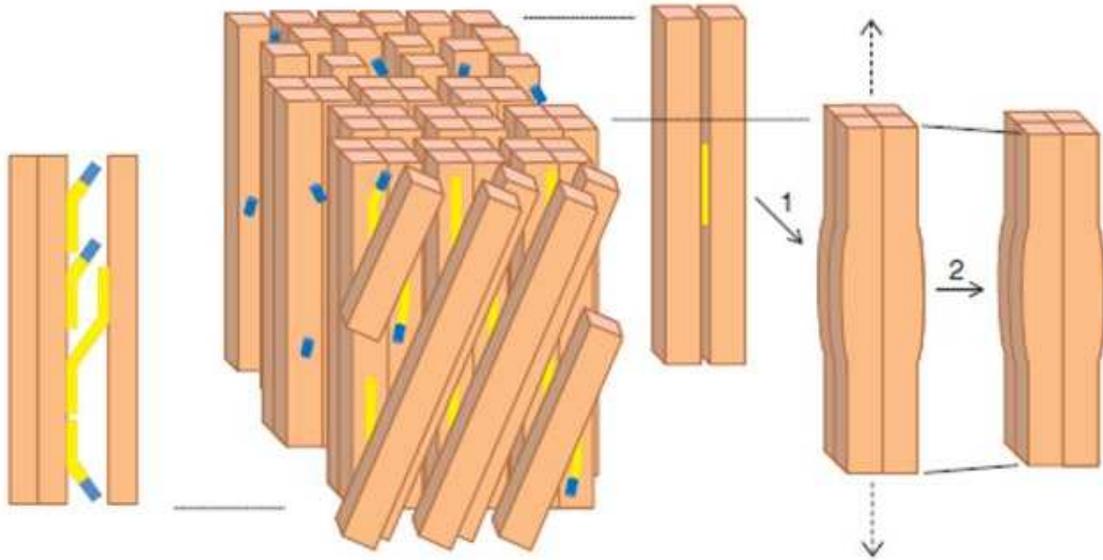


Figure 14 : Modèle de l'attachement de la couche G à la couche S2 proposant le rôle des XGs (en jaune), des XTHs (en bleu) et des fibrilles de cellulose (en beige) dans le développement des forces élastiques au cours de la formation du bois de tension. La couche S2 correspond aux microfibrilles inclinées. La couche G correspond quant à elle aux fibrilles agencées en agrégats de 4 microfibrilles orientées verticalement et piégeant des XGs (1). Cela induit des stress élastiques longitudinaux conduisant au raccourcissement des microfibrilles (2). Les XGs lient de plus S2 et G (à gauche du schéma), et les XTHs saturent ce polysaccharide pour lui permettre de se reconnecter rapidement aux microfibrilles lors de ruptures mécaniques. Par transglycosylation, les XTH induisent la réparation des liaisons entre XGs et microfibrilles.

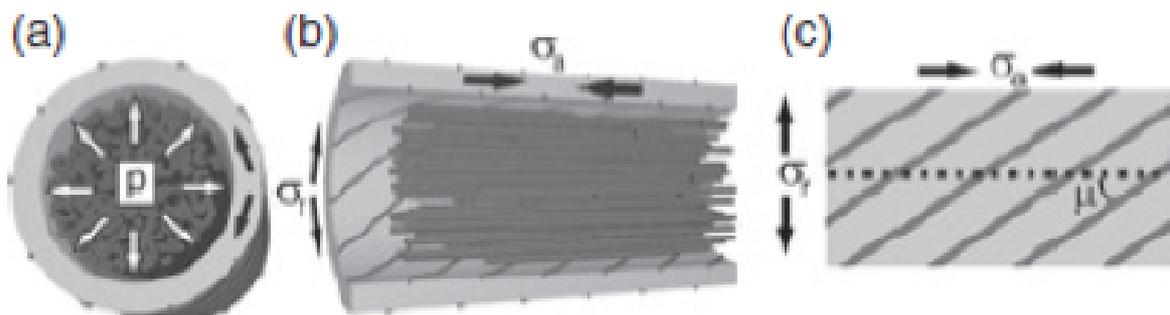


Figure 15 : Modèle de développement du stress élastique dans les fibres G du bois de tension. A : Pression p générée par le gonflement de la couche G sur toute la surface de S2. B : Le stress circonférentiel (σ_r) est converti en stress élastique axial (σ_a) dans S2. C : Le rapport σ_a/σ_r est gouverné par la direction des fibrilles de cellulose de la paroi. L'AMF est indiqué schématiquement par les lignes inclinées de la paroi (d'après Goswami *et al.*, 2008).

hydrolases (XTHs) responsables de l'activité XET permettraient de connecter rapidement les XGs lors de ruptures mécaniques dues au stress de maturation (Fig. 14). En effet, Nishikubo *et al.* (2007), suggèrent que cette enzyme peut maintenir l'intégrité mécanique de la couche G. De plus, les AGPs détectées au sein de la couche G pourraient aussi promouvoir l'activité XET (Mellerowicz *et al.*, 2008).

A l'inverse, pour Bowling et Vaughn (2008), ne trouvant pas ou quasiment pas de XGs au sein de la couche G mais des quantités significatives d'AGPs et de RG-I, la source des forces générées par le bois de tension dans la couche G résiderait dans ces deux derniers polymères non-cellulosiques. Etant donné qu'ils sont trouvés dans d'autres tissus de plantes où un gonflement se produit (exemple : graines d'*Arabidopsis thaliana* s'entourant d'un halo de mucilage dont le composé pectique correspond principalement aux RG-I ; Macquet *et al.*, 2007), les auteurs proposent qu'ils agissent par des forces contractiles sur les microfibrilles de cellulose pour générer la force de tension nécessaire à la courbure des tiges inclinées.

Une autre théorie, suggérant un gonflement de la couche G, a été proposée (Goswami *et al.*, 2008). Par analyse des déformations obtenues entre du bois de tension avec couche G et le même bois de tension dont la couche G a été éliminée par traitement enzymatique, une sévère élongation axiale et une rétraction radiale ont été observées. L'hypothèse selon laquelle la couche G agit indirectement sur la contractilité des fibres de peuplier a donc été émise. En effet, son gonflement forcerait la couche S2 à se contracter suivant un axe longitudinal (couche S2 : AMF élevé ; couche G : AMF proche de 0° ; Fig. 15). Il est donc question dans cette théorie de l'orientation des microfibrilles de cellulose et non de leurs propriétés contractiles comme précisé par Clair *et al.* (2006b). En effet, si l'AMF est important dans la contraction, il ne peut y avoir de contraction par les fibres de cellulose dans la couche G. En revanche la couche S2 possédant un AMF plus grand (environ 36°), une contraction peut s'y développer. Cette idée rejoint celle développée par Burgert et Fratzl (2009) où les plantes contrôlent les propriétés et la position de leurs organes à travers l'orientation des fibrilles de cellulose des parois cellulaires (Fig. 16).

Finalement, une propriété de la couche G révélée il y a très peu de temps pourrait améliorer la compréhension des mécanismes responsables des forces générées dans le bois de tension. D'après les résultats d'isothermes d'adsorption-désorption de l'azote par le bois de tension ayant subi la dessiccation au point critique, la couche G peut être considérée comme un hydrogel dont la mésoporosité a été estimée entre 2 et 50 nm chez le châtaignier. Il a ainsi été déterminé que le bois de tension présente une mésoporosité plus de 30 fois supérieure à

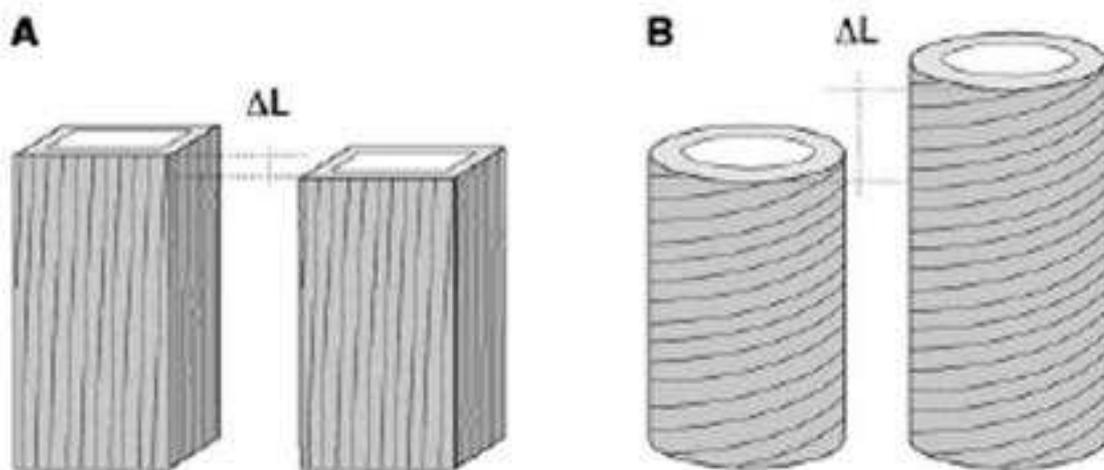


Figure 16 : Représentation schématique de la déformation des cellules contenant des fibrilles de cellulose inextensibles dans leur paroi durant le gonflement. A : Parois avec un AMF peu important. B : Paroi avec un AMF important. Durant le gonflement, l'allongement axial est positivement corrélé avec l'AMF (d'après Burgert et Fratzl, 2009).

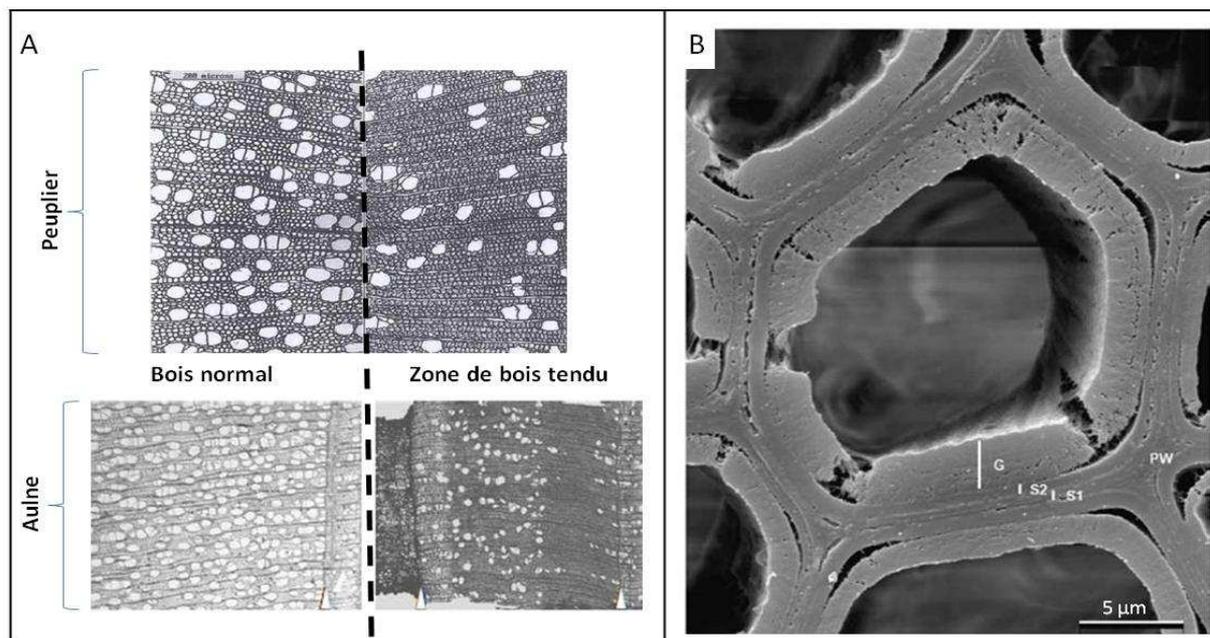


Figure 17 : A : Comparaison de la porosité entre bois normal et bois tendu sur coupes transversales de peuplier euraméricain (*Populus euramericana* cv « Ghoy » ; 1^{ère} saison de végétation) et d'aulne glutineux (*Alnus glutinosa* ; d'après Jourez, 1997a ; Heinrich *et al.*, 2007). B : Micrographie d'une fibre de bois de tension de peuplier présentant une épaisse couche gélatineuse (G). S1 et S2 : strates de la paroi secondaire ; PW : paroi primaire et lamelle moyenne (d'après Pilate *et al.*, 2004a).

celle du bois normal (Clair *et al.*, 2008). Aussi, suivant une étude portant sur 6 espèces tropicales, les bois de tension présentant d'épaisses couches G possèdent une forte mésoporosité comparée à ceux avec une fine couche G, tandis que les bois sans couche G montrent une mésoporosité environ égale à celle du bois normal (Chang *et al.*, 2009). La mésoporosité de la couche G associée à l'hydratation des composés pariétaux pourrait permettre de maintenir les propriétés mécaniques et contractiles du bois (Ha *et al.*, 1997). Les molécules d'eau jouent en effet un rôle crucial dans les propriétés rhéologiques et les modifications des interactions entre les composés pariétaux (Foster *et al.*, 1996). En revanche, si la teneur en cellulose n'est pas différente entre une couche G épaisse et fine, cela permettrait d'expliquer pourquoi ces deux types de strate provoquent des mêmes stress élastiques de croissance (Chang *et al.*, 2009). Ces auteurs suggèrent de plus que plusieurs mécanismes pourraient participer aux fortes contraintes et que ceux-ci diffèrent entre les espèces ou à l'inverse sont communs.

III. Modifications anatomiques du bois de tension

1. Les facteurs discriminants

Anatomiquement, ce bois se distingue du bois opposé principalement : (i) par une diminution du nombre de vaisseaux (Fig. 17A), (ii) par un regroupement des vaisseaux, (iii) par une longueur des fibres et des vaisseaux qui est significativement plus importante (Jourez *et al.*, 2001) et (iv) par la mise en place d'une couche pariétale gélatineuse (couche « G ») généralement épaisse au niveau des fibres en différenciation (Fig. 17 B).

Cependant, ces caractéristiques restent générales au regard des différents travaux proposés dans la littérature. Ruelle *et al.* (2006) ont en effet discriminé le bois opposé et le bois tendu en partie sur des critères anatomiques à partir d'un panel de 21 espèces tropicales présentant ou non une couche gélatineuse. Il en résulte que seule la diminution de la fréquence des vaisseaux du bois de tension apparaît comme un critère significatif présent chez tous les individus. Le regroupement des vaisseaux, dans une moindre mesure, semble aussi être un caractère souvent rencontré dans le bois de tension. Tous les autres critères (forme et surface des vaisseaux, diamètre des fibres et épaisseur des parois) ne représentent en revanche aucune tendance généralisable. Une étude conduite par Heinrich *et al.* (2007), visant à détecter les réponses de croissance de l'aulne et du hêtre suivant l'application de différents

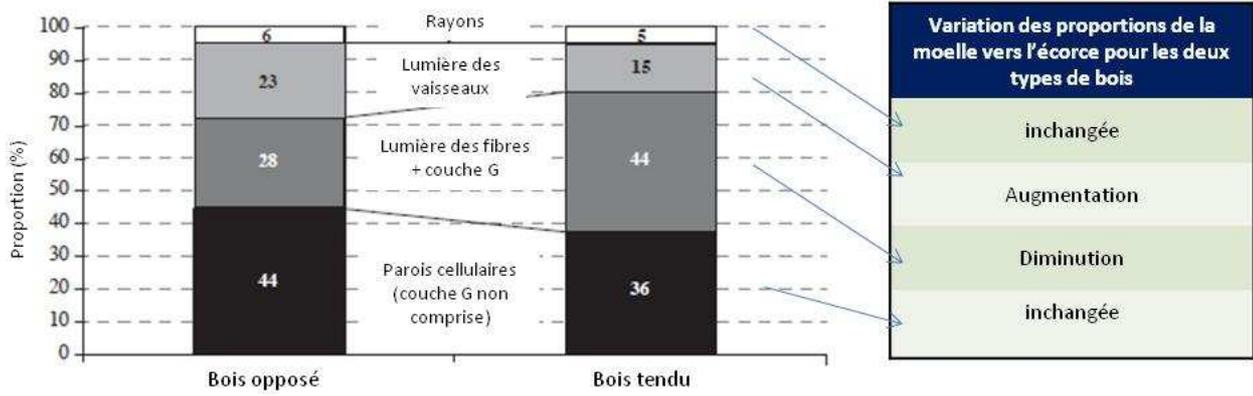


Figure 18 : Représentation graphique de la proportion des différents éléments suivant le type de bois. Résultats obtenus à partir d'analyses d'images de coupes transversales effectuées chez le peuplier euraméricain (d'après Jourez *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Divergences anatomiques entre bois tendu et bois opposé chez le peuplier euraméricain (*Populus euramericana* cv « Ghoy » ; d'après Jourez *et al.*, 2001). ↗ = augmentation, ↘ = diminution, BT : Bois Tendu ; BO : Bois Opposé.

	Type de traitement	Evolution bois tendu/ bois opposé	Observations	Bois tendu Evolution de la moelle vers l'écorce	Bois opposé Evolution de la moelle vers l'écorce	Observations
Fibres	Longueur	Macération	+4,5%	↗	↗	
	Diamètre externe	Macération	Dépend de la localisation sur le plan radial	↘	↗	
Éléments de vaisseaux	Longueur	Macération	+2,6%	↗ (+3,1%)	↗	
	Diamètre externe	Macération	+3,7%	↘ (-17%)	↘	
	Surface de la lumière	Section transversale	+5%	↘	↘	La surface des vaisseaux isolés est plus importante que celle des vaisseaux regroupés
	Fréquence	Section transversale	-33%	↗	↗	
	Porosité	Section transversale	-29%	↗	↗	
	Diamètre maximum	Section transversale	+4%	= puis ↘ quand proche de l'écorce	= puis ↘ quand proche de l'écorce	
	Diamètre minimum	Section transversale	+2%	= puis ↘ quand proche de l'écorce	= puis ↘ quand proche de l'écorce	
	Index de regroupement	Section transversale	+6%	↗	↗	Plus on se rapproche de l'écorce, plus les vaisseaux se regroupent
	Index de forme	Section transversale	+14%	↗	↗	Indique une forme plus circulaire pour les vaisseaux du bois opposé
Rayons ligneux	Nombre par mm	Section tangentielle	+8,5%	=	=	
	Taille (nombre de cellules)	Section tangentielle	-6,5%	↘	↘	

stress mécaniques (inclinaison, blessure, suppression de certaines parties de l'arbre, ...) indique que plus la sévérité du stress soumis est importante, plus il y a dépôt de matériel pariétal et moins la lumière des fibres est grande. Une variation du volume du lumen des vaisseaux semble aussi liée aux traitements appliqués à ces deux espèces (Heinrich *et al.*, 2007). Chez de jeunes peupliers euraméricains (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'), Jourez *et al.* (2001) ont conclu que la formation du bois sous stimulus gravitationnel (inclinaison des plants de 30° par rapport à la verticale) subit des modifications développementales cellulaires à la fois au cours de la différenciation (nombre d'éléments de vaisseaux, de fibres et de rayons ligneux) et au cours de la maturation (dimension des cellules, de leur longueur et de leur lumière). Ces observations, rassemblées dans la figure 18 et le tableau 1, ont été obtenues à partir de multiples mesures réalisées sur des prélèvements effectués à proximité de la moelle ou de l'écorce dans les zones tendues et opposées.

Ainsi, au vu de la grande variabilité entre les espèces végétales et des réponses de croissances divergentes au sein d'une même espèce, il apparaît difficile de trouver des caractères anatomiques spécifiques du bois de tension. Seule la diminution de la fréquence des vaisseaux et l'augmentation de leur regroupement semblent être corrélés à la formation de ce bois. Ces deux paramètres suggèrent ainsi une mobilisation des ressources pour l'établissement de structures de soutien au détriment des éléments de conduction (Heinrich *et al.*, 2007 ; Jourez *et al.*, 2001).

2. La couche G : autre facteur discriminant du bois de tension ?

Comme cité précédemment, un autre aspect du bois de tension repose généralement sur la présence de la couche G au sein des fibres. Elle se forme notamment en remplacement de la couche S3 de la paroi secondaire (Onaka, 1949) et peut parfois se substituer à la couche S2 voire S1 chez quelques espèces comme le frêne de Mandchourie (*Fraxinus mandshurica* ; Prodhan *et al.*, 1995). Chez le genre *Populus*, elle est formée à la suite d'une fine couche S2 développée (Araki *et al.*, 1983). Etant donné les variantes structurales rencontrées, une classification rassemblant les 3 formes de paroi secondaire est proposée : S1+S2+S3+G, S1+S2+G et S1+G (Dadswell et Wardrop, 1955 ; Saiki et Ono, 1971). Il existe de plus un autre type de paroi secondaire récemment observé chez deux espèces de la famille des Flacourtiacées : *Casearia javitensis* et *Laetia procera* (Clair *et al.*, 2006c). Cette paroi atypique dans la zone de bois de tension est constituée de plusieurs strates comme le montre la figure

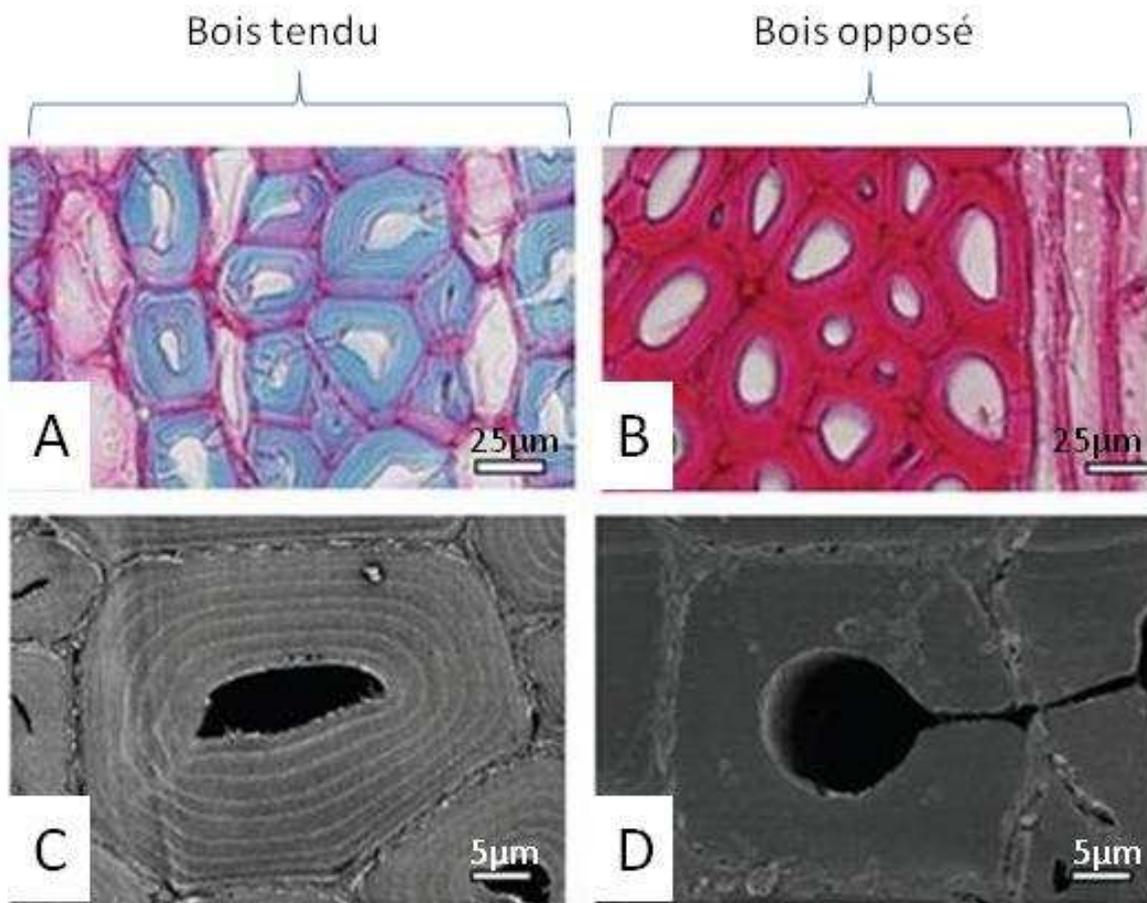


Figure 19 : Photos de la paroi secondaire atypique du bois de tension observée chez *Laetia procera*. Sections transversales du bois de tension et du bois opposé après coloration safranine/vert intense (A et B) ou observation au microscope électronique à balayage (C et D). Les différentes strates sont uniquement visibles au sein de la zone tendue. Une différence de lignification est observée entre les deux types de paroi grâce au colorant (d'après Ruelle *et al.*, 2007a).

19. Une caractérisation plus fine de cette nouvelle structure a été réalisée par Ruelle *et al.* (2007a). Ils observent que les différentes strates sont alternées et d'épaisseurs variables : 5 à 6 fines couches séparées par des couches parfois 10 fois plus épaisses. Les fines couches sont ressemblantes à S3, présentent des microfibrilles de cellulose peu organisées avec un AMF plus grand que dans les couches épaisses. Une lignification moindre que dans la couche S2 du bois opposé est détectée mais elle apparaît cependant plus importante que dans la couche G habituelle, surtout au sein des fines strates.

La répartition spatiale de la couche G au sein d'une fibre apparaît quant à elle homogène en épaisseur lors des premiers stades de formation de la paroi. En revanche, à maturation, cette couche G est plus épaisse dans la partie axiale de la fibre (Okumura *et al.*, 1977).

Outre cette répartition des strates au sein des fibres, de nombreuses données renseignent aussi sur la localisation et la distribution de la couche G inter et intra-espèces. Il apparaît ainsi une grande variabilité dans ce domaine. En effet, hormis le bois de tension, cette strate atypique peut également être retrouvée dans les fibres phloémiennes de certaines plantes dont le lin (*Linum usitatissimum* ; Salnikov *et al.*, 2008 ; Gorshkova et Morvan, 2006) et chez certaines essences résineuses comme l'épicéa (*Picea sp.*), le sapin (*Abies sp.*) et le pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L. ; Jacquot et Trénard, 1974). De plus, certaines angiospermes développent un bois de tension ne possédant pas de couche gélatineuse, tel est le cas de l'eucalyptus hybride et du cerisier (Baillères *et al.*, 1995 ; Yoshida *et al.*, 2000). Cette absence de fibre gélatineuse ou fibre G (fibre possédant une couche G) ne demeure pourtant pas exceptionnelle puisque sur un échantillonnage de 122 espèces de dicotylédones ligneuses réparties en 46 familles, seule 56 espèces (46%) présentent une couche G distincte (Fisher et Stevenson, 1981). Dans le même ordre de valeur, Grzeskowiak *et al.* (1996) estiment à 50% le nombre d'espèces feuillues développant des fibres gélatineuses.

Ainsi, au vu de ces données, la couche G ne représente pas spécialement un caractère typique du bois de tension, mais elle est souvent considérée comme telle chez le peuplier ou le hêtre (Clair *et al.*, 2003). De plus, il est à préciser que son absence chez certaines espèces n'exclut pas des artéfacts d'observations qui pourraient être dus au choix des échantillons. En effet, les zones « tendues » sont parfois localisées dans de petites portions de la tige à la fois sur des plans radial et longitudinal qui peuvent ne pas être choisies lors de l'échantillonnage. De plus, il se peut que certaines espèces développent des fibres G en trop faible quantité pour être détectée ou dans des conditions extrêmes de croissance (Jourez, 1997a). Il est aussi probable

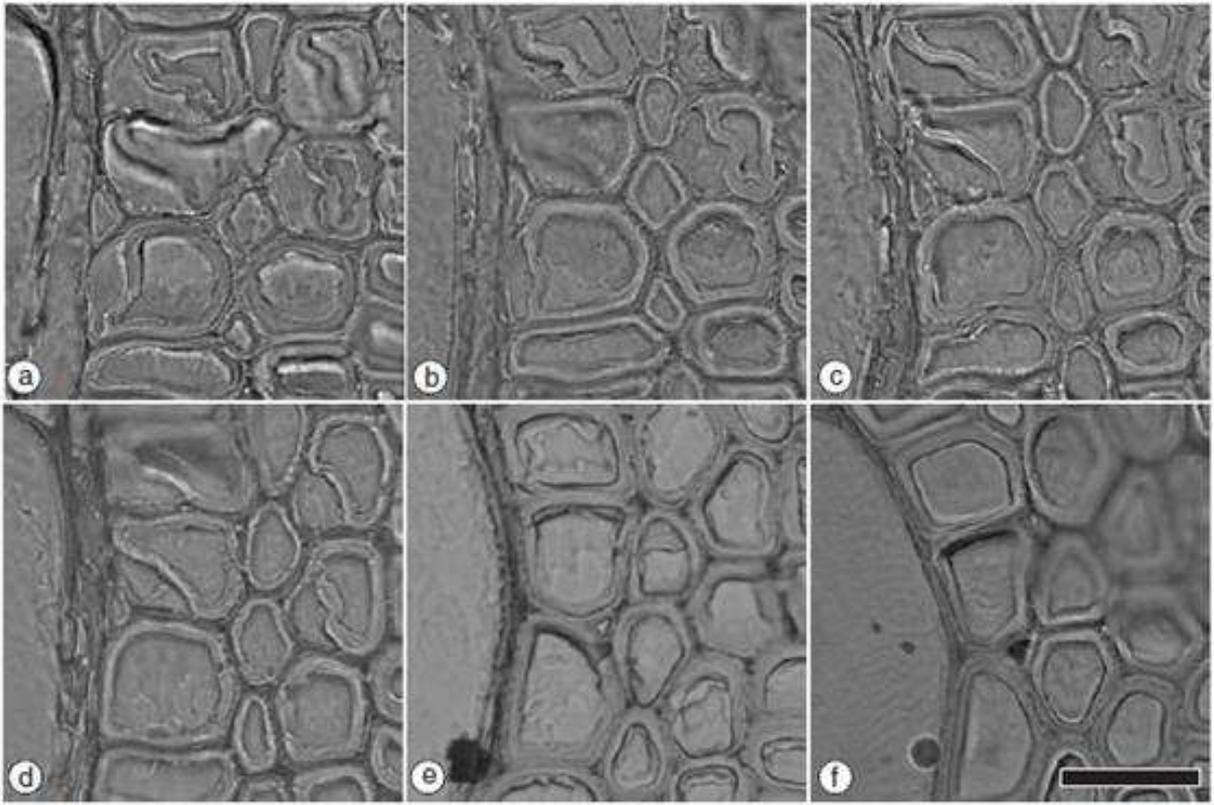


Figure 20 : Mise en évidence de la cohésion entre la couche gélatineuse et le reste de la paroi. Chacune des photographies correspond à une section transversale de tige séchée (105°, 6h) de *Populus euramericana* effectuée à des distances déterminées de la section de référence. Eloignement par rapport à celle-ci : a = 10 μm , b = 16 μm , c = 34 μm , d = 50 μm , e = 96 μm , f = 150 μm (d'après Clair *et al.*, 2005).

que la couche G soit un caractère évolutif qui n'a pas été choisi par toutes les espèces. En effet, Necessary (1955) affirme que le bois de tension serait plus fréquent dans les familles dont la structure anatomique est peu spécialisée (cité par Jourez, 1997a). Finalement, il a souvent été pensé que cette couche ne pouvait pas « conduire » les tractions longitudinales du bois de tension étant donné son décollement aux autres couches généralement observé lors de coupes transversales. Ceci laisse présager une faible cohésion entre cette dernière et les autres strates de la paroi. Cependant, contrairement à cette idée, le frêne présente une couche G fortement attachée à la couche S1 (Prodhan *et al.*, 1995). Ceci converge avec les récents travaux de Clair *et al.* (2005) dans lesquels ils démontrent que l'hypothèse de « faible cohésion » est le résultat d'un artefact expérimental. En effet, ce détachement n'est visible uniquement qu'à la surface des coupes réalisées mais disparaît au sein de l'échantillon à partir d'un éloignement d'environ 100 μm (Fig. 20).

Tout en tenant compte des artefacts expérimentaux potentiels ou d'un critère évolutif particulier, il reste néanmoins difficile d'établir un modèle dans lequel la couche G joue à elle seule un rôle essentiel dans la restauration de la rectitude des arbres. Plusieurs travaux soutiennent plus ou moins indirectement cette hypothèse en définissant la couche G comme le (ou un) site de genèse du retrait longitudinal (Arganbright *et al.*, 1970 ; Clair et Thibaut, 2001 ; Yoshida *et al.*, 2002b ; Clair *et al.*, 2003 ; Washusen *et al.*, 2003 ; Yamamoto *et al.*, 2005 ; Fang *et al.*, 2008). Pour exemple, l'observation par microscopie à force atomique a permis de mettre en évidence que les forces de tractions longitudinales sont plus fortes dans la couche G (4,7%) que dans les autres couches pariétales (Clair et Thibaut, 2001). Suivant la même logique, aucune fibre G n'est observée pour des DRLM inférieures à 0,06% tandis que leur proportion peut atteindre 50% dans le bois de tension pour des DRLM supérieures à 0,08%. Additionné au fait que les DRLM sont d'autant plus élevées que la couche G est épaisse, les auteurs suggèrent un rôle important de cette strate dans l'établissement des forces de traction longitudinale (Fang *et al.* 2008). Meloche *et al.* (2007) étudient quant à eux le mécanisme d'enroulement des vrilles chez *Brunnichia ovata* (Walt.) Shiners. Cette plante produit en effet des fibres possédant une couche similaire à la couche G, impliquée dans l'enroulement des vrilles.

A l'inverse, d'autres travaux contredisent cette première hypothèse (Norberg et Meier, 1966 ; Clair *et al.*, 2006c). En effet, chez le genre *Eucalyptus*, les fibres ne possèdent pas de couche G mais ont des parois secondaires différentes comparées aux fibres de bois normal

(Baillères *et al.*, 1995 ; Qiu *et al.*, 2008). Pour Boyd (1977), les retraits longitudinaux observés dans le bois de tension seraient dus aux microfibrilles de cellulose de la couche S1.

Ainsi, quelles que soient les hypothèses formulées, il existe des corrélations entre la présence de fibres G et l'amplitude des forces élastiques dans le bois (Yoshida *et al.*, 2000). Il en résulte néanmoins que cette strate spécialisée n'apparaît pas comme le seul déterminant de l'induction des stress de croissance chez ces plantes (Fisher et Stevenson, 1981 ; Okuyama *et al.*, 1994, Yoshida *et al.*, 2000). Il reste toutefois à noter que chez le tulipier de Virginie (*Liriodendron tulipifera* L.), Yoshida *et al.* (2002b) n'observent pas de couche G mais une strate S2 ressemblant à cette dernière (diminution de la teneur en lignine et de l'AMF, augmentation de la teneur en cellulose). Ce serait donc la composition moléculaire particulière de la dernière strate pariétale qui interviendrait dans le redressement des tiges.

Outre les retraits macroscopiques longitudinaux, quelques études se sont portées sur les retraits transversaux des cellules xylémiennes et leurs relations avec les déformations longitudinales de maturation du bois de tension (sur le plan radial et tangentiel). Washusen et Ilic (2001) rapportent de forts retraits transversaux dans le bois de tension à la différence d'Arganbright *et al.* (1970) et de Barefoot (1963, cité par Fang *et al.*, 2007) chez l'érable (*Acer saccharinum* L.) et le tulipier de Virginie (*Liriodendron tulipifera* L.), respectivement. Suivant une méthode de mesure préservant la couche G dans son «contexte cellulaire», Fang *et al.* (2007) ont pu observer que des retraits transversaux de fibres G de peuplier euraméricain (*Populus euramericana* cv. I4551) sont corrélés négativement avec les déformations de croissance et qu'ils ne sont pas significativement dépendants de la couche G mais plutôt des autres couches pariétales.

En conséquence, la couche G peut apparaître seulement dans certains cas comme un facteur essentiel à l'établissement des paramètres mécaniques du bois de tension. Cependant, les autres éléments de structure et surtout d'ultrastructure du bois doivent aussi être regardés de manière complémentaire pour expliquer les différences physiques et mécaniques entre bois normal et bois de tension (Jourez, 1997a). Néanmoins, il semblerait que l'organisation macromoléculaire de la paroi secondaire au sein des cellules xylémiennes est effectivement largement responsable des propriétés mécaniques du bois (Ruel *et al.*, 2006). Etant donné toutes les divergences observées, il suffit peut être de concevoir la couche G comme une structure présente uniquement chez certaines espèces et qui par sa présence agit directement ou indirectement en synergie avec les autres couches de la paroi secondaire pour participer à l'effort de courbure. Son absence chez certains végétaux serait alors compensée par des

modifications biochimiques et structurales des couches composant ces parois secondaires (Baillères *et al.*, 1995 ; Qiu *et al.*, 2008).

Dans notre modèle d'étude, le bois tendu de peuplier se caractérise par la présence de fibres G. C'est pourquoi un état des lieux de la structure et la composition de la couche G est proposé dans les parties suivantes.

IV. Paroi secondaire et couche G

La couche G, généralement remplaçante de la couche S3 chez plusieurs plantes, est considérée comme une structure intégrante de la paroi secondaire. Bien que celle-ci soit de constitution très particulière, elle reste néanmoins la couche finale se mettant en place lors de la formation du bois de tension chez certaines espèces. Outre cette couche, le reste de la paroi secondaire est aussi le lieu de modifications moléculaires.

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur la caractérisation moléculaire et histologique de la couche G en relation avec les strates sous-jacentes. Les aspects structuraux du reste de la paroi secondaire, notamment ceux de certaines hémicelluloses (xylanes et xyloglucanes), seront abordés sous forme de sous-parties introductives du chapitre Résultats (parties II et III respectivement).

1. Les lignines

Par comparaison entre bois tendu et bois opposé, la teneur en lignine est généralement admise comme plus faible chez le premier. Cependant, suivant la structure pariétale considérée, cette affirmation apparaît fautive lorsque l'on considère la paroi secondaire des vaisseaux, des fibres et des couches S1 et S2 des fibres G. Ainsi, le faible taux de lignification ne doit pas s'appliquer à la globalité du bois de tension mais uniquement à la couche G (Timell, 1969 ; cité par Pilate *et al.*, 2004a). Chez le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) et l'érable du Canada (*Acer rubrum*), la couche G est décrite comme une structure composée essentiellement de microfibrilles de cellulose cristalline, mais dépourvue de lignines (Blanchette *et al.*, 1994). Néanmoins, si la lignification de la couche G est réduite, la présence de ce polymère y a été montrée : (i) sur des coupes transversales de frêne (*Fraxinus mandshurica*) après coloration au permanganate de potassium (Prodhan *et al.*, 1995), (ii) chez le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*) par une technique de micro-spectrophotométrie

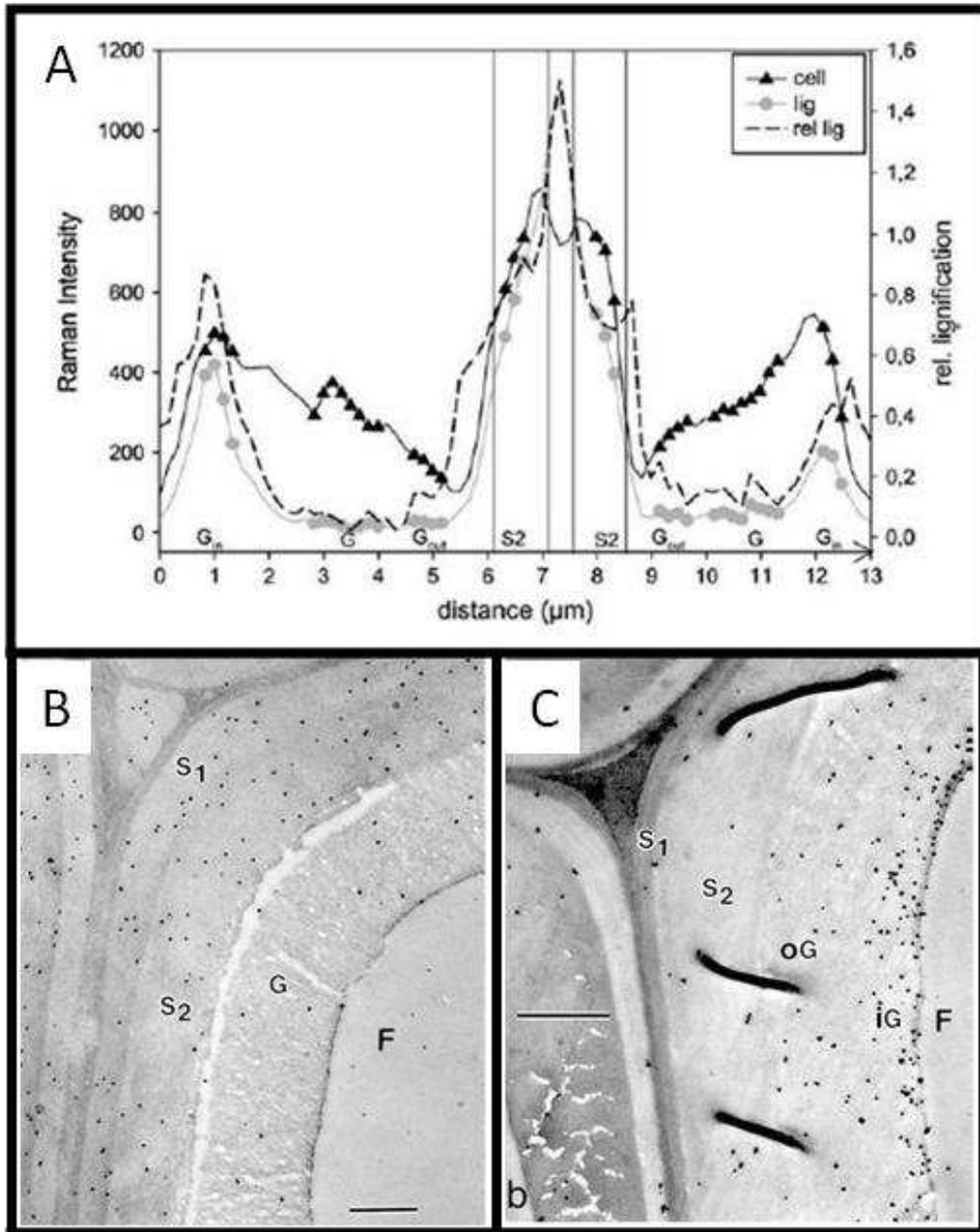


Figure 21 : Mise en évidence de la présence de lignine dans la couche G. A : Spectre Raman indiquant l'intensité de distribution des lignines (lig), de la cellulose (cell) et de la lignification relative (rel lig ; rapport des intensités lignine/cellulose) au sein de la paroi cellulaire des fibres G chez le peuplier (d'après Gierlinger et Schwanninger, 2006). B et C : Immunomarquage à l'or des lignines de type G et S (respectivement) au sein des fibres G du bois de tension de peuplier (d'après Joseleau *et al.*, 2004). Les lignines de type G sont distribuées de manière homogène dans S1 et S2 et sont peu présentes dans la couche G. Les lignines de type S sont plus présentes dans la couche G que celles de type G et plus particulièrement dans la zone la plus proche de la lumière cellulaire. F = fibre ; G = couche G ; S1 et S2 = strates de la paroi secondaire. Barres d'échelle = 0,5 μm pour B et 1 μm pour C.

UV (Yoshida *et al.*, 2002a), (iii) chez le peuplier (*Populus nigra* x *Populus deltoides*), le hêtre, le chêne et l'érable (*Fagus sylvatica*, *Quercus robur* L. et *Acer spp.*, respectivement) *via* la microscopie confocale Raman (Gierlinger et Schwanninger, 2006 ; Lehringer *et al.*, 2008 ; Fig. 21 A) et chez le peuplier (*Populus deltoides*) par immunomarquage à l'aide d'anticorps (Ac) spécifiques dirigés contre certains épitopes (pools d'unité guaiacyl (G), pools d'unité syringyl (S) et des pools d'unité guaiacyl–syringyl (GS)) de la lignine (Joseleau *et al.*, 2004 ; Fig. 21 B et C).

Il apparaît ainsi que la lignification de la couche G favorise les unités S (plus forte distribution à proximité de la lumière de la cellule) et conduit à l'augmentation du rapport S/G (Pilate *et al.*, 2004a). Ces modifications qualitatives et quantitatives des lignines se retrouvent également dans les parois secondaires (couche S1 et S2) des plantes, qui soumises à des contraintes mécaniques, induisent la formation d'un bois de tension sans couche G comme l'eucalyptus et le tulipier de Virginie (Baillères *et al.* 1995 ; Yoshida *et al.*, 2002b, respectivement). A partir de toutes ces données et concernant la couche G, il reste cependant à déterminer comment des dépôts discrets et qualitativement différents de lignine peuvent moduler les forces de tension à l'intérieur de l'arbre (Joseleau *et al.*, 2004).

2. Les protéines

a) Les arabinogalactanes-protéines (AGPs)

Les AGPs constituent une classe abondante de protéines hautement glycosylées qui se caractérisent par une structure complexe et des localisations variables (Rumyantseva *et al.*, 2005). Elles appartiennent à la classe des Hydroxyproline Rich GlycoProteins (HRGPs) qui comporte en plus : les extensines, les Proline Rich Proteins (PRPs) et des lectines (Lafarguette *et al.*, 2004). Par immunomarquage avec différents Ac (JIM14, CCRC-M7, CCRC-M34) sur le bois de tension de plusieurs angiospermes ligneuses, des AGPs sont révélées au sein de la couche G. Celles-ci ne sont présentes chez le peuplier qu'en limite entre cette couche et la lumière cellulaire (Lafarguette *et al.*, 2004 ; Fig. 22), tandis qu'elles sont présentes sur toute la surface de la couche G chez le copalme d'Amérique et le micocoulier de Virginie (Bowling et Vaughn, 2008). Cependant, des réactions croisées des Ac utilisés avec les RG-I n'excluent pas la localisation de structures polysaccharidiques autres que les AGPs. L'observation de ces dernières reste toutefois en accord avec les analyses d'expression des gènes qui montrent une sur-expression importante d'une sous classe d'AGPs de type fascicline-like AGPs (FLAs)

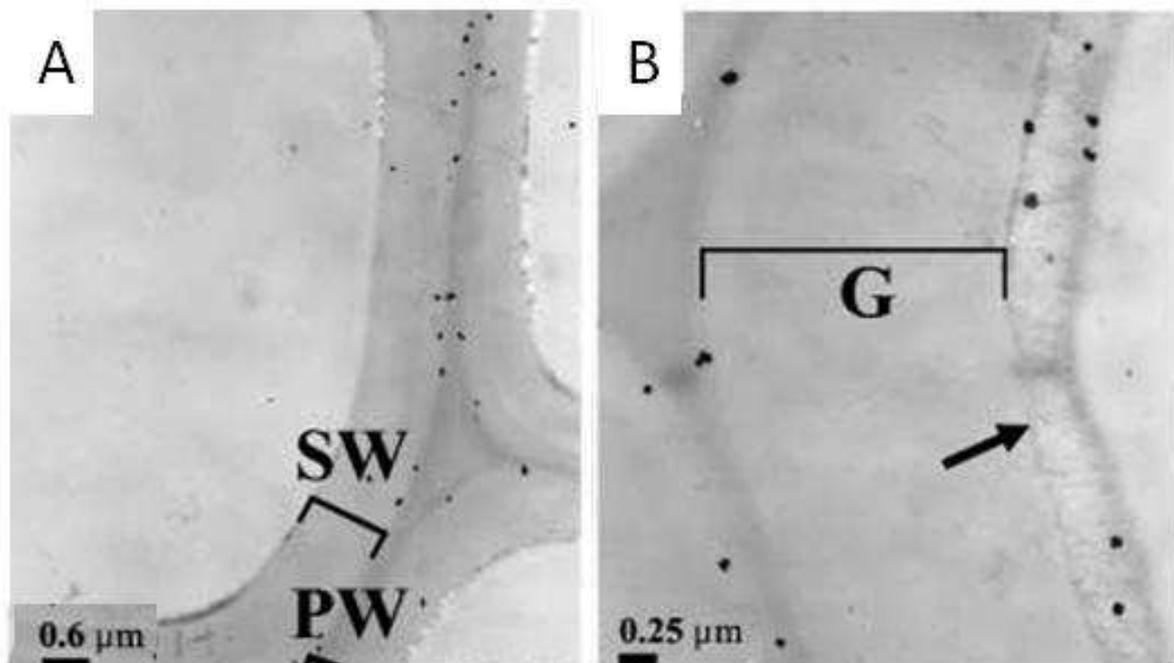


Figure 22 : Micrographies de la paroi cellulaire des bois opposé et tendu de peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4) après immunomarquage des AGPs par JIM14. A : Bois opposé, marquage de la lamelle moyenne et de la paroi primaire (PW) mais pas de la paroi secondaire (SW). B : Bois tendu, marquage identique à celui du bois opposé excepté la présence d'AGPs en bordure de la couche G (G) du côté du lumen (d'après Lafarguette *et al.*, 2004).

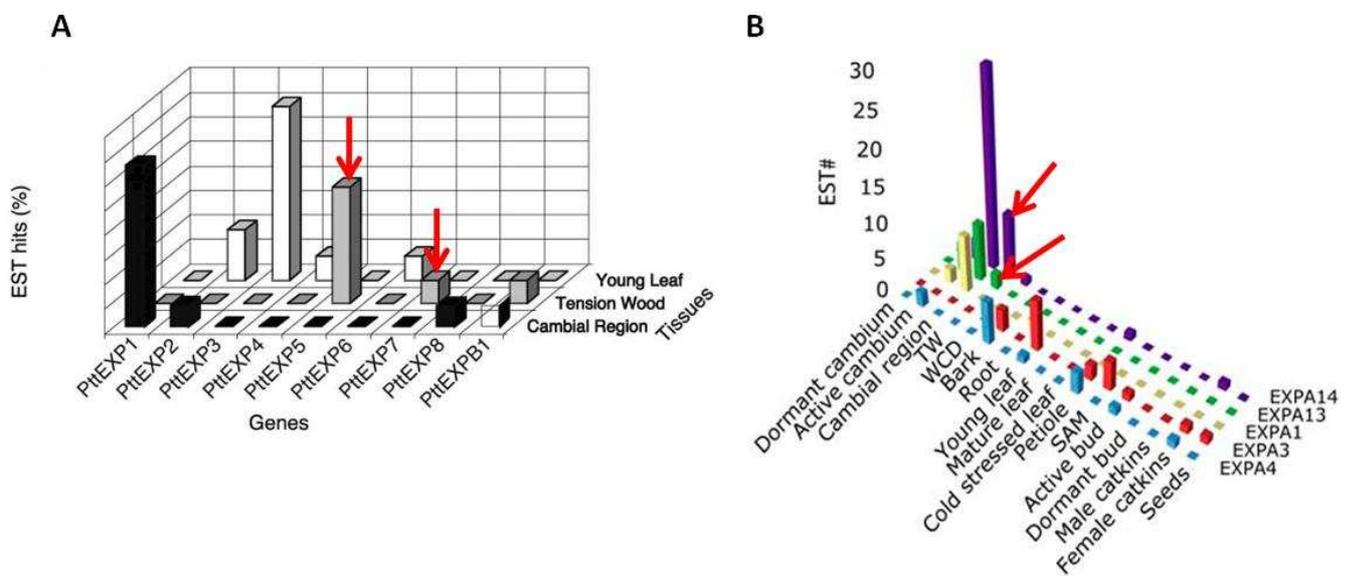


Figure 23 : Représentations graphiques du niveau d'expression des gènes codant des expansines par comparaison de la fréquence des Expressed Sequences Tag (ESTs) issus de différentes banques. A : d'après Gray-Mitsumune *et al.*, 2004. B : d'après Geisler-Lee *et al.*, 2006. TW : Bois de Tension. Les flèches rouges indiquent les gènes spécifiquement exprimés dans le BT.

dans le bois de tension (Lafarguette *et al.*, 2004). De même, une étude globale d'expression des gènes au cours de la formation du bois de tension de peuplier (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006) a permis d'identifier 24 gènes codant des AGPs dont la majorité fait partie de la classe A des FLAs et dont 22 sont similaires à FLA12 d'*Arabidopsis thaliana* (*AtFLA12*). Les FLAs se répartissent en effet en quatre classes (A-D) dont la « A » correspond à celles possédant un simple domaine fascicline flanquée de deux régions AGPs et d'un signal d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) en C-terminal (Johnson *et al.*, 2003). Ces protéines pourraient jouer un rôle soit dans la cohésion pariétale, soit dans l'élasticité de la paroi.

b) Les expansines

Les expansines, protéines non enzymatiques considérées comme acteurs pH dépendant de la croissance, ont la capacité de casser à pH acide les liaisons hydrogènes entre la cellulose et les polysaccharides associés tels les XGs et les xylanes. L'action de ces protéines couplée à la pression de turgescence facilite ainsi l'élongation cellulaire et le relâchement pariétal (Yennawar *et al.*, 2006). Leur rôle pourrait être également de réguler l'accès aux enzymes dégradant spécifiquement les composés pariétaux et/ou affecter les dépôts de polymères (revu par Gray-Mitsumune *et al.*, 2008). En considérant les propriétés de ces protéines, il peut ainsi être envisagé leur implication dans la formation du bois de tension. Cette supposition s'avère probable étant donné la présence spécifique des transcrits des gènes *PttEXP5* et *PttEXP7*, codant des α -expansines, uniquement au sein du BT (Gray-Mitsumune *et al.*, 2004 ; Fig. 23 A). Geisler-Lee *et al.* (2006) obtiennent des résultats similaires pour *PttEXPA13* et *PttEXPA14* ainsi qu'au niveau du cambium (Fig. 23 B) et Andersson-Gunnerås *et al.* (2006) identifient aussi des α et β -expansines spécifiquement exprimées dans le bois de tension par analyse globale du transcriptome chez le tremble hybride (*P. tremula* x *P. tremuloides*). Finalement, il se peut que ces protéines agissent sur la croissance dissymétrique du bois de tension par rapport au bois opposé étant donné que la sur-expression du gène *PttEXPA1* codant pour une α -expansine induit des modifications spécifiques sur le développement des éléments du bois normal de trembles transgéniques (Gray-Mitsumune *et al.* 2008). En effet, après différents types de mesures, il s'avère que ces lignées transgéniques présentent des vaisseaux légèrement plus longs (+2 à 7%) et des fibres diamétralement plus grandes (+9 à 16%) que le type sauvage.

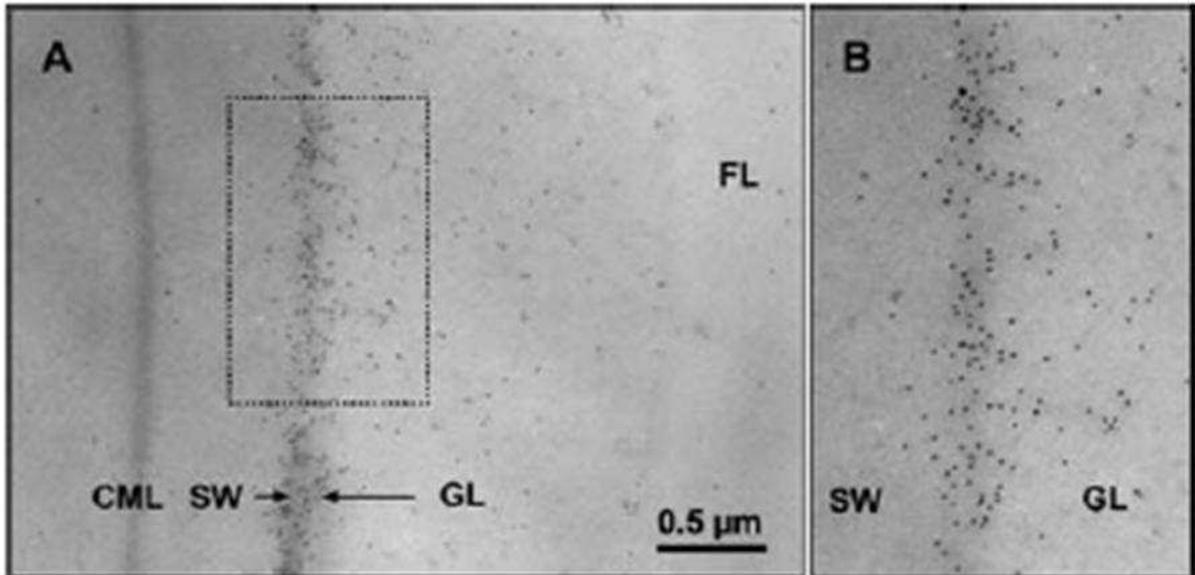


Figure 24 : Mise en évidence par immunomarquage à l'or et microscopie électronique à transmission (MET) de la présence de (1,4)- β -D-galactane entre les couches S2 et G du bois de tension de peuplier. A: micrographie de la paroi secondaire (S2 + couche G) ; B : grossissement du cadre en pointillé de A ; d'après Arend, 2008). SW : Paroi secondaire ; CML : Lamelle moyenne ; GL : Couche gélatineuse ; FL : Fibre.

c) Les extensines

De la classe des HRGPs, ces protéines sont polymérisées dans la paroi à la fin de la croissance cellulaire. Par différentes liaisons au réseau pariétal, elles en assurent sa rigidification et sont impliquées dans de nombreux aspects développementaux dont notamment la réponse aux attaques pathogènes ou lors de stress mécaniques (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1979 ; Showalter *et al.*, 1985). Cependant, aucune donnée n'est à ce jour disponible sur l'implication de ces protéines lors de la formation du BT. Il est simplement suggéré que les extensines puissent intervenir dans la liaison de la couche G à sa couche précédente étant donné la plus faible densité en microfibrilles de cellulose supposée à ce niveau (Nishikubo *et al.*, 2007). Ces auteurs précisent tout de même que d'autres polymères tels différents glycanes pourraient aussi assurer cette fonction. Cependant, malgré le manque d'informations concernant cette protéine, des essais d'immunomarquages anti-extensines ont été réalisés. L'Ac LM1 au sein des vrilles de *Brunnichia ovata* ou les Ac JIM19 et LM1 sur tige de bois tendu du copalme d'Amérique (*Liquidambar styraciflua*) montrent un signal faible voire inexistant au niveau des couches S1/S2 des fibres G respectivement (Meloche *et al.*, 2007 ; Bowling et Vaughn, 2008). JIM20, quant à lui, se fixe également au niveau des fibres des vrilles mais aucune précision n'est disponible sur les strates marquées.

d) Xyloglucane endo-transglycosidase (XET)

Des gènes codants des enzymes putatives ayant des activités XET ont été identifiés dans des banques d'ADNc produites à partir de plusieurs ARNm isolés de bois tendu de peuplier (Bourquin *et al.*, 2002 ; Takeda *et al.*, 2002 ; Dejardin *et al.*, 2004). Plusieurs gènes codant cette enzyme (*XTH16-36*, *XTH16-21*, *XTH16-14* et *XTH16-27*) ont en effet montré une surexpression dans le bois de tension de peuplier (*P. tremula* x *P. tremuloides*) et l'activité XET a également été détectée dans la couche G en développement par la technique d'incorporation *in situ* de xylogluco-oligosaccharides marqués à la sulforhodamine (Nishikubo *et al.*, 2007). Dans les fibres plus matures, cette activité se déplace de la couche G vers S2 mais les auteurs suggèrent une possible imperméabilité de la couche G empêchant son marquage par le substrat fluorescent.

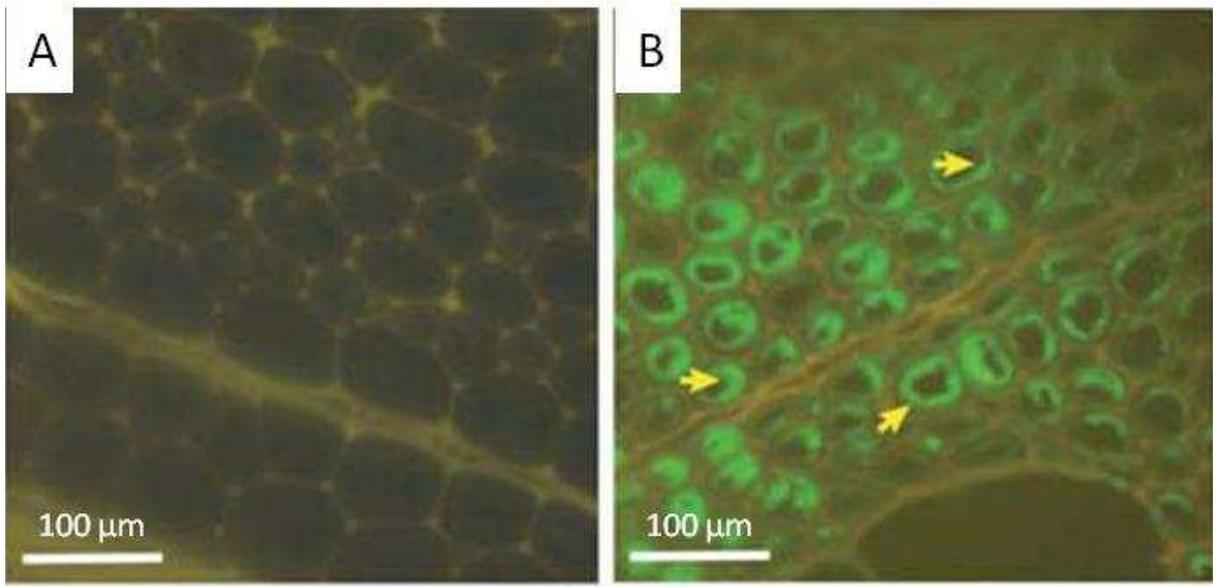


Figure 25 : Mise en évidence de la cellulose cristalline par immunofluorescence avec l'anticorps CBM1_{HjCel7A} sur coupes transversales de tiges de peuplier. A : témoin non marqué. B : marquage par l'Ac couplé à un fluorochrome. Les flèches indiquent des exemples de couches G révélées par le marquage (d'après Daniel *et al.* 2006).

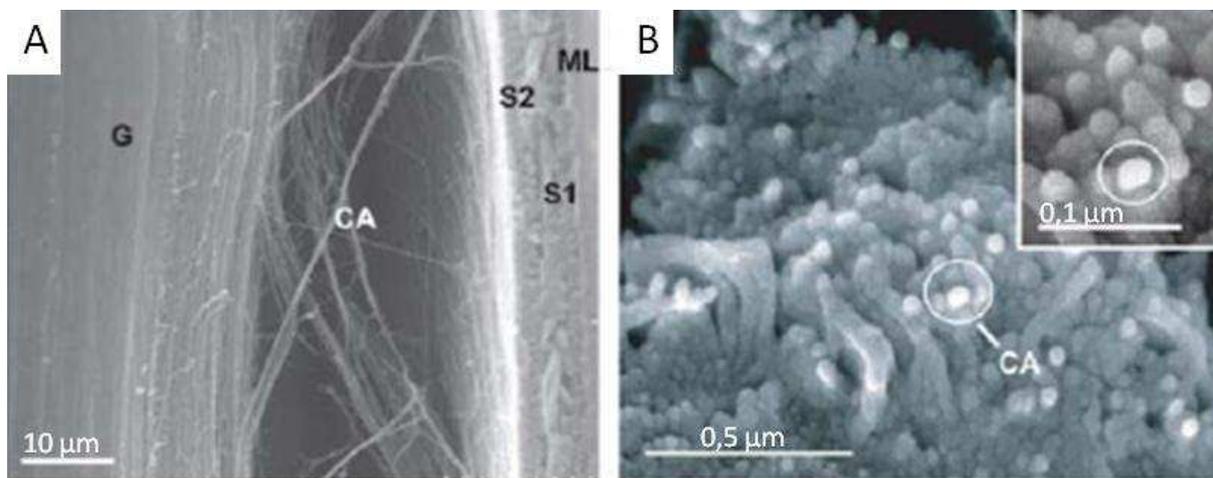


Figure 26 : Micrographies de l'ultrastructure de la couche G au niveau des fibres du bois de peuplier. Observations au FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy). A : orientation des microfibrilles de cellulose parallèle à l'axe des fibres. B : agrégats cylindriques de microfibrilles de cellulose au sein de la couche G à différents grossissements. La taille d'un agrégat est d'environ 36 nm. G : couche G ; S1, S2 : strates de la paroi secondaire ; ML : lamelle moyenne ; CA : agrégat de cellulose (d'après Daniel *et al.*, 2006).

3. Les polysaccharides pariétaux

a) Les pectines

Suivant la même approche expérimentale que précédemment, Bowling et Vaughn (2008) ont testé un large panel d'anticorps pour mettre en évidence des composés pectiques dans la couche G. Plusieurs d'entre eux, JIM14/CRCM-7, 10, 22 et 34, montrent une affinité plus ou moins localisée au sein de la couche G suggérant ainsi la présence de RG-I et d'arabinogalactanes ; ces derniers constituent souvent les chaînes latérales des RG-I. Nishibuko *et al.* (2007) mentionnent aussi une légère fraction d'arabinogalactanes II au sein de la couche G suite à une analyse biochimique des polysaccharides par chromatographie. Meloche *et al.* (2007) détectent également des RG-I grâce aux Ac LM5 et LM6 (spécifiques des $\beta(1,4)$ -galactanes et des $\alpha(1,5)$ -arabinanes respectivement) au sein de la couche G et de l'interface paroi primaire-lamelle moyenne dans les vrilles de *Brunnichia ovata*. Arend (2008) a quant à lui mis en évidence la présence de (1,4)- β -D-galactane dans la zone séparant S2 de la couche G dans le bois de tension de peuplier (Fig. 24). Cependant, ce motif glucidique peut être présent à la fois dans les pectines et dans les hémicelluloses (Jones *et al.*, 1997 ; cité par Arend, 2008).

b) La cellulose

Dans son ensemble, le bois de tension connaît une augmentation d'environ 10 à 20% de sa teneur (dépendante des espèces), comparé au bois normal (Timell, 1969). Au niveau de la couche G, celle-ci forme le polymère majoritaire et constitue environ 98% de cette strate sous forme cristalline comme le prouve l'immunomarquage réalisé par Daniel *et al.* (2006) avec l'anticorps CBM1_{HjCel7A} (Fig. 25 A et B). Elle est disposée en microfibrilles parallèles entre-elles et s'oriente suivant un angle de presque 0° par rapport à l'axe longitudinal des cellules (Fig. 26 A et 27; Norberg et Meier, 1966 ; Baillères *et al.*, 1995 ; Chaffey, 2000 ; Daniel *et al.*, 2006), tandis qu'elle forme un angle plus important dans les autres couches de la paroi secondaire (Fig. 27). Les cristaux de cellulose constituant ces microfibrilles présentent de plus des tailles différentes suivant le type de bois : 3,6 nm ou 3,31 nm dans le bois de tension et 3,2 nm ou 2,65 nm dans le bois opposé (Washusen et Evans, 2001 ; Ruelle *et al.*, 2007a respectivement). Une organisation en agrégats a également été rapportée au sein de la paroi secondaire (Fig. 26 B) mais les tailles mesurées sont variables. En effet, des valeurs d'environ 36 nm, 55 nm et 6,5 nm sont obtenues pour des agrégats de la couche G (Daniel *et al.*, 2006 ;

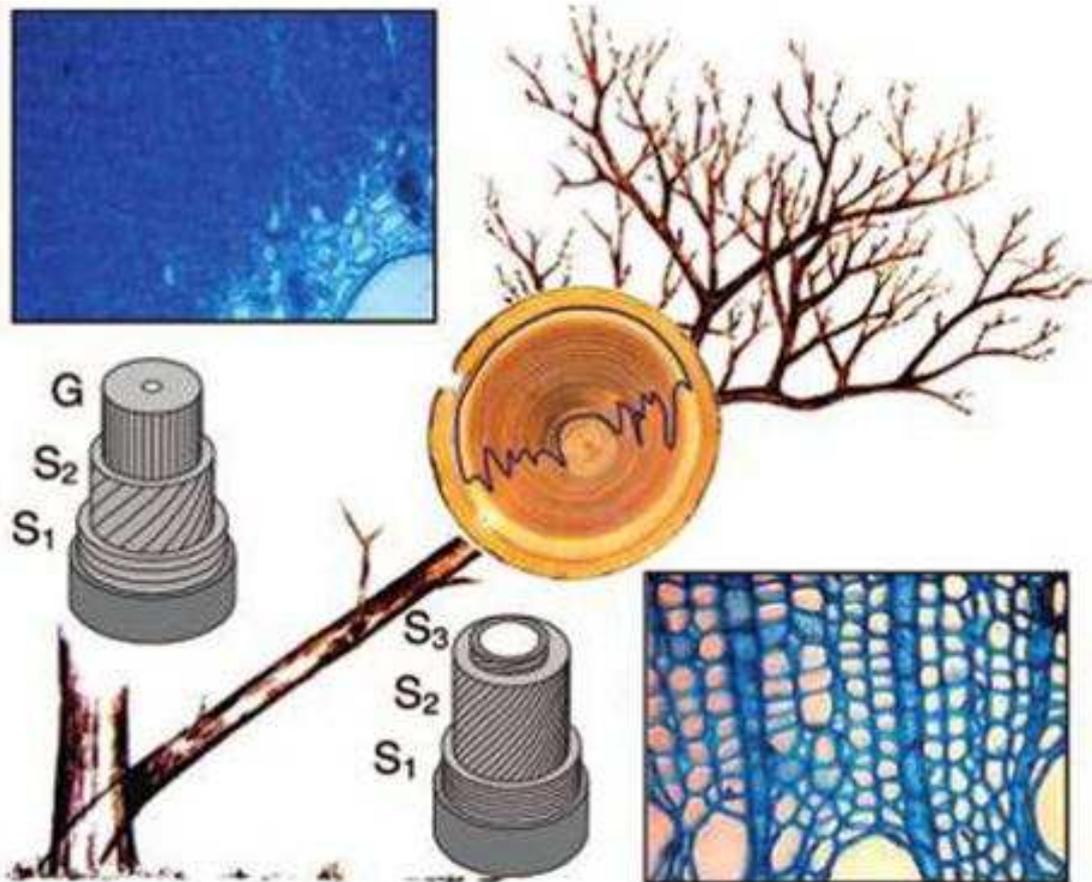


Figure 27 : Représentation schématique de la disposition et de l'angle des microfibrilles de cellulose au sein des fibres de bois tendu (face supérieure) et opposé (face inférieure). Pour chaque type de bois, une photographie de la section transversale colorée au bleu de toluidine est présentée. Dans le bois opposé, le faible AMF de S2 renforce la direction axiale tandis que le fort AMF de S1 et S3 fournit une stabilité transversale. Dans le bois tendu, une partie de S2 est remplacée par la couche G et S3 est inexistante (d'après Clair *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Composition en glucides neutres de la couche G de peuplier (*Populus alba*) isolée par sonication (d'après Nishikubo *et al.*, 2007).

Quantité relative de monosaccharides neutres (%)						
Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
0,6	1,3	0,7	5,6	2,1	1,1	88,6

Clair *et al.*, 2008 ; Müller *et al.*, 2006 ; respectivement). De plus, par opposition à la couche G, les microfibrilles de cellulose de la couche S2 peuvent avoir un diamètre plus grand ou plus petit suivant le cas (Ruelle *et al.*, 2007a ; Donaldson, 2007 ; cités par Clair *et al.*, 2008). Ainsi, il est probable que ces divergences soient la résultante de la préparation des échantillons (Clair *et al.*, 2008).

c) Les hémicelluloses

i. Xylanes

Les xylanes constituent les hémicelluloses majoritaires de la paroi secondaire des fibres ligneuses. Ainsi, plusieurs immuno-marquages à l'aide des Ac LM10 et LM11 (spécifiques des xylanes dé-arabinosylés et des xylanes arabinosylés, respectivement) montrent un fort signal au sein des couches S1 et S2 chez toutes les plantes étudiées (Bowling et Vaughn, 2008 ; Meloche *et al.*, 2007). En revanche, au sein de la couche G, la présence de ces composés n'a jamais été détectée.

ii. Xyloglucanes

Très récemment, une analyse de la composition polysaccharidique de la couche G isolée après sonication de fibres de bois tendu de peuplier (*Populus tremula*) a permis la mise en évidence de composés hémicellulosiques jamais clairement identifiés jusqu'alors (Tab. 2) comme les xyloglucanes fucosylés et non fucosylés (Nishikubo *et al.*, 2007 ; Mellerowicz *et al.*, 2008). Ces premières données ont été confortées par des observations faites en immunofluorescence à l'aide de l'Ac CCRC-M1 (Fig. 28). Cependant, si le marquage est important dans la paroi naissante, ce dernier disparaît dans la couche G mûre suggérant un masquage des épitopes par d'autres polymères. De plus, un autre marquage à l'aide du même Ac a lui aussi permis d'identifier des XGs fucosylés dans toutes les couches de la paroi secondaire (S1 et S2) dont une assimilée à une couche G des fibres des vrilles de *Brunnichia ovata* (Walt.) Shiners (Meloche *et al.* 2007).

Par opposition, des travaux d'immunohistochimie utilisant les Ac CCRC-M1 et LM15 ne font pas état de xyloglucanes et xyloglucanes fucosylés chez le copalme d'Amérique (*Liquidambar styraciflua*) et le micocoulier de Virginie (*Celtis occidentalis*) respectivement. Seuls des marquages sont observés au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire, avec toutefois une présence variable de XGs fucosylés uniquement chez le copalme au niveau

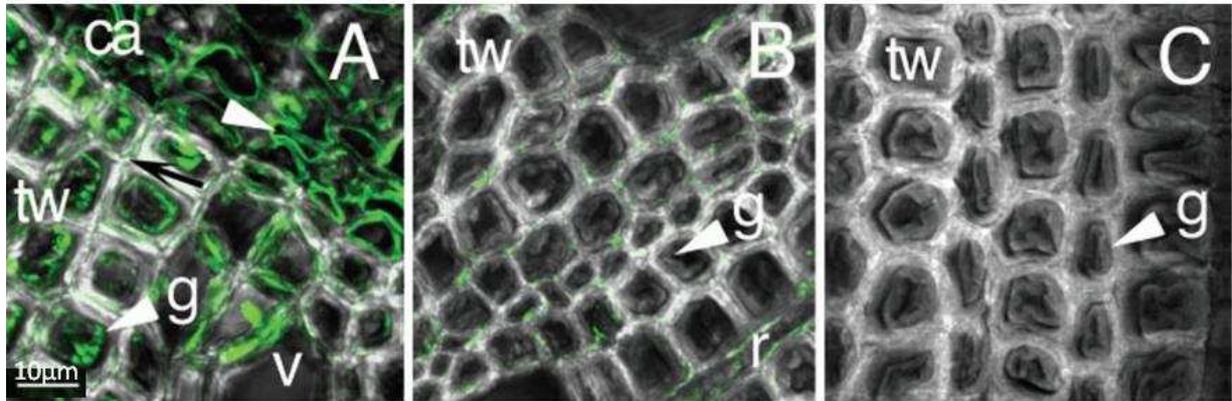


Figure 28 : Mise en évidence par immunofluorescence avec l'Ac CCRC-M1 de la présence de xyloglucanes fucosylés dans la couche G de bois de tension de peuplier (A : couche G en développement ; B : couche G mature ; C : témoin non marqué sans Ac primaire; d'après Nishikubo *et al.*, 2007).

de la zone de transition entre la couche G et le lumen (Bowling et Vaughn, 2008). Cependant, l'auteur précise que l'Ac CCRC-M1 reconnaît aussi les rhamnogalacturonanes I (RG-I) ce qui ne permet ni d'identifier clairement le polymère marqué ni de définir les XGs comme composés non-cellulosiques les plus abondants de la couche G.

iii. Les glucomannanes

Suivant la même étude que précédemment, Nishikubo *et al.* (2007) observent la présence d'approximativement 2% de 4-mannose (Tab. 2) au sein de la couche G isolé. Il y aurait ainsi présence de glucomannanes dans cette structure.

Objectifs de la thèse

En considérant la composition chimique de la couche G, les résultats actuels montrent qu'il existe une plus grande diversité de polymères que ce qui était connu jusqu'alors. La difficulté d'identification de certains d'entre eux repose notamment sur leur faible teneur au sein de cette strate, ce qui induit un obstacle supplémentaire à l'interprétation de leur(s) fonction(s). Néanmoins, la paroi cellulaire, singulière aux végétaux, peut sans aucun doute être assimilée à une structure dynamique riche en polymères divers dont les proportions peuvent varier fortement suivant la strate considérée. La mise en place de ces composés suit des voies de biosynthèse qui leurs sont propres et leurs réarrangements par voies enzymatiques apportent ainsi à la paroi une plasticité lui permettant de s'adapter au mieux à son environnement.

Sous certaines contraintes physiques, la paroi secondaire du peuplier est modifiée donnant lieu à l'élaboration d'une nouvelle strate nommée couche gélatineuse ou couche G. Si la cellulose et la lignine sont les deux polymères les plus étudiés et les plus abondants, d'autres composés comme les xylanes et les XGs pourraient participer à la fonction physiologique des fibres G. En effet, au sein de la paroi primaire, ce sont des polysaccharides non-cellulosiques présents et impliqués dans la dynamique fonctionnelle. Qu'en est-il en revanche au niveau de la paroi secondaire ? Des éléments de réponse sont apportés par des données bibliographiques récentes qui identifient soit la présence de certains d'entre-eux, soit l'activité d'enzymes impliquées dans le remodelage de ces polysaccharides hémicellulosiques. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, une attention particulière est portée aux hémicelluloses : les xylanes connus pour être majoritairement présents dans la paroi secondaire et les XGs qui sont identifiés comme des polysaccharides clefs de la paroi primaire. Ce dernier point fait l'objet de controverses quant à leur présence dans la paroi secondaire.

De part leurs fortes interactions avec les autres polymères de la paroi, les xylanes et les XGs constituent deux hémicelluloses pouvant potentiellement être impliquées directement ou indirectement dans le processus de formation des stress de croissance comme pour le bois de tension. En effet, les xylanes sont liés aux lignines par des liaisons ester, ether, ester-ether ou phénylglycosidiques (Moine, 2005) et sont suggérés comme enrobant les microfibrilles de cellulose (Awano *et al.*, 2002) et influençant l'orientation hélicoïdale de celles-ci (Reis et Vian, 2004). Les XGs, quant à eux, sont décrits comme liant les microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogène pour assurer le maintien de l'architecture pariétale (Hayashi *et al.*, 1987).

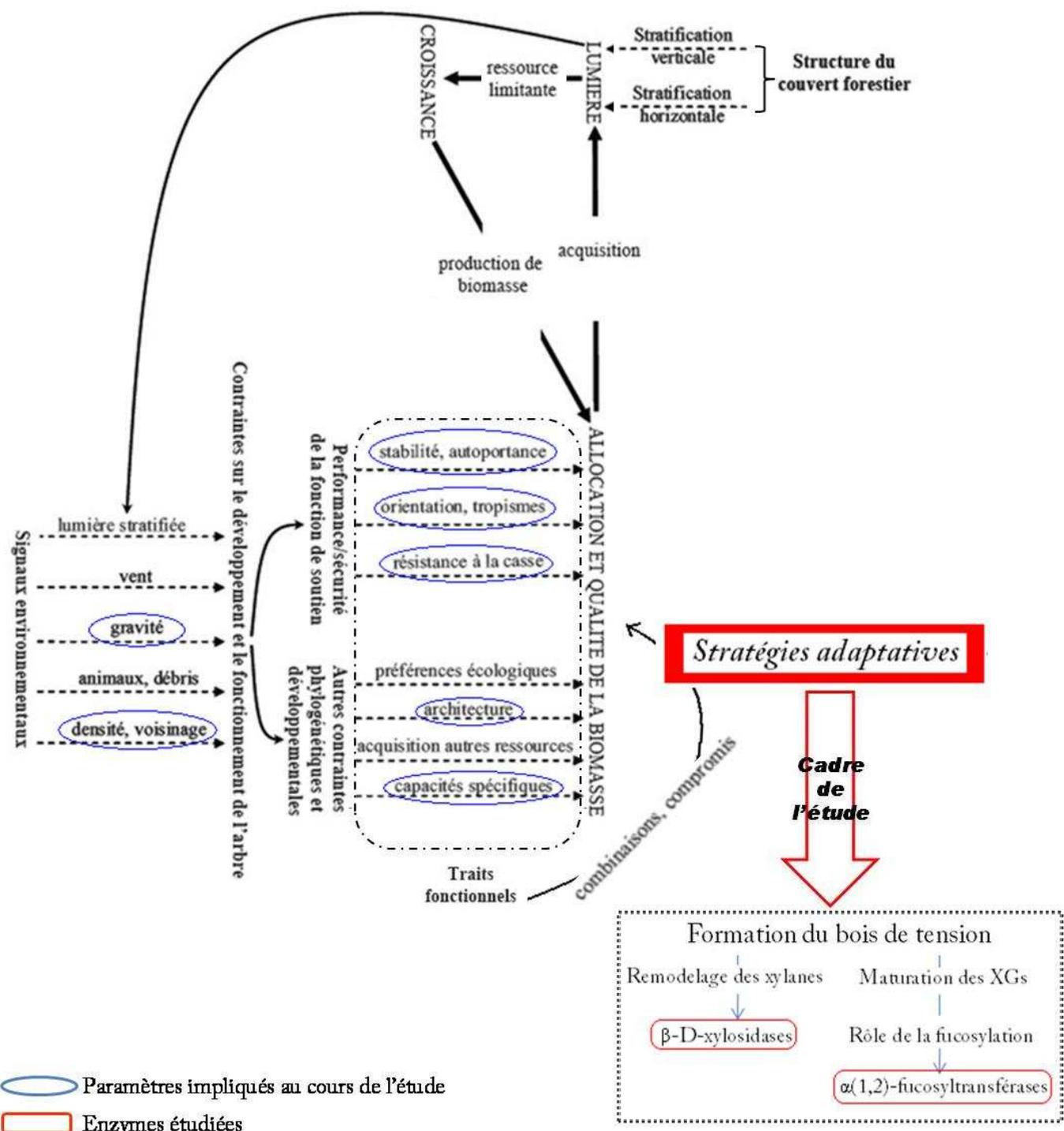


Figure 29 : Représentation schématique de la physiologie intégrée du développement aérien des arbres et positionnement des acteurs moléculaires ciblés par l'étude dans ce contexte développemental (application au bois de tension). Les différents signaux externes perçus par l'arbre sont représentés (lumière, vent, gravité, etc) ainsi que les réponses induites en conséquence. Celles-ci correspondent à la combinaison de valeurs de traits fonctionnels pouvant induire des stratégies adaptatives ; ces dernières étant dépendantes de contraintes phylogénétiques (préférence de l'espèce pour un milieu, modèle architectural, capacité) en lien avec les nécessités biologiques d'acquisition de toutes les ressources nécessaires pour croître et survivre (issu et adapté de Jaouen, 2007).

Étant donné que les différentes hypothèses émises pour expliquer le mécanisme de genèse des forces élastiques au sein du bois de tension proposent généralement la cellulose et/ou la lignine comme acteurs majeurs, le rôle d'hémicelluloses liant ces polymères telles que les xylanes et les XGs est à considérer lors de ce processus.

Ainsi, la stratégie adaptative considérée dans le cadre de cette étude, c'est-à-dire la formation du bois de tension chez le peuplier hybride (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4), sert de modèle à la compréhension des mécanismes de biosynthèse et de remodelage des hémicelluloses de la paroi secondaire des fibres xylémiennes. Deux enzymes impliquées dans le métabolisme de ces polymères sont principalement ciblées au cours de cette étude : la β -D-xylosidase et la XG $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférase (Fig. 29). Ce travail vise ainsi à contribuer à la compréhension des processus de formation du bois ainsi que les modifications de cohésion paritale induites lors de la formation du bois de tension. L'impact de l'activité de ces enzymes permettrait alors de mettre en évidence ces mécanismes.

RESULTATS

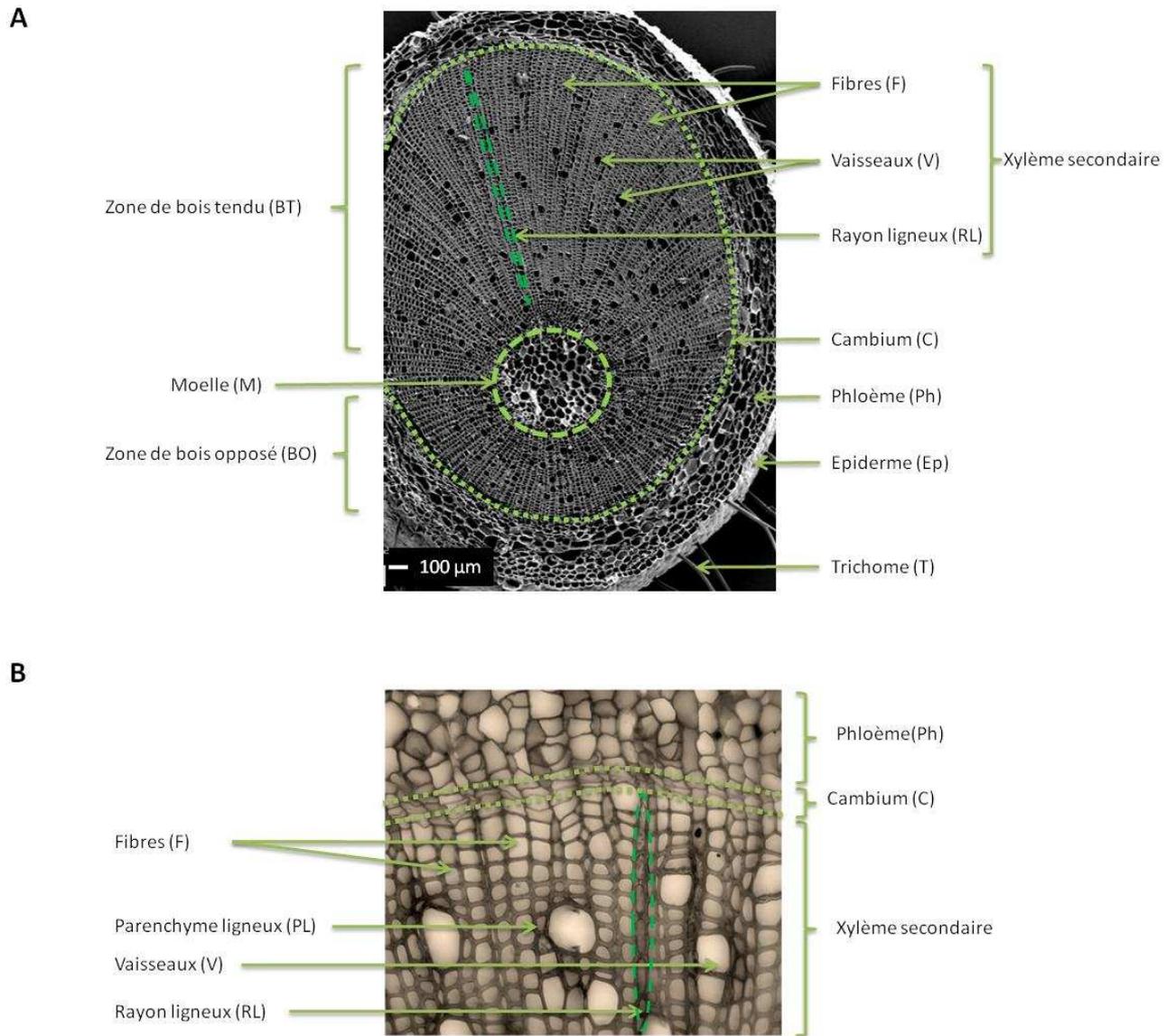


Figure 30 : Mise en évidence des différentes structures anatomiques identifiables sur coupes transversales (CT) de tiges de peuplier *in vitro*. A : Peuplier *in vitro* (BT) âgé de 4 mois observé au MEB. B : Peuplier *in vitro* âgé de 3 mois observé en MP.

Partie I : Applications de la microscopie à l'étude du bois de tension

I. Introduction

La microscopie en biologie végétale est une discipline à part entière apportant de nombreuses données visuelles des structures biologiques observées. Son utilisation en recherche correspond plus précisément à un ensemble de techniques intervenant aussi bien dans des étapes préliminaires que dans la vérification et la validation de résultats.

Les différentes études portant sur l'analyse du bois de tension ciblent particulièrement des arbres plus ou moins âgés (2 ans et plus). En règle générale, chez ces bois, les structures observées sont fortement différenciées et ont quasiment atteint leur maturité biologique. A ce stade de développement, le masquage possible de certains sites antigéniques reconnus par les Ac a été rapporté par Marcus *et al.* (2008). En effet, les polymères pariétaux interagissent entre-eux par de multiples liaisons qui sont alors un obstacle à la reconnaissance des épitopes spécifiques aux différents Ac. La représentativité des polymères *in situ* est donc biaisée et ne reflète pas exactement la réalité. C'est aussi dans cette optique qu'il paraissait important d'identifier les polysaccharides pariétaux néosynthétisés et non encore masqués par des incrustations et liaisons inter-polymères supplémentaires. La couche G en développement chez des plants cultivés *in vitro* constitue ainsi un stade physiologique intéressant pour observer des structures non ou peu identifiables à maturité. Cette caractérisation structurale chez des individus à ce stade de développement n'a de plus jamais été réalisée jusqu'à présent.

De plus, la micro-analyse biochimique et la micro-dissection ne permettent pas une analyse fine de la composition moléculaire des parois. De ce fait, l'étude par immunohistochimie apparaît comme un moyen efficace, préliminaire et complémentaire à toute étude de génétique moléculaire. Ainsi, par différentes techniques de colorations et par immunohistochimie, il a été entrepris la localisation de plusieurs polymères (protéines de structures, hémicelluloses, cellulose, pectines) au niveau du bois de tension de peuplier *in vitro*.

Les observations microscopiques ont été réalisées sur des coupes transversales de tige de peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4) dont l'âge était soit de 3 mois (vitro-plants), soit de 2 ans (plants cultivées en serre). Afin de préciser les différentes structures observables sur ces coupes, des micrographies légendées de tige de peuplier *in vitro* sont présentées en figure 30 et servent de modèle.

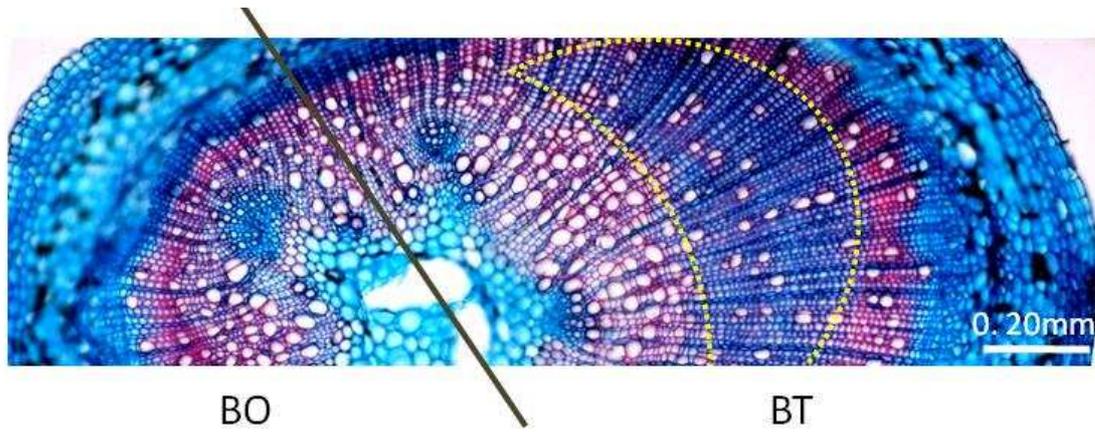


Figure 31 : Montage micrographique de coupes transversales (CT) d'une tige courbée de peuplier *in vitro* âgée de 3 mois et colorée au fasga. La zone entourée en pointillée jaune correspond à une forte présence de composés cellulosiques. L'excentricité de la moelle et la différence de porosité entre les deux zones séparées par le trait oblique sont aussi observées. Ces caractéristiques anatomiques suggèrent la présence des bois tendu et opposé. Observation en microscopie photonique (MP).

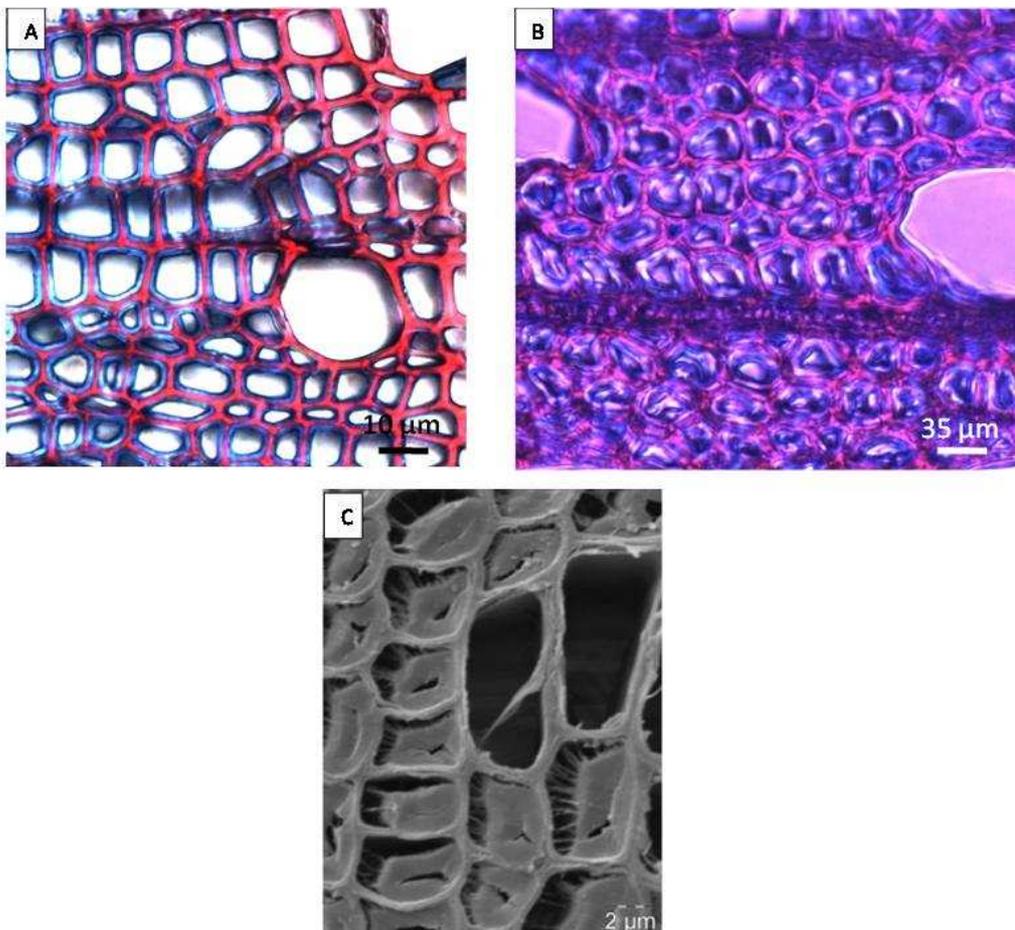


Figure 32 : A et B : Observations microscopiques (MP) comparées des zones de bois tendu entre peuplier *in vitro* âgée de 3 mois et peuplier de la serre âgé de 2 ans, respectivement. La coloration correspond au fasga. C : Observation au MEB d'un peuplier *in vitro* âgé de 3 mois.

II. Résultats

1. Coloration du bois de tension chez le peuplier

Pour confirmer la présence de la couche G dès les premiers stades de développement de plants de peupliers courbés, des coupes transversales (CT) de tiges sont réalisées puis colorées au fasma. Suivant ce protocole, la mise en évidence d'un « croissant bleu » dans la zone de bois la plus développée (forte activité cambiale) confirme la présence de composés cellulosiques majoritaires (Fig. 31). De plus, l'excentricité de la moelle du côté opposé à la face supérieure de la tige ainsi que la diminution du nombre de vaisseaux au niveau du croissant (d'environ 50%) valident la présence de bois de tension dans cette zone.

Que ce soit en microscopie optique ou électronique, un épaissement typique de la paroi secondaire des fibres est observé (Fig. 32 A, B et C). Sur la figure 32 A, la zone cambiale se situe sur la droite (non visible). Suivant une différenciation centripète des fibres et des vaisseaux, on observe à partir du cambium une augmentation progressive de la lignification sauf dans la zone de BT où l'épaississement pariétal des fibres se caractérise par un dépôt de cellulose de couleur bleue. Par comparaison, les fibres de BT de peuplier de 2 ans présentent une couche G mature plus épaisse (Fig. 32 B). La lignification des parois se trouve là aussi moins dense étant donné la faible épaisseur des couches S1 et S2. Au MEB (Fig. 32 C), la couche G présente un aspect conforme à ce qui est décrit dans la littérature (Norberg et Meier, 1966 ; Lafarguette *et al.*, 2004). Cette strate apparaît de plus fortement décollée dans certaines zones. Cette constatation suggère des artefacts de préparation de l'échantillon comme précisé par Clair *et al.* (2005) mais laisse tout de même entrevoir des « filaments » encore connectés à la couche S2.

Afin de discerner qualitativement la lignification et la répartition des monolignols au sein des cellules xylémiennes, des colorations spécifiques sont utilisées (phloroglucine chlorhydrique : unités S et G (rouge), Maüle : unités S (rouge) et unités G (brun)).

Après coloration au phloroglucine chlorhydrique (Fig. 33 A et B), une coloration plus intense est révélée au niveau des vaisseaux comparée aux fibres quelque soit l'âge de la plante. De plus, la couche G sur chacune des micrographies de cette même figure apparaît de couleur blanche ce qui traduit l'absence de lignification ou plus probablement une lignification insuffisante pour être détectée par simple coloration. La coloration de Maüle, quant à elle, présente des divergences entre les parois de BO (Fig. 33 C ; couleur brune) et de BT (Fig. 33

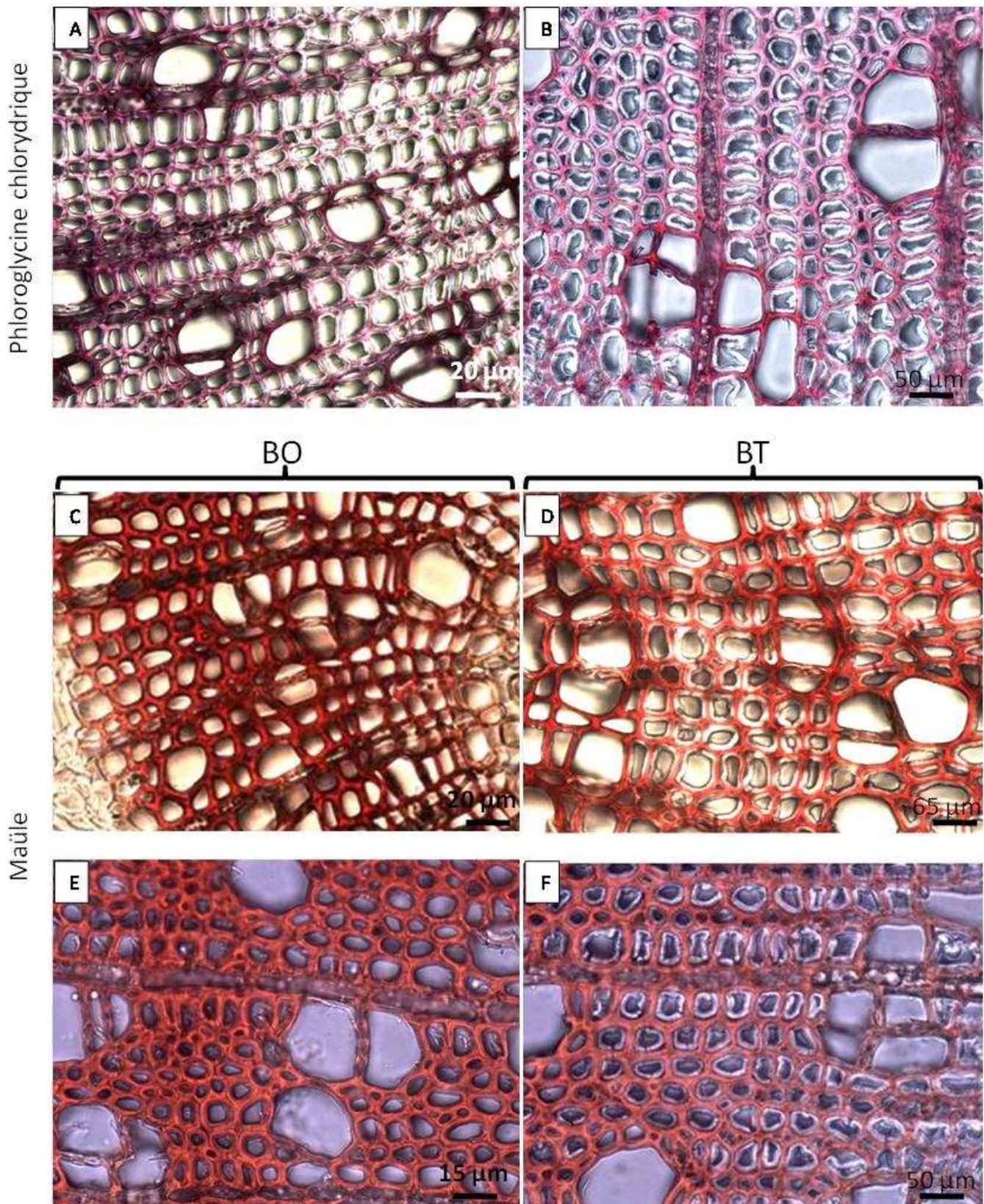


Figure 33 : Observations en MP du bois de tension coloré au phloroglucine chlorhydrique (A et B) ou au colorant de Maüle (C-F). A, C et D : Sur peuplier *in vitro* âgé de 3 mois. B, E et F : Sur peuplier de la serre âgé de 2 ans.

D ; couleur rouge pâle diffuse) sur le peuplier *in vitro*. Ceci suggère une diminution de la lignification et de la teneur en unité G dans le bois de tension excepté pour les vaisseaux de xylème secondaire. Cette différence correspond à celle décrite par Baillères *et al.* (1995), où la quantité globale de lignines, et plus particulièrement des unités G, diminue quand les DRLM augmentent, c'est à dire au niveau du BT. Ceci pourrait ainsi correspondre à une lignification plus tardive au niveau des fibres comme le propose cet auteur puisque la cinétique de lignification des parois secondaires du bois normal est telle que les unités G sont déposées dès le départ, puis les unités S arrivent plus tardivement (Terashima, 1990). Le dépôt différentiel des monolignols a également été observé par Joseleau *et al.* (2004), où les lignines de type S sont plus présentes dans la couche G que celles de type G. Ceci illustre ainsi, d'après l'auteur, que la synthèse des lignines de types S dans le BT est régulée de manière spatiale et temporelle.

A l'inverse, la couleur brune de la paroi des vaisseaux du BT observée traduit une lignification plus précoce, par comparaison aux fibres. Cette constatation fait référence aux travaux de Murakami (1999) qui observe que le dépôt des lignines se produit en premier lieu au niveau des vaisseaux et des cellules adjacentes puis plus tardivement au sein des fibres.

Finalement, sur peuplier plus âgé (Fig. 33 E et F), cette différence de lignification des fibres n'est pas observée entre BT et BO. La maturation des parois secondaires étant plus avancée, la différence de lignification n'est plus décelable ; le dépôt d'unité G ayant rattrapé son retard redonnant une couleur brune aux parois des fibres du BT.

Ainsi, au vu des résultats, il est clair que la mise en place de la couche G peut être très précoce chez des vitro-plants de peuplier dont la courbure est induite artificiellement. Celle-ci est très nettement identifiable par simple coloration et pourrait représenter un bon modèle d'étude notamment pour la caractérisation des polymères qui la composent à ce stade. En effet, la jeunesse de cette couche pourrait permettre de révéler d'autres polymères de part leur plus grande accessibilité aux Ac et dont les épitopes seraient masqués à maturité. C'est dans cette optique que des immunomarquages à l'aide d'une large gamme d'Ac ont été réalisés pour essayer d'identifier et de localiser les polymères de la couche G.

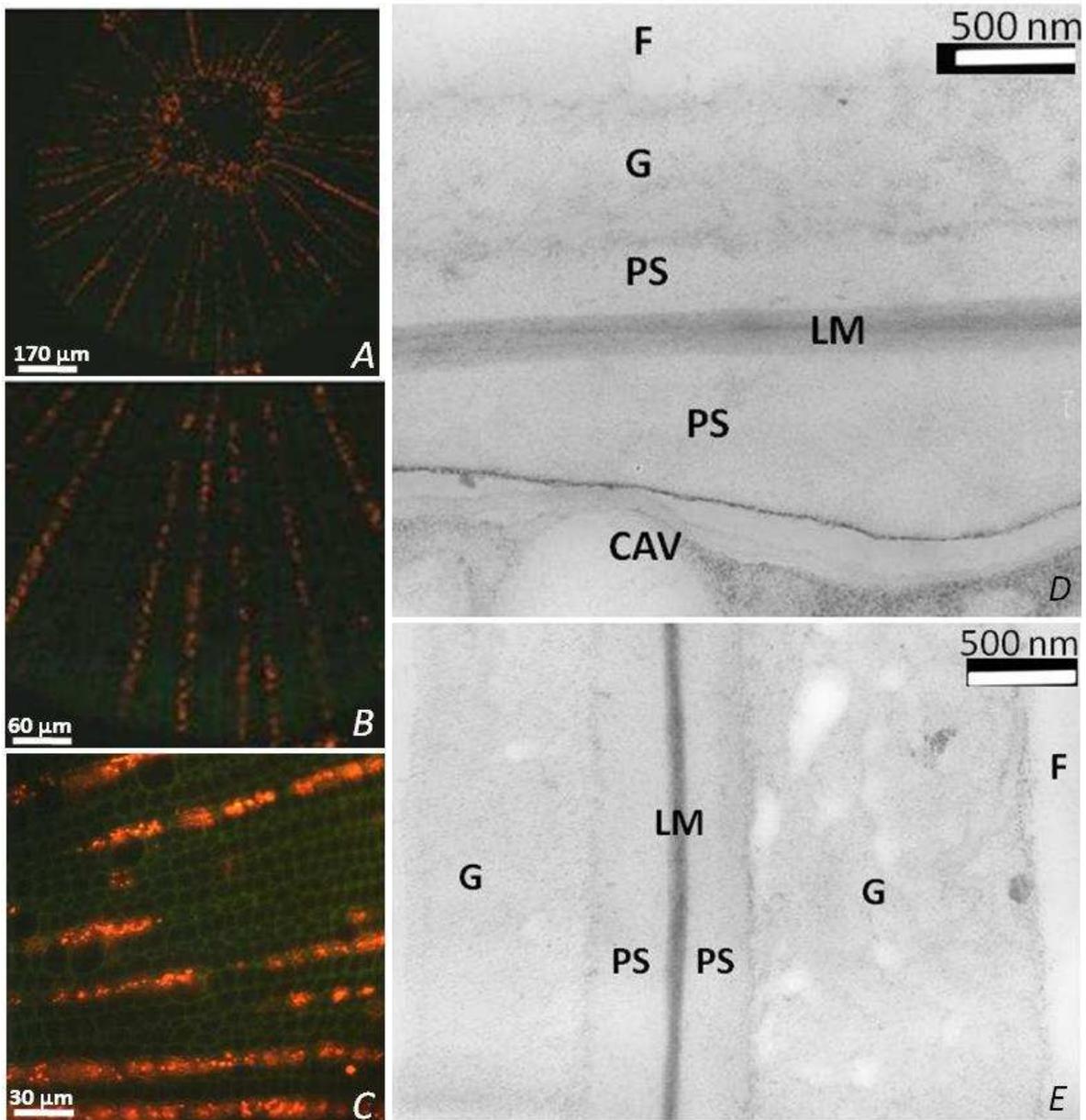


Figure 34 : Visualisation de quelques micrographies témoins de vitro-plants de peuplier (3 mois) observés en microscopie à fluorescence (A, B et C) et au MET (D et E). Les Ac primaires ou secondaires ou les deux ont été omis. F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne et paroi primaire ; CAV : cellule associée au vaisseau.

2. Immunohistochimie du bois de tension chez le peuplier

Par immunofluorescence et immunomarquage à l'or sur CT de tiges de peuplier inclus en résine ou non, un large panel d'Ac est testé. Ces derniers sont décrits dans la partie « Matériels et Méthodes, tableau 7 p.278 ». Pour chaque essai, des témoins sont réalisés soit avec l'Ac et le polysaccharide qu'il reconnaît, soit sans Ac primaire ou sans Ac secondaire ou soit sans aucun des deux Ac. La figure 34 représente quelques unes des micrographies obtenues dans les conditions précédemment décrites. Il n'est observé aucun marquage pour chacun des témoins. Pour la technique d'immunofluorescence (Fig. 34 A, B et C), la seule auto-fluorescence observable apparaît en rouge (amidon), en particulier au niveau des rayons ligneux et des pôles xylémiens. L'écorce n'est pas conservée au cours des expérimentations étant donné la faible résistance mécanique de l'assise génératrice libéro-ligneuse lors des CT.

a) Marquage des protéines

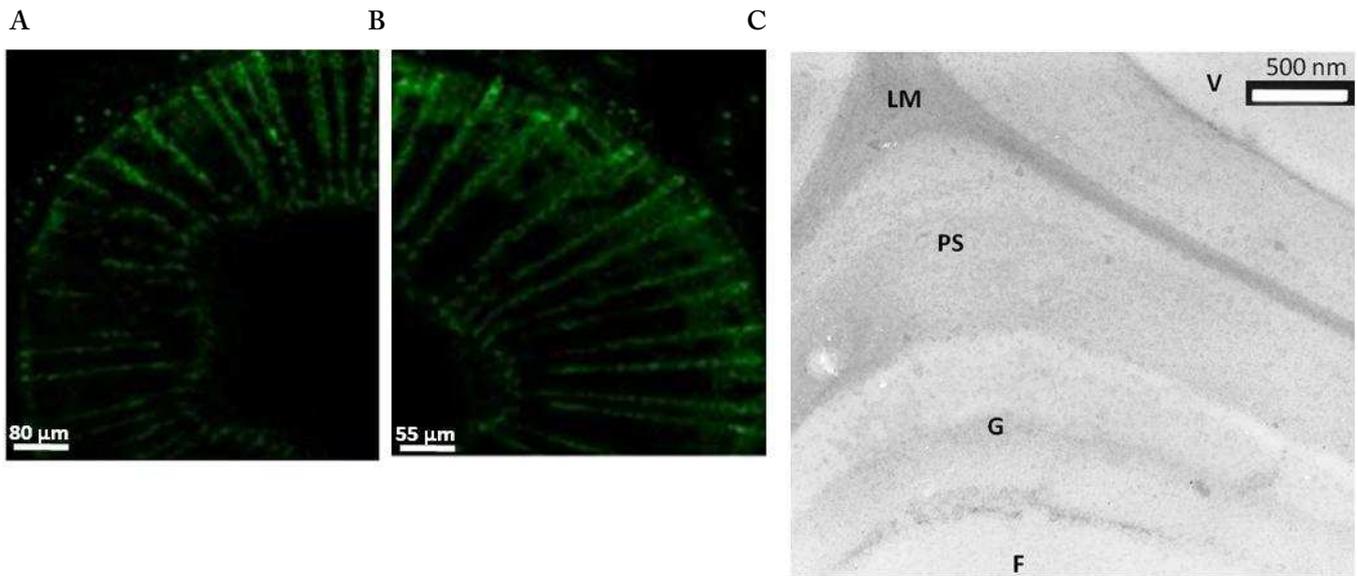
Parmi les protéines pariétales étudiées, seules certaines d'entre-elles ont fait l'objet d'immunomarquages. Ainsi, pour les HRGPs, l'étude porte exclusivement sur les AGPs et les extensines mais pas sur les PRPs ni sur les lectines. Aucun marquage n'a de plus été réalisé pour les expansines.

i. Les AGPs

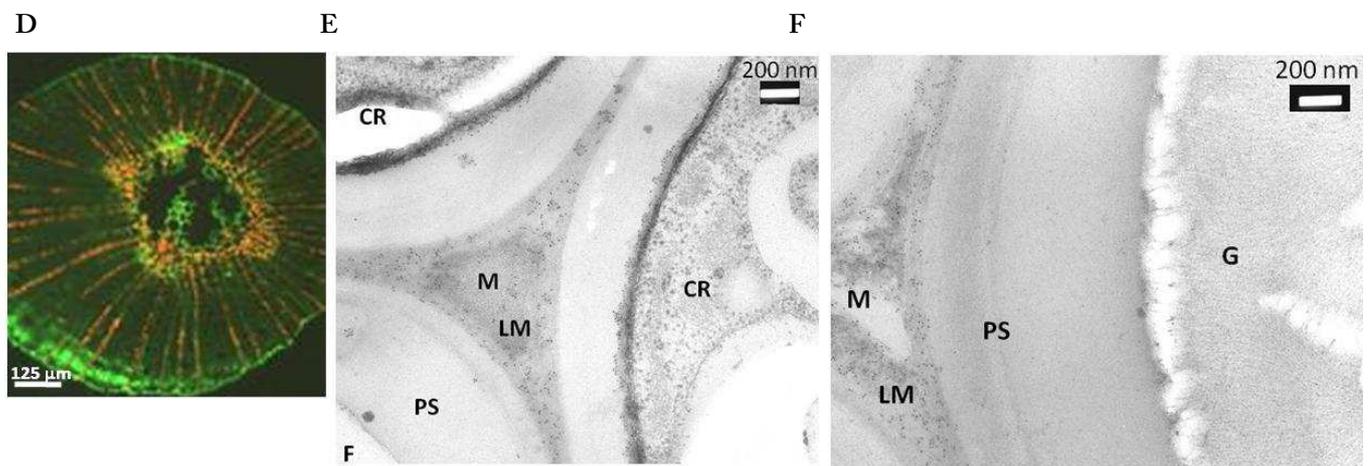
Pour ces protéines, plusieurs Ac ont été utilisés : JIM4, JIM13 et JIM8. Ils reconnaissent la partie glycanique des AGPs dont l'épitope n'est connu que pour JIM4 et JIM13 : β -D-GlcA-(1-3)- α -D-GalA-(1-2)- α -L-Rha. Les micrographies obtenues sont présentées dans la figure 35.

Pour l'ensemble des Ac, le marquage est observé essentiellement au niveau des rayons ligneux (Fig. 35 A, B, D et G), tant du côté BT que BO. Des trois Ac, seul JIM8 semble le plus réagir avec certaines AGPs du bois de peuplier. Il marque légèrement la partie interne de la paroi secondaire des fibres ainsi que la couche G dans sa totalité mais de manière assez diffuse (Fig. 35 I). Il est aussi retrouvé au sein de la moelle (résultat non montré). De plus, une fine zone fluorescente est visible uniquement dans le BT à proximité du cambium (Fig. 35 G). Deux hypothèses peuvent permettre d'expliquer la présence d'AGPs dans les parois de ces cellules : (i) soit il y a présence d'une fine couche G en formation et/ou (ii) soit il y a un faible taux de lignification laissant les sites antigéniques accessibles aux Ac.

AcJIM4



AcJIM13



AcJIM8

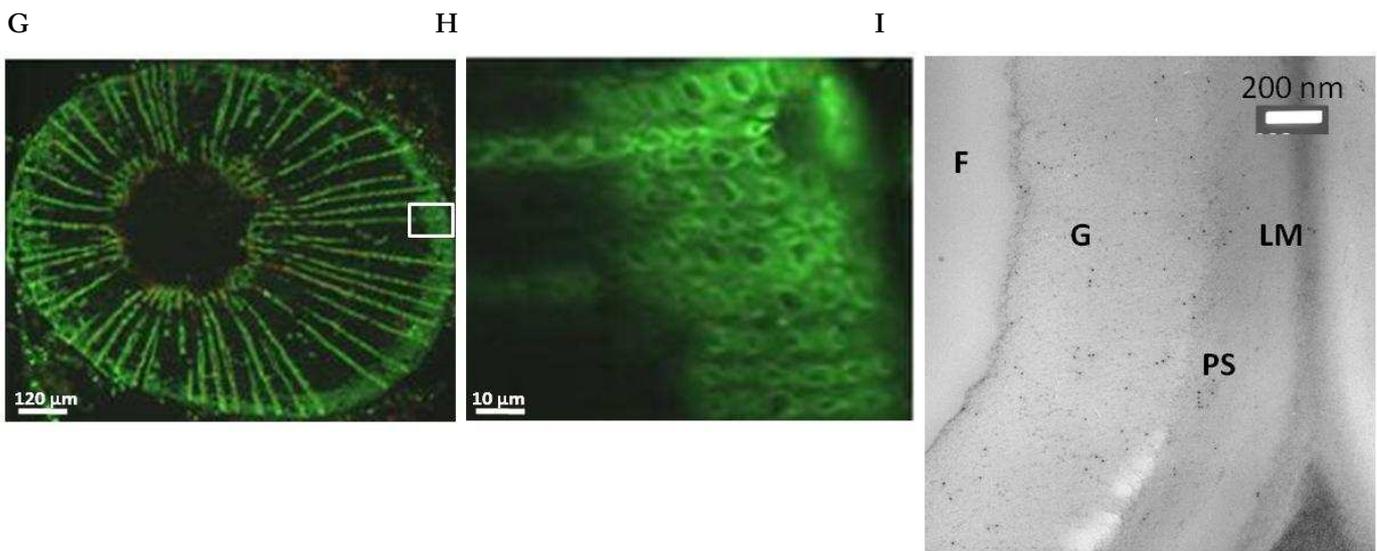


Figure 35 : Marquage des AGPs sur vitro-plants de peuplier (3 mois), excepté la micrographie F (2 ans). Observation en microscopie à fluorescence (A, B, D, G et H) et au MET (C, E, F et I). La micrographie H correspond à la zone délimitée par le cadre blanc de la micrographie G. PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; M : méat ; F : fibre ; CR : cellule de rayon ; G : couche G.

Pour JIM4, aucun marquage n'est observé au niveau des fibres. En revanche, la reconnaissance d'AGPs par JIM13 sur vitro-plants (Fig. 35 E) est observée dans la lamelle moyenne (LM), exceptés les méats, et la membrane plasmique (MP) des cellules des rayons. Les cellules cambiales sont elles aussi marquées. De plus, la fixation de l'Ac sur les CT de tige de peuplier âgé de 2 ans présente les mêmes caractéristiques, hormis la présence de billes d'or au sein des méats entre fibres et rayons (Fig. 35 F).

Ainsi, d'après ces données, il apparaît que les AGPs se retrouvent bien dans la couche G comme démontré avec JIM14 par Bowling et Vaughn (2008). Par contre, Lafarguette *et al.* (2004) identifient des AGPs reconnus par JIM14 uniquement sur la face interne de la couche G et dans les parois des cellules des rayons. Que ce soit pour JIM13 ou JIM8, les résultats obtenus par Bowling et Vaughn (2008) ou par Meloche *et al.* (2007) sont en opposition avec ceux obtenus sur les vitro-plants de peuplier. En effet, chez le copalme d'Amérique, Bowling et Vaughn (2008) mettent en évidence des AGPs reconnues par JIM13 au niveau de la paroi primaire (PP) et de la paroi secondaire (PS) des fibres G. De même, ces auteurs n'observent pas de marquage de la couche G avec l'Ac JIM8 chez le copalme d'Amérique, ni Meloche *et al.* (2007) chez *Brunnichia ovata*. Seule la présence d'AGPs est observée avec cet Ac à l'interface de la lumière cellulaire et de la PS dans les fibres des vrilles de cette dernière plante. L'ensemble de ces résultats suggèrent alors une implication différente des classes d'AGPs dans les parois de BT. Il faut noter cependant qu'une incertitude persiste toujours quant à la cible antigénique reconnue par cet Ac. En effet, JIM8 pourrait réaliser des réactions croisées avec les RG-I. La forte glycosylation de cette sous classe d'HRGPs pourrait aussi limiter la reconnaissance par les Ac. Il serait ainsi nécessaire d'isoler des AGPs de la plante étudiée pour produire des Ac qui leurs sont spécifiques (Lafarguette *et al.*, 2004).

ii. *Les extensines*

Deux Ac (JIM20 et LM1) ont été utilisés pour la localisation des extensines au sein des parois cellulaires des fibres du bois de tension. Les résultats présentés dans la figure 36 montrent qu'aucune extensine n'a été détectée quelque soit l'Ac, que ce soit dans les parois des fibres de BT ou dans celles des fibres de BO (micrographies A-E ; MET non présentée). Ceci reste ainsi en accord avec les résultats de Bowling et Vaughn (2008). En revanche, JIM20 et LM1 marquent très nettement les vaisseaux et les CAV du BT et du BO (Fig : 36 A, C, D) ainsi que les méats des cellules de la moelle (Fig. 36 B, C, E). Une plus faible présence

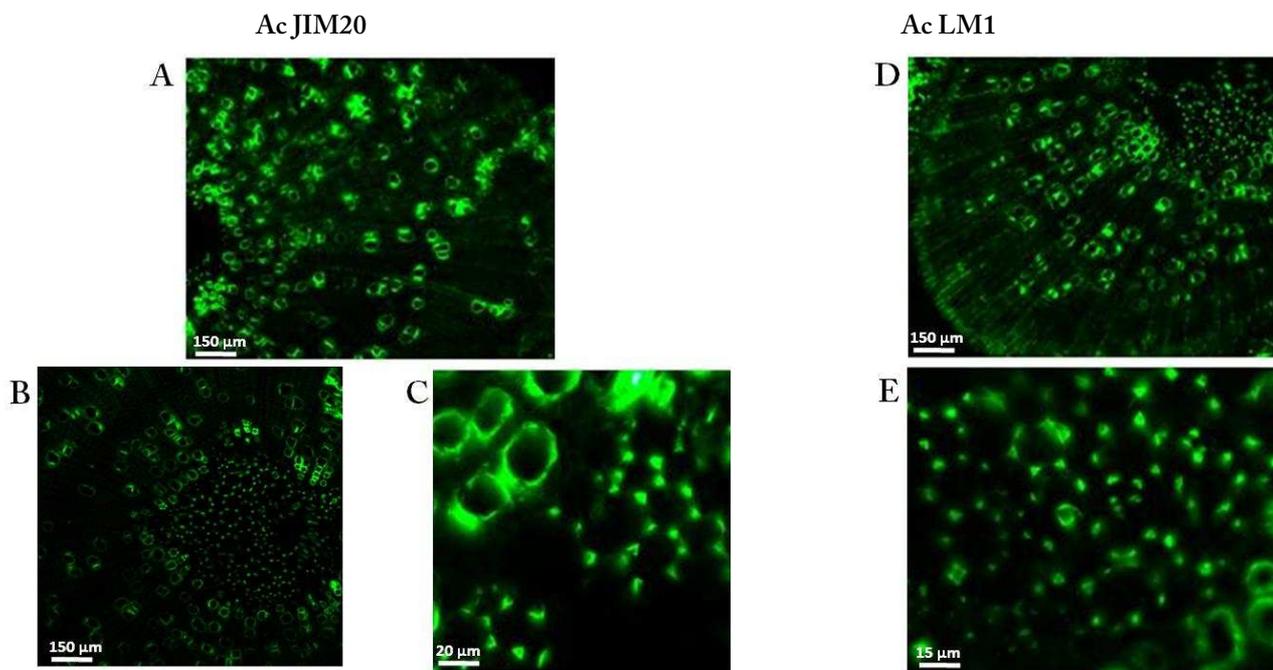
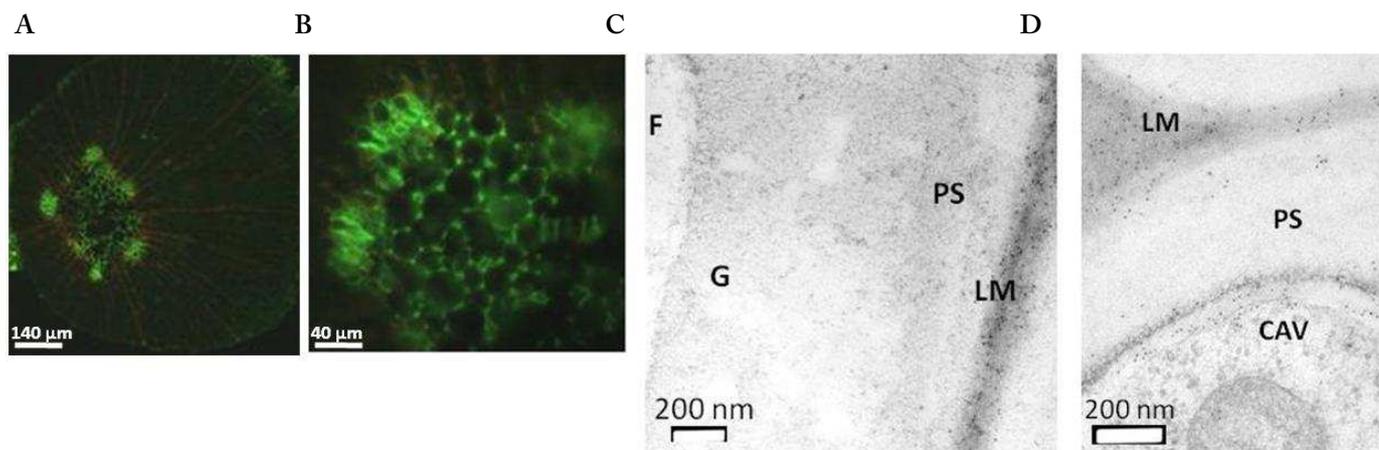


Figure 36 : Marquage des extensines sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence.

AcJIM5



AcJIM7

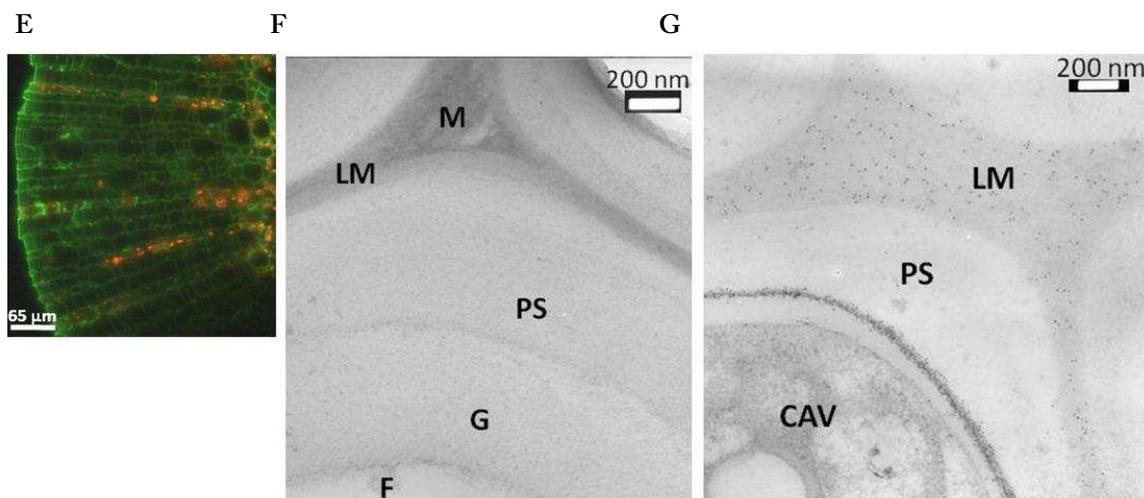


Figure 37 : Marquage des HGs sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence (A, B et E) et au MET (C, D, F et G). F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; CAV : cellule associée au vaisseau ; M : mét.

d'extensines est cependant notée au niveau des plus jeunes vaisseaux du BT (Fig. 36 A et D) pour les deux Ac.

b) Marquage des polysaccharides pariétaux

i. Les pectines

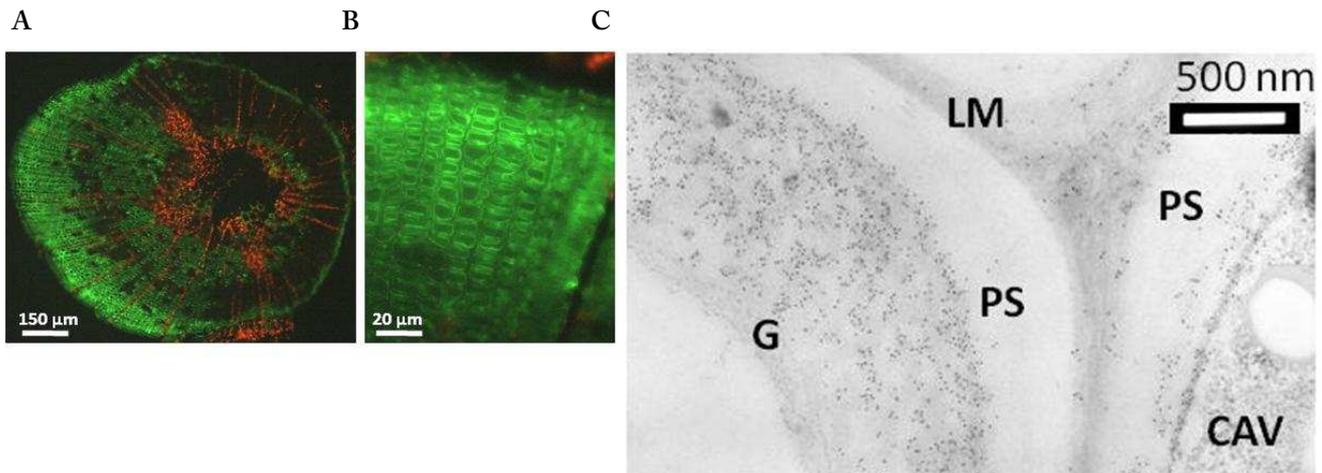
Famille d'hétéropolysaccharides anioniques complexes dont l'élément structural majeur est l'acide galacturonique (GalA) (Voragen *et al.*, 1995), les pectines sont présentes au niveau des parois cellulaires suivant une répartition décroissante de la lamelle moyenne jusqu'à la paroi secondaire. Outre les résidus GalA, des oses neutres tels que le α -L-rhamnose (Rha), le β -L-arabinose (Ara) et le α -D-galactose (Gal) ainsi que des substituants tels que des groupements méthyls, l'acide acétique et l'acide férulique, sont essentiellement retrouvés dans les pectines par association lors du passage dans l'appareil de Golgi. Les pectines sont de plus décrites comme une alternance de deux zones distinctes: les zones "lisses" et les zones "hérissées" correspondant aux HGs et RG-I, respectivement (Sakai *et al.*, 1993 ; De Vries *et al.*, 1982 ; Voragen *et al.* 1995).

Les Ac JIM5, JIM7, LM5 et LM6 liant les pectines sont ainsi utilisés pour la recherche de ces polysaccharides au sein de la couche G. Les deux premiers Ac se fixent aux HGs partiellement méthylestérifiés (JIM5 et 7) ou non méthylestérifiés (JIM5).

Pour JIM5, le marquage est retrouvé uniquement au niveau du cambium, des pôles xylémiens et des méats des cellules de la moelle (Fig. 37 A et B). Les micrographies C et D de cette même figure représentent les parois d'une fibre G et du pôle xylémien, respectivement. En micrographie C, le marquage est situé uniquement au niveau de la LM tandis qu'en micrographie D, il est présent au sein des méats, de la LM, de la partie interne de la PS et dans le lumen des cellules associées aux vaisseaux (CAV). Pour JIM7, les micrographies E-G (Fig. 37), montrent des résultats assez similaires à ceux précédemment décrits excepté une intensité moindre du marquage. Les HGs sont présents au sein des méats, de la LM et à l'intérieur des CAV mais sont absents de la couche G (Fig. 37 F). Des différentes études visant à caractériser la couche G, toutes présentent des marquages similaires à ceux présentés ici : marquage de la LM voire de la paroi primaire et de la couche S1, absence de marquage de la couche G (Meloche *et al.*, 2007 ; Bowling et Vaughn, 2008 ; Arend, 2008).

LM5 reconnaît quant à lui le tétrasaccharide linéaire (1-4)- β -D-galactane des RG-I mais ne réagit pas avec les (1-3)- β -D-galactanes ou les (1-6)- β -D-galactanes. Les données

AcLM5



AcLM6

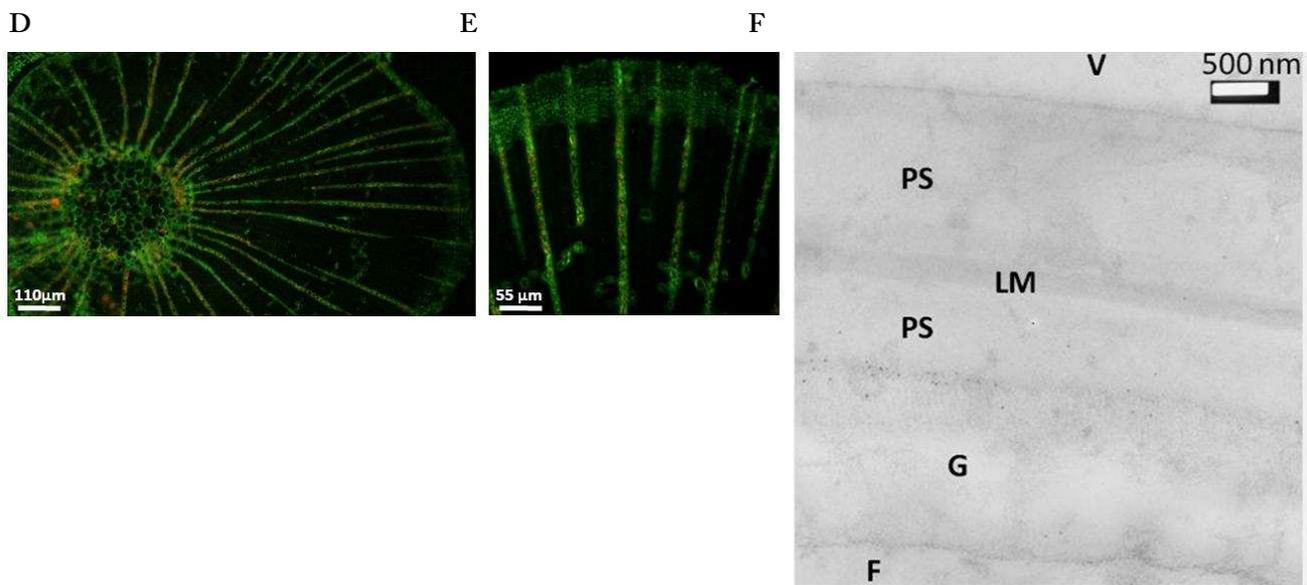


Figure 38 : Marquage des RG-I sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence (A, B, D et E) et au MET (C et F). F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; CAV : cellule associée au vaisseau ; V : vaisseau.

AcCBM3a

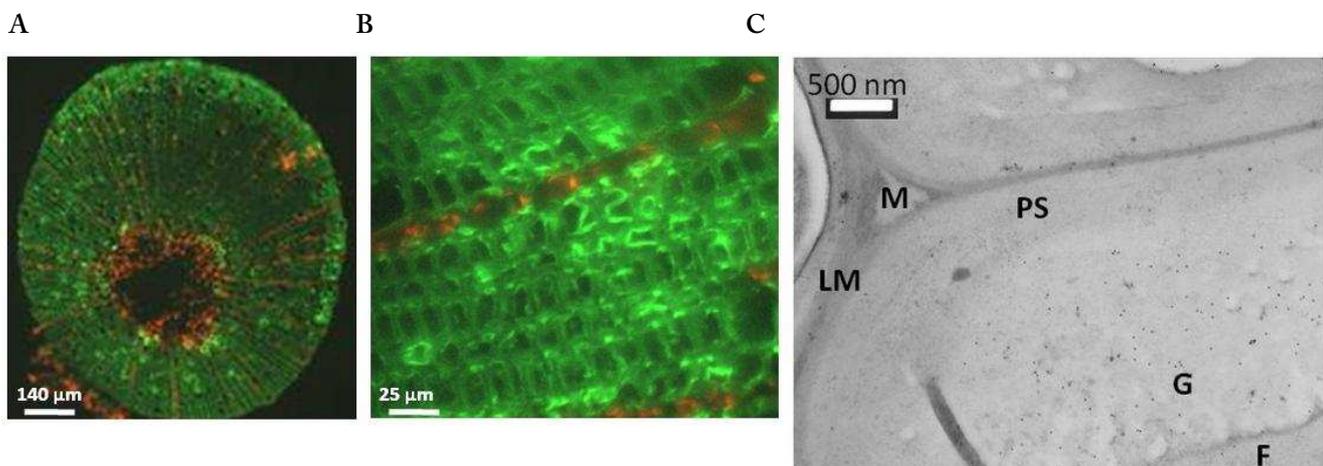


Figure 39 : Marquage de la cellulose cristalline sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence (A et B) et au MET (C). F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; M : méat.

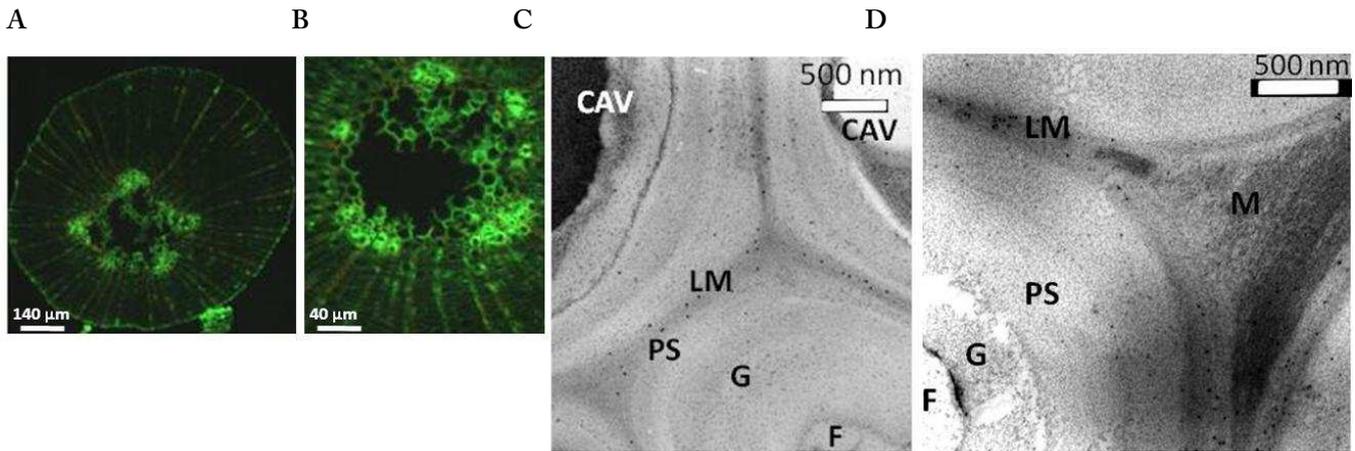
obtenues après immunofluorescence indiquent une présence de ce polysaccharide uniquement au niveau du BT mais suivant un marquage décroissant en intensité du cambium vers la moelle (Fig. 38 A et B). Il n'est pas à exclure que l'intensité variable du marquage suit l'évolution de la maturité de la couche G. En micrographie C (Fig. 38), un gradient croissant de marquage de la couche G est observé de l'intérieur de la fibre vers la paroi secondaire en accord avec les résultats d'Arend (2008). Dans un modèle différent, Meloche *et al.* (2007) observent aussi un marquage de la couche G mais également de la paroi primaire des fibres. Les résultats de l'immunomarquage à l'or indiquent de plus que la LM et le bord interne des cellules des CAV sont marqués mais assez faiblement (résultats non présentés).

Concernant LM6, les données de la littérature précisent que cet Ac se lie au pentasaccharide linéaire (1-5)- α -L-arabinane des RG-I et peut parfois reconnaître des AGPs comme chez la mousse *Physcomitrella patens* (Lee *et al.*, 2005). En figure 38 D et E, seule la moelle, les rayons ligneux, les pôles xylémiens et le cambium révèlent la présence de ces polymères. Il en est de même pour quelques vaisseaux ou CAV et une fine bande à proximité du cambium sur tout le porteur de la coupe. La micrographie F obtenue au MET correspond, quant à elle, aux parois d'une fibre G et d'un vaisseau. La couche G présente quelques grains à sa jonction avec S2, ce qui est conforme aux résultats de Meloche *et al.* (2007) bien que leur marquage ne soit pas si localisé que celui-ci. De plus, étant donné que l'Ac LM6 est capable de reconnaître les AGPs, il est intéressant de remarquer que le marquage ainsi observé est très similaire à celui de l'Ac JIM8. En effet, ces deux Ac ont en commun le marquage des rayons ligneux, des pôles xylémiens, d'une fine bande proche du cambium et de la couche G mais suivant une distribution un peu différente. Aussi, ils ne marquent (presque) pas la LM et la PS. C'est pourquoi les résultats obtenus pour LM6 correspondent peut-être à la distribution d'AGPs au sein des parois des cellules du xylème secondaire ou à la distribution croisée d'AGPs et de RG-I.

ii. Marquage de la cellulose

Pour réaliser un état des lieux de la distribution de la cellulose cristalline, un marquage à l'aide de l'Ac CBM3a est effectué. D'après les micrographies A et B de la figure 39, il est observé un faible marquage de presque toutes les cellules excepté les pôles xylémiens, la moelle et les rayons ligneux. Une plus forte intensité de marquage est de plus visualisée dans le BT à proximité du cambium, notamment au niveau de la couche G (micrographie B). Le décollement de cette strate permet de plus de l'identifier clairement. L'immunomarquage à

Ac CCRC-M1



Ac LM15

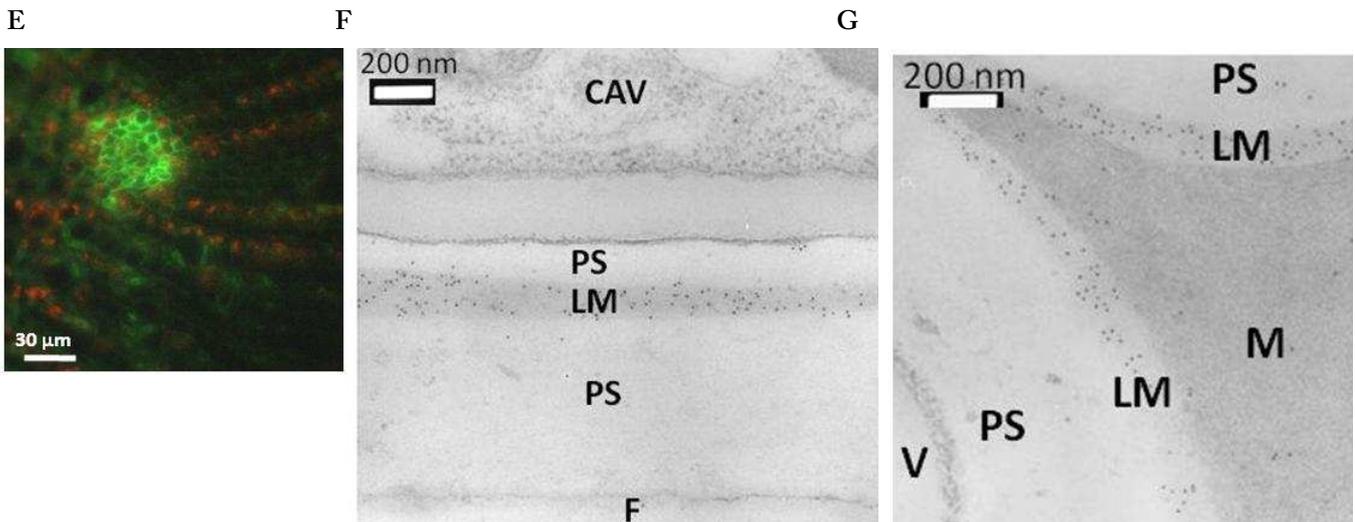


Figure 40 : Marquage des XGs sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence (A, B et E) et au MET (C, D, F et G). En D, une désincrustation de la coupe à la méthylamine est réalisée pour libérer davantage de sites antigéniques. F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; M : méat (jonction intercellulaire) ; CAV : cellule associée au vaisseau ; V : vaisseau.

l'or, quant à lui, confirme ce résultat dans la couche G (Fig. 39 C). Des grains sont tout de même retrouvés dans le reste de la paroi mais de manière plus diffuse. Ainsi, les différentes données obtenues à l'aide de l'Ac CBM3a chez des vitro-plants de peuplier sont en adéquation avec les travaux antérieurs.

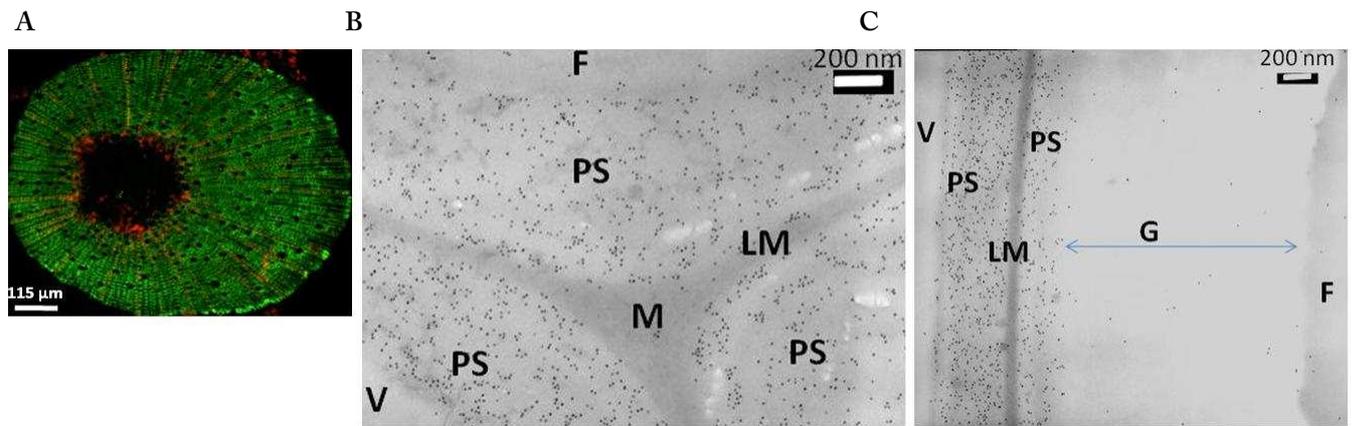
iii. Marquage des hémicelluloses

Les résultats obtenus avec l'Ac CCRC-M1 ne montrent aucun marquage de celui-ci au sein de la couche G (Fig. 40 C). Seuls le cambium, la moelle, les pôles xylémiens et les rayons ligneux (légèrement) sont marqués (Fig. 40 A et B). Il est à noter de plus un marquage assez faible au niveau de la LM des fibres ce qui n'est cependant pas visible par immunofluorescence. Récemment, les travaux de Nishikubo *et al.* (2007) montrent la présence de xyloglucanes fucosylés uniquement au sein de la couche G en développement chez le peuplier (*P. tremula x P. tremuloides*). Pour expliquer ces résultats contradictoires, l'hypothèse de manque d'accessibilité des sites antigéniques des XGs nous a conduit à mettre au point et à tester des techniques de « désincrustation » de la résine et de la lignine à la fois. Cependant, le traitement à la méthylamine n'a pas permis de mettre en évidence la présence de XGs fucosylés dans la couche G (Fig. 40 D). Si les résultats de Nishikubo n'ont pu être vérifiés, les résultats présentés ici concordent néanmoins avec ceux de Bowling et Vaughn (2008).

De façon similaire, les xyloglucanes non fucosylés reconnus par l'Ac LM15 n'ont pas été observés dans la couche G (Fig. 40 E-G). Par contre, en accord avec Marcus *et al.* (2008), nous avons retrouvé des XGs non fucosylés dans toutes les parois primaires.

Dans une dernière partie sur la localisation des polymères pariétaux de vitro-plants de peuplier, le marquage des xylanes est réalisé. Deux Ac sont utilisés : LM10 et LM11 reconnaissant chacun des xylanes non ou peu substitués. LM11 a de plus été identifié comme reconnaissant des arabinoxylanes chez le blé (McCartney *et al.*, 2005). Les marquages obtenus par immunofluorescence sont très semblables pour les deux Ac. Ces derniers se fixent essentiellement au niveau du xylème secondaire mais plus particulièrement sur la paroi des fibres et des vaisseaux du BT et du BO (Fig. 41 A et D). De plus, il est remarqué une plus forte intensité de fluorescence pour le bois le plus ancien (micrographies non montrées) et pour les vaisseaux avec LM11 (Fig. 41 D). En revanche, la moelle, les pôles xylémiens et les rayons ligneux ne correspondent pas à des sites de fixations pour ces Ac. Dans la zone de BT, la couche G des fibres ne présente aucun marquage suggérant ainsi l'absence de xylanes ce qui est en accord avec Meloche *et al.* (2007) et Bowling et Vaughn (2008).

Ac LM10



Ac LM11

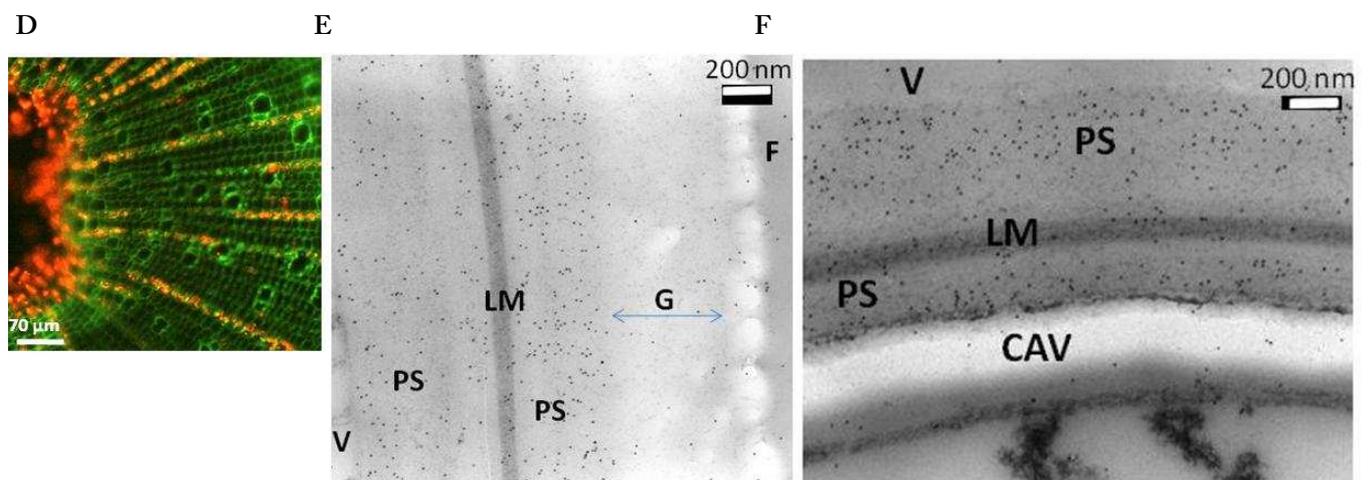


Figure 41 : Marquage des xylanes sur vitro-plants de peuplier (3 mois). Observation en microscopie à fluorescence (A et D) et au MET (B, C, E et F). L'Ac primaire utilisé pour chaque marquage est inscrit à droite. F : fibre ; G : couche G ; PS : paroi secondaire ; LM : lamelle moyenne ; M : méat ; CAV : cellule associée au vaisseau ; V : vaisseau.

III. Conclusion

Suite aux différentes colorations et à l'analyse au MEB, la présence de la couche G chez le peuplier hybride *in vitro* (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4) a pu être mise en évidence. Cette strate s'établissant au sein des fibres des tiges du BT peut donc se mettre en place précocement, dès les premières phases de développement du végétal.

Chez des individus présentant la couche G, il est observé une lignification différentielle entre BT et BO mais aussi suivant l'âge de la plante. Plusieurs observations sont en effet constatées : (i) le BT présente une plus forte proportion de lignines de type S que de lignine de type G tandis que le BO possède plus de lignines de type G, (ii) cette différence de lignification observée chez des peupliers *in vitro* ne se retrouve pas chez des peupliers plus âgés (2 ans). De ces aspects, il apparaît que la lignification est modifiée ou altérée par un dépôt de lignines de type G ralenti et ceci dès les premiers stades de formation du bois de tension. Ce retard semble cependant disparaître avec la maturité du bois (2 ans).

En revanche, si aucune différence dans la composition polysaccharidique et protéique n'a pu être faite par coloration entre les peupliers *in vitro* et le peuplier âgé de 2 ans, une étude par immunomarquage a été réalisée. Celle-ci, sur tige de vitro-plants de peuplier, a permis de montrer que la couche G est composée de cellulose cristalline, de RG-I et d'AGPs tandis que ni hémicelluloses (xylanes ou xyloglucanes), ni HGs et extensines n'y sont trouvés. La couche G apparaît donc comme une structure différente du reste de la paroi secondaire à la fois sur la présence ou l'absence de certains polymères (xylanes par exemple) et sur la proportion qu'ils occupent au sein de cette strate. Leur révélation à l'aide d'Ac chez des vitro-plants confirme de plus leur présence dès les débuts de formation de la couche G ce qui démontre des systèmes de perception du stimulus abiotique existants et très sensibles, ainsi que la mise en place rapide de systèmes de biosynthèses. Les peupliers *in vitro* constituent donc un support expérimental fiable pour toutes les études de formation de la couche G en microscopie mais également en biochimie et en biologie moléculaire, tout en permettant une réduction de la durée de culture par comparaison aux peupliers cultivés en serre pendant au minimum 2 ans. Même si les vitro-plants ne peuvent se substituer à ces derniers, le modèle d'étude du bois jeune peut être considéré comme complémentaire.

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus par immunodétection sur CT de tige de peuplier *in vitro* (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4). L'intensité de marquage est estimée arbitrairement et est représentée par les symboles : ++ (forte), + (moyenne), +/- (faible), ? (incertain). M : Méats ; LM : Lamelle moyenne ; PS : Paroi secondaire ; ND : Non déterminé.

Polymères reconnus		Ac	Moelle	Pôles xyéliens	Cambium	Rayons ligneux	Fibres	Fibres G	Vaisseaux du bois	CAV du bois	Remarques	
Protéines structurales	AGPs	JIM4			ND	LM ++					LM des rayons ligneux excepté les méats	
	β -D-GlcA-(1-3)- α -D-	JIM13	++		++	LM ++					Marquage d'une fine bande à proximité du cambium dans BT	
	GalA-(1-2)- α -L-Rha (pour JIM13 et 8)	JIM8	+		++	LM ++		SZ, G+			Jeunes vaisseaux moins marqués dans BT	
	Extensines	JIM20	M ++		+/-				++	++		
		LM1	M ++		+				++	++		
Pectines	HGs partiellement méthylestérifiées ou non méthylestérifiées	JIM5	M ++	LM ++ PS int +/-	+		ND	LM +			Marquage de la LM des fibres G non visible en immunofluorescence	
	HGs partiellement méthylestérifiées	JIM7	LM +	M, LM +	++		ND	+				
	RG-I (1-4)- β -D-galactane	LM5	+		++	++	LM +/-	MP +	Couche G ++ surtout côté PS		LM, PS int +	Marquage uniquement du BT surtout à proximité du cambium Marquage des rayons ligneux non visible en immunofluorescence
		LM6	LM +	++	++	+(+)	M ++ LM ?		Jonction SZ/G +/-	+/- très localisé	+/- très localisé	Très faible marquage entre SZ et G, mais souvent observé
	Cellulose cristalline	CBM3a			+	+	LM, PS +/-		Couche G ++(+)	LM, PS +/-	LM, PS +/-	Marquage de toute la surface de la couche G, mais assez diffus
Hémicelluloses	XGs fucosylés/RG-I	CCRC-M1	++		++	LM +/-	LM +/-	LM +/-			Pas de marquage même après décapage à la méthylamine	
	XGs de type XXXG	LM15	++	++	++	LM +/-	LM +	LM +	LM +	LM +	Marquage de la couche G incertain. Aspécifique ?	
	Xylanes non ou peu substitués	LM10				PS ++	PS ++	PS ++(+) LM +/-	PS ++	PS +	Marquage de la PS surtout à proximité de la lumière	
	Xylanes non ou peu substitués/AXs	LM11				PS +	PS + LM +/-	PS + LM +/-	PS ++(+) LM +/-	PS + LM +/-	PS + LM +/-	Plus forte fluorescence pour les vaisseaux et le bois le plus âgé

Partie II : Les xylanes

I. Introduction

Les xylanes sont les principales hémicelluloses de la paroi secondaire des trachéides et des fibres des dicotylédones ligneuses et constituent environ 25 à 35% de la biomasse sèche. Ils constituent le polysaccharide le plus abondant après la cellulose. Chez les monocotylédones Poacées en revanche, ils représentent jusqu'à 50% de certains tissus des grains de céréales (Ebringerova et Heinze, 2000).

1. Structure des xylanes

Les xylanes sont formés d'une chaîne principale dont les motifs D-xylopyranosyles (Xyl) sont liés par des liaisons $\beta(1-4)$. Ils peuvent être ramifiés par de courtes chaînes carbonées et leurs variabilités structurales, suivant le tissu et l'espèce considéré, se manifestent par le degré et la nature des substitutions qui peuvent apparaître sur les C2 et C3 des unités Xyl (Ebringerová et Heinze, 2000), tels que des résidus de L-arabinofuranose ou plus rarement de L-arabinopyranose, liés en $\alpha(1\rightarrow3)$. D'autres substituants sont l'acide glucuronique (GlcA) et son dérivé O-méthylé en position 4, liés en $\alpha-(1\rightarrow2)$ sur la chaîne principale. Enfin, certaines unités Xyl portent des groupements acétyl en positions 2 et 3. Sur ce squelette général, différentes particularités ont été mises en évidence suivant l'essence considérée, comme la présence d'autres substituants que ceux généralement trouvés ou l'existence de chaînes latérales (Moine, 2005). Chez les espèces ligneuses, les xylanes correspondent à des hétéroxylanes dont les substitutions sont des groupements acétyles, D-glucuronyles ou 4-O-méthyl- α -D-glucuronyles. Ils constituent ainsi les polysaccharides dénommés glucuronoxylanes (GXs) et 4-O-méthylglucuronoxylanes (MGXs ; Aspinall, 1980 ; Ebringerova et Heinze, 2000 ; Ebringerova *et al.*, 2005). Il existe également des hétéropolysaccharides plus complexes comme les glucuronoarabinoxylanes (GAXs) ou les arabinoglucuronoxylanes (AGXs). Ceux-ci possèdent en plus des résidus d'acide glucuronique (GlcA) et de L-arabinose (Ara).

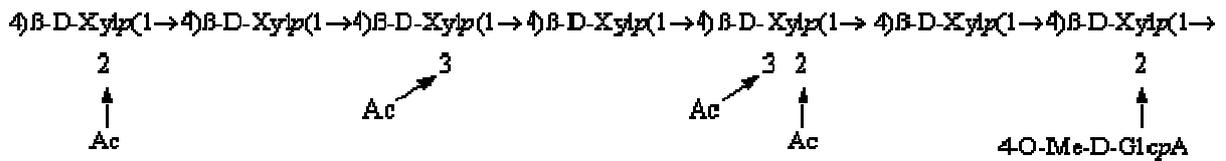


Figure 42 : Structure du 4-O-méthyl-D-glucurono-D-xylane (MGX) de bois de peuplier (d'après Teleman, 2000).

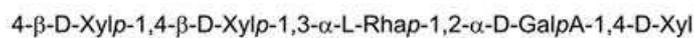


Figure 43 : Structure de la séquence présente à l'extrémité réductrice des GXs, retrouvée à la fois chez *A.thaliana*, *B. verrucosa* et *P. abies* (d'après Peña *et al.*, 2007).

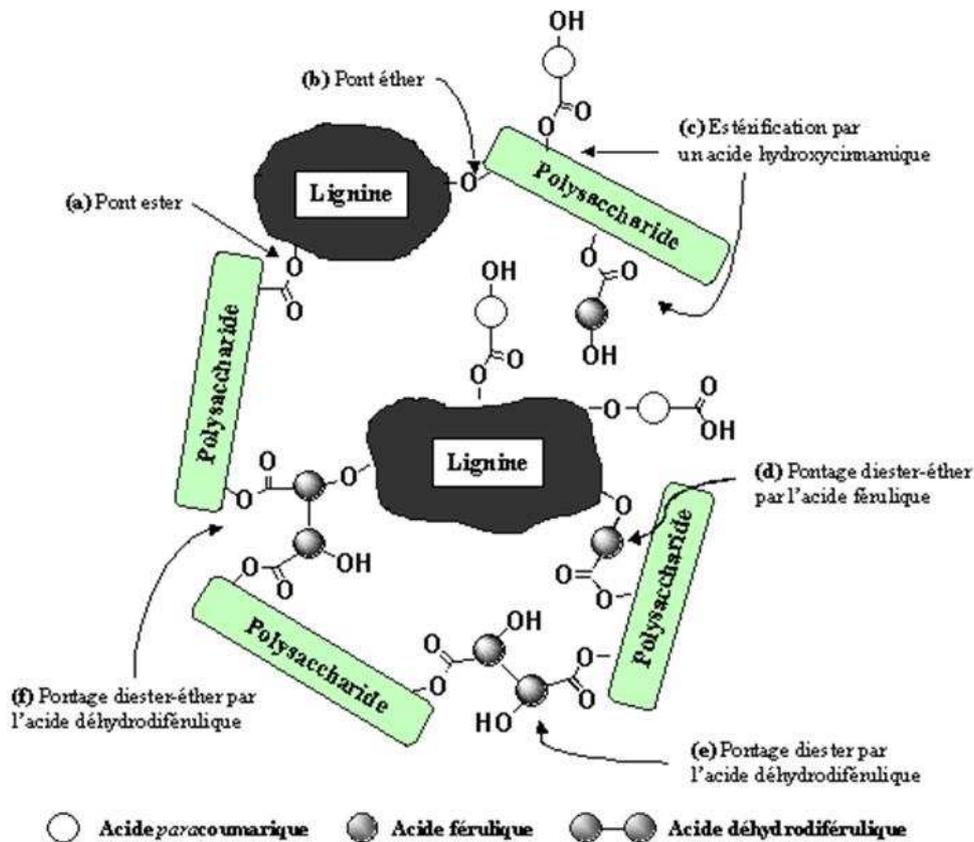


Figure 44 : Représentation schématique des liaisons possibles s'opérant entre les xylanes et la lignine au sein de la paroi secondaire (d'après Iiyama *et al.*, 1994, adapté par Moine, 2005).

a) Les glucuronoxylanes

La plupart des glucuronoxylanes (GXs) possèdent, outre la chaîne xylane d'un degré de polymérisation (DP) d'environ 200 résidus, un groupement acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique (MeGlcA) lié à la chaîne principale en position 2 (Fig. 42). Cependant, le GlcA existe aussi sous la forme non méthylée bien que les MGXs constituent l'hémicellulose principale des feuillus (Aspinall, 1980 ; Ebringerova et Heinze, 2000). Le rapport Xyl : MeGlcA varie suivant les conditions d'extraction mais correspond en moyenne à une valeur de 10 : 1 (Ebringerova *et al.*, 2005). A l'état natif, les xylanes sont O-acétylés en position 2 et/ou 3 (Gröndahl et Gatenholm, 2005) et le degré d'acétylation des GXs de tremble (*Populus tremula*) se situe entre 0,6 et 0,7 (Khan *et al.*, 1990 ; Teleman *et al.*, 2000).

Chez le bois d'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), les MGXs sont atypiques puisqu'ils contiennent un résidu α -D-galactose en O-2 de certains MeGlcA (Shatalov *et al.*, 1999 ; Evtuguin *et al.*, 2003). De même, chez le bouleau (*Betula verrucosa*) et l'épicéa (*Picea abies*), les xylanes contiennent d'autres oses prolongeant la chaîne principale tels que l'acide galacturonique et le rhamnose (Shimizu *et al.*, 1976 ; Johansson et Samuelson, 1977 ; Andersson *et al.*, 1983). La structure de l'extrémité réductrice des GXs, présentée figure 43, a aussi été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* suggérant une conservation de cette dernière entre plante herbacées et ligneuses (Peña *et al.*, 2007).

b) Les arabinoglucuronoxylanes et les glucuronoarabinoxylanes

Les AGXs et les GAXs, d'un DP compris entre 50 et 185, possèdent de simples résidus MeGlcA et L-Ara attachés en O-2 et O-3 de la chaîne principale respectivement (Ebringerova et Heinze, 2000). Les xylanes forment des liaisons avec la lignine *via* ces résidus Ara qui peuvent être estérifiés avec des acides hydroxycinnamiques tels que les acides féruliques ou *p*-coumariques (Grabber *et al.*, 2004 ; Fig. 44). Ces AGXs sont retrouvés chez les conifères mais ne représentent pas le composé hémicellulosique majoritaire. En revanche, ils sont prédominants dans les tissus lignifiés des Poacées. En règle générale, les AGXs possèdent un squelette plus fortement substitué par le MeGlcA que celui des MGXs des feuillus (Fig. 45).

Les GAXs sont quant à eux présents dans tous les tissus des graines de céréales excepté l'endosperme (Ebringerova *et al.*, 2005). Les branchements de GlcA sont 10 fois moins nombreux que ceux d'Ara et des doubles substitutions de ces oses se produisent également.

Des substitutions dimériques par des résidus L-Ara ont également été mises en évidence (Fig. 46). La ramification par l'Ara est rapportée comme étant souvent estérifiée par l'acide férulique à la position O-5 (Wende et Fry, 1997).

2. Métabolisme des xylanes

a) Biosynthèse

Les xylanes de la paroi cellulaire sont synthétisés dans l'appareil de Golgi à partir de différents nucléotides-sucres (UDP-xylose, UDP-arabinose, UDP-acide glucuronique, ...) avant d'être exportés et incorporés dans la paroi (Brett *et al.*, 1997). Pour la synthèse des GXs, plusieurs enzymes interviennent dont celles nécessaires à la formation de la séquence présente au niveau de l'extrémité réductrice, ainsi que des xylanes synthases, des xylosyltransférases (XylT), des arabinosyltransférases (AraT), des méthyltransférases, des acétyltransférases (acétylT) et des glucuronyltransférases (GlcAT ; Lee *et al.*, 2007b ; Peña *et al.*, 2007). Ces deux dernières transférases ont été localisées dans le *cis*-Golgi et le *médian*-Golgi du pois (*Pisum sativum* ; Baydoun et Brett, 1997). Outre l'identification des enzymes impliquées dans le motif glucidique, Grégory *et al.* (2002) ont purifié une enzyme glycosyltransférase golgienne montrant une activité xylane synthase. En revanche, la détection de cette activité enzymatique n'est significative qu'au niveau des cellules xylémiennes en développement ce qui traduit une expression cellule spécifique.

Bien que certaines enzymes aient été clonées, la biosynthèse des xylanes reste encore à ce jour relativement floue. Par exemple, il n'est pas encore connu si les GAXs, AXs et GXs sont synthétisés suivant le même mécanisme et/ou les mêmes enzymes et si la glucuronation et l'arabinylation sont des processus aléatoires ou ordonnés (Zeng *et al.*, 2008). Des recherches récentes permettent néanmoins de palier ce manque de données en apportant de nombreux éléments nouveaux. Grâce à des mutants d'*Arabidopsis*, des gènes candidats impliqués dans la biosynthèse des GXs de la paroi secondaire ont été isolés (Brown *et al.*, 2005 ; Zhong *et al.*, 2005 ; Brown *et al.*, 2007 ; Peña *et al.*, 2007 ; Persson *et al.*, 2007). La caractérisation de 5 mutants (*irregular xylem8 (irx8)*, *fragile fiber8 (fra8)*, *irx9*, *irx14* et *parvus*) indique que la teneur et la longueur des chaînes de GXs sont affectées ainsi que la présence de la séquence oligosaccharidique présente à leur extrémité réductrice (Brown *et al.*, 2007 ; Peña *et al.*, 2007 ; Persson *et al.*, 2007). Plusieurs auteurs suggèrent ainsi que la biosynthèse des GXs de la paroi secondaire nécessite cette séquence qui est considérée comme une amorce pour soit initier,

soit stopper le processus d'élongation. Il est admis que les protéines IRX7, IRX8 et PARVUS sont nécessaires pour la synthèse de cette séquence oligosaccharidique spécifique et que les protéines IRX14 et IRX9 sont impliquées dans l'élongation de la chaîne principale des GXs (Brown *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007a). La protéine GT43A/B du peuplier, homologue de IRX9, qui est exprimée lors de la formation du bois (Aspeborg *et al.*, 2005), est probablement responsable de l'élongation du squelette des GXs. Elle peut en effet, après complémentation du mutant *irx9*, restaurer la synthèse des GXs et l'activité XylT déficiente (Lee *et al.*, 2007a ; Zhou *et al.*, 2007). De plus, il est supposé que la xylane synthase fasse partie de la superfamille des « cellulose synthase-like (*Csl*) » (Richmond et Somerville, 2000, 2001). Deux AraT putatives d'*A. thaliana*, RRA1 et RRA2, (pour « reduced residual arabinose ») ont récemment été mises en évidence à l'aide de deux mutants (*rra1* et *rra2*). Ceux-ci montrent une diminution de 20% de la teneur en Ara au sein des parois cellulaires de la région méristématique, mais la spécificité de substrat de ces enzymes n'est pas encore connue et pourrait correspondre aux xylanes, RG-I ou extensines (Egelund *et al.*, 2007).

Il apparaît de plus que certaines enzymes agissent en synergie. C'est le cas notamment d'une XylT et d'une GlcAT de pois (Baydoun *et al.*, 1989) alors que des résultats contradictoires sont observés chez *A. thaliana* par Lee *et al.* (2007a) puisque la mutation *irx9* induit une altération de l'activité XylT mais pas de celle de la GlcAT.

Finalement, par des approches bioinformatiques et/ou génomiques (puce à ADN), Mitchell *et al.* (2007) ont identifié des gènes candidats pouvant potentiellement être impliqués dans la synthèse et la féruloylation des AXs. Aspeborg *et al.* (2005) ont quant à eux identifiés une O-acétylT putative chez le tremble hybride (*Populus tremula* x *tremuloides*).

b) Dégradation des xylanes

La paroi cellulaire est une structure dynamique où les polymères qui la composent subissent des réarrangements permettant ainsi son adaptation au processus développemental (Burton *et al.*, 2005). La maturation des xylanes pariétaux des cellules xylémiennes implique ainsi la participation de plusieurs enzymes appartenant à la classe des hydrolases. Celles-ci, assurant des activités plus ou moins spécifiques, correspondent à des $\beta(1-4)$ -endoxylanases, des β -D-xylosidases, des α -L-arabinofuranosidases, des α -D-glucuronidases, des acétylxylane estérases et des phénolique acide estérases (Sunna et Antranikian, 1997).

Les endo- $\beta(1,4)$ -xylanases hydrolysent le squelette insoluble des xylanes en xylo-oligosaccharides solubles. Elles ont été mises en évidence chez plusieurs plantes supérieures

telles l'orge (*Hordeum vulgare* L. cv. Triumph) ou *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* ; Caspers *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2002 ; respectivement). Les β -D-xylosidases, en revanche, hydrolysent les xylo-oligosaccharides et les xylobioses à partir de leur extrémité non réductrice pour libérer les résidus Xyl (Sunna et Antranikian, 1997). Leur identification a été réalisée chez plusieurs espèces et en particulier chez *Arabidopsis* (Goujon *et al.*, 2003 ; Minic *et al.*, 2004). AtBXL1 et AtBXL4, spécifiquement exprimées dans la paroi secondaire, permettent le relâchement des GXs et facilitent l'incrustation par la lignine. Aussi, chez le peuplier (*P. tremula* x *P. tremuloides* Michx), certaines de ces β -D-xylosidases sembleraient sous-exprimées dans le bois de tension (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006). Cependant, il a été démontré qu'une telle enzyme peut présenter une activité sur différents substrats. Par exemple, une β -D-xylosidase d'*Arabidopsis* nommée XYL1 montre aussi une activité α -L-arabinofuranosidase (α -L-AFases) sur AXs (Minic *et al.*, 2004). Ces α -L-AFases sont impliquées dans l'hydrolyse des liaisons α -L-Ara. Elles jouent un rôle important dans le réarrangement pariétal puisque la présence des substitutions Ara au sein des xylanes inhibe l'action des hydrolases. En effet, l'action de ces enzymes accélère l'hydrolyse des liaisons glycosidiques d'environ 10^{17} fois, ce qui en fait un des catalyseurs connu le plus efficace (Numan et Bhosle, 2006). Les estérases quant à elle n'ont toujours pas été clonées chez les plantes supérieures.

II. Résultats : rôle des β -D-xylosidases lors de la formation de la paroi

secondaire

Comme décrit précédemment, les xylanes constituent les composés majoritaires de la paroi secondaire des végétaux ligneux (Kulkarni *et al.*, 1999) et prennent majoritairement la forme de 4-O-méthylglucuronoxylanes (MGXs) dans le bois (Timell, 1969). Leur biosynthèse nécessite cependant l'activation d'un nombre limité d'enzymes parmi lesquelles des xylane xylosyltransférases, des glucuronosyltransférases et des méthyltransférases (Blee *et al.*, 2001). Si la formation du bois de tension résulte bien d'un processus de neo-synthèse, comme le démontre de nombreux travaux (Joseleau *et al.*, 2004 ; Lafarguette *et al.*, 2004 ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006 ; ...), un remodelage des polysaccharides déjà présent peut être envisagé. Ainsi, des glycosyl-, des acétyl- et méthyltransférases ou/et des glycosidases, acétylases, et des méthylases travaillant directement dans l'espace pariétal peuvent participer à la réorganisation de la paroi. Chez *Arabidopsis thaliana*, Goujon *et al.* (2003) ont identifié plusieurs gènes (*AtBXL1* et *AtBXL4*) codant des β -D-xylosidases impliquées dans le

remodelage de la paroi secondaire. Ces dernières pourraient alors agir sur le relâchement de la paroi, facilitant ainsi son imprégnation par la lignine.

Après avoir purifié puis déterminé la structure des xylanes de peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone 717-1-B4), nous avons alors cherché à identifier et à cloner les gènes orthologues aux gènes *AtBXL1* et *AtBXL4*. L'ensemble de ce travail est présentée sous forme d'une publication : Decou *et al.* Cloning and expression analysis of a wood-associated xylosidase gene (*PtaBXL1*) in poplar tension wood. *Phytochemistry* (2009) 70: 163-172.

III. Conclusion

S'il existe, à l'instar d'autres plantes comme *A. thaliana*, plusieurs gènes codant des β -D-xylosidases chez le peuplier, seul un nombre réduit d'entre eux est impliqué dans le remodelage des parois secondaires. Ainsi, *PtaBXL1*, orthologue fonctionnel et structural d'*AtBXL1*, s'exprime de façon spécifique dans la paroi secondaire et joue de plus un rôle dans la réorganisation de cette dernière lorsqu'elle est soumise à une contrainte mécanique. Ce travail nous permet de valider l'importance des mécanismes intra-pariétaux dans l'organisation, le réarrangement et donc la fonctionnalité des polysaccharides au cours de l'ontogenèse végétale. La formation d'un tissu et l'adaptation des arbres à des contraintes, ici abiotiques, se sont traduites par une activation des gènes permettant des néo-synthèses (Déjardin *et al.*, 2004) mais également par une réorganisation des polysaccharides pariétaux (Bourquin *et al.*, 2002 ; Nishikudo *et al.*, 2007 ; Decou *et al.*, 2009).

Si les xylanes sont absents de la paroi secondaire des fibres de bois de tension, se pose alors la question de la présence des hémicelluloses dans cette paroi et plus particulièrement dans la couche G. Cependant, récemment, de nouvelles données semblent suggérer l'existence de XGs dans cette strate (Nishikudo *et al.*, 2007 ; Mellerowicz *et al.*, 2008). Les XGs, connus comme impliqués dans le relâchement des parois primaires en croissance, joueraient un rôle mécanique dans le bois de tension. D'autres arguments militent en faveur de la présence de cette hémicellulose dans la paroi, comme la très forte expression de XETs (Bourquin *et al.*, 2002 ; Déjardin *et al.*, 2004 ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006). Bien que n'ayant pas identifié de XGs fucosylés dans notre modèle *in vitro*, nous avons cependant cherché à isoler la xyloglucane $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférase de peuplier (XG $\alpha(1,2)$ -FucT) dans la partie suivante.

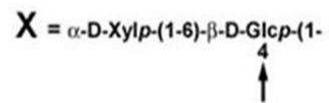
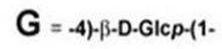


Figure 47: Représentation schématique des chaînes latérales G et X des XGs (source <http://www.ccruc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>).

I. Introduction

Le D-xylo-D-glucane ou XG est un composé hémicellulosique typique de la paroi primaire retrouvé chez toutes les plantes supérieures. Cependant, le pourcentage de XGs dans la paroi et sa structure varie selon la plante considérée. En effet ce polysaccharide peut représenter de 10 à 25% du poids sec de la paroi primaire des Angiospermes dicotylédones et des monocotylédones non-graminées ce qui en fait l'hémicellulose la plus représentée dans ces parois (McNeil *et al.*, 1984). En revanche, la paroi cellulaire des plantes de la famille des Poacées (monocotylédones) ne contient quant à elle que 6% de XGs (Carpita, 1996 ; Gibeaut *et al.*, 2005). Parmi les dicotylédones, certaines semences chez les Fabacées contiennent au sein de leurs épaisses parois de grandes quantités de xyloglucanes (40% du poids sec des cotylédons pour les graines de *Hymenaea courbaril* par exemple; Tiné *et al.*, 2000). Ces XGs ont une fonction de composés de réserve pouvant être mobilisés durant la germination (Reid, 1985 ; Buckeridge *et al.*, 1992, 2000).

1. Structure des xyloglucanes

Les XGs sont composés d'un squelette identique à celui de la cellulose avec des résidus Glc liés en $\beta(1-4)$. En revanche, jusqu'à 75% de ces résidus sont substitués en O-6 par des chaînes latérales mono-, di- ou tri-saccharidiques. Chacun des glucides constituant ces chaînes latérales possède plusieurs groupements hydroxyles qui peuvent servir de site de liaison pour le glucide suivant de la chaîne. En conséquence, une grande diversité de structures est possibles (Perrin *et al.*, 2001).

Lorsque le résidu Glc est branché, le premier ose qui lui est presque toujours lié est l' α -D-xylopyranoses (Xyl) *via* une liaison $\alpha(1-6)$. Par souci de simplification, une nomenclature internationale a été proposée pour nommer les structures des chaînes latérales des XGs (Fry *et al.*, 1993). Ainsi les résidus Glc non branchés sont notés « G (Glucose) » et ceux substitués par le Xyl sont représentés par les lettres « X (Xylose) » (Fig. 47).

Les XGs possèdent une structure relativement régulière basée sur la répétition de sous-unités oligosaccharidiques (Hayashi et Maclachlan, 1984). L'hydrolyse des liaisons glycosidiques par des $\beta(1-4)$ - endoglucanase permet de libérer ces oligosaccharidiques.

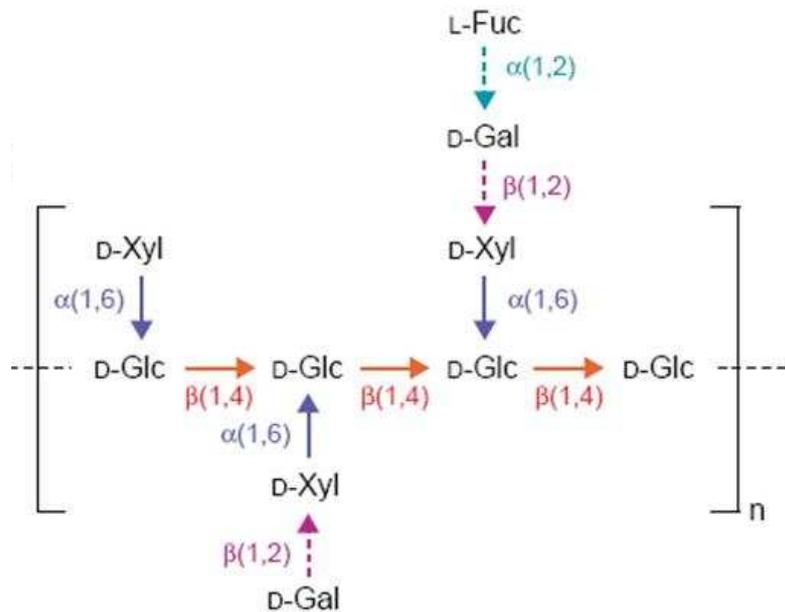


Figure 48: Représentation schématique des substitutions mono-, di- ou tri-saccharidiques des XGs généralement observées chez les végétaux. Mise en évidence des types de liaisons impliquées (d'après Reiter, 2002).

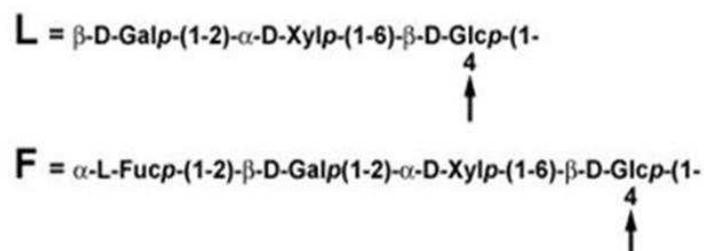


Figure 49: Représentation schématique des chaînes latérales L et F des XGs (source <http://www.crc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>).

Par différents moyens de détection incluant la séparation par chromatographie et l'analyse des fragments par spectrométrie de masse, il est possible de définir leurs structures.

Ainsi, dans les parois des végétaux, deux types majeurs d'oligosaccharides dérivés de XGs (XGOs) sont identifiés suivant le nombre et la distribution de chaînes latérales attachées à la chaîne principale : XXXG et XXGG où approximativement 75% ou 50% de résidus Glc sont branchés, respectivement (Vincken *et al.*, 1997). Parmi ces structures typiques des XGOs, des substitutions plus complexes sont observées et sont variables suivant les espèces et les tissus (Fry, 1989). Il existe de plus quelques structures particulières se différenciant de ces deux classes majeures. Les XGOs des cotylédons du courbaril (*H. courbaril* L. ; Fabacées) sont formés de 5 résidus Glc au sein de la chaîne principale. Ce XXXXG constitue 50% des sous-unités des XGs, l'autre moitié étant composée de XGOs du type XXXG (Buckeridge *et al.*, 1997). De même, dans les feuilles de la belle de jour (*Ipomea purpurea*) un cellopentaose de type XXGGG a été révélé (Hoffman *et al.*, 2005). En revanche, dans la tige de pois (*Pisum sativum*) et la graine de soja (*Glycine maxima*) des cellotrioses de type XXG sont présents (Pauly *et al.*, 2001a et Huisman *et al.*, 2000 respectivement).

a) Les XGs de type XXXG

Ils sont retrouvés chez la plupart des plantes supérieures incluant les gymnospermes, les monocotylédones (excepté les Poacées) et les angiospermes dicotylédones (à l'exception des Lamiacées et des Solanacées ; Hoffman *et al.*, 2005 ; Obel *et al.*, 2007). Ces XGOs se caractérisent par les substitutions de leurs chaînes latérales où (i) le Xyl peut être décoré en O-2 par un résidu β -D-Galactopyranose (Gal) grâce à une liaison $\beta(1-2)$ et (ii) le Gal peut lui-même porté un α -D-Fucopyranoses (Fuc) en O-6 par le biais de liaisons $\alpha(1-2)$ (Fry *et al.*, 1993 ; Fig. 48).

Chacune de ces structures est désignée par les lettres « L (gaLactose) » et « F (Fuucose) » respectivement et peuvent ainsi former des motifs typiques tels XXXG, XXFG, XLXG/XXLG et XLFG (Fig. 49). Chez le peuplier par exemple (*Populus alba* L.), les XGOs sécrétés sont principalement construits sous ces différentes formes (excepté XLXG) et distribués de manière aléatoire mais suivant le même rapport au sein du polymère (Hayashi et Takeda, 1994). Les parois cellulaires des feuilles d'une plante parasite (*Phragmanthera capitata*) sont quant à elles formées de XGOs fucosylés dont les motifs majoritaires sont XLFG/XFLG (Angone *et al.*, 2009). Les graines de soja (*Glycine maxima*) présentent elles aussi des XGs fucosylés (Huisman *et al.*, 2000) mais la fucosylation de la chaîne latérale n'est

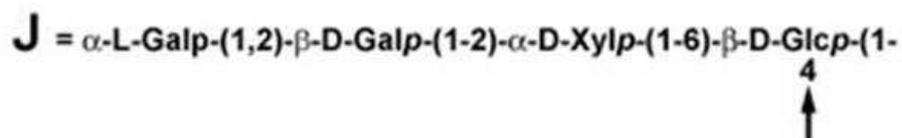


Figure 50: Représentation schématique de la chaîne latérale J des XGs (source <http://www.crc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>).

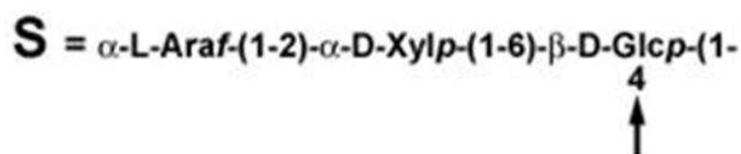


Figure 51: Représentation schématique de la chaîne latérale S des XGs (source <http://www.crc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>).

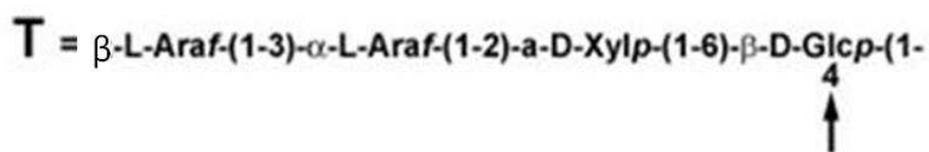


Figure 52: Représentation schématique de la chaîne latérale T des XGs (source <http://www.crc.uga.edu/~mao/xyloglc/Xtext.htm>).

généralement pas rencontrée dans les graines et les cotylédons de certains végétaux. C'est notamment le cas chez le tamarinier (*Tamarindus indica*), le copalier de Langsdorff (*Copaifera langsdorffii*) et le courbaril (*Hymenaea courbaril* L.) où les XGOs sont formés uniquement de XXXG, XLXG, XXLG, XLLG (Buckeridge *et al.*, 1992 ; 1997).

Outre ces motifs très largement observé chez les végétaux, l'existence d'une variabilité structurale donne lieu à de nouveaux motifs oligosaccharidiques. Par exemple, dans les graines de jojoba (*Simmondsia chinensis*), la présence de chaînes latérales comportant deux Gal sous les formes lévogyre et dextrogyre a été rapportée par Hantus *et al.* (1997). Celle-ci, notée « J (Jojoba) », apparaît ainsi sous la forme décrite dans la figure 50. Les motifs ainsi isolés correspondent à XXJG et XLJG. La présence d'une chaîne latérale de ce type avait toutefois été suggérée chez le mutant *mur1* d'*Arabidopsis thaliana* (Zabackis *et al.*, 1996) déficient dans la synthèse *de novo* du L-fucose conduisant à une diminution de plus de 95% en résidus Fuc des polymères pariétaux des parties aériennes (Reiter *et al.*, 1993 ; 1997). Pour contrecarrer cette mutation, 30 à 40% du Fuc des XGs foliaires de la plante sont remplacés par un ose structuralement proche : l' α -L-Gal (Zabackis *et al.*, 1996).

Dans les feuilles d'arganier (*Argania spinosa*, famille des Sapotacées), en plus des motifs XXXG, XXFG, XLXG/XXLG et XLFG, le motif XUFG a été mis en évidence par Ray *et al.* (2004). Celui-ci consiste en une chaîne latérale composée de deux résidus Xyl dont le plus externe est lié en β (1-2) à son homologue (Fig. 51).

b) XGs de type XXGG

Ce type de XGOs est rencontré essentiellement chez plusieurs espèces de la famille des Lamiacées et de celle des Solanacées. Celles-ci, appartenant toutes les deux à la sous-classe des Astéridées, sont considérées comme contenant des XGs arabinosylés et non-fucosylés (Hoffman *et al.*, 2005 ; Obel *et al.*, 2007). En effet, à partir d'une suspension cellulaire de tabac (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun), les XGOs sécrétés sont principalement formés des motifs XSGG et XXGG (York *et al.*, 1996). Le « S (Solanacées) » signifie qu'un unique résidu α -L-Arabinofuranose (Ara) est lié en O-2 par une liaison α (1-2) à un Xyl de la chaîne latérale portée par le Glc (Fig. 51).

En revanche, pour les cultures en suspension de tomate (*Lycopersicon esculentum*), les XGOs sécrétés sont plus complexes et comportent des chaînes latérales composés du trisaccharide Ara-Ara-Xyl avec une liaison β (1-3) entre les deux Ara et une liaison α (1-2) entre le Xyl et l'Ara (Jia *et al.*, 2003). Cette substitution est notée « T (Tomato) » (Fig. 52).

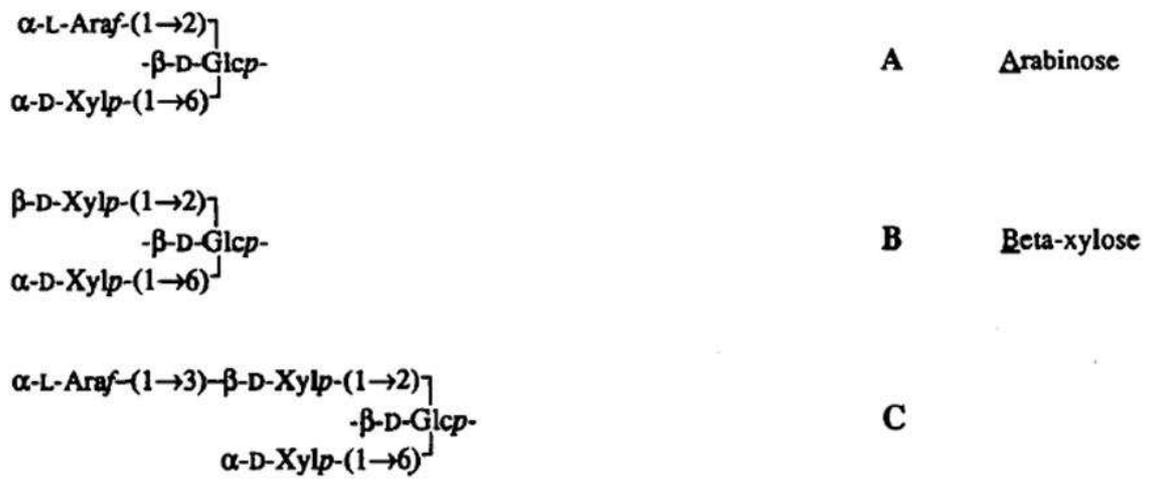


Figure 53: Représentation schématique des chaînes latérales A, B et C des XGs de sycamore (d'après York *et al.*, 1995).

Cependant, certaines plantes font figure d'exception. L'olive (*Olea europaea* cv Koroneiki ; Lamiacées) est constituée de XGOs de type XXXG qui se composent essentiellement de motifs XXSG et XLSG (Vierhuis *et al.*, 2001). Les XGOs de graines de tamarin, appartenant eux aussi au type XXXG, présentent des chaînes latérales constituées d'un galactose lié en $\beta(1-5)$ à un arabinose, lui même lié en $\alpha(1-6)$ au glucose de la chaîne principale. Chez ces mêmes graines, les auteurs suggèrent aussi la présence d'une autre ramification constituée de : Gal-Ara-Ara-Glc (Niemann *et al.*, 1997).

Bien que n'appartenant pas à la famille des Solanacées, les feuilles d'une ortie nommée « zouti rouge » (*Fleurya aestuans*) possèdent les deux types de structures XXXG et XXGG dont la dernière est caractérisée par des chaînes latérales avec un Gal terminal (Aboughe Angone *et al.*, 2009).

c) Structures atypiques

A partir d'une suspension cellulaire d'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*), approximativement 3% des XGOs sécrétés possèdent des chaînes latérales atypiques pouvant lier le résidu Glc en deux points. Ces substitutions notées « A (Arabinose) », « B (Béta-xylose) » et « C » sont présentées en figure 53 (Hisamatsu *et al.*, 1992 ; York *et al.*, 1995).

d) O-acétylation

Plusieurs études montrent que l'acétylation peut avoir lieu sur chacun des monosaccharides, excepté le Fuc et le Xyl, suivant différentes positions et suivant leur place dans la chaîne latérale. Ces branchements sont indiqués dans la nomenclature de la façon suivante : F, G, S,...

Les résidus Gal sont en général O-acétylés en O-6 dans le cas de chaînes latérales L et F mais peuvent aussi l'être en O-3 et O-4 (Kiefer *et al.*, 1989, 1990 ; Maruyama *et al.*, 1996 ; Pauly *et al.*, 1999). De plus, la présence du Fuc semble faciliter l'acétylation du Gal (Perrin *et al.*, 2003). Le Glc quant à lui est parfois acétylé en O-6 mais le plus souvent en 3^{ème} position du motif XXGG, ce qui suggère que le O-acétyle pourrait substituer le Xyl des XGs de type XXXG (Obel *et al.*, 2007). L'arabinose quant à lui peut porter un groupement acétyle en O-5 dans les structures S (Jia *et al.*, 2005). Chez les Poacées, les XGs de type XXGG se caractérisent par des chaînes très peu substituées ou uniquement par le résidu Xyl et des O-acétyles. Ils prennent ainsi des formes telles que XXGGG et XXGGGG (Jia *et al.*, 2005).

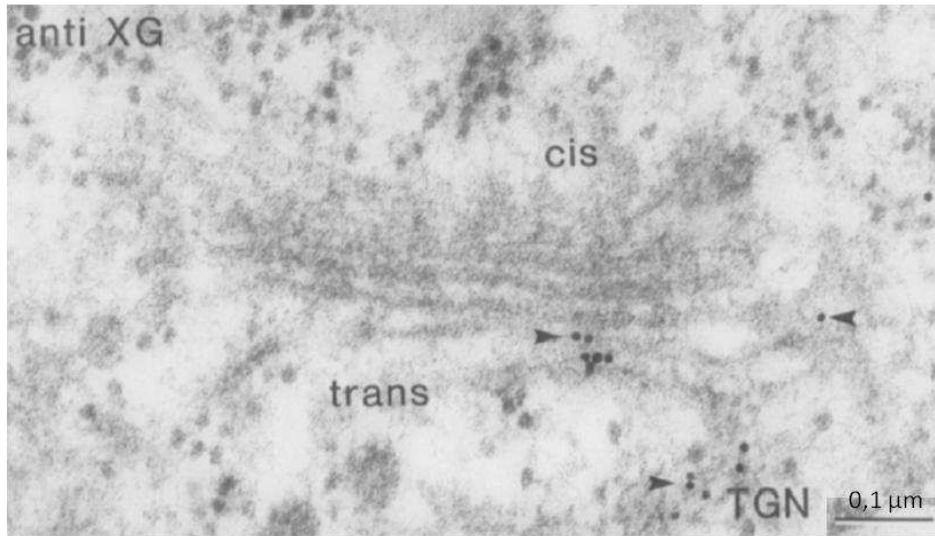


Figure 54: Mise en évidence de la localisation de la synthèse des XGs au sein de l'appareil de Golgi par immunomarquage à l'aide d'un Ac anti XGs (d'après Moore *et al.*, 1991)

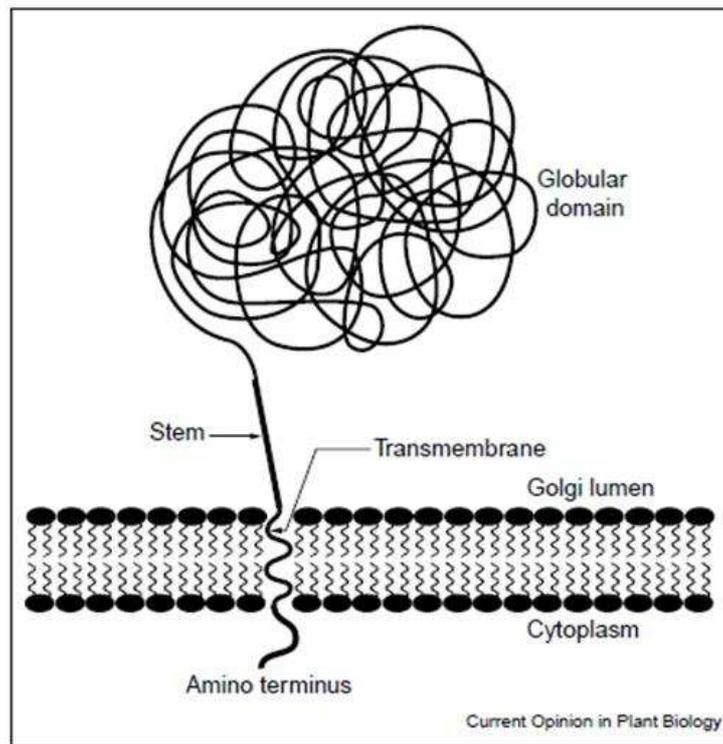


Figure 55: Représentation schématique de l'architecture des GTs localisées au sein de l'appareil de Golgi (d'après Keegstra et Raikhel, 2001)

2. Métabolisme des XGs

a) Biosynthèse

Le métabolisme des XGs implique l'action de différentes enzymes dont des glycosyltransférases, des O-acétyltransférases et des hydrolases. Ces enzymes permettent la formation ou la rupture des liaisons glycosidiques assurant respectivement l'élaboration des chaînes principales et de ses substitutions ainsi que les remodelages nécessaires au développement pariétal (Burton *et al.*, 2005). Avant leur dépôt au sein de la paroi cellulaire, les XGs sont synthétisés et branchés durant leur transit au sein de l'appareil de Golgi (Ray, 1980 ; Camirand *et al.*, 1987, Moore *et al.*, 1991 ; Zabolina *et al.*, 2008 ; Fig. 54). Dans un premier temps, du côté *cis* de l'appareil de Golgi, les résidus Glc de la chaîne principale et les unités Xyl sont assemblés puis les monosaccharides additionnels viennent décorer ces structures dans la partie *trans* et les vésicules golgiennes (Brummell *et al.*, 1990). A la sortie de cette « chaîne d'assemblage », les XGs sont délivrés au niveau de la membrane cellulaire par exocytose des vésicules de sécrétion golgiennes pour former une matrice pariétale poreuse assemblée autour des fibres de cellulose. La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse des XGs sont des protéines membranaires de type II possédant un domaine transmembranaire, une courte extrémité N-terminale face au cytosol et une extrémité C-terminale portant le site catalytique au niveau de la lumière golgienne (Keegstra et Raikhel, 2001 ; Fig. 55).

La synthèse des XGs est considérée se dérouler en 3 étapes : (i) l'initiation *via* potentiellement des amorces oligosaccharidiques (Peña *et al.*, 2008), protéiques ou lipidiques, (ii) l'élongation consistant en la synthèse de la chaîne principale par des $\beta(1,4)$ -glucane synthases et l'addition des chaînes latérales par des glycosyltransférases (GTs) et (iii) la terminaison stoppant l'action des enzymes de l'étape précédente (Perrin *et al.*, 2001). Pour l'initiation et la terminaison, aucune donnée concernant les XGs n'est cependant disponible.

La séquence des glucides au sein des polysaccharides est déterminée par la spécificité des enzymes formant les ponts entre les monosaccharides. Etant donné la grande diversité des structures des XGs possibles, cette spécificité joue un rôle primordial (Perrin *et al.*, 2001). Elles sont donc classées en différentes familles suivant la molécule donneuse de glucide, le type de glucide incorporé et le type de liaison réalisée (Keegstra et Raikhel, 2001) mais aussi suivant les motifs conservés (Henrissat et Davies, 2000). Parmi celles-ci sont retrouvées au moins 3 enzymes dont des α -FucTs, des β -galactosyltransférases et des α -xylosyltransférases

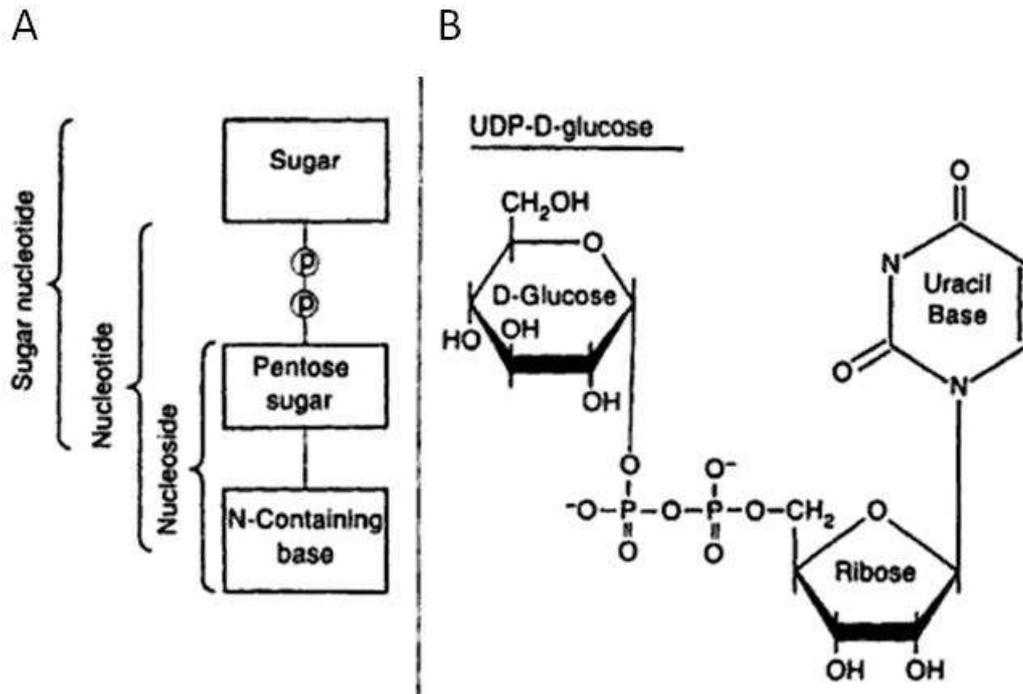


Figure 56 : Structure schématique des nucléotides-sucres. A : Structure générale. B : Structure de l'UDP-D-Glc (d'après Brett et Waldron, 1996).

(Faik *et al.*, 2002), mais aussi des arabinosyltransférases et des O-acétyltransférases. Outre les XGOs, des nucléotides-sucres tels que le GDP-L-Fuc, le GDP-L-Gal, UDP-D-Xyl, ... (Fig. 56) sont nécessaires à l'activité transférase. Ceux-ci proviennent de l'UDP-D-Glc ou du GDP-D-Man activés par des nucléosides diphosphates pyrophosphorylases. Plusieurs enzymes telles que des carboxy-lyases, décarboxylases déshydrogénases épiméras, déshydratases sont impliquées dans l'interconversion de ces sucres diphosphonucléosidiques (Seifert, 2004).

i. Formation de la chaîne principale

Comme précisé précédemment pour les xylanes, la similarité entre les squelettes des XGs et de la cellulose suggère qu'un ou des gène(s) *Cellulose Synthase-Like (CSL)* semblable(s) à ceux codant la cellulose synthase (*CESA*) code(n)t une $\beta(1-4)$ glucane synthase localisée au niveau de l'appareil de Golgi et qui serait spécifique de certaines hémicelluloses (Richmond et Somerville, 2001 ; Hazen *et al.*, 2002). Une publication confirme cette hypothèse par la découverte d'une glycane synthase spécifique de la synthèse des xyloglucanes dans les graines de capucine (*Tropaeolum majus* ; Cocuron *et al.*, 2007). L'activité de cette enzyme, vérifiée chez la levure *Pichia pastoris*, rapporte ainsi pour la première fois qu'une protéine de la famille des CSLC (= sous famille C) est impliquée dans la synthèse de la chaîne glucane. Cette enzyme a été immunolocalisée grâce à l'Ac CSLC6 dans des fractions microsomales d'*Arabidopsis thaliana* (Dunkley *et al.*, 2006). Konishi *et al.* (2004) suggèrent de plus que ces glucanes synthases sont associées à des saccharoses synthases dans la tige de peuplier permettant ainsi l'apport d'UDP-Glc pour la synthèse des chaînes principales des XGs.

ii. Formation des chaînes latérales

Les α -xylosyltransférases sont nécessaires au greffage d'un résidu Xyl issu de l'UDP-xylose sur le Glc du squelette des XGs. Elles sont suggérées agir de concert avec des $\beta(1,4)$ -glucane synthases pour être fonctionnelles (Faik *et al.*, 1997 ; 2002) et interviendraient dans la partie *cis* de l'appareil de Golgi (Brummell *et al.*, 1990). La synthèse de XGs *in vitro* à partir d'une fraction enzymatique issue d'une suspension cellulaire de soja a permis de mettre en évidence l'activité $\alpha(1,6)$ -xylosyltransférase et de préciser sa dépendance à l'UDP-Glc (Hayashi et Matsuda, 1981). Trois gènes codant cette enzyme ont depuis été isolés chez *Arabidopsis thaliana* (nommés *XXT1*, *XXT2* et *XXT5*) par homologie de séquence avec une

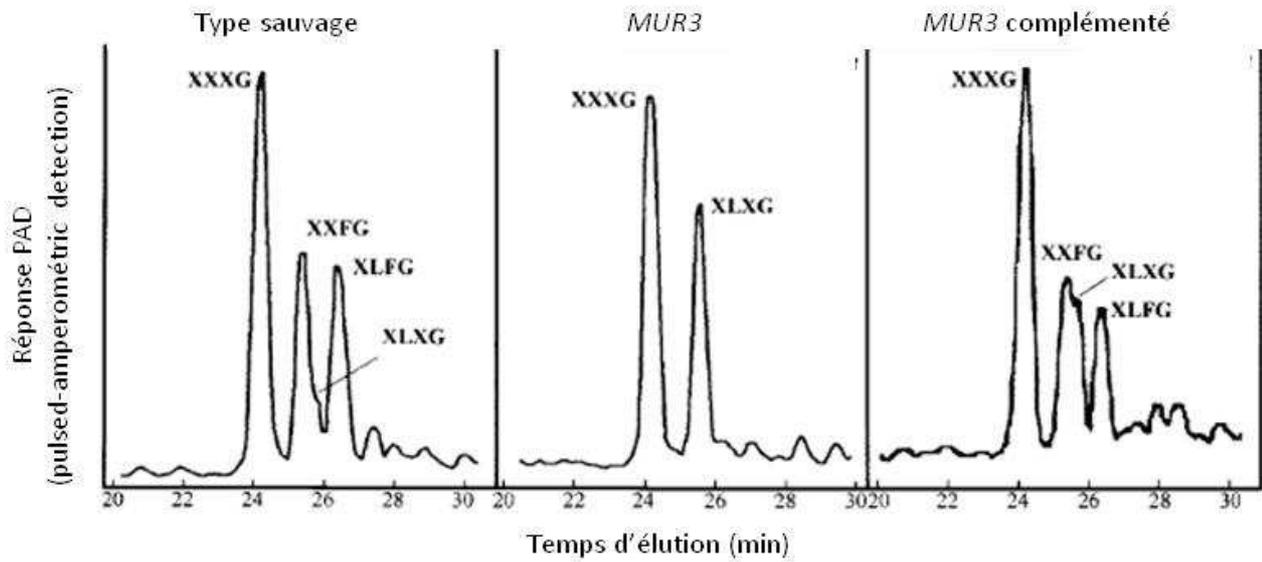


Figure 57 : Comparaison des structures des XGs retrouvés chez *Arabidopsis thaliana*. Type sauvage (gauche), mutant *MUR3* (milieu), complémentation du mutant *MUR3* (droite ; d'après Madson *et al.*, 2003).

$\alpha(1,6)$ -galactosyltransférase spécifique des galactomannanes de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) identifiée par Edwards *et al.* (1999). Ces enzymes présentent en commun la capacité de former des branchements en $\alpha(1,6)$ sur le squelette de la chaîne linéaire $\beta(1,4)$ -glucane. L'activité de ces $\alpha(1,6)$ -xylosyltransférases a été validée par expression chez la levure et dans des cellules d'insectes ainsi qu'en isolant un simple mutant *xxt5* et un double mutant *xxt1 xxt2* déficients en XGs (Faik *et al.*, 2002 ; Cavalier et Keegstra, 2006 ; Cavalier *et al.*, 2008 ; Zabotina *et al.*, 2008).

Les XGs β -galacosyltransférases, permettent la liaison d'un résidu Gal sur le Xyl des XGs. L'une d'entre elles a été détectée chez un mutant d'*Arabidopsis* nommé *MUR3* et liait spécifiquement le résidu Gal sur le troisième résidu Xyl de la structure XXXG (Madson *et al.*, 2003). Ces mutants ont une teneur réduite en résidus Fuc et Gal mais celle-ci est restaurée par complémentation du gène *MUR3* (Fig. 57). La protéine *MUR3* contient de plus le même motif pfam03016 que le domaine β -glucuronyltransférase de l'exostosine animale impliquée dans la synthèse des héparanes sulfates.

De plus, par analyse de régions codantes similaires à celle de *MUR3* chez *A. thaliana*, Li *et al.* (2004) ont pu mettre en évidence dix β -galactosyltransférases putatives étant chacune transcrites (*AtGT11-20*). Deux mutants *AtGT13* et *AtGT18* montrent une réduction de la teneur en Gal au niveau pariétal, suggérant ainsi que ces deux gènes codent des β -galactosyltransférases.

Les XGs $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases réalisent quant à elles le greffage d'un résidu Fuc sur un résidu Gal des chaînes latérales des XGs. Elles sont suggérées intervenir à la fin de la maturation des XGs dans la partie *trans* de l'appareil de Golgi ou dans les vésicules de sécrétion (Brummell *et al.*, 1990). La mise en évidence de la fucosylation *in vitro* des XGs a été réalisée pour la première fois par Camirand et Maclachlan (1986). Depuis, plusieurs des enzymes possédant cette activité ont été caractérisées chez différentes plantes. Par exemple, Faik *et al.* (2000) ont pu isoler cette enzyme chez le pois. L'enzyme nommée *AtFUT1* a été isolée chez *A. thaliana* par homologie avec la séquence peptidique partielle de la fucosyltransférase d'épicotyles de pois (Perrin *et al.*, 1999). Elle appartient à la famille 37 des glycosyltransférases et forme une famille multi-génique de 10 gènes chez *Arabidopsis*. Cependant, seule *AtFUT1* présente une activité fucosyltransférase spécifique des XGs (Sarria *et al.*, 2001). L'obtention du mutant d'*Arabidopsis* *MUR2*, déficient en XGs fucosylés et altéré au niveau du gène *AtFUT1*, a de plus confirmée l'activité de cette enzyme. Etant donné la déficience sévère en XGs fucosylés, *AtFUT1* semble « gérer » à elle seule la fucosylation de ce polymère chez cette plante (Vanzin *et al.*, 2002). Au niveau de la paroi secondaire des fibres

de peuplier, des XGs fucosylés ont été mis en évidence par immunomarquage avec l'Ac CCRC-M1 (Bourquin *et al.*, 2002). Bien que les XGs soient minoritaires au sein de cette paroi, la présence de tels polysaccharides indique que plusieurs GTs qui leur sont spécifiques sont impliquées dans ces formations secondaires.

b) Dégradation des XGs

Comme pour la biosynthèse, les réarrangements des XGs sont réalisés par de nombreuses enzymes qui vont modifier leur structure et leurs interactions avec les autres polymères de la paroi. Ces modifications peuvent intervenir tant sur la chaîne principale que sur ses branchements et impliquent de ce fait des glycosides hydrolases (GHs) et des transglycosidases telles que des β -D-galactosidases, α -D-xylosidases, endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) et des β -D-glucosidases (Minic et Jouanin, 2006). A celles-ci s'ajoutent des fucosidases et des arabinofuranosidases. La dégradation des XGs est réalisée suivant l'action coordonnée de chacune de ces enzymes. Leur(s) activité(s) intervien(nen)t notamment pour l'élongation cellulaire, la maturation des fruits, la mobilisation des réserves des graines, la sénescence, la signalisation, la défense contre les pathogènes, ... (de Alcântara *et al.*, 2006 ; Minic, 2008). Des GHs peuvent aussi probablement contrôler la taille moléculaire des XGs synthétisés avant leur relargage dans la matrice extracellulaire. La fonction précise de celles-ci lors de la biosynthèse reste cependant à préciser (Minic, 2008). De plus, ces enzymes agissent principalement au niveau des XGs de la paroi primaire. Les XGs étant faiblement présents au sein de la paroi secondaire, peu de données existent sur des GHs et des transglycosidases agissant au sein de cette dernière. Seule l'activité XET détectée au sein de la paroi secondaire et de la couche G du bois de peuplier peut être reliée au remodelage des XGs dans des structures secondaires (Bourquin *et al.*, 2002 ; Déjardin *et al.*, 2004 ; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006 ; Nishikubo *et al.*, 2007 ; Mellerowicz *et al.*, 2008). Ainsi, même si toutes les données présentées ci-après concernent principalement la paroi primaire, il peut être envisagé néanmoins, par extrapolation de résultats, que des isoformes de ces enzymes soient impliquées dans la restructuration des parois secondaires.

i. Modifications des chaînes latérales

L'élimination des oses des ramifications de la chaîne principale font intervenir des enzymes spécifiques à chaque résidu monosaccharidique. Celles-ci sont toutes localisées au niveau du fluide apoplastique des cellules (Iglesias *et al.*, 2006) et des variations de pH dans la

paroi peuvent induire leur activité étant donné les différents pH optimum trouvés pour une β -galactosidase (Buckeridge *et al.*, 2000). Concernant les XGs fucosylés, plusieurs $\alpha(1,2)$ -fucosidases rompant la liaison entre le Fuc et le Gal (fucosidases de classe II) ont pu être caractérisées récemment chez l'arabette et le lys (Ishimizu *et al.*, 2007 ; Léonard *et al.*, 2008). Chez ce dernier, cette protéine forme un complexe enzymatique avec une endo- β -mannosidase. Cependant, certaines autres enzymes considérées comme possédant une activité $\alpha(1,2)$ -fucosidases se sont révélées posséder une activité spécifique d'autres types de liaison (de la Torre *et al.*, 2002 ; Zeleny *et al.*, 2006) voire une activité totalement différente (Augur *et al.*, 1993 ;1995 ; Tarragó *et al.*, 2003).

Les β -galactosidases, caractérisées par leur capacité à hydrolyser le Gal terminal d'un β -D-galactoside, sont fortement étudiées et plusieurs ont été purifiées (Edwards *et al.*, 1988 ; de Alcântara *et al.*, 2006) et leurs gènes parfois isolés (Smith et Gross, 2000). Il est de plus suggéré que les interactions des hydrolases avec les XGs soient dépendantes ou modulées par la présence du résidu Gal des substitutions latérales (Tiné *et al.*, 2003).

L'élimination du résidu Xyl des XGs nécessite quant à elle l'action d'une α -xylosidase. Sampedro *et al.* (2001) ont identifié le gène codant cette enzyme chez *A. thaliana* par homologie de séquence avec une α -xylosidase de chou (*Brassica oleracea*). Ce gène est rapporté comme codant aussi une α -glucosidase chez *A. thaliana*. Les activités α -xylosidase et α -glucosidase seraient ainsi assurées par la même enzyme (Monroe *et al.*, 2003).

ii. Hydrolyse de la chaîne principale

Comme précédemment cité, l'activité β -glucosidase spécifique des XGs serait le propre d'une enzyme ayant déjà une activité α -xylosidase. Les β -glucosidases ont pour propriété de catalyser l'hydrolyse de résidus Glc de XGOs sans réaliser de transglycosylation. L'une d'entre-elles a déjà été isolée et clonée chez la capucine (*Tropaeolum majus* L.). Elle n'agit que sur des XGOs où le Glc terminal non réducteur est libre (Crombie *et al.*, 1998). A l'inverse de cette activité, la chaîne principale des XGs est attaquée par des XTHs qui ont deux activités distinctes : hydrolyse (xyloglucanase ou xyloglucane endo- β -(1-4)-glucanase ; XEH) et/ou endotransglycosylation (XET ; Baumann *et al.*, 2007 ; Michailidis *et al.*, 2009). Pour ces derniers auteurs, l'activité XEH a évolué comme un gain de fonction d'une XET ancestrale. Quelques membres de la famille des XTHs peuvent ainsi utiliser l'eau comme accepteur, ce qui résulte en l'hydrolyse des XGs. Néanmoins, ces enzymes ont pour fonction très majoritaire de rompre les chaînes principales des XGs et de transférer, au niveau de leur extrémité

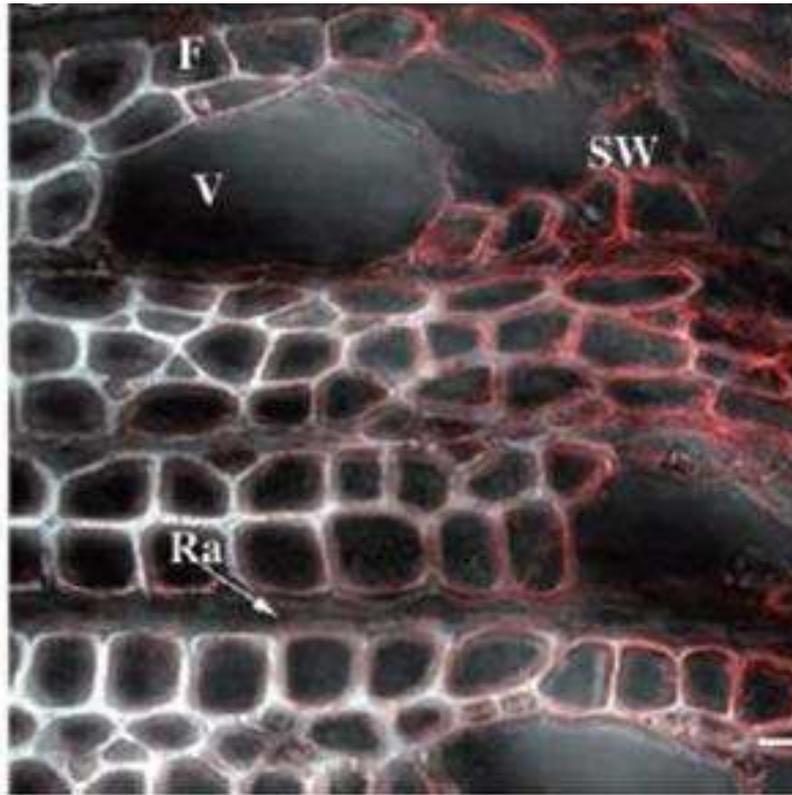


Figure 58 : Localisation de l'activité XET dans le xylème en différenciation de tige de peuplier (d'après Bourquin *et al.*, 2002). Le marquage est réalisé par incubation de sections fraîches de tiges avec des XGOs couplés à la rhodamine. Les rayons ligneux (Ra) sont faiblement marqués tandis que les fibres (F) le sont fortement lors des premiers stades de développement de la paroi secondaire (SW). V : vaisseaux.

réductrice, d'autres chaînes principales existantes ou nouvellement synthétisées de XGs ou de XGOs (Monroe *et al.*, 2003 ; Fry *et al.*, 2008). Par leur double mode d'action, ces enzymes peuvent être considérées comme participant à la biosynthèse et au remodelage des XGs (Rose *et al.*, 2002). Cette activité enzymatique globale permet ainsi l'allongement des XGs et leurs greffages à d'autres polysaccharides pariétaux (Fry, 2004). Les XTHs contrôlent par le fait l'extensibilité et les propriétés mécaniques de la paroi (Kurasawa *et al.*, 2009). Ces enzymes ont été très largement étudiées et plusieurs d'entre-elles sont caractérisées, tant d'un point de vue biochimique que moléculaire. Chez *A. thaliana*, il est considéré que 33 gènes composent cette famille enzymatique (Yokoyama et Nishitani, 2001). Bourquin *et al.* (2002), ont de plus montré que les XETs et les XGs fucosylés sont présents au sein de la paroi secondaire et surtout de la couche S1 (Fig. 58). Ces auteurs, suggèrent ainsi que pendant la formation de celle-ci, les XGs sont sécrétés et transportés jusqu'à la paroi primaire où ils sont incorporés. Ce processus permettrait alors de renforcer les liens entre ces deux parois et notamment avec les microfibrilles de cellulose. Les XTH d'orge (*Hordeum vulgare* L., cv. Clipper) peuvent également catalyser la transglucosylation entre des substrats donneurs cellulosiques dont l'hydroxyéthylcellulose (HEC) et les XGs (Hrmova *et al.*, 2007).

II. Résultats : rôle des $\alpha(1,2)$ -FucTs lors de la formation de la paroi secondaire.

1. Identification et caractérisation des gènes codant des $\alpha(1,2)$ -FucTs

L' $\alpha(1,2)$ -fucosylation a été décrite sur les hémicelluloses, les pectines, et les arabinogalactane-protéines. Deux activités $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases végétales ont fait l'objet d'études. La première transfère un résidu fucose sur un résidu Gal des XGs tandis que la seconde réalise cette même liaison avec un résidu arabinose des AGPs.

La première de ces deux enzymes, la XG $\alpha(1,2)$ FucT, a été purifiée d'un facteur 1400 à partir d'épicotyles de pois (*Pisum sativum* ; Faïk *et al.*, 2000) par des techniques de chromatographie d'affinité, d'exclusion et d'échange d'anion. Il s'agit d'une protéine dont la masse évaluée en gel SDS-PAGE est de 60 kDa. Son séquençage partiel a permis l'identification d'une EST d'*Arabidopsis thaliana* qui a servi de sonde pour le criblage d'une banque d'ADNc de cette même espèce. Une séquence de 1677 nucléotides (nt) constituant un

cadre de lecture ouvert codant une protéine de 63,5 kDa a ainsi été identifiée (Perrin *et al.*, 1999). L'ADNc ainsi que la séquence génomique correspondante ont été appelés *AtFUT1*. La confirmation qu'*AtFUT1* code une $\alpha(1,2)$ -FucT a été apportée par l'immuno-précipitation de l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène *AtFUT1* avec un anticorps dirigé contre cette protéine. Le second gène codant une $\alpha(1,2)$ -FucT de plante, obtenu chez le pois, a été appelée *PsFUT1*. Il code une protéine de 565 acides aminés dont la séquence peptidique présente 62,3% d'identité avec *AtFUT1* (Faik *et al.*, 2000). L'une et l'autre de ces enzymes présentent un domaine trans-membranaire de 23 acides aminés dans la région NH₂-terminale. Neuf gènes additionnels codant des protéines de fortes identités avec *AtFUT1* ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Il s'agit des gènes *AtFUT2* à *AtFUT10*. À l'exception d'*AtFUT3*, ces gènes sont organisés en clusters regroupant *AtFUT6* à *AtFUT9* sur le chromosome 1, *AtFUT1* et 2 sur le chromosome 2 et *AtFUT4*, *AtFUT5* et *AtFUT10* sur le chromosome 2 (Sarria *et al.*, 2001). Les gènes *AtFUT1*, 2 et 3 sont exprimés dans la plante entière ce qui n'est pas le cas des autres gènes. Par exemple, *AtFUT9* n'est exprimé que dans la tige et les feuilles tandis qu'*AtFUT6* est principalement exprimé dans les fleurs et les racines. Parmi les neuf gènes d'*Arabidopsis*, seul *AtFUT1* est caractérisé en terme de spécificité d'accepteur. À l'instar de nombreuses autres N-glycosyltransférases, les XG $\alpha(1,2)$ -FucTs sont des protéines membranaires de type II. Lors des études de purification de l'enzyme de pois, Faik *et al.* (2000) démontrent une co-localisation de l'enzyme avec une protéine chaperone BiP. Sans connaître la relation exacte entre les deux protéines, les auteurs suggèrent l'existence de complexes protéiques au sein des saccules golgiens indispensables à la biosynthèse des XGs. Les XG-FucTs fucosylent préférentiellement les octasaccharides Glc₄Xyl₃Gal. Les produits, *in vitro*, de l'activité XG-FucTase de pois sont principalement Glc₄Xyl₃GalFuc et Glc₄Xyl₃Gal₂Fuc. Ces derniers, quoique présents dans les tissus de pois, sont très minoritairement représentés (Guillen *et al.*, 1995). Les gènes codant des XG $\alpha(1,2)$ -FucTs ont été caractérisés, et sont rassemblés au sein de la famille 37 des glycosyltransférases à l'adresse suivante : http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/gtf_37.html.

Sur la base des données de séquence des $\alpha(1,2)$ -FucTs préalablement identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs séquences orthologues ont été identifiées chez le peuplier (*Populus trichocarpa*). Les séquences orthologues du peuplier (*PtFUT*) ont été obtenues par comparaison (tblastN) soit à partir de la séquence nucléotidique d'*AtFUT1* et de *PsFUT1* (n° d'accèsion SwissProt : *Q9SWH5* et *Q9M5Q1* respectivement), soit à partir des domaines

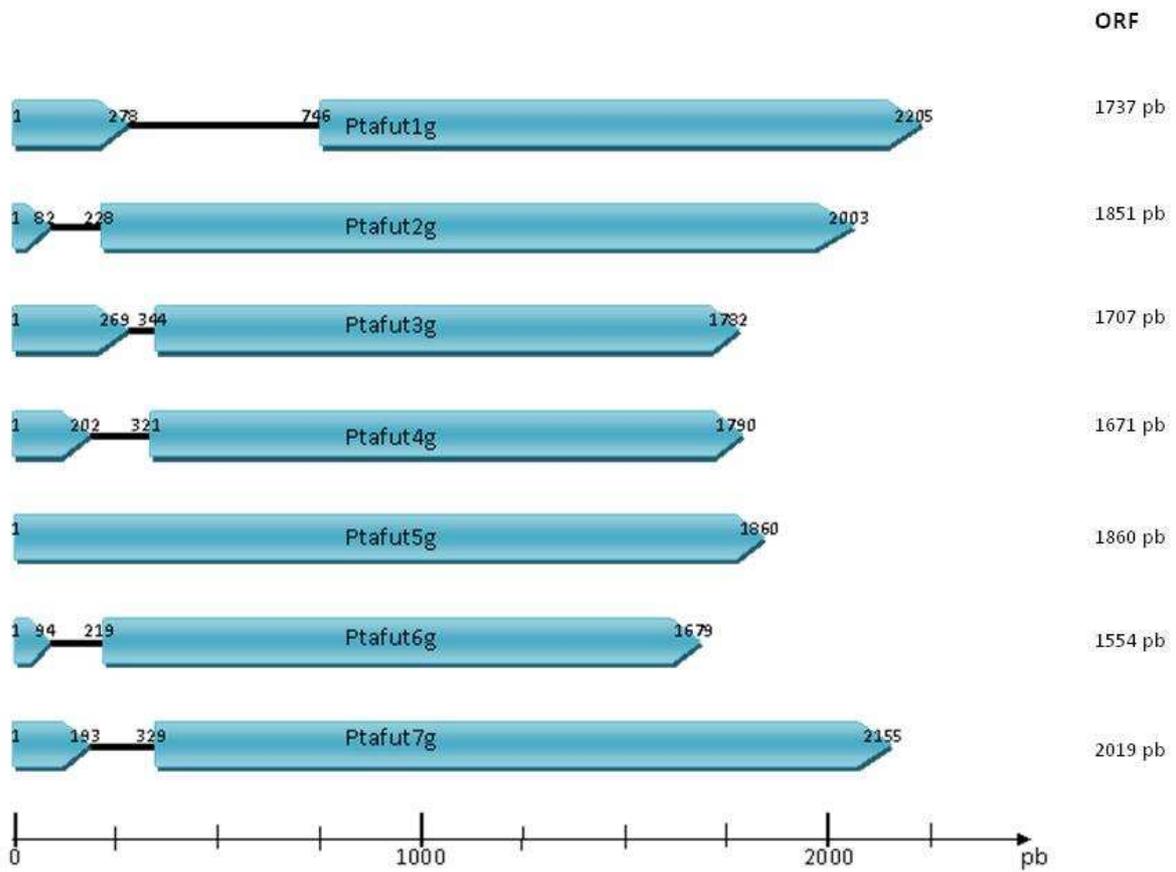


Figure 59 : Représentation schématique de la séquence génomique des gènes *PtaFUT* et détail de la longueur de la séquence codante de chaque gène (ORF) déduite après suppression des introns.

consensus des séquences nucléotidiques de plantes codant des $\alpha(1,2)$ -FucTs (n° d'accension SwissProt : Q6Z6F4 (*Oriza sativa japonica*) ; n° d'accension GenBank : CAH67093.1 (*Oriza sativa indica*). Des BLASTn ont ainsi été effectués sur le génome du peuplier à partir du site internet « Joint Genome Institut » (JGI ; http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html). Les résultats des tBlastN ont permis d'identifier un total de 7 gènes codant des $\alpha(1,2)$ -FucTs putatives, nommés suivant leur ordre de découverte *PtFUT1* à 7 (Fig. 59). Après avoir analysé et comparé les gènes de peuplier et de l'arabette des dames, des amorces ont été dessinées dans le but d'amplifier les gènes correspondants, non pas chez *Populus trichocarpa* mais sur notre modèle d'étude (*P. tremula* x *P. alba*, clone INRA 717-1-B4). Sept amplicons différents (*PtaFUT1* à 7) obtenus par PCR à partir d'ADNg ont pu être clonés et séquencés dans leur intégralité. Ces différentes séquences présentent de fortes homologues (i) soit avec leur orthologue identifié chez *P. trichocarpa* : de 89% (*PtFUT2*) à 99,1% (*PtFUT1*) sur l'intégralité de leur séquence, (ii) soit avec *AtFUT1* : de 59,3% (*PtaFUT2*) à 70,7% (*PtaFUT1*) sur une séquence moyenne de 1423 nucléotides (nt) correspondant à la partie la plus conservée entre les gènes alignés. Les fortes homologues entre les deux espèces de peuplier se révèlent conformément aux résultats proposées par Geisler-Lee *et al.* (2006) étant donné que les similarités des séquences codantes entre *P. trichocarpa* et *P. tremula* x *P. alba* sont proches de 97,5%.

Pour valider expérimentalement le nombre de copies du gène codant des $\alpha(1,2)$ -FucTs putatives, une analyse du génome du peuplier par Southern blot à l'aide de « sondes froides » a été réalisée. Une sonde marquée à la digoxygénine de 209 nt correspondant à la séquence située entre le 968^{ème} et le 1177^{ème} nt de *PtaFUT4g* a ainsi été synthétisée (située dans la zone la plus conservée entre les séquences génomiques des gènes *PtaFUT*) afin qu'elle puisse s'hybrider au mieux à toutes les séquences génomiques *PtaFUT*. Dans le but d'optimiser et de valider les différentes étapes du protocole de Southern blot, plusieurs essais ont été réalisés, telles la vérification de la synthèse de cette sonde et son hybridation à sa séquence complémentaire (Fig. 60 A et B). Les résultats obtenus montrent ainsi uniquement le marquage du vecteur sans spécificité. Cependant, le signal apparaît faible étant donné la grande quantité de vecteur présent sur la membrane de nylon (1 μ g de plasmide déposé au maximum). Suite à la validation des essais préliminaires, le Southern blot a été réalisé sur ADNg du peuplier hybride digéré par *EcoR1* ou *BamH1* à l'aide de la même sonde que précédemment. Plusieurs essais ont été réalisés, mais aucun n'a permis de révéler la présence des gènes après colorimétrie. Étant donné la faiblesse du signal (Fig. 60 C), le manque de

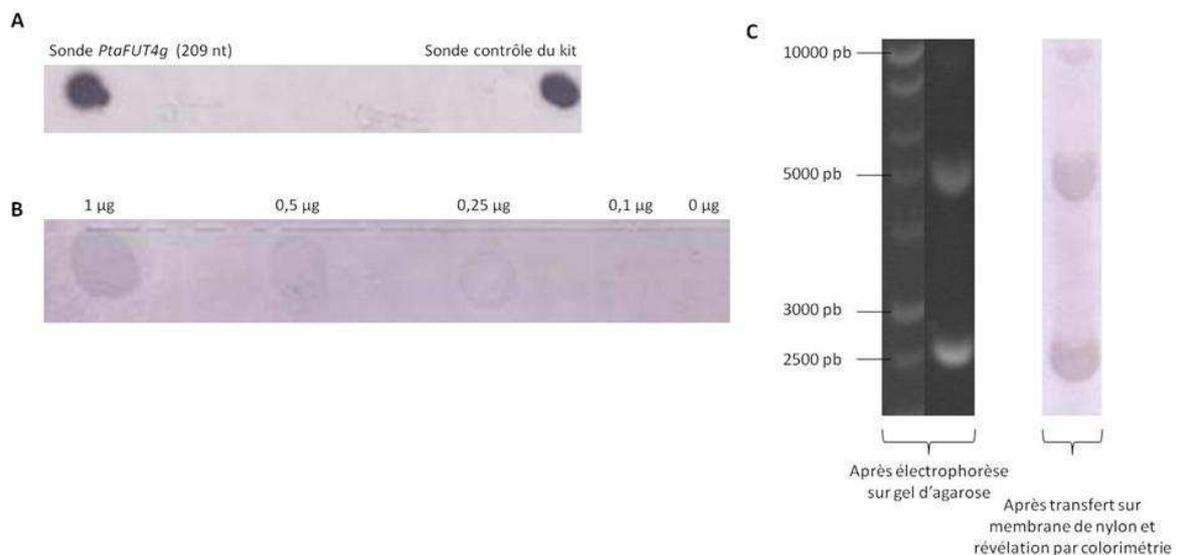


Figure 60 : Détermination du nombre de copies des gènes *PtaFUT4g* chez le peuplier hybride par Southern blot suivant une révélation par colorimétrie. A : Contrôle de la synthèse de la sonde marquée à la digoxygénine (séquence de 209 nt du gène *PtaFUT4g*) par dépôt de 500 ng de celle-ci sur membrane de nylon. Le contrôle de la sonde du kit a été réalisé en parallèle suivant le même protocole. B : Vérification de l'hybridation de la sonde *PtaFUT4g* (209 nt) sur le plasmide *pGEM-Teasy::PtaFUT4g* préalablement fixé à la membrane par simple dépôt et suivant diverses quantités (de 0 à 1 µg). C : Optimisation et validation des différentes étapes du protocole expérimental depuis la migration sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique (1 µg de *pGEM-Teasy::PtaFUT4g*) jusqu'à la révélation par colorimétrie. Plusieurs formes du vecteur sont observées : relachée (\approx 5000 pb), sur-enroulée (\approx 2500 pb).

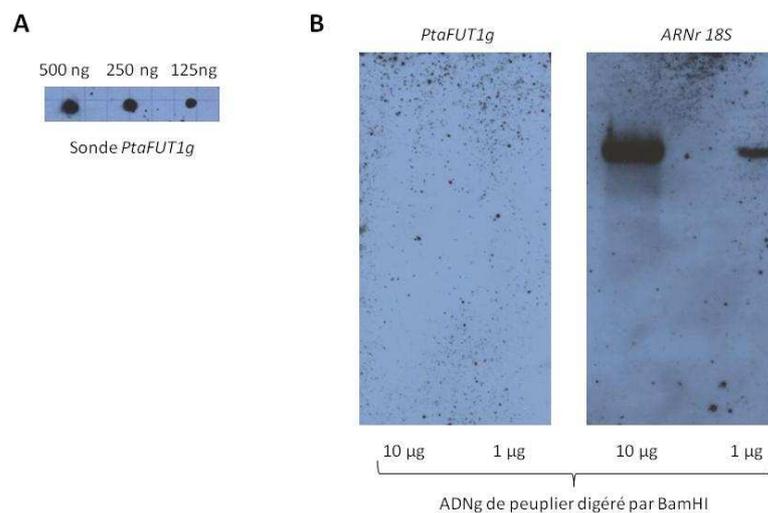


Figure 61 : Détermination du nombre de copies des gènes *PtaFUT1g* chez le peuplier hybride par Southern blot suivant une révélation par chimiluminescence. A : Contrôle qualitatif de la synthèse de la sonde marquée à la digoxygénine (séquence de 510 nt du gène *PtaFUT1g*) suivant différentes quantités déposées sur membrane de nylon. B : Film autoradiographiques obtenus après marquage de l'ADNg de peuplier digéré par BamHI et marqué soit par la sonde *PtaFUT1g* ou soit par la sonde *ARNr 18S*. Les quantités d'ADNg déposées par piste avant migration sur gel d'agarose sont indiquées en dessous des films autoradiographiques.

sensibilité de la technique a été considéré comme responsable de l'absence de marquage. Une détection par chemiluminescence décrite comme 10 fois plus sensible a donc été choisie pour vérifier cette hypothèse. Le film autoradiographique obtenu ne montre cependant aucun signal correspondant à l'hybridation de la sonde aux gènes *PtaFUTg* (résultat non montré). Pour s'affranchir d'éventuels problèmes liés à la sonde choisie (longueur de celle-ci, zone de l'ADN peu accessible), la synthèse d'une nouvelle sonde correspondant à une séquence de 510 nt de *PtaFUT1g* a été réalisée (séquence située dans la partie 5' du gène comprenant l'intron ; entre le 507^{ème} et le 1017^{ème} nt). Sa vérification en chemiluminescence a été effectuée tant par simple dépôt sur membrane de nylon (Fig. 61 A) que par hybridation sur le vecteur *pGEM-T easy ::PtaFUT1g* fixé sur membrane (résultat non montré). Le film autoradiographique obtenu après révélation lors des essais sur ADN_g de peuplier digéré par *BamHI* (10 µg ou 1 µg) ne donne cependant aucun résultat d'hybridation concluant (Fig. 61 B). Le faible nombre de copie des gènes pourraient ainsi expliquer ces résultats. Pour vérifier cette supposition, un Southern blot a été réalisé suivant les mêmes conditions expérimentales pour la révélation du gène constitutif codant l'ARN ribosomal 18S. Le film autoradiographique présenté figure 61B montre clairement le signal correspondant à ce gène même pour un dépôt d'ADN_g de peuplier initial de 1 µg. Un marquage de ce gène suivant deux bandes distinctes a aussi été observé dans le cas d'ADN_g de peuplier digéré par *EcoRI* (site *EcoRI* située dans la zone reconnue par la sonde ; résultat non montré). Il est donc suggéré que les gènes *PtaFUT* possèdent peu de copies au sein du génome ce qui rend difficile leur détection par Southern blot suivant une hybridation par une sonde froide. L'utilisation de sondes radioactives pourrait s'avérer ainsi le seul moyen de détection.

Concernant les séquences codantes de gènes *PtaFUT*, l'ensemble de celles-ci a pu être isolé (n° d'accension GenBank des *PtaFUT1*, 2, 4-7 : *ABS70459.1*, *ABS70453.1*, *ABS70455.1*, *ABS70456.1*, *ABS70457.1*, *ABS70458.1*) excepté pour *PtaFUT3* (*ABS70454.1*) ce qui laisse supposer soit une expression particulière de ce gène (tissu spécifique, condition environnementale particulière) soit une absence d'expression (pseudogène). Ainsi, par alignement des séquences génomiques et codantes pour chaque gène, la position des introns a été validée sauf pour *PtaFUT3* où cette dernière ne reste qu'hypothétique. Une représentation schématique des gènes est ainsi proposée dans la figure 59. D'après cette dernière, nous pouvons observer que la longueur des séquences génomiques et codantes des *PtaFUT* montre une certaine variabilité de 1679 à 2205 pb et de 1554 à 2019 pb respectivement. Cependant, les gènes *PtaFUT* dévoilent une organisation génique conservée ne possédant qu'un seul

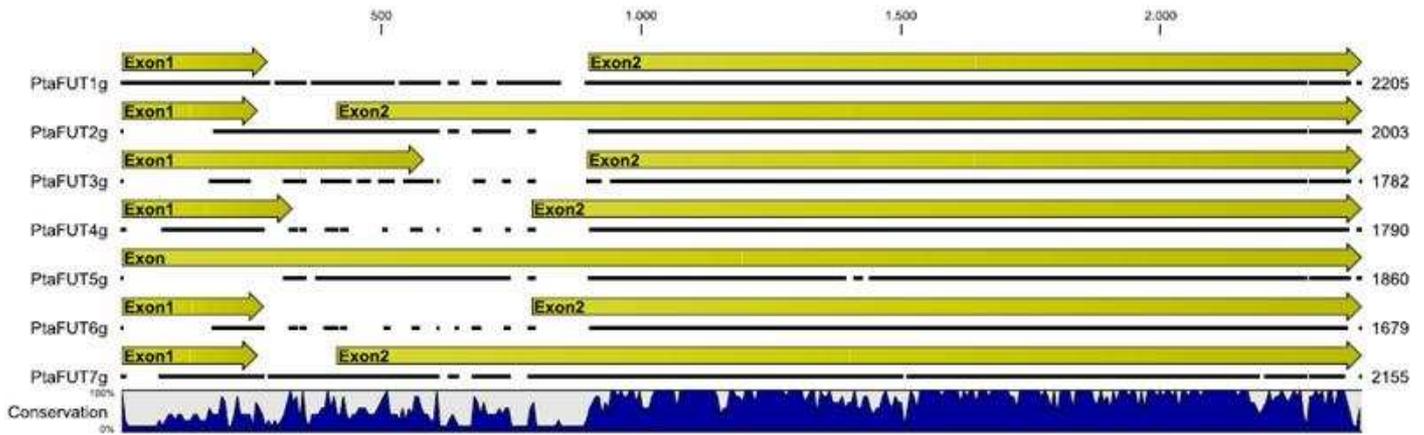


Figure 62 : Illustration schématique de l'alignement des séquences génomiques des *PtaFUT*. Mise en évidence du polymorphisme important au niveau de la zone 5' et de la zone fortement conservée au niveau du second exon. Alignement réalisé avec MUSCLE (maximum iterations : 16) sous le logiciel CLC Sequence viewer 6.0.2.

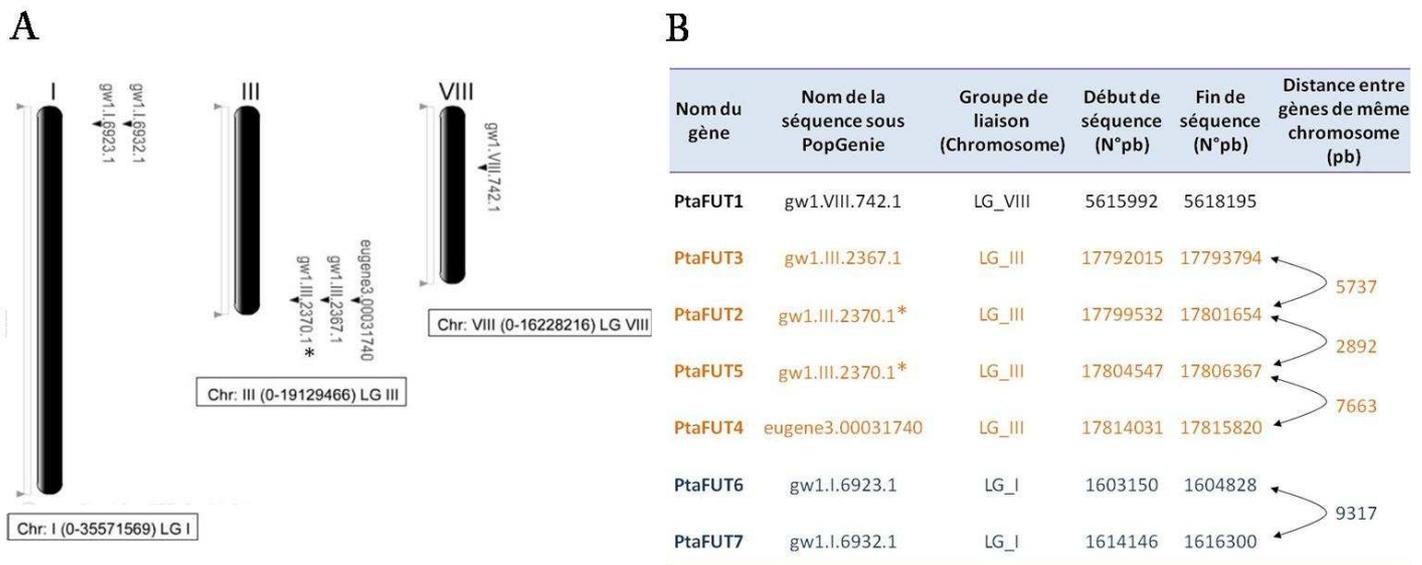


Figure 63 : Position au sein du génome de *Populus trichocarpa* des gènes *PtaFUT* identifiés par bioinformatique. A : Carte physique des gènes *PtaFUT* réalisée à l'aide du serveur PopGenIE. B : Tableau d'identification des gènes et de leur localisation (en pb) au sein des chromosomes. Le symbole * signifie que la séquence gw1.III.2370.1 est constituée en fait des gènes *PtaFUT2* et 5 (non identifié comme tel sur le serveur PopGenIE).

intron en début de séquence mis à part *PtaFUT5* qui n'en possède pas. De plus, seul *PtaFUT1* se caractérise par un intron de « grande taille » (468 pb contre 130 pb en moyenne pour les autres gènes). Pour observer la variabilité existante entre chacune de ces séquences, un alignement des séquences génomiques a été effectué (Fig. 62). Un polymorphisme important est constaté dans la partie 5' de chacun des gènes *PtaFUT*, comme l'indique la courbe de conservation. La restauration d'une homologie importante entre les différents gènes se trouve cependant après l'intron, plus particulièrement dans la seconde partie du 2^{ème} exon (excepté pour *PtaFUT5*). De façon équivalente, l'ensemble des gènes *AtFUT* et *PtaFUT* présentent aussi un très fort polymorphisme en partie 5', qui s'estompe très nettement dans la séquence correspondant au 2^{ème} exon.

A l'aide de ces différentes données moléculaires et grâce à la base de données présente sur le serveur PopGenIE, une carte physique de ces gènes a pu être établie (Fig. 63). Celle-ci indique que leur position au sein du génome est au niveau des chromosomes I, III et VIII. Cependant, il est important de rappeler que cette carte est établie en fonction du génome de *Populus trichocarpa* et non du peuplier hybride de cette étude (clone 717-1-B4). D'après les résultats de localisation de chacun des gènes, trois groupes distincts sont identifiables. *PtFUT2, 3, 4, 5* (chromosome III) forment un 1^{er} cluster avec des distances entre chaque gène inférieures à 8 Kb (voire inférieures à 3 Kb entre *PtFUT2* et 5). *PtFUT6* et 7 (chromosome I) forment un 2^{ème} groupe avec là encore une très forte proximité (inférieure à 10 Kb). *PtFUT1* quant à lui (chromosome VIII) constitue le 3^{ème} groupe.

Les protéines correspondantes aux 7 CDS clonés font parties de la famille 37 des glycosyltransférases de plante (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>; Campbell *et al.*, 1997, 1998 ; Coutinho *et al.*, 2003). Ces peptides possèdent un ou plusieurs sites de N-glycosylation. Cependant, seules quatre d'entre-elles (*PtaFUT1, 3, 4* et 7) seraient des protéines membranaires de type II localisées au niveau de l'appareil de Golgi avec une partie C-terminal luminale et un domaine transmembranaire suivi d'une partie N-terminal cytosolique (Tab. 4). Pour *PtaFUT2* et 6, leur localisation serait cytoplasmique. *PtaFUT5*, quant à elle, possède un peptide signal clivé entre le 23^{ème} et 24^{ème} acide aminé ce qui laisse supposer une localisation extracellulaire. La diversité des localisations subcellulaires suggère des activités enzymatiques différentes ou du moins ciblées sur une grande variété de substrats ; la prédiction de fucosyltransférases solubles ayant notamment été démontrée auparavant (Li *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Comparaison des protéines PtaFUT suivant différentes caractéristiques prédites à l'aide de plusieurs programmes informatiques : taille des protéines déduite de leur séquence codante, poids moléculaire des protéines (PeptideMass), de leur type (SOSUI ; iPSORT), de leur localisation subcellulaire (TargetP ; iPSORT), de leur séquence signal (SignalP ; iPSORT ; TargetP) et des sites potentiels de N-glycosylation (NetNGlyc).

	PtaFUT1	PtaFUT2	PtaFUT3	PtaFUT4	PtaFUT5	PtaFUT6	PtaFUT7
N°d'accession	ABS70459	ABS70453	ABS70454	ABS70455	ABS70456	ABS70457	ABS70458
Protéine (aa)	578	616	568	556	619	517	672
Poids moléculaire (kDa) (PeptideMass)	65,6	70	64,1	63	70	58,6	76
Type de protéine (SOSUI; iPSORT)	Protéine membranaire de type II	Protéine soluble non sécrétée	Protéine membranaire de type II	Protéine membranaire de type II	Protéine soluble sécrétée	Protéine soluble non sécrétée	Protéine membranaire de type II
Localisation subcellulaire (TargetP; iPSORT)	Golgi	Cytoplasme	Golgi	Golgi	Extracellulaire	Cytoplasme	Golgi
Peptide signal (SignalP)	(23<clivage<24)						
Signal-ancre (SignalP)	(55<signal>56)		(60<signal>61)	(34<signal>35)			(33<signal>34)
Domaines (SOSUI)	N-terminal	1-36> (cytosol)	1-37> (cytosol)	1-15> (cytosol)			1-20> (cytosol)
	Transmembranaire (signal-ancre ou peptide signal)	<37-59>	<38-60>	<16-38>	1-29>		<21-43>
	C-terminal	<60-578 (lumière)	<61-568 (lumière)	<39-556 (lumière)	<30-619		<44-672 (lumière)
Sites de N-glycosylation (NetNGlyc)	518N	21N, 55N, 61N, 76N, 117N, 304N, 475N	94N, 157N, 241N, 511N	60N, 147N	30N, 54N, 60N, 90N, 216N, 283N	26N, 106N, 118N, 209N, 362N	92N, 98N, 112N, 132N, 153N, 168N, 172N, 177N, 187N, 202N, 370N

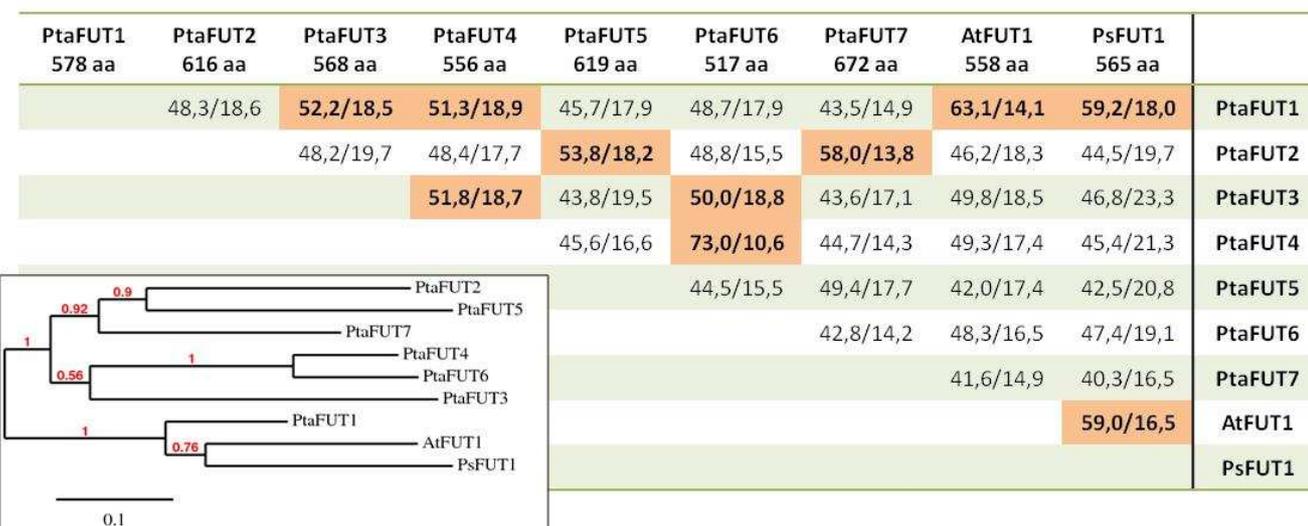


Figure 64 : Pourcentage d'identité/forte similarité entre toutes les séquences peptidiques pleine longueur de la famille des PtaFUT, AtFUT1 (*Q9SWH5*) et PsFUT1 (*Q9M5Q1*). Alignements réalisés avec Clustal W (gap opening penalty : 10 ; gap extension penalty : 0,1). Les valeurs surlignées et en caractère gras correspondent à des pourcentages d'identité supérieur à 50. L'arbre phylogénétique en bas à gauche, réalisé avec Phylogeny.fr (Clustal W pour l'alignement, Gblocks (v0.91b) pour le traitement des régions ambiguës, PhyML (v3.0 aLRT ; SH-Like) pour la construction de l'arbre (méthode : maximum de vraisemblance) et TreeDyn (v198.3) pour la représentation), est issu du même alignement de séquences.

L'analyse d'homologie des séquences peptidiques pleines longueurs a été réalisée entre AtFUT1, PsFUT1 et les différents membres de la famille PtaFUT (Fig. 64). PtaFUT1 se distingue par une plus forte identité avec les enzymes déjà caractérisées chez l'arabette ou le pois (63,1% et 59,2% respectivement), par comparaison aux autres PtaFUT (49,8% et 47,4% maximum respectivement). De plus, l'identité entre PtaFUT1 et les autres PtaFUT varie entre 43,5% et 52,2%, indiquant que PtaFUT1 partage plus d'homologies avec ses orthologues qu'avec les PtaFUT isolées chez le peuplier. L'arbre phylogénétique de cet alignement élaboré suivant le maximum de vraisemblance (Fig. 64), montre clairement que PsFUT1, AtFUT1 et PtaFUT1 forment un groupe dissocié des autres PtaFUT. Il en est de même pour PtaFUT3, 4 et 6 qui se distinguent des PtaFUT (2, 5 et 7). Il est à noter qu'un même alignement réalisé avec MUSCLE (v3.7) donne des résultats similaires.

Afin d'étendre la recherche d'homologies entre $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases de plantes et de détecter ses proches orthologues chez d'autres familles végétales, une recherche de similarité entre la séquence peptidique de PtaFUT1 et la banque de données Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) a été réalisée. Plus d'une centaine de séquences ont été identifiées dont celles déjà présentées précédemment. A partir de ce résultat, chaque séquence appartenant à une nouvelle famille végétale et donnant le meilleur score a été sélectionnée. A l'aide du serveur CDART, la recherche du domaine catalytique putatif de ces enzymes a été effectuée. Ces différents domaines constituent la famille déjà existante « pfam03254 », membre de la superfamille cl03962. Elle a été établie à partir de la XG $\alpha(1,2)$ -FucT d'Arabidopsis (AtFUT1) isolées par Perrin *et al.* (1999). Ainsi, les différentes protéines ont été répertoriées dans la figure 65 pour la représentation et la localisation de leur domaine catalytique. Celui-ci est généralement localisé au niveau du COOH terminal et à ce jour, 148 séquences peptidiques répertoriées chez 8 familles végétales portent une partie ou la totalité de ce domaine. Cependant, il est intéressant de constater que le domaine catalytique de chacune de ces enzymes est supposé correspondre à celui des XG $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases malgré les prédictions précédentes de localisations subcellulaires diverses entre les PtaFUT (Tab. 4). Dans le but d'identifier plus précisément les relations existantes entre ces XG $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases putatives, un nouvel arbre phylogénétique a été généré uniquement sur la base du domaine catalytique de chaque enzyme sélectionnée (Fig. 66). Ce choix a été motivé par l'existence d'un important polymorphisme sur la partie NH2 terminale comme précisé précédemment. Les données ainsi obtenues indiquent un ancêtre commun constitué par une bryophyte (*P. patens*) à partir de laquelle

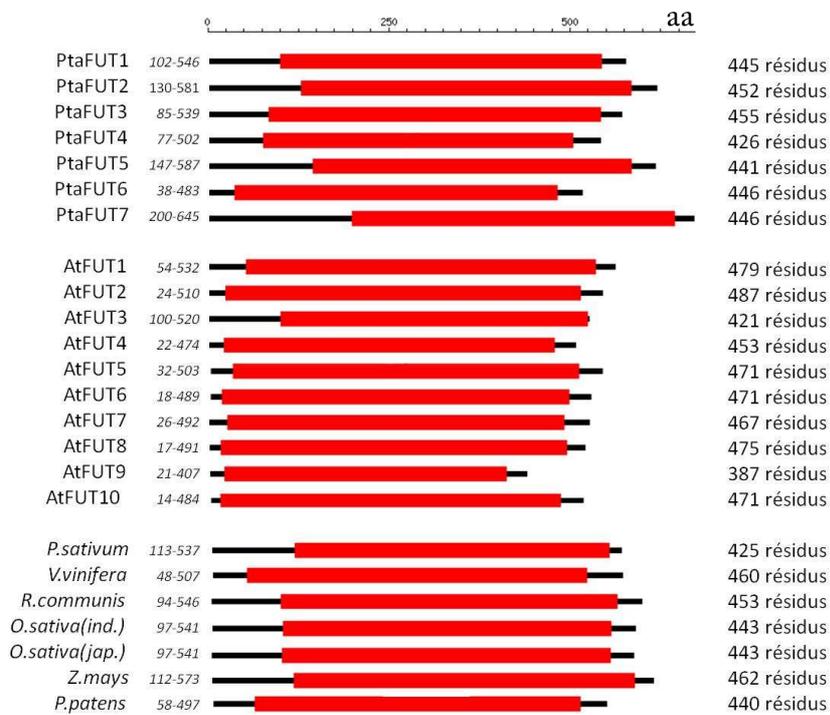


Figure 65 : Localisation des domaines XGs fucosyltransférases (rouge) retrouvés chez les PtaFUT en comparaison de ceux identifiés chez d'autres plantes. Les valeurs de gauche indiquent les positions peptidiques de début et de fin de domaine et celles de droite la longueur des domaines. La recherche et l'alignement des domaines ont été réalisés à l'aide du serveur CDART. L'ensemble des domaines représentés constitue une partie de la famille « pfam03254 », membre de la superfamille cl03962.

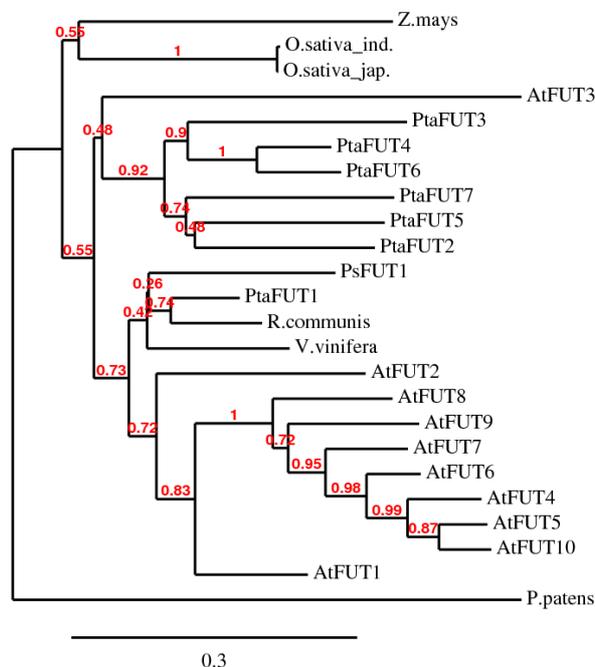


Figure 66 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences peptidiques des domaines XG FTases des PtaFUT, AtFUT, PsFUT1 et de celles d'autres végétaux. L'arbre a été généré à l'aide du serveur Phylogeny.fr (MUSCLE (v3.7) pour l'alignement, Gblocks (v0.91b) pour le traitement des régions ambiguës, BioNJ (Bootstraps 100) pour la construction de l'arbre (méthode : maximum de vraisemblance) et TreeDyn (v198.3) pour la représentation.

divergent monocotylédones (*Z. mays*, *O. sativa*) et dicotylédones (*R. communis*, *V. vinifera*, *A. thaliana*, *P. sativum*, *P. tremula* x *P. alba*). Au sein des dicotylédones, 2 groupes se distinguent particulièrement dont l'un correspond à toutes les PtaFUT excepté PtaFUT1. L'autre groupe se divise lui aussi en deux sous groupes dont l'un est composé de presque toutes les AtFUT (dont AtFUT1) et l'autre correspond à toutes les autres protéines dont notamment PsFUT1 et PtaFUT1. Ainsi, ces divergences constatées uniquement au niveau du domaine catalytique des FucTs démontrent la particularité de PtaFUT1 par rapport à ses paralogues et sa plus grande homologie de séquence avec des XG $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases expérimentalement identifiées et caractérisées.

Sur la base des hypothèses quant aux fonctions et aux similarités de séquences, une analyse par blocs des alignements de séquences peptidiques a été réalisée dans le but de localiser les différents motifs consensus présents chez les membres de la famille PtaFUT. Des travaux antérieurs visant à détecter des motifs communs aux $\alpha(2)$, $\alpha(3/4)$ et $\alpha(6)$ FucTs de vertébrés, invertébrés, plantes et bactéries ont déjà permis d'identifier par la méthode « hydrophobic Cluster Analysis (HCA ; Woodcock *et al.*, 1992) sept motifs conservés (Breton *et al.*, 1998 ; Oriol *et al.*, 1999 ; Faik *et al.*, 2000 ; Chazalet *et al.*, 2001). Certains de ces motifs apparaissent ainsi soit spécifiques d'une famille de FucTs, soit communs à deux familles de FucTs. A partir de ces données existantes et d'alignements préalablement effectués sur les FucTs de plantes (Faik *et al.*, 2000 ; Sarria *et al.*, 2001) une méthodologie similaire a été employée pour les PtaFUT. Ainsi, les motifs I- $\alpha(2/6)$, II- $\alpha(2)$, III- $\alpha(2)$, II- $\alpha(6)$ et III- $\alpha(6)$ identifiés par Oriol *et al.* (1999) ont été recherchés chez les $\alpha(1,2)$ -FucTs de peuplier à partir d' $\alpha(1,6)$ -FucTs de bactéries NodZ, d' $\alpha(1,2)$ -FucTs de bactéries et d'eucaryotes animaux et végétaux (Fig. 67). Le résultat obtenu de cet alignement indique la présence du motif-I commun aux $\alpha(1,2)$ -FucTs et $\alpha(1,6)$ -FucTs. Celui-ci est supposé correspondre au site de liaison du GDP-Fuc dont l'arginine (R) pointée par la flèche représente un acide aminé nécessaire pour l'activité $\alpha(1,6)$ -FucT humaine *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2000). La présence de ce motif chez les PtaFUT ainsi que la conservation de cet arginine suggère ainsi leur appartenance à la famille des enzymes à activité fucosyltransférase. L'absence de ce motif chez AtFUT9 ainsi que la substitution de l'arginine par la glycine chez AtFUT3 pourrait ainsi expliquer qu'aucune activité fucosyltransférase pour ces enzymes n'ait été détectée jusqu'à présent. Hormis cet acide aminé, la glycine (G), positionnée en amont de quatre acides aminés par rapport à l'arginine, semble elle aussi très conservée au sein de ce motif ce qui lui suggère un rôle essentiel à l'activité FucT. Cependant, les $\alpha(1,2)$ -FucTs de *C. elegans* et

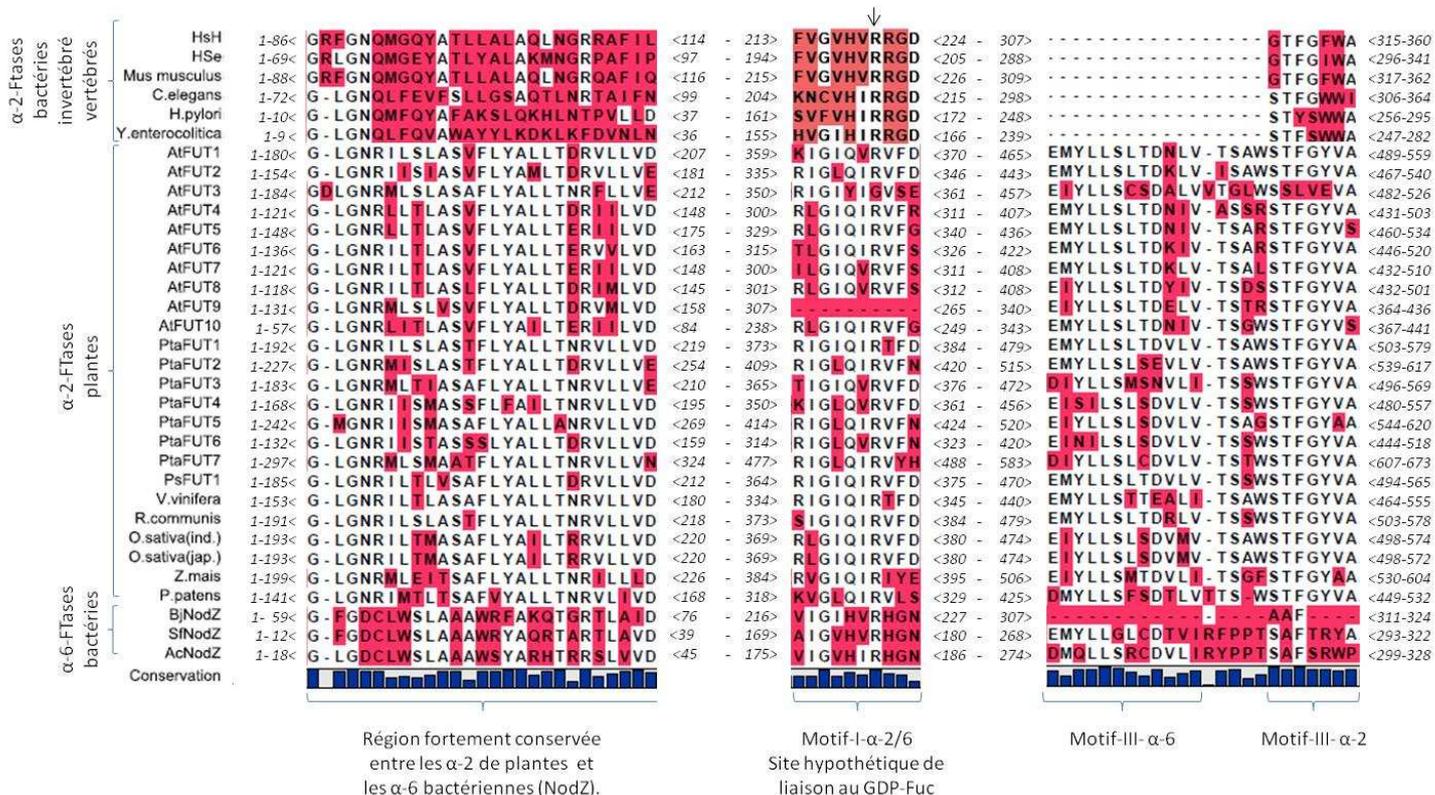


Figure 67 : Représentation schématique des motifs peptidiques communs entre XG-FucT (putatives ou non) et l'ensemble des $\alpha(1,2)$ -FucTs (bactéries, invertébré, vertébrés) et $\alpha(1,6)$ -FucTs (bactéries NodZ). Les acides aminés surlignés en rouge représentent ceux qui diffèrent de l'acide aminé le plus représenté à la même position. La flèche indique la position de l'arginine (R) nécessaire à l'activité FUT1 humaine *in vitro*.

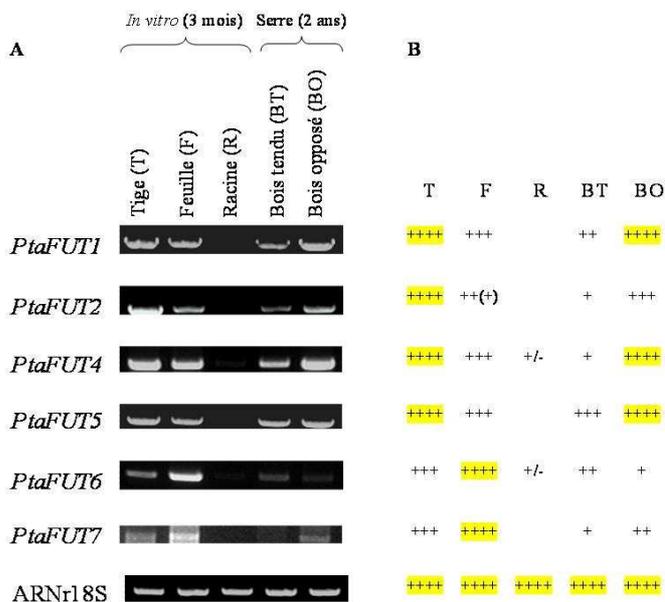


Figure 68 : Analyse du profil d'expression des gènes PtaFUT par RT-PCR suivant l'organe ou le tissu considéré. L'ARNr 18S constitue le contrôle positif. A : Photos obtenues après migration sur gel d'agarose coloré au BET. B : Niveau d'expression des amplicons retranscrit sous forme de symboles "+" de manière arbitraire. Les données surlignées en jaune correspondent à l'expression la plus forte obtenue pour le gène considéré, indépendamment des autres gènes.

H. pylori ne possèdent pas cette glycine mais l'activité de cette enzyme chez ces deux organismes n'est que putative. De plus, de toutes les $\alpha(1,2)$ -FucTs connues et fonctionnellement caractérisées, le motif GxxxR est toujours présent. Les motifs III, spécifiques des $\alpha(1,2)$ -FucTs et des $\alpha(1,6)$ -FucTs respectivement, sont aussi retrouvés chez les PtaFUT. A l'inverse, les motifs II- $\alpha(2)$ et $-\alpha(6)$ ne sont pas présents comme déjà observé par Faik *et al.* (2000) chez PsFUT1.

Un dernier motif est finalement mis en évidence chez les $\alpha(1,2)$ -FucTs de plantes et les $\alpha(1,6)$ -FucTs de bactéries NodZ uniquement. Son rôle n'est pas déterminé à ce jour. Il est à noter que les $\alpha(1,2)$ -FucTs autres que celles de plantes possèdent le début de ce motif (3-4 acides aminés).

2. Profil d'expression des gènes *PtaFUT*...

a) ... par RT-PCR

Afin de déterminer plus précisément le profil d'expression de chaque gène chez le peuplier hybride, une RT-PCR a été réalisée sur différents organes (tige, feuille et racine de peuplier *in vitro*) et sur les bois opposé et tendu de peuplier cultivé en serre.

En considérant exclusivement l'expression des gènes suivant leur localisation, il apparaît nettement que les racines ne correspondent pas au lieu d'expression des gènes *PtaFUT* (Fig. 68 A et B). Seuls *PtaFUT 4* et *6* présentent un très faible signal mais qui n'apparaît pas sur la figure où très peu. Cependant, il n'est pas à exclure une expression dans cet organe sous des conditions physiologiques différentes ou un stade de développement particulier. Étonnamment, *PtaFUT1* étant l'orthologue d'*AtFUT1*, un profil d'expression identique entre les deux gènes aurait pu être attendu. En effet, chez *Arabidopsis*, *AtFUT1* présente une expression à la fois dans les tiges, feuilles et racines (Sarria *et al.*, 2001). Il est cependant possible que la fucosylation des XGs au niveau des jeunes racines en croissance ne soit pas réalisée à ce stade de développement. En effet, il est suggéré que le résidu Fuc favorise la liaison des XGs aux microfibrilles de cellulose suivant un rapport deux fois plus grand, comparé aux XGs non fucosylés (Levy *et al.*, 1997). Ce résidu jouerait ainsi un rôle de stabilisateur des parois et interviendrait préférentiellement dans les tissus en fin d'élongation cellulaire. Les jeunes racines en croissance ne seraient alors pas le site privilégié de la fucosylation des XGs.

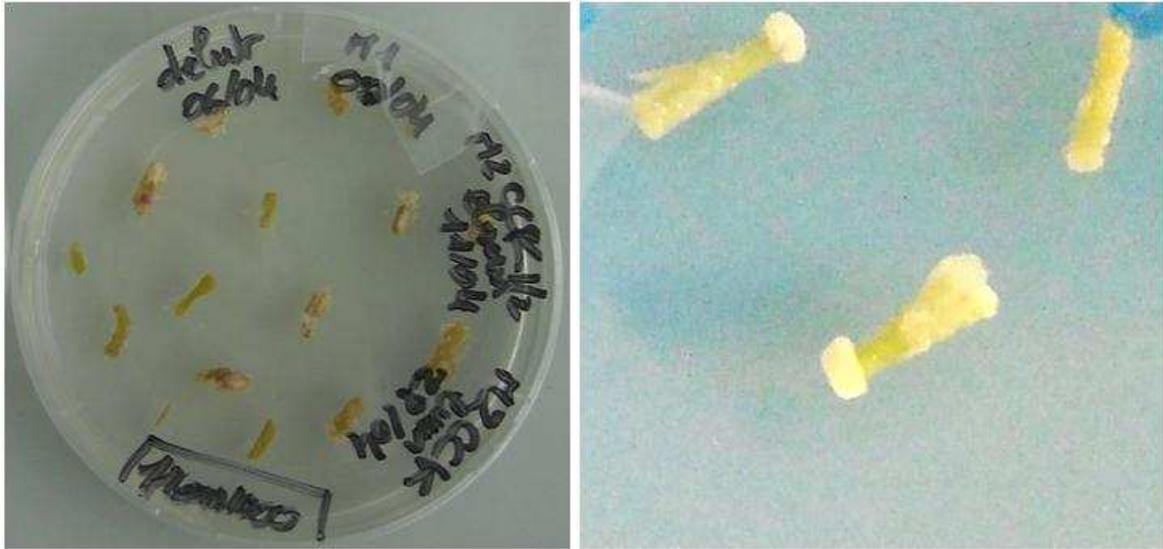


Figure 69 : Photographies des explants de peuplier ayant été transformés depuis 20 jours *via* *Agrobacterium tumefaciens* avec la construction *PtaFUT1(1000pb)::pORE-R3*. Certains explants développent des cals mais qui nécrosent au bout de quelques semaines.

Deux groupes au profil d'expression différents se distinguent (Fig.68 B): (i) *PtaFUT1*, 2, 4 et 5, (ii) *PtaFUT6* et 7. L'expression de *PtaFUT1*, 2, et 4 est en général plus forte dans les tiges de peuplier *in vitro* et dans le bois opposé de peuplier cultivé en serre. Une sous-expression est ainsi nettement observée pour ces 3 gènes dans le bois tendu. Il en est de même pour *PtaFUT5* mais la différence entre BT et BO est moins prononcée. A l'inverse de ces résultats, une expression plus forte est retrouvée dans les feuilles pour *PtaFUT6* et 7 ce qui se traduit par une faible expression à la fois dans le BT et dans le BO du peuplier de la serre. Par comparaison de ces résultats avec la position des gènes *PtaFUT* au sein du génome (Fig. 63), il est intéressant de constater que les gènes appartenant au même cluster présentent des profils d'expression quasiment identiques. En effet, *PtaFUT6* et 7 sont positionnées sur le chromosome I tandis que *PtaFUT2*, 4, 5 sont présents sur le chromosome III. Cette constatation suggère ainsi un promoteur commun par cluster ou de probables duplications géniques ayant eu lieu au cours de l'évolution. Celles-ci pourraient être à l'origine d'une adaptation de la plante à son environnement ou à son propre développement garantissant des expressions spécifiques à certains tissus. Il n'est pas improbable aussi que ces gènes supposés dupliqués aient pour but d'augmenter la quantité de protéines produites (effet dose) où qu'ils aient subi des modifications induisant une nouvelle spécificité de substrat.

b) ... par transgénèse

Pour analyser l'expression des gènes *PtaFUT* chez le peuplier hybride suivant une méthode autre que la RT-PCR et pour valider les résultats précédemment obtenus, la séquence promotrice des gènes a été couplée à la GFP, puis cette construction a été introduite par transgénèse chez le peuplier. Cette approche permet ainsi de suivre indirectement la localisation *in vivo* de l'expression des gènes *PtaFUT*. Pour l'ensemble des gènes *PtaFUT*, excepté *PtaFUT6*, la séquence de 1000 pb en amont de l'ATG, sensée contenir la région promotrice, a été obtenue par PCR puis clonée dans le vecteur pORE-R3. Ce vecteur possède le gène *smgfp* codant une protéine GFP soluble modifiée. Dans un premier temps, des essais ont été réalisés avec *PtaFUT1(1000pb)::pORE-R3* (Fig. 69). La transformation génétique du peuplier réalisée *via A. tumefaciens* selon le protocole décrit dans le « Matériels et Méthodes » (cf. V.2.c) n'a cependant pas donné de résultats satisfaisants étant donné l'absence de plants régénérés. Aucune détection de l'activité GFP n'a ainsi pu être réalisée chez le peuplier. Des essais supplémentaires ont été effectués pour mettre au point la technique de transgénèse au sein du laboratoire, mais ces essais ne sont pas concluant pour le moment. Seule une

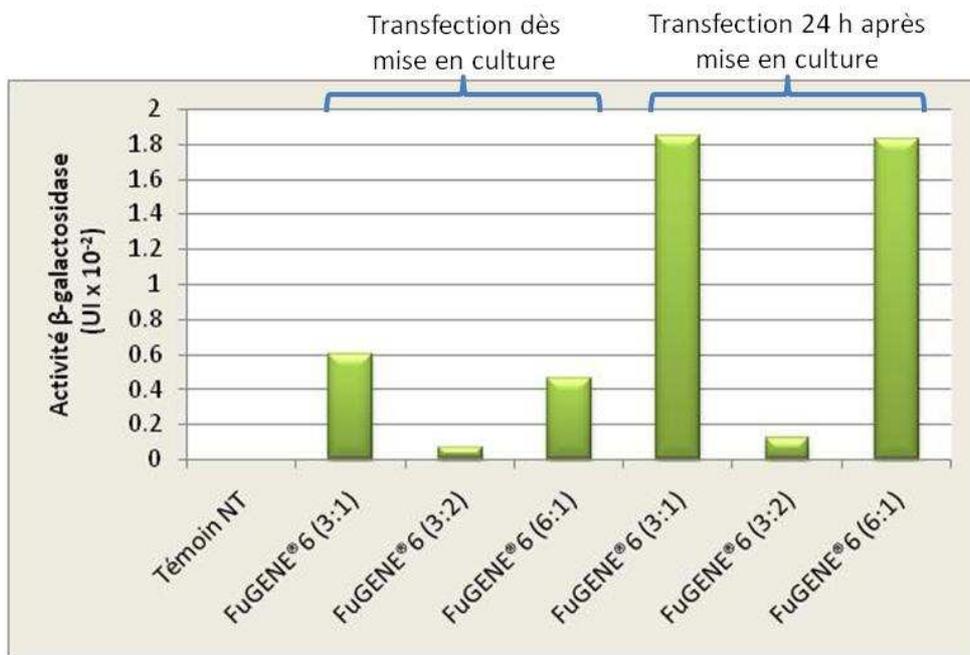


Figure 70 : Représentation graphique de l'activité β-galactosidase exprimée en cellules COS-7 suivant différents paramètres de transfection (rapport « volume de réactif de transfection en μL:μg de vecteurs utilisé » ; temps de culture des cellules COS-7 avant transfection). L'agent de transfection utilisé est le FuGENE®6 (Roche, France). La lyse des cellules par une solution détergente (triton, SDS, ...) suivi du dosage de l'activité enzymatique ont été réalisées 48 h après transfection.

expérimentation en cours concernant un autre type de construction plasmidique pourrait s'avérer positive ; la vérification de son intégration au sein du génome du peuplier est en cours.

3. Activité de la protéine PtaFUT1

a) En cellules COS-7

Afin de vérifier l'activité $\alpha(1,2)$ -FucT des gènes isolés chez le peuplier, des expériences d'expression de ces derniers en système hétérologue ont été initiés. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec des plasmides recombinants porteurs des CDS *PtaFUT*. Ces cellules ont été choisies car elles présentent un faible niveau d'expression des gènes endogènes codant des activités α -fucosyltransférases (Clarke and Watkins, 1997). Ce même modèle cellulaire a été utilisé pour caractériser l'expression d'*AtFUT1* et pour démontrer ainsi que la protéine codée par ce gène est une XG $\alpha(1,2)$ -FucT (Perrin *et al.*, 1999).

Les clonages des séquences codantes des gènes *PtaFUT* (excepté *PtaFUT3*) ainsi que *AtFUT1* (témoin positif) ont été effectuée dans le vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO®. Plusieurs mises au point de la technique de transfection ont été réalisées afin d'optimiser les paramètres expérimentaux. La première série d'essais a été effectuée à l'aide d'un vecteur portant le gène de la β -galactosidase (vecteur LacZ). Celui-ci a été utilisé comme témoin pour confirmer la transfection et l'expression de gènes exogènes en cellules COS-7. De plus, par dosage de l'activité de cette enzyme, les meilleures conditions d'utilisation du réactif de transfection (FuGENE®6, Roche) ont été testées. D'après la figure 70, les résultats de transfection pour les rapports 3:1 et 6:1 (volume de FuGENE®6 en μ L : μ g de vecteurs) indiquent toujours une activité β -galactosidase très proche et plus forte que pour le rapport 3:2. Aussi, le temps de mise en culture des cellules COS-7 avant transfection apparaît comme déterminant pour une activité enzymatique optimale. En effet, si la transfection intervient 24 h après la mise en culture des cellules (cellules adhérentes, en division), l'activité β -galactosidase est trois fois supérieure à celle mesurée sur des cellules transfectées aussitôt après leurs mises en culture (cellules non adhérentes et division cellulaire non débutée). D'après ces résultats, le rapport 3:1 a été choisi puisqu'il permet une activité enzymatique plus forte pour une moindre consommation en réactif. De même, la transfection 24 h après mise en culture des cellules a été adoptée pour les essais avec les *PtaFUT*. Cependant, dans le souci de préserver l'activité enzymatique des protéines, d'autres essais ont été réalisés à l'aide du même vecteur. Ainsi, plusieurs nouveaux paramètres de lyse cellulaire ont été définis permettant de

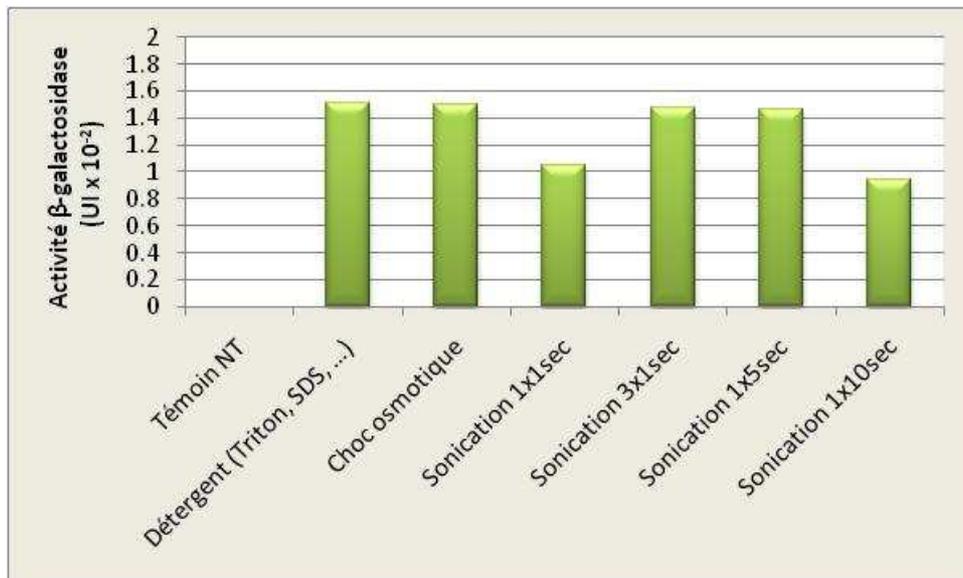


Figure 71 : Représentation graphique de l'activité β-galactosidase exprimée en cellules COS-7 suivant différents paramètres de lyse cellulaire (détergent triton, SDS, ...), choc osmotique ou sonication ; 48 h après transfection). La lyse par choc osmotique est facilitée par un décollement mécanique (grattage) des cellules. L'agent de transfection (FuGENE®6) a été utilisé pour un rapport 3:1, 24 h après mise en culture des cellules COS-7.

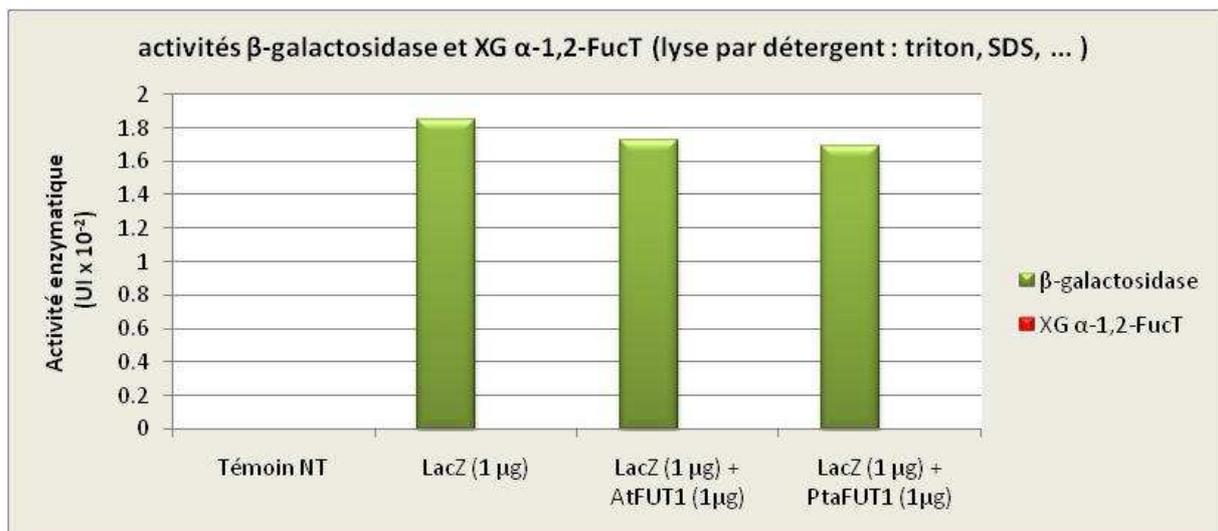


Figure 72 : Représentation graphique des activités β-galactosidase et XG α(1,2)-FucT exprimées en cellules COS-7. Les transfections ont été réalisées avec les vecteurs LacZ (témoin de co-transfection), *AtFUT1* (témoin positif) et *PtaFUT1* (essai). L'agent de transfection (FuGENE®6) a été utilisé pour un rapport 3:1, 24 h après mise en culture des cellules COS-7. La lyse des cellules a été réalisée 48 h après transfection avec une solution détergente (triton, SDS, ...). Le dosage de l'activité XG α(1,2)-FucT a été réalisé sur oligosaccharide de XGs non fucosylés.

ne pas altérer la conformation des protéines exprimées. Les dosages d'activité correspondant aux différentes lyses pratiquées sur les cellules COS-7 sont présentés dans la figure 71. Au vu de ces résultats, il semble que la β -galactosidase n'est pas sensible aux différentes conditions d'extraction qui lui ont été appliquées. Seule la sonication induit une baisse d'activité lorsque celle-ci est pratiquée une seule fois pendant une ou dix secondes. Ceci pourrait s'expliquer par une rupture incomplète des membranes plasmiques des cellules COS-7 dans le premier cas et par une altération de la conformation protéique dans le second cas. Ainsi, de toutes les conditions utilisées, la lyse par choc osmotique accompagnée d'un décollement mécanique (grattage) semble être la plus sûre pour maintenir l'intégrité des protéines. Cependant, cette technique ne peut s'appliquer que dans le cas de protéines cytoplasmiques telle la β -galactosidase ou certaines des PtaFUT (2 et 6) comme prédit dans le tableau 4. La lyse à l'aide d'une solution détergente a donc été privilégiée pour la suite des expérimentations.

Pour la réalisation des dosages des enzymes à activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT, il a été réalisé uniquement la transfection des cellules COS-7 par AtFUT1 (témoin positif) et PtaFUT1 (enzyme partageant le plus d'homologies avec AtFUT1). Les résultats observables dans les figures 72 et 73 ne montrent aucune activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT pour AtFUT1 et PtaFUT1 bien que la transfection ait eu lieu (activité β -galactosidase détectée). Ceci apparaissait d'autant plus surprenant pour AtFUT1, étant donné les résultats de Perrin *et al.*, (1999). Plusieurs hypothèses ont ainsi été émises quant à cette absence d'activité : (i) l'enzyme ne peut avoir une activité que sur un polymère de XGs et non pas sur un substrat oligosaccharidique, (ii) la lyse avec la solution détergente entraînerait une altération de la conformation de l'enzyme (dénaturation chimique et/ou physique), (iii) ou enfin un manque de sensibilité de la méthode d'analyse des produits de l'activité enzymatique. En effet, ce dernier point considéré, il s'avère que la méthode de détection de la fucosylation des XGs de tamarin par spectrométrie de masse demeure une technique moins sensible par comparaison à la méthode radioactive. Pour palier certains de ces éventuels problèmes, deux modifications ont été apportées au protocole expérimental. Le premier changement a consisté au remplacement de la solution de lyse contenant du SDS et du Triton X-100 par du CHAPS (détergent zwitterionique non dénaturant). La seconde modification a porté sur les XGs de tamarin qui ont été utilisés sous forme de polymère et non sous forme oligosaccharidique comme précédemment. Cependant bien que ces changements aient été apportés au protocole expérimental, aucune activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT n'a été détectée (Fig. 74 et 73). Il apparaît néanmoins que la lyse avec le CHAPS donne des résultats d'activité β -galactosidase du même ordre de grandeur que lors de la lyse des cellules COS-7 avec la solution détergente contenant du triton et du SDS, excepté pour la

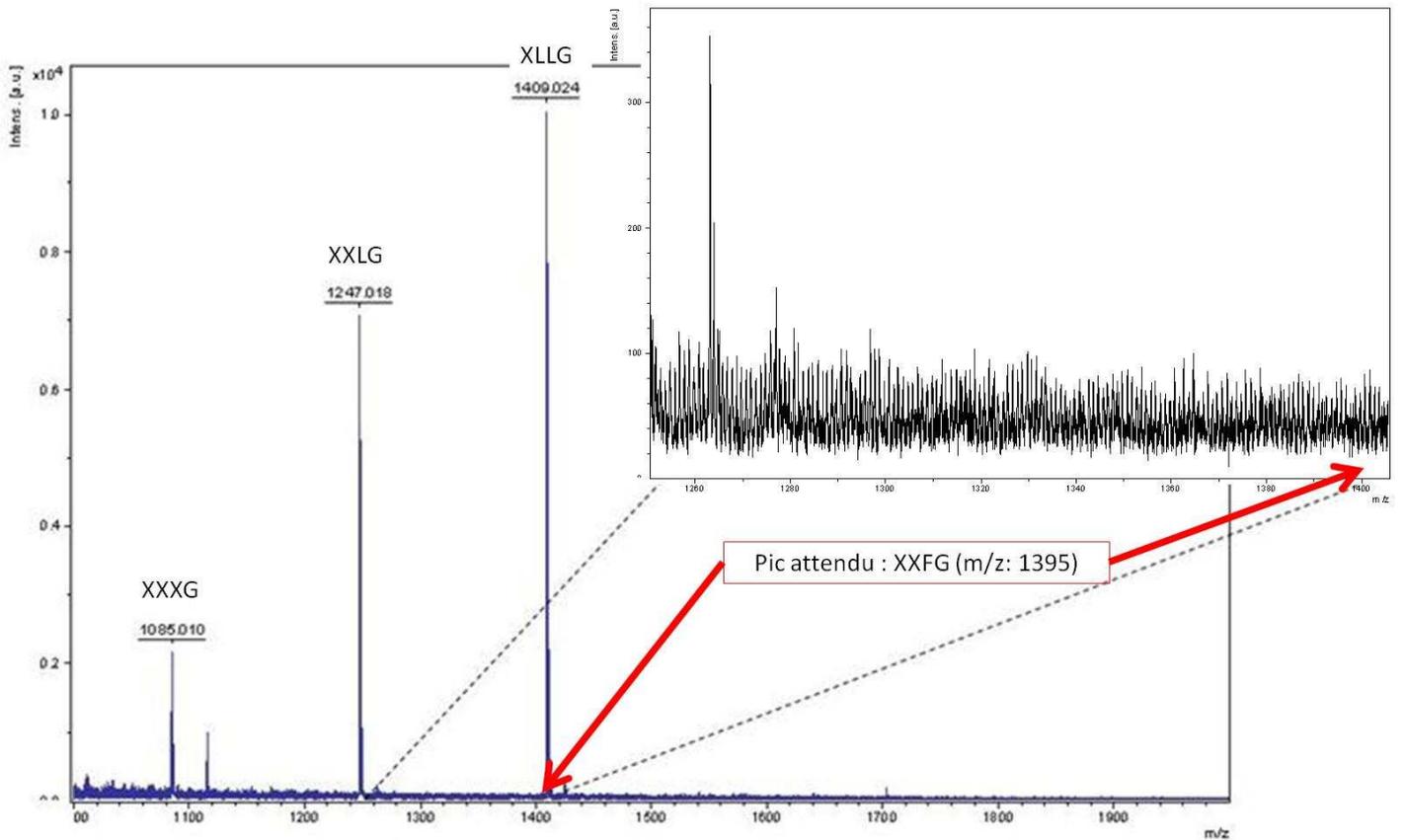


Figure 73 : Spectre de masse typique obtenu après réaction enzymatique impliquant PtaFUT1, le donneur (GDP-Fuc) et l'accepteur (oligosaccharides de XGs de tamarin non fucosylés). L'absence du pic à 1395 (XXFG) indique qu'aucune activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT n'a eu lieu durant la réaction enzymatique.

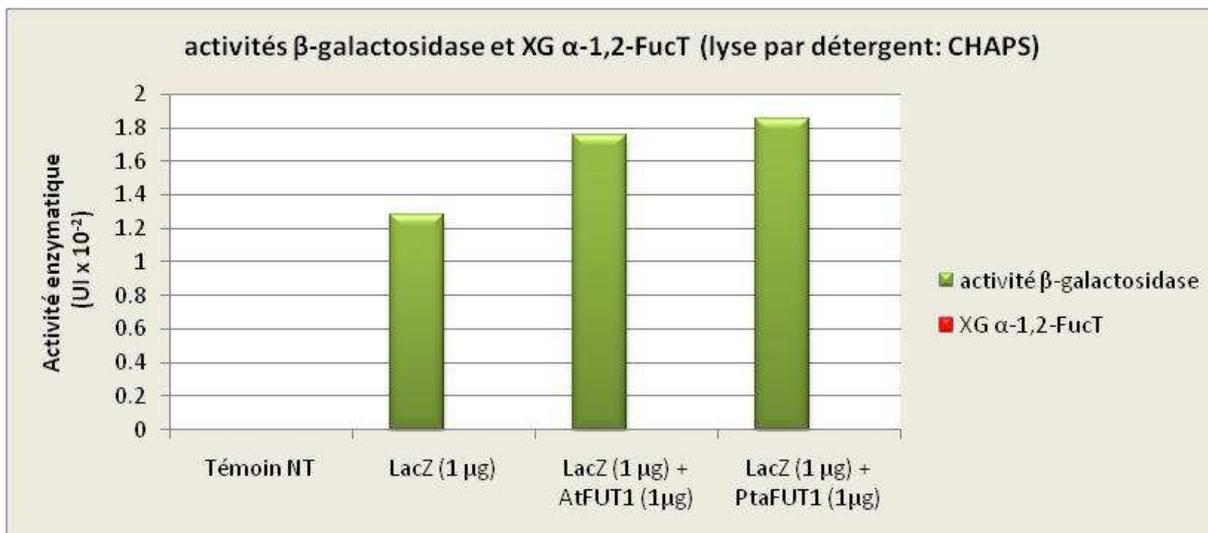


Figure 74 : Représentation graphique des activités β -galactosidase et XG $\alpha(1,2)$ -FucT exprimées en cellules COS-7. Les transfections ont été réalisées avec les vecteurs LacZ (témoin de co-transfection), *AtFUT1* (témoin positif) et *PtaFUT1* (essai). L'agent de transfection (FuGENE®6) a été utilisé pour un rapport 3:1, 24 h après mise en culture des cellules COS-7. La lyse des cellules a été réalisée 48 h après transfection avec une solution détergente zwitterionique non dénaturante (CHAPS). Le dosage de l'activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT a été réalisé sur polymère de XGs non fucosylés.

transfection par le vecteur « LacZ » seul qui est plus faible ($1,285 \cdot 10^{-2}$ UI contre $1,85 \cdot 10^{-2}$ UI). Ce dernier étant non dénaturant, son utilisation pour la libération des protéines membranaires, telles certaines XG $\alpha(1,2)$ -FucTs, semble donc plus appropriée pour la conservation de l'activité enzymatique. Cependant, au vu des résultats, l'absence d'activité fucosyltransférase provient d'un ou plusieurs autre(s) paramètre(s). Ceux-ci pourraient en effet correspondre à la méthode de détection et/ou au substrat utilisé. Faik *et al.* (2000) ont en effet démontré l'importance du substrat pour l'activité de la XG $\alpha(1,2)$ -FucT chez le pois (*Pisum sativum*). La forme oligosaccharidique des XGs est un moins bon substrat que la forme polysaccharidique. De plus, l'enzyme montre une spécificité quant à la structure 3D du polymère : celle-ci cible exclusivement les formes XXLG et XLLG pour former les produits XXFG (majoritairement) et XLFG. Chez le pois, la forme XFFG n'est pas retrouvée mais elle est présente chez les cellules de sycamore (Hisamatsu *et al.*, 1991). Il est ainsi suggéré que la fucosylation des XGs chez cette plante fasse intervenir une XG $\alpha(1,2)$ -FucT travaillant sur les deux résidus Gal, sans discrimination, ou que deux XG $\alpha(1,2)$ -FucTs soient chacune spécifique d'un des deux résidus Gal. Des différents gènes isolés dans cette étude, il est alors possible que certains d'entre-eux soient spécifiques à la fois du substrat « XGs » et de la disposition particulière de leurs ramifications. Outre cet accepteur, plusieurs autres polymères correspondent potentiellement au substrat des PtaFUT. PtaFUT1 ne serait alors pas spécifique des XGs mais des AGPs ou des RG-I/RG-II ce qui explique l'absence d'activité pour cette enzyme au cours de cette étude. Cependant, cette hypothèse n'explique pas l'absence d'activité pour AtFUT1 qui a été caractérisée comme une XG $\alpha(1,2)$ -FucT. Excepté un problème de substrat, il n'est pas à exclure non plus que la demi-vie de l' $\alpha(1,2)$ -FucT soit courte, ni que le système hétérologue utilisé ne soit pas adapté à l'expression de protéines végétales (défaut de glycosylation). Cependant, bien que ces deux dernières hypothèses puissent être envisagées, elles paraissent improbables étant donné la détection et la mesure de l'activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT en cellules COS-7 (Perrin *et al.*, 1999). Néanmoins, une nouvelle approche a été mise en place pour exprimer les $\alpha(1,2)$ -FucTs dans un système hétérologue végétal (cf. ci-après).

a) Chez le tabac

En parallèle de l'expression de *PtaFUT1* en cellules de Mammifère, son expression a aussi été réalisée de manière transitoire chez *Nicotiana benthamiana* par agroinfiltration. La réalisation de cette expérimentation a cependant nécessité le clonage du gène dans un autre

vecteur d'expression : le plasmide p21GT (vecteur pP2T modifié au niveau du polylinker). Ce plasmide est spécifique de la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. A la différence de la construction réalisée pour les cellules COS-7, le gène *PtaFUT1* inséré dans le p21GT a été délété de son codon STOP pour conserver le "tag" histidine porté par le vecteur et ainsi détecter l'expression de la protéine "taggée" par Western blot. Les résultats obtenus par Western blot ne montrent qu'une faible bande uniquement pour l'une des feuilles agroinfiltrées, correspondant à la protéine PtaFUT1 « taggée » (résultat non montré étant donné le très faible signal obtenu sur membrane de nylon). Les tests d'activités XG $\alpha(1,2)$ -FucT sur polymère de XGs n'ont quant à eux pas permis d'identifier cette activité pour PtaFUT1, comme le montre le spectre obtenu après la réaction enzymatique (Fig. 73). Ainsi, il est fort probable que la quantité de protéines PtaFUT1 produite soit trop faible pour que le substrat potentiellement fucosylé soit détectable en spectrométrie de masse. Des essais supplémentaires sont nécessaires pour optimiser cette technique.

4. Rôle de la fucosylation des XGs lors de la formation du bois

Afin d'étudier le rôle des XGs fucosylés lors de la formation du bois, la modification génétique de plants de peuplier a été entreprise. Deux approches ont ainsi été mises en place : l'une visant à la surexpression de XG $\alpha(1,2)$ -FucTs *via* l'insertion du gène *AtFUT1* dans le génome de peuplier et l'autre visant la sous-expression voire la non-expression de XG $\alpha(1,2)$ -FucTs *via* la technique RNAi à partir d'une partie de la séquence du gène *PtaFUT1*. Pour réaliser ces deux techniques, des constructions plasmidiques préalables ont été réalisées. Le gène *AtFUT1* a ainsi été cloné dans le vecteur pMDC32, tandis que les séquences sens et antisens correspondant à une séquence de 232 nt comprise entre le 111^{ème} et le 343^{ème} nt du gène *PtaFUT1* (ADNc) sont en cours de clonage dans le vecteur pSK-int. Ce dernier servira de vecteur de transition pour la réalisation du plasmide RNAi final correspondant au plasmide pX7-GFP dont la séquence du gène codant la GFP est remplacée par la construction RNAi de *PtaFUT1*. Dans le cas de *AtFUT1::pMDC32*, la transformation génétique du peuplier a été réalisée à l'aide d'*A. tumefaciens*. Cependant, après plusieurs essais, la régénération des explants a généralement échoué. Un essai a tout de même permis la régénération de quelques explants mais aucun ne possédait le gène *AtFUT1* intégré dans son génome. Actuellement, quelques explants obtenus suite à une nouvelle tentative sont en cours de régénération. La vérification de la transformation génétique sera prochainement réalisée. La

non-obtention de peupliers transgéniques surexprimant la XG $\alpha(1,2)$ -FucT représente ainsi un frein à la poursuite de l'étude du rôle de la fucosylation des XGs dans la cohésion pariétale. L'analyse ultrastructurale des peupliers transgéniques ainsi que la révélation par immuno-détection de la distribution des XGs fucosylés ou non étaient envisagées afin d'observer l'impact de ces modifications sur le développement pariétal, notamment au cours de la formation du bois de tension.

III. Conclusion

Grâce au séquençage complet du génome de plusieurs espèces, dont notamment le peuplier (*Populus trichocarpa*) et l'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) ainsi qu'aux banques de données aisément accessibles, 7 gènes putatifs codant des $\alpha(1,2)$ -FucTs ont pu être isolés. Afin de vérifier expérimentalement le nombre de copies de ce gène, un Southern blot a été réalisé mais n'a pas permis d'identifier ces 7 copies du gène $\alpha(1,2)$ -FucT. Un problème de sensibilité de la technique employée est probablement la cause de ce résultat étant donné l'observation du signal correspondant au gène codant l'ARNr 18S (ARN exprimé constitutivement et parfaitement détecté suivant le protocole utilisé). Bien que les gènes *PtaFUT* n'aient pas été mis en évidence au sein du génome du peuplier hybride lors de cette expérimentation, la fucosylation de certains polymères végétaux tels que les RG-I, RG-II, AGPs et XGs demeure un processus s'établissant lors de la mise en place de la paroi. Néanmoins, le rôle du résidu fucose dans la cohésion pariétale reste toujours un sujet controversé. C'est ce à quoi l'ensemble des expérimentations réalisées dans le cadre de cette étude à chercher à éclaircir, notamment à travers le modèle expérimental que constitue le bois de tension.

L'analyse des séquences a permis notamment de mettre en évidence un gène en particulier se distinguant des autres : *PtaFUT1*. Celui-ci présente en effet de fortes homologies avec des XG $\alpha(1,2)$ -FucTs préalablement caractérisées (Perrin *et al.*, 1999 ; Faïk *et al.*, 2000 ; Sarria *et al.*, 2001). D'après les résultats obtenus chez le mutant *MUR2* d'Arabidopsis et présentant *AtFUT1* comme le seul gène impliqué dans la fucosylation des XGs chez ce végétal (Vanzin *et al.*, 2002), il est possible qu'il en soit de même pour *PtaFUT1* chez le peuplier. Les autres *PtaFUT* pourraient alors être supposés spécifiques d'autres polymères.

Concernant les alignements de séquences réalisés entre les séquences génomiques des *PtaFUT*, un fort polymorphisme est révélé au niveau de leur séquence 5'. En règle générale, la

zone la plus conservée entre chacun de ces gènes est située après le seul et unique intron qu'ils possèdent (excepté pour *PtaFUT5* qui n'est constitué que d'un seul exon). De plus, par confrontation de leur séquence peptidique déduite avec des FucTs d'autres organismes (bactéries, invertébrés, vertébrés) fixant le résidu Fuc en $\alpha(1,2)$ ou en $\alpha(1,6)$, plusieurs motifs consensus ont pu être mis en évidence. L'un d'entre eux, nommé « motif-I » et commun aux $\alpha(1,2)$ -FucTs et $\alpha(1,6)$ -FucTs, est supposé correspondre au site de liaison au GDP-Fuc. La présence de ce motif chez les PtaFUT isolées lors de cette étude suggère ainsi une activité FucT du produit de ces gènes. De la même manière, les différentes prédictions informatiques établissant certaines PtaFUT comme des protéines membranaires de type II localisées dans l'appareil de Golgi (pour PtaFUT1, 3, 4 et 7) renforcent cette idée.

Par recherche de similarités des séquences peptidiques PtaFUT avec celles présentes dans les banques de données, plus d'une centaine de proches orthologues ont été répertoriées chez différentes plantes. Comme suggéré précédemment, l'appartenance des protéines PtaFUT à la famille des XG $\alpha(1,2)$ -FucTs apparaît de plus en plus probable étant donné la présence du domaine spécifique de la famille « pfam03254 ». Un arbre phylogénétique généré uniquement à partir du domaine catalytique de diverses XG $\alpha(1,2)$ -FucTs (putatives ou non) donne de plus une divergence de ces protéines entre monocotylédones et dicotylédones à partir d'un ancêtre commun constituée par une bryophyte.

Afin de déterminer avec exactitude l'activité enzymatique de ces protéines et notamment de PtaFUT1, l'expression en système hétérologue (cellules COS-7) a été mise au point. Après optimisation du protocole et différents essais, aucune activité enzymatique n'a cependant pu être décelée. Le problème de la spécificité du substrat face à l'enzyme demeure alors posé. En effet, l'enzyme ne pourrait être fonctionnelle que suivant un degré de polymérisation (DP) du substrat bien défini et le type de ramification porté par celui-ci (Faik *et al.*, 2000). Les AGPs et les RG-I/RG-II, substrat potentiels des $\alpha(1,2)$ -FucTs, devraient aussi être testés. Cependant, l'absence d'une large gamme de substrats commerciaux rend ainsi la tâche plus difficile. Pour palier ce problème, la préparation de substrats au sein du laboratoire pourrait alors s'avérer nécessaire bien que cela reste un travail fastidieux.

Outre l'expression en cellules COS-7, une expression de *PtaFUT1* chez le tabac par transgénèse a été réalisée afin de s'affranchir de possibles problèmes inhérents à l'expression d'une protéine végétale dans un système animal (glycosylation par exemple). Malgré ce changement, l'activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT n'a pas pu être détectée. Bien que l'activité des protéines PtaFUT ne soit pas déterminée mais fortement supposée, l'analyse de l'expression des gènes les codant à tout de même été réalisée par RT-PCR. Il apparaît, pour l'ensemble

d'entre-eux, des profils d'expression différents qui semblent coïncider avec l'organisation en clusters des gènes (excepté pour *PtaFUT3* qui n'a pu être cloné). Cette constatation combinée à des localisations différentes des clusters sur les chromosomes suggèrent ainsi une duplication des gènes au cours de l'évolution du génome du peuplier. De plus, des profils d'expression différents suivant la localisation des gènes FucTs sous forme de clusters chez *A. thaliana* ont également été rapportés par Sarria *et al.* (2001). Hormis cette observation, il est identifié 3 voire 4 gènes (*PtaFUT1*, 2, 4 (et 5 ?)) pour qui le niveau d'expression diverge entre BO et BT de peuplier âgé de 2 ans. Ceci se matérialise par une sous-expression dans le BT. En revanche, *PtaFUT6* et 7 semblent s'exprimer préférentiellement dans les feuilles et leur régulation n'apparaît donc pas modifiée lors de la formation d'un moment de courbure. Etant donné le manque d'information sur l'activité de ces enzymes et notamment leur spécificité de substrat, il est difficile de discuter le rôle de cette sous-expression. Néanmoins, en supposant une activité XG $\alpha(1,2)$ -FucT pour *PtaFUT1* en particulier, il peut être suggéré un renforcement de la cohésion pariétale au niveau des parois des fibres du BO lors de la mise en place de la paroi secondaire. Bourquin *et al.* (2002) trouvent en effet des XGs fucosylés au sein de la paroi secondaire en formation dans les fibres du bois de tremble (*P. tremula* x *P. tremuloides*) par immunomarquage à l'aide de l'Ac CCRC-M1. Ce marquage apparaît nettement au niveau de la lamelle moyenne et à la jonction paroi primaire/couche S1. Pour ces auteurs, ces résultats laissent à penser à une sécrétion et un transport des XGs à travers la paroi secondaire à destination de la paroi primaire pour renforcer les liaisons entre ces deux structures, en particulier pour améliorer la jonction entre des strates pariétales présentant des AMF divers. Lors de la formation d'un moment de courbure chez le peuplier, la sous-expression du gène *PtaFUT1* dans la zone de bois tendu pourrait alors être considérée comme une régulation génique induisant une moindre fucosylation des XGs et permettant ainsi indirectement un relâchement des jonctions entre la paroi primaire et la couche S1. Ce mécanisme participerait à la déformation du BT et faciliterait alors la courbure. Cette hypothèse propose ainsi un rôle important du résidu fucose des XGs dans les liaisons s'établissant avec d'autres polymères et plus particulièrement avec la cellulose bien qu'ils puissent aussi se fixer aux pectines (Keegstra *et al.*, 1973 ; Thompson et Fry, 2000). En effet, de tous les modèles d'architecture de la paroi proposés (paroi primaire essentiellement), un concept commun demeure maintenant admis : les XGs sont adsorbés et enrobent les microfibrilles de cellulose, permettant ainsi des pontages entre microfibrilles adjacentes (Carpita et Gibeau, 1993) et jouant un rôle dans l'orientation des microfibrilles et dans la cohésion du réseau cellulosique (Hayashi, 1989). Ces fonctions inhérentes aux XGs résultent de l'établissement de liaisons hydrogènes entre les deux

polymères qui semblent être affectées par les ramifications des xyloglucanes (Vincken *et al.*, 1995) et dépendante du diamètre des fibres de cellulose (Hayashi *et al.*, 1987). Cependant, le rôle du résidu Fuc dans ces interactions demeure toujours un sujet controversé. Pour certains, les XGs fucosylés interagissent plus fortement à la cellulose que ceux non fucosylés (Levy *et al.*, 1991, 1997 ; Hayashi *et al.*, 1994 ; Vincken *et al.*, 1995). Pour d'autres, le résidu Fuc ne serait pas essentiel (Chambat *et al.*, 2005) et seules les ramifications galactosylées semblent jouer un rôle mécanique dans ces associations (Madson *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2004). Ainsi, la substitution des XGs par le résidu Fuc a conduit à diverses hypothèses parfois contradictoires ajoutant à la complexité du réseau pariétal une difficulté supplémentaire au discernement des mécanismes mis en jeu dans l'association XGs/microfibrilles de cellulose. Scheible et Pauly (2004) précisent de plus : « il n'est pas à exclure que la fucosylation des XGs pourrait être un vestige de l'évolution ou pourrait permettre un avantage sélectif sous certaines conditions de croissance qui n'ont cependant pas encore été identifiées ». Suivant cette dernière remarque et d'après les résultats d'expression géniques présentés ici, il peut être supposé que ces conditions de croissance non encore identifiées puissent correspondre, entre-autre, à la formation du bois de tension. Ces résultats d'expression ne faisant appel qu'à la technique de RT-PCR, le rôle de la fucosylation des XGs proposé précédemment ne reste qu'à l'état hypothétique. La confirmation de ces résultats par une autre méthode a donc été entreprise. Celle-ci faisant appel à la transgénèse végétale, avait pour but l'étude du niveau et de la localisation de l'expression des gènes *PtaFUT1* par le biais de leur région promotrice. Pour réaliser ce type d'expérimentation, des constructions plasmidiques permettant l'expression d'un gène rapporteur (GFP) ont été préparées. Cependant, les difficultés d'obtention de plantes transgéniques ont empêché l'achèvement du protocole expérimental. Aucune donnée supplémentaire n'a donc été obtenue.

Confrontée au même problème, l'étude du rôle de la fucosylation par le biais de peupliers transgéniques surexprimant *ATFUT1* ou sous-exprimant *PtaFUT1* (RNAi) n'a pu être terminée. Des essais de transgénèse végétale en cours pourront peut-être apporter les résultats non obtenus jusqu'à présent. Plusieurs paramètres concernant (i) le temps de co-culture et la densité cellulaire des agrobactéries avec les explants de peuplier ainsi que (ii) la préparation des milieux de culture des explants avant et après transformation sont actuellement vérifiés pour installer et maîtriser pérennément la création et la culture de peupliers transgéniques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La formation du bois, et plus particulièrement la formation du bois de tension chez le peuplier hybride (*P. tremula* x *P. alba*, clone INRA 717-1-B4) a été étudiée *via* une analyse biochimique et/ou immunohistochimique des polymères présents dans la paroi secondaire des fibres G ainsi que par l'expression de gènes impliqués soit dans le remodelage des xylanes, soit dans la maturation des XGs. Le choix de ce modèle a été effectué au regard de travaux déjà acquis par l'équipe mais également dans le cadre d'une collaboration entre plusieurs laboratoires travaillant d'une part à la compréhension de la formation de ce bois et d'autre part à l'élucidation du rôle des polymères pariétaux dans le rétablissement de la rectitude du bois soumis à des contraintes mécaniques. Si le modèle génétique est le même entre les différents partenaires, nous avons souhaité mettre au point une nouvelle méthode de formation du bois de tension grâce à la culture *in vitro*. Ce nouveau modèle d'analyse du bois tendu, complémentaire de ceux développés par l'INRA d'Orléans sur des arbres de 2 ans, avait pour objet de nous fournir des organismes végétaux qui permettent d'approcher les premiers stades de formation de ce bois particulier. En effet, les travaux réalisés à l'INRA d'Orléans montrent que quelques heures après la mise en tension, des modifications génétiques apparaissent entre le BT et le BO (Pilate *et al.*, 2004). De plus, l'importante quantité de lignine dans la paroi secondaire peut représenter un handicap pour l'analyse des polysaccharides et/ou protéines faiblement exprimés mais ayant peut être des fonctions clés dans la formation de ce bois. Notre but était alors d'analyser un matériel biologique peu lignifié mais supposé capable, malgré tout, de former un bois de tension.

Dans une première partie, nous avons ainsi vérifié que le modèle *in vitro* représente bien une alternative crédible au modèle classique quant à l'étude de ce processus. Par une approche immunohistochimique sur ce dernier, nous avons presque retrouvé la même distribution des polymères que celle déjà observée sur d'autres modèles (présence d'AGPs, de RG-I et de cellulose cristalline). Ainsi, la couche G, décrite initialement comme n'étant constituée que de cellulose et de lignine, et bien plus riche en polysaccharides et/ou protéines pariétales, ce que certaines études ont démontré auparavant (Lafarguette *et al.*, 2004 ; Nishikubo *et al.*, 2007 ; Arend, 2008 ; Bowling et Vaughn, 2008). Le modèle *in vitro* nous a permis de plus de confirmer par des colorations spécifiques la plus faible représentation des lignines et plus particulièrement de l'incorporation de certains monolignols (moindre lignification mais plus de lignine de type S dans les parois secondaires de BT par comparaison au BO). De la même manière, la technique d'immunomarquage nous a permis d'identifier des AGPs et des RG-I au sein de la couche G des fibres du BT, ce qui avait déjà été rapporté par

Bowling et Vaughn (2008). En revanche, les extensines non pas été trouvées dans le BT de peuplier *in vitro*. Etant donné que ces protéines favorisent la rigidité des parois, il semble normal de ne pas en observer chez ces peupliers. Cependant, le résultat le plus marquant de cette première partie de l'étude est l'absence d'hémicelluloses dans la couche G car ni xylanes, ni XGs y ont été détectés. L'absence de xylanes ou plus justement la très faible représentativité de ces derniers a été démontré (Salnikov *et al.*, 2008). En revanche, concernant les XGs, nos résultats sont en contradiction avec ceux récemment publiés par Nishikubo *et al.* (2007). Nos observations microscopiques restent néanmoins en accord avec nos analyses quant à l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de ces hémicelluloses. En effet, les gènes clonés (*PtaBXL1* et *PtaFUT1*) ont permis de déceler une sous-expression dans le BT chez des peupliers âgés de 2 ans. Cet état de fait ainsi que l'absence d'hémicelluloses dans la couche G suggèrent alors que les propriétés mécaniques du BT ont pour acteurs exclusifs la cellulose et la lignine. La réponse mécanique des arbres à cette contrainte pourrait ainsi s'expliquer soit par un gonflement entraînant la contraction longitudinale des fibres G dû au dépôt de lignine dans la paroi secondaire (Boyd, 1972), soit par la contractibilité des microfibrilles de cellulose (Bamber, 1979) ou soit suivant les deux mécanismes (Okuyama *et al.*, 1994). De plus, si ni les xylanes, ni les XGs ne sont présents dans cette couche, les théories proposées par Mellerowicz *et al.* (2008) ne peuvent se justifier. Il reste toutefois troublant que des études abordant le BT, quelque soit le modèle génétique de bois tendu analysé, tentent toutes à démontrer la présence spécifique des XETs au sein de la zone tendue (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006 ; Nishikubo *et al.*, 2007). Si l'artéfact expérimental d'identification de cette enzyme ne peut être précisé, la fonction biologique des XETs dans la couche G se doit d'être identifiée. En effet, il n'est pas à exclure que cette enzyme catalyse des réactions spécifiques d'un autre polymère. Par exemple, les XETs d'orge (*Hordeum vulgare* L., cv. Clipper) peuvent catalyser la transglucosylation avec des substrats donneurs cellulosiques dont l'hydroxyéthylcellulose (HEC). Cette réaction entre ces deux substrats est comparable à celle entre les XGs accepteurs et des XGs de tamarin donneurs (Hrmova *et al.*, 2007). Etant donné la forte présence de cellulose dans la couche gélatineuse, les XETs identifiées par Nishikubo *et al.* (2007) pourraient fonctionner à la fois sur plusieurs substrats mais plus particulièrement sur la cellulose. De plus, Zeng *et al.*, (2008) suggèrent les GAXs comme substrat potentiel de la XET chez le riz étant donné la faible teneur en XGs au sein des parois cellulaires de ce végétal. Ainsi, bien que la XET ait été localisée au sein de la couche G, il n'est pas sûr que celle-ci soit spécifique des XGs au vu des différents substrats qui lui sont attribués. L'absence de XGs au sein de la couche G du copalme et du micocoulier

(Bowling et Vaughn, 2008) rendent d'autant plus incertain le mode d'action de la XET dans cette strate.

Outre cette constatation, ce travail amène également une réflexion quand aux rôles de certaines AGPs dont la présence est toujours détectée dans le BT. A l'instar de ce qui est proposé par Lafarguette *et al.* (2004), peut-on suggérer pour ces composés une participation à la « gestion » mécanique des contraintes dans le BT. En effet, cet auteur propose un rôle possible des AGPs dans les connections entre le cytosquelette et la paroi durant l'extension des fibres et leur élongation ainsi qu'un rôle potentiel dans les propriétés de signalisation. Mis à part ces suggestions, il est aussi probable que d'autres polymères faisant partie intégrante de la couche G participent directement ou indirectement au développement des forces au sein des fibres du BT. Parmi ceux-ci, les RG-I sont généralement rencontrés dans la couche G (Meloche *et al.*, 2007 ; Arend, 2008 ; Bowling et Vaughn, 2008). Il est notamment proposé que ces RG-I jouent un rôle prépondérant dans le BT en créant des forces de traction sur les fibrilles de cellulose (Bowling et Vaughn, 2008). Pour Arend (2008), les $\beta(1,4)$ -galactanes retrouvés à la jonction entre les couches S2 et G chez le peuplier jouent un rôle d'adhésion en servant de lien entre ces deux couches. Cette hypothèse se trouve justifiée si l'on considère que les pectines riches en galactanes lient les microfibrilles de cellulose *via* leurs chaînes latérales (Zykwinska *et al.*, 2005, 2007). Elles pourraient ainsi intervenir dans ce type d'interaction dans les fibres G, favorisant alors la cohésion pariétale.

Ainsi, au vu des résultats d'immunomarquages comparés, entre le modèle *in vitro* et les autres modèles, la présence de divers polymères dans la couche G est confirmée, et ceci, dès les premiers stades de sa formation. Le BT de peupliers *in vitro* peut donc être considéré comme un support expérimental intéressant pour toute étude microscopique de la couche G. Des études cinétiques de formation du BT peuvent ainsi être envisagées afin de mieux visualiser les changements structuraux s'opérant au sein de ce bois atypique. De telles données permettraient probablement de découvrir des polymères de la couche G non identifiés jusqu'à présent, notamment à l'aide d'immunomarquages utilisant un plus large panel d'Ac. Cependant, le système expérimental « bois de tension *in vitro* » n'en étant qu'à ses débuts, des essais supplémentaires seront nécessaires pour établir un système d'obtention de BT mieux maîtrisé.

Concernant l'analyse des gènes *PtaBXL* et de leur produit, l'ensemble des résultats obtenus permettent d'identifier la paroi secondaire comme une structure « non figée » après sa biosynthèse. En effet, *PtaBXL1* montre une expression spécifique à la paroi secondaire mais aussi lors de la formation du BT (sous-expression dans la zone tendue). Au vu des activités

mesurées pour cette enzyme, le réarrangement pariétal semble donc un processus adaptatif nécessaire en réponse à la perte de verticalité des tiges. Outre la néosynthèse de polymères pariétaux, le réarrangement de certains d'entre eux au sein des parois constitue un processus supplémentaire qui a pu être mis en évidence chez le peuplier hybride au cours de cette étude. Le suivi de l'expression des gènes *PtaFUT* démontre lui aussi une régulation spécifique lors de la formation du BT (sous-expression dans la zone tendue). Ne connaissant pas l'activité de l'enzyme codée par *PtaFUT1* mais la supposant fortement -au vu des résultats d'homologies de séquences avec *AtFUT1* et *PsFUT1* et de conservation de motifs propres aux XG $\alpha(1,2)$ -FucT- il peut néanmoins être suggéré que les XGs fucosylés puissent jouer un rôle participatif dans une cohésion pariétale plus forte du côté opposé. Du côté tendu, la plus faible expression du gène *PtaFUT1* comparée à celle du BO pourrait limiter la cohésion pariétale ce qui donnerait à ce bois une plus large capacité de « mouvement » pour faciliter la courbure de la tige. Ainsi, le remodelage de polymères de la paroi secondaire couplé à la néosynthèse de polymères vers des zones spécifiques du bois peut très probablement aider à la « gestion » des forces nécessaires au redressement du bois. Le rôle de la fucosylation des XGs lors de la formation du bois reste néanmoins à démontrer. La détermination de l'activité de *PtaFUT1* et des autres *PtaFUT* ainsi que l'obtention de peupliers transgéniques pourront certainement éclairer ce sujet. Suivant une autre approche, le clonage de gènes codant des fucosidases et leur insertion dans le génome du peuplier par transgénèse (sous-expression ou surexpression) constitueraient là aussi un moyen supplémentaire pour analyser l'importance du résidu fucose dans la cohésion pariétale.

Pour conclure, la mise en place de divers mécanismes complémentaires lors de la formation du bois de tension semble nécessaire. En effet, en supposant que la couche G représente le site principal du développement des forces nécessaires au redressement des arbres, il existe plusieurs modifications pariétales s'opérant différenciellement entre le BO et le BT. Celles-ci incluent entre autre des expressions géniques spécifiques, régulées de manière temporelle et spatiale, comme le démontre les résultats de cette étude. Cette idée rejoint notamment celle développée par Joseleau *et al.* (2004) concernant le dépôt différentiel des lignines. Aussi, la présence, même faible, de polymères au sein de la couche G peut probablement suffire à la modification des propriétés mécaniques de cette strate atypique. D'autres aspects biochimiques qui n'ont pas encore été identifiés ainsi que certains aspects du BT tels que la mésoporosité de la couche G apporteront certainement de nouvelles hypothèses et perspectives de recherche quant à la compréhension des processus régissant les forces asymétriques du bois de tension.

MATERIELS & METHODES

I. Matériel biologique et culture

1. Organismes végétaux

a) Espèces

Plusieurs modèles végétaux ont été utilisés au cours de cette étude, à savoir :

- Le peuplier hybride (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA N° 717-1-B4) fournit par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) d'Orléans.
- L'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia).
- Le tabac (*Nicotiana benthamiana*) fournit par le Département de chimie de l'Université des Ressources Naturelles et des Sciences de la Vie Appliquée situé à Vienne (Autriche).

b) Cultures

i. Culture *in vitro*

La micro-propagation du peuplier est réalisée en tubes sur milieu MS $\frac{1}{2}$ (Murashige et Skoog, 1962) dont sa composition est reportée en annexes 1 et 2. Les plants ou explants sont placés en chambre de culture à 24°C avec une photopériode 16 h jour/8 h nuit. Le repiquage est effectué toutes les 8 semaines afin d'entretenir et régénérer les cultures.

Pour l'obtention de bois de tension chez les vitroplants de peupliers, la micro-propagation sur milieu MS $\frac{1}{2}$ est réalisée en bocal (10cm de hauteur x 10cm de diamètre) à raison de 6 explants par bocal. Cette densité de culture a créé des obstacles à la croissance des explants, notamment pour la recherche de la lumière, ce qui s'est traduit par des courbures sur certaines parties de la tige.

ii. Culture en serre

Pour le peuplier, l'arabette des dames et le tabac, la culture en serre est réalisée sur un support de culture commercial répondant à la norme nfu 44-551, composé de tourbes et de terre végétale désinfectée ainsi qu'un engrais NPK 14.16.18 + oligoéléments (1,5 kg/m³) et un mouillant à raison de 0,1 L/m³ (Société des Terreaux et Amendements Rochelais, France, réf : PAM 703T).

2. Bactéries

a) Souches

Plusieurs souches bactériennes sont utilisées. Elles servent :

⇒ soit à la réplication des plasmides et sont dérivées d'*Escherichia coli* K12 :

- JM 109 Competent Cells (Promega, France, réf : L2001, <http://www.promega.com>)
- One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen, France, réf : C404010, <http://www.invitrogen.com>)
- One Shot® OmniMAX™ 2 T1^R (Invitrogen, France, réf : C854003)

⇒ soit à la transformation génétique du peuplier :

- *Agrobacterium tumefaciens*, souche C58/pMP90 (INRA d'Orléans)

b) Cultures

Les bactéries se multiplient par fission binaire durant laquelle le chromosome et les plasmides se dupliquent. Deux types de cultures bactériennes sont utilisés suivant le résultat attendu : la culture liquide et la culture solide.

i. Culture en milieu liquide :

Principalement utilisée pour une production quantitative de plasmides, elle est réalisée dans le milieu Luria Bertani (LB ; Annexe 3). L'ajout d'un antibiotique de sélection auquel la bactérie est résistante évite la contamination par d'autres microorganismes. Après ensemencement, les milieux sont incubés à 37°C ou 28°C sous agitation (200 rpm) pendant respectivement 12 h pour *E. Coli* ou 24 h pour *A. tumefaciens*.

ii. Culture sur milieu solide en boîte de Pétri :

Cette méthode est généralement choisie pour la sélection de bactéries recombinantes après clonage. Comme pour la culture liquide, le milieu LB est utilisé, supplémenté en général d'un ou plusieurs antibiotiques de sélection. L'étalement des bactéries se fait au râteau en condition stérile jusqu'à l'absorption complète de la solution bactérienne liquide dans la gélose. Les milieux gélosés ensemencés sont incubés à 37°C pendant 12 h pour *E. Coli* ou à 28°C pendant 24 h pour *A. tumefaciens*.

Tableau 5 : Caractéristiques des vecteurs utilisés dans les différentes expérimentations de l'étude. Amp^R : résistance à l'ampicilline, Km^R : résistance à la kanamycine, Hyg^R : résistance à l'hygromycine, Spn^R : résistance à la spectinomycine.

Nom et fournisseur	Marqueur de sélection	Taille (pb)	Promoteur	Utilisation
pGEM [®] -T Easy (Promega)	Amp ^R	3015	LacZ	Séquençage
pcDNA3.1/V5-His-TOPO [®] (Invitrogen)	Amp ^R	5523	CMV	Expression des <i>PtaFUT</i> en cellules de Mammifère
pORE-R3 (ABRC)	Km ^R	8255	P _{hpl}	Localisation de l'expression des gènes <i>PtaFUT</i> au sein du peuplier <i>via</i> l'expression de la Green Fluorescent Protein (GFP)
pDONR [™] 221 (Invitrogen)	Km ^R	4762	T7	Vecteur intermédiaire pour le clonage en système Gateway
pMDC32 (INRA Orléans)	Km ^R (bactéries) Hyg ^R (plantes)	11752	2 x 35S	Transgénèse du peuplier (surexpression d' <i>AtFUT1</i>)
p21GT (Université de Vienne, Autriche)	Km ^R	13081	35S	Expression transitoire de <i>PtaFUT1</i> dans le tabac
pSK-int (UMR 520 CNRS Université Bordeaux2)	Km ^R	3109		Vecteur intermédiaire pour la construction d'un vecteur « ARN interférent » (RNAi)
pX7-GFP (UMR 520 CNRS Université Bordeaux2)	Spn ^R (bactéries) Hyg ^R (plantes)	13940	35S	Transgénèse du peuplier par la technique RNAi

3. Cellules animales

a) Souche

Les cellules COS-7 (n° ATCC : CRL-1651™) ont servi de système hétérologue pour l'expression de protéines végétales. Ce sont des cellules fibroblastiques de rein de singe vert d'Afrique immortalisées par transformation avec un mutant du virus simien SV40 (Gluzman, 1981).

b) Culture

Les cellules COS-7 sont cultivées et repiquées tous les 3 jours dans des flacons de cultures ventilés de 75 cm² en présence de 25 mL de milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM+/+ ; Annexe 4). Lors de chaque repiquage, le milieu est éliminé par aspiration puis les cellules sont lavées 3 fois par 15 mL de milieu DMEM-/- (Annexe 4) afin de supprimer toute trace de sérum de veau fœtal. Un volume de 5 mL de trypsine- acide éthylène-diamine-tétraacétique (Trypsine-EDTA ; Eurobio, France, réf : CEZTDA000U, <http://www.eurobio.fr/>) est ensuite ajouté pour décoller les cellules ; ceci est facilité par une incubation à 37°C pendant 5 min. Le mélange cellules/trypsine-EDTA est récupéré puis placé dans des tubes à centrifuger en présence de 15 mL de DMEM+/+ afin de stopper l'action de la trypsine. Le tube est alors centrifugé (température ambiante(TA), 5 min, 1200g) puis le surnageant est éliminé. Les cellules sont suspendues à nouveau avec 1 mL de milieu DMEM+/+ et un volume de 50 µL de cette suspension cellulaire est finalement dilué dans 25 mL de DMEM+/+ contenus dans un nouveau flacon de culture. La souche cellulaire est cultivée dans un incubateur (Innova CO-48, New Brunswick Scientific, France, <http://www.nbsc.com/>) à 37°C et 5% de CO₂.

4. Plasmides

Différents plasmides, réplikatifs chez *Escherichia coli* ou *Agrobacterium tumefaciens*, ont été utilisés et leurs caractéristiques sont représentées dans le tableau 5.

II. Bioinformatique

La recherche des gènes codant les XG $\alpha(1,2)$ -FucTs de peuplier et leur localisation sur les chromosomes ont été effectuées sur le génome de *Populus trichocarpa* accessible sur la base de données des sites JGI et PopGenIE (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html, Sterky *et al.*, 2004 ; Tuskan *et al.*, 2006 ; <http://www.popgenie.db.umu.se/popgenie/>, Sjodin *et al.*, 2009 respectivement). Lors du séquençage de l'ADN, les électrophorégrammes ont été analysés avec le logiciel FinchTV. Les séquences identifiées comme correspondant à des XG $\alpha(1,2)$ -FucTs putatives ont été enregistrées sous la base de données GenBank.

Les séquences nucléotidiques isolées ont ensuite été analysées suivant différents serveurs et logiciels : recherche des sites de restriction à l'aide du logiciel CLC Free Workbench 3, prédiction du poids moléculaire (Peptidmass, <http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>), du type protéique (SOSUI, <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/> ; iPSORT, <http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>), de la localisation subcellulaire (TargetP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> ; iPSORT), d'un peptide signal (SignalP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), des sites de glycosylation (NetNGlyc, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). La traduction des séquences nucléotidiques a été réalisée grâce au serveur Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>) et les séquences promotrices ont été recherchées sur le serveur SoftBerry (<http://www.softberry.ru/berry.phtml>) à l'aide de PlantProm et de TSSP (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=plantprom&group=data&subgroup=plantprom>; <http://www.softberry.ru/berry.phtml?group=programs&subgroup=promoter&topic=tssp>).

Pour détecter des séquences peptidiques ou nucléotidiques similaires à celles du peuplier, des BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) ont été réalisés à partir des sites NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) sur différentes banques de données : GenBank, EMBL-EBI, Swiss-prot et TAIR. Les domaines consensus des XG $\alpha(1,2)$ -FucTs ont été identifiés à l'aide du serveur CDART (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>, Geer *et al.*, 2002 ; Marchler-Bauer et Bryant, 2004 ; Marchler-Bauer *et al.*, 2005, 2007).

Les alignements de séquences nucléotidiques ou peptidiques ont été effectués à l'aide des programmes MUSCLE (<http://www.bioinformatics.nl/tools/muscle.html>) et ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, Thompson *et al.*, 1994) sur les sites EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) ou BioAssist (<http://www.bioinformatics.nl/>). Le logiciel CLC Sequence Viewer 6.0.2 permet lui aussi de réaliser ces alignements. Les arbres

phylogénétiques ont été élaborés sur ce même logiciel ou à partir du serveur Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/> ; Dereeper *et al.*, 2008).

III. Techniques usuelles de biologie moléculaire

1. Préparation des acides nucléiques

a) Extraction des acides nucléiques

i. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir de tissus frais végétaux à l'aide de la solution commerciale « Plant DNAzol® Reagent » (Invitrogen, France, réf: 10978-021). La technique est basée sur l'utilisation d'un tampon de lyse à base de guanidine qui permet l'hydrolyse des ARN et la précipitation sélective de l'ADNg. Ainsi, dans un premier temps, 100 mg de tissus végétaux sont broyés dans un mortier en fine poudre à l'aide d'azote liquide. Le broyat obtenu est transféré dans un tube 1,5 mL contenant 0,3 mL de Plant DNAzol®. Après homogénéisation, la solution est incubée 5 min à 25°C puis 0,3 mL de chloroforme y sont ajoutés. Celle-ci est mélangée vigoureusement, incubée sous agitation constante (5 min, 25°C) puis centrifugée (12000g, 10 min). L'ADNg ainsi isolé dans la phase aqueuse est récupéré dans un nouveau tube 1,5 mL additionné de 0,225 mL d'éthanol absolu. Après agitation manuelle du tube et incubation (5 min, 25°C), la solution est centrifugée (5000g, 4 min) afin de précipiter l'ADNg. Le culot ainsi obtenu est lavé avec 0,3 mL d'une solution de Plant DNAzol®/éthanol absolu constituée par un ratio de 1/0,75 (v/v). De la même manière que précédemment, ce mélange est soumis à agitation au vortex, incubation (5 min, 25°C) et centrifugation (5000g, 4 min). Suite à cette précipitation, le surnageant est éliminé puis un dernier lavage est effectué avec 0,3 mL d'éthanol 75% suivi d'une dernière centrifugation (5000g, 4 min). L'ADNg est finalement solubilisé dans 30 µL d'eau ultra-pure stérile après avoir préalablement éliminé l'éthanol et séché le culot. Une fois la concentration déterminée au spectrophotomètre (cf. III.1.b), la solution d'ADNg est stockée à -20°C.

ii. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN est réalisée d'après le protocole de la solution commerciale TRIzol® Reagent (Invitrogen, France, réf: 15596-026). Ce réactif contient du phénol et de

l'isothiocyanate de guanidine (d'après la méthode développée par Chomczynski et Sacchi, 1987) et permet la lyse des cellules tout en maintenant l'intégrité des ARN.

La première étape du protocole consiste en l'homogénéisation dans un mortier des tissus végétaux dans la solution de TRIzol® (50 à 100 mg de tissus frais/mL TRIzol®). L'homogénat ainsi obtenu est incubé 5 min à 25°C afin de permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques puis y sont ajoutés 0,2 mL de chloroforme/mL de TRIzol® initial. Le tout est mélangé au vortex 15 sec puis incubé 2-3 min à 25°C. Une première centrifugation est réalisée (12000g, 15 min, 4°C). A la fin de celle-ci, trois phases apparaissent dans le tube : la phase aqueuse supérieure contenant principalement les ARN totaux, la phase organique et l'interphase contenant l'ADNg, les débris cellulaires et les protéines. Ce dernier est transféré dans un nouveau tube contenant 0,5 mL d'isopropanol/mL de TRIzol® initial. Après 5-10 min d'incubation à 25°C, une nouvelle centrifugation (12000g, 10 min, 4°C) permet d'obtenir un précipité blanchâtre au fond du tube. Le surnageant éliminé, le culot d'ARN est lavé 1 fois par de l'éthanol 75% (1 mL éthanol 75%/mL TRIzol® initial) sous agitation suivi d'une étape de centrifugation (7500 g, 5 min, 4°C). Le culot d'ARN est finalement séché à l'air puis solubilisé dans 30 µL d'eau ultra-pure. La concentration de la solution est déterminée au spectrophotomètre (cf. III.1.b) puis un traitement à la DNase I est effectué suivant le protocole du kit «DNase I, Amplification Grade » (Invitrogen, France, 18068015). Les échantillons d'ARN sont stockés à -80°C.

b) Aspects quantitatif et qualitatif des acides nucléiques

La pureté et le dosage des acides nucléiques extraits sont vérifiés à l'aide d'un micro-spectrophotomètre (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, Etats-Unis d'Amérique, <http://www.nanodrop.com>). Un spectre d'absorption entre 220 nm et 300 nm permet d'estimer la pureté de l'extrait en calculant les rapports de densité optique (DO) et de déterminer la quantité d'acides nucléiques (DO_{260nm}).

La concentration des échantillons est estimée par la formule suivante :

$$\text{concentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{absorbance}_{260nm} \times R \times \text{facteur de dilution}$$

où R dépend de la nature des acides nucléiques :

$$\text{ADN : } R = 50$$

$$\text{ARN : } R = 40$$

Les acides nucléiques sont jugés purs pour des rapports DO_{260}/DO_{280} et DO_{230}/DO_{260} compris entre 1,8-2,0 et supérieur à 2,0 respectivement.

La séparation par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium (BET 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma, France, réf : E1510) est aussi réalisée afin d'évaluer visuellement leur pureté. Cela permet de détecter, pour une solution d'ARN, la présence d'ADN contaminant. De même pour une solution d'ADN afin de vérifier que celui-ci n'est pas dégradé.

c) Séparation électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN peuvent être séparés par électrophorèse en gel d'agarose en fonction de leur taille. La concentration en agarose varie en fonction de la taille des fragments que l'on souhaite séparer. L'agarose, mélangé avec du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE : Tris-acetate 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) ou Tris-Borate-EDTA (TBE : Tris-borate 90 mM ; EDTA 2 mM pH 8,0), est dissout par chauffage au micro-onde. Avant d'être coulé, du BET à 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final est ajouté pour permettre la visualisation ultérieure des fragments d'ADN aux ultra-violet (UV) à 312 nm. Un marqueur de poids moléculaire est déposé en regard des échantillons afin d'apprécier la taille de ces derniers et un tampon de charge est mélangé aux échantillons pour faciliter leur dépôt dans les puits du gel et suivre leur migration. Ce tampon de charge est généralement fourni avec le marqueur de taille et s'utilise suivant les recommandations du fabricant. La migration s'effectue de la cathode vers l'anode sous une tension de 25 à 100 V et pendant un temps dépendant de l'appréciation de l'expérimentateur. La migration arrivée à son terme, le gel est placé sur une plaque UV (312 nm) afin d'observer le ou les fragments d'ADN. Une photographie du gel est réalisée à l'aide d'un système d'acquisition d'image (Vilber Lourmat, Allemagne, <http://www.vilber.eu>).

d) Extraction et purification d'ADN sur gel d'agarose

Le gel d'agarose étant placé sur plaque UV (312 nm), la découpe de la bande d'intérêt visualisée est effectuée à l'aide d'un scalpel stérile. Il est important de limiter le temps d'exposition de l'ADN aux UV afin d'en éviter la dégradation. La séparation de l'ADN et de l'agarose est réalisée conformément aux protocoles décrits par les fournisseurs dans les kits QIAquick gel Extraction Kit (QIAGEN, France, réf : 28704, <http://www1.qiagen.com>), Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Etats-Unis d'Amérique, réf : D4001) et Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (Promega, France, réf : A9281)

Tableau 6 : Caractéristiques des enzymes de restriction utilisées lors de l'étude.

Nom de l'enzyme	Séquence reconnue	Extrémité débordante	Sensibilité à la méthylation	Reconnaissance d'un palindrome
BamHI	ggatcc	5'	N4-méthylcytosine	Oui
EcoRI	gaattc	5'	N6-méthyladenosine	Oui
NotI	gcggccgc	5'	N4-méthylcytosine	Oui
SacI	gagctc	3'	5-méthylcytosine	Oui
SacII	ccgctgg	3'	5-méthylcytosine	Oui
SalI	gtcgac	5'	N6-méthyladenosine	Oui
SpeI	actagt	5'		Oui
XbaI	tctaga	5'	N6-méthyladenosine	Oui
XhoI	ctcgag	5'	N6-méthyladenosine	Oui

e) Précipitation et purification de l'ADN d'une solution aqueuse

À 1 volume d'une solution d'ADN est ajouté 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 3M pH 5,5. Après homogénéisation, 10 volumes d'éthanol absolu glacial y sont incorporés puis la solution est une première fois centrifugée à 16000g pendant 20 min à 4°C. A la fin de cette étape, le surnageant est éliminé puis remplacé par 10 volumes d'éthanol 75% pour effectuer un lavage de l'ADN. Une deuxième centrifugation identique à la première est réalisée suivie de l'élimination du surnageant. Un séchage du culot est effectué en laissant le tube ouvert à l'air libre jusqu'à la disparition de toute trace d'alcool. L'ADN est repris dans un volume approprié d'eau ultra-pure stérile.

f) Digestions enzymatiques

Les enzymes de restriction de classe II, de provenance bactérienne, appartiennent à la classe des endonucléases et reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques de 4 à 10 paires de bases (appelés « sites de restriction »), le plus souvent palindromiques. Elles permettent le clivage à l'intérieur d'un ADN double brin (db) de la liaison phosphodiester entre 2 nucléotides. Il se forme, après coupure, soit des extrémités à bord franc soit des extrémités débordantes. Le tableau 6 ci-contre représente l'ensemble des endonucléases utilisées lors des expérimentations. Le protocole suivi lors des digestions enzymatiques est celui recommandé par les fournisseurs (Promega ou Fermentas).

Dans le cas d'une double digestion, il est possible d'utiliser un tampon pour lequel les deux enzymes possèdent toute leur activité ou au moins 75% de celle-ci. Cependant, ce type de tampon ne peut s'appliquer à toutes les enzymes. Il est ainsi réalisé dans certains cas une digestion enzymatique séquentielle avec précipitation et purification de l'ADN entre les deux réactions (cf. III.1.e).

g) Extraction et purification de plasmides

Les colonies bactériennes identifiées comme possédant un vecteur d'intérêt après criblage sont cultivées en milieu LB liquide (Annexe 3) à 37°C sous agitation (250 rpm). Ces cultures sont soit réalisées pour un volume de 5 mL, soit pour un volume de 50 mL suivant la quantité de plasmide souhaité. Les protocoles d'extraction utilisés sont réalisés à partir de kits Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System et Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System, Promega, France, réf : A1330 et A7640 respectivement.

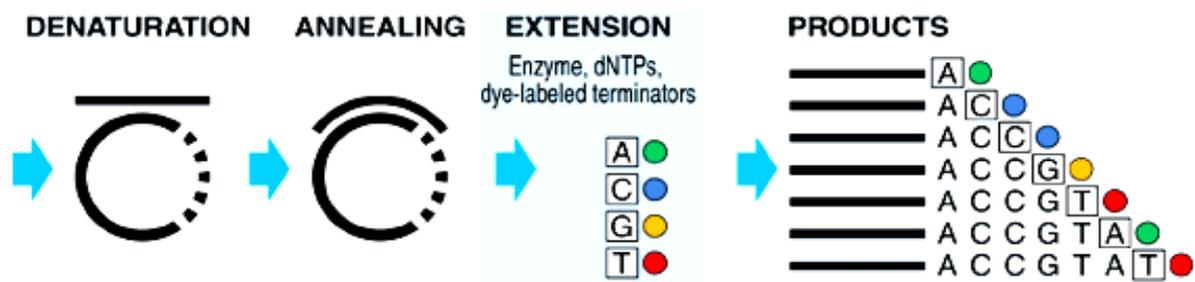


Figure 75 : Représentation schématique du principe de séquençage. (Source : *Applied Biosystems*)

Ces kits utilisés, suivant les recommandations du fabricant, reposent sur la lyse alcaline des bactéries et la précipitation différentielle de l'ADN plasmidique vis-à-vis de l'ADN chromosomique. Une dénaturation contrôlée à haute force ionique permet de précipiter seulement l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique en solution est chargé sur une colonne échangeuse d'anions pour réaliser sa purification. La solution plasmidique isolée en fin d'expérimentation est dosée au spectrophotomètre (cf. III.1.b) puis le plasmide est séquencé.

h) Séquençage de l'ADN par électrophorèse capillaire

i. Principe

Le séquençage est réalisé par la méthode des didésoxyribonucléotides (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977). Ceux-ci diffèrent des désoxyribonucléotides (dNTPs) par l'absence d'un groupement 3'OH et sont marqués par des molécules fluorescentes (une couleur différente pour chaque). La réaction de séquençage consiste en l'amplification par PCR de l'ADN à séquencer. Cette première étape nécessite en particulier une amorce (complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer ou d'une séquence connue du vecteur contenant l'ADN d'intérêt), la matrice ADNdb, des dNTPs, des ddNTPs (à plus faible concentration que les dNTPs), l'ADN polymérase et un thermocycleur pour assurer l'amplification de l'ADN.

Ainsi, la polymérisation de l'ADN d'intérêt est initiée à partir de l'extrémité 3'-OH libre de l'amorce hybridée. S'en suit l'élongation de cette dernière grâce à l'ADN polymérase qui va incorporer les dNTPs et les ddNTPs de façon aléatoire. Cependant, l'incorporation de ces derniers au nouveau fragment synthétisé stoppe l'élongation. L'ADN polymérase n'est en effet plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite. Cette technique permet ainsi de générer des fragments d'ADN de différentes tailles dont le dernier nucléotide possède un fluorochrome qui lui est spécifique (Fig. 75). La « lecture » de la séquence est ensuite réalisée par électrophorèse capillaire couplé à un détecteur de fluorescence. Cela permet la séparation des fragments suivant leur longueur et l'identification de la fluorescence générée au niveau du dernier nucléotide de l'ADN. La succession des nucléotides identifiés constitue ainsi la séquence de l'ADN analysé.

ii. Méthode

Les réactions de séquençage sont réalisées avec un thermocycleur (GeneAmp® PCR System 9600, Perkin Elmer Applied Biosystems, France, réf : , <http://las.perkinelmer.com>) à partir de 300 ng d'ADN plasmidique, en utilisant le mélange réactionnel composé de 2 µL de « BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Standard » (Applied Biosystems, France, réf : 4336935), 3 µL de « BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer 5X » (Tris-HCl 400 mM pH 9,0, MgCl₂ 10 mM ; Applied Biosystems, France, réf : 4336697) et 10 pmoles d'amorce, le tout complété à 20 µL par de l'eau ultra-pure stérile. Le programme de l'automate consiste en l'enchaînement pendant 25 cycles de : 10 sec à 96°C (étape de dénaturation de l'ADN), 5 sec à 55°C (étape d'hybridation des amorces), 4 min à 60°C (étape d'élongation par l'ADN polymérase).

Afin d'obtenir des amplifiats exempts de contaminants, la réaction de séquence est purifiée. Il est ainsi ajouté 80 µL d'isopropanol 75% à -20°C au mélange réactionnel; le tout étant transféré dans un nouveau tube de 0,5 mL. Après 15 min à TA, le tube est centrifugé (16000g, 10°C, 20 min) puis le surnageant éliminé. Un volume de 200 µL d'isopropanol 75% (-20°C) est à nouveau ajouté afin d'effectuer un dernier rinçage. Après avoir mélangé vigoureusement, le tube est centrifugé comme précédemment pendant 10 min. Le surnageant éliminé, le culot est séché durant 1 min dans un bloc chauffant à 85°C puis 10 µL de formamide sont ajoutés au culot pour sa resuspension. Un passage de 2 min du tube dans un bloc chauffant à 95°C assure finalement la dénaturation de l'ADNdb. Le tube est placé aussitôt sur glace après cette étape afin d'éviter tout ré-appariement de l'ADN. La solution peut ainsi être chargée dans la plaque 96 puits du séquenceur (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

2. Génération d'ADNc par Reverse Transcriptase (RT)

a) Principe

La transcriptase inverse est spécifique de la matrice ARN pour fonctionner. C'est une enzyme rétrovirale utilisée dans le cadre de la RT qui permet la synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) au brin d'ARN. Elle a besoin d'amorces oligonucléotidiques pour initier la synthèse du brin d'ADN et utilise les dNTPs comme substrat.

b) Méthode

Cette technique a été réalisée à l'aide du kit « SuperScript™ III First-Strand Synthesis System » (Invitrogen, France, réf : 18080-051) suivant le protocole décrit par le fournisseur. L'amorce oligo(dT)₂₀ (50 µM) ainsi qu'un maximum de 5 µg d'ARN totaux extraits pour un volume maximal de 8 µL sont utilisés pour générer une solution de 20 µL d'ADNc. Un traitement à la ribonucléase H (RNase H) pendant 20 min à 37°C permet l'élimination des ARN de la solution d'ADNc nouvellement synthétisée. Les ADNc sont stockés à -20°C.

3. Amplification d'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR)

a) Principe

Les ADN polymérase thermostables sont utilisées lors de l'amplification de l'ADN par PCR, mise au point par Saiki *et al.* (1988). Cette technique permet d'amplifier, *in vitro*, de manière exponentielle et sélective, un fragment d'ADN à partir de deux amorces. Ces dernières (de 15 à 25 nucléotides) sont capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin antisens. L'enzyme peut ainsi effectuer la polymérisation du brin complémentaire à partir de l'extrémité 3'OH libre d'une amorce dans le sens de synthèse 5'→3'.

b) Méthode

Plusieurs types de PCR ont été réalisées pour l'obtention notamment des séquences génomiques et codantes des gènes *PtaFUTi* et *AtBXLi*, mais aussi des régions promotrices des *PtaFUT*. Ces séquences codantes ont aussi fait l'objet de modifications par PCR de leurs extrémités pour assurer leur ligature dans des vecteurs de clonage spécifiques. Finalement, le criblage des bactéries transformées ainsi que la synthèse de sondes moléculaires pour le Southern blot ont été réalisés par cette technique. Ces synthèses sont décrites en annexe 7.

i. Amorces oligonucléotidiques

Les différentes amorces utilisées pour les réactions de PCR ont été fournis par Invitrogen et MWG (Annexe 6). La température utilisée pour l'hybridation de ces amorces sur la matrice d'ADN est égale à la température de fusion des brins complémentaires (« Temperature melting » ou T_m) diminuée de 5°C. Le T_m correspond à la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont dénaturées par rupture des liaisons hydrogène entre les brins. Pour des amorces de plus de 15 nucléotides, une approximation du T_m peut-être obtenue par la formule suivante :

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$$

ii. ADN polymérase

Au cours de cette étude plusieurs ADN polymérases ont été utilisées dont la « GoTaq Flexi DNA polymerase » (Promega, France, réf : M8301) pour les PCR de « routine », telles celles réalisées notamment pour le criblage de bactéries, et la « Titanium Taq DNA polymerase » (Clontech, France, réf : 639208, <http://www.clontech.com>) pour les amplifications d'ADNc rares. Ces deux enzymes recombinantes dérivent de la bactérie *Thermophilus aquaticus* retrouvée principalement au niveau des sources d'eau chaude.

Il existe aussi d'autres formes commerciales de polymérase, notamment celles possédant une activité « proofreading » générant des amplifiats fidèles à la matrice d'origine (sans ajout d'un adénine terminal). La protéine recombinante « Pfx50™ DNA Polymerase » (Invitrogen, France, réf : 12355012) issue de *Thermococcus zilligii*, a ainsi été utilisée pour la compatibilité des amplifiats de PCR avec certains kits biologiques de clonage.

Finalement, des Taq particulières, dont la « Taq Hot Start Polymerase » (Kalys, France, réf : KY-TAQHS) se différencient des Taq DNA polymérases classiques par leur très grande thermostabilité. En effet, ces enzymes sont rendues inactives à température ambiante par modification chimique. Elles sont activées uniquement par chauffage de plusieurs minutes (entre 5 et 10) à 94-95°C.

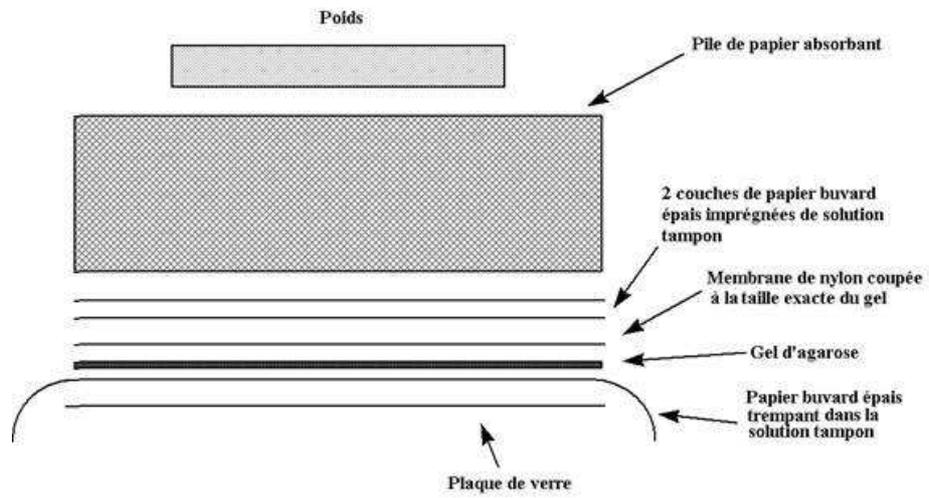


Figure 76 : Représentation schématique du dispositif de transfert passif de l'ADN sur membrane de nylon. (Source : <http://www.edu.upmc.fr>).

4. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR semi-quantitative

La RT-PCR semi-quantitative est réalisée à l'aide du kit « SuperScript™ III First-Strand Synthesis System » (Invitrogen, France, réf : 18080-051) pour étudier l'expression différentielle des gènes *PtaFUT* dans différents organes ou parties de la plante. La matrice ARN utilisée correspond à des ARN totaux extraits, purifiés et traités à la DNase I (cf. III.1.a.ii). Ces ARN proviennent de tige, feuilles et racines de vitro-plants de peuplier et des bois tendu et opposé de peuplier âgés de 2 ans. Aussi, pour obtenir des résultats reflétant le niveau de transcription des gènes tout en conservant les proportions entre chaque, il a été nécessaire de calibrer la quantité d'ARN totaux avant la RT. Ainsi, 2,5 µg d'ARN de chaque condition expérimentale ont servi à la synthèse de 20 µL d'ADNc. Les PCR sur ADNc nouvellement synthétisés ont été finalement effectuées sur *PtaFUT 1, 2, 4, 5, 6* et *7* ainsi que sur l'ARNr 18S (ARN ribosomique de la petite sous-unité du ribosome). En effet, le gène codant 18S est considéré comme constitutif et ubiquitaire ce qui permet son utilisation comme témoin du calibrage des ARN. Les conditions de PCR utilisées sont décrites en annexe 7.

5. Hybridation moléculaire sur membrane

a) Transfert d'ADNg sur membrane de nylon

Cette technique est réalisée suivant la méthode de Southern (1975). De l'ADN génomique de peuplier digéré préalablement par des enzymes de restriction est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% en tampon TAE (Tris-acétate 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0) additionné de BET 0,25 µg/mL. Cette migration s'effectue sur une distance de 10-12 cm à une vitesse de 0,7 cm/h. L'ADN avant d'être transféré sur membrane est dénaturé dans un premier temps par immersion du gel (2 x 30 min) dans une solution alcaline (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) et sous agitation orbitale. Un bref rinçage à l'eau ultra-pure est réalisé suivi d'une étape de neutralisation. Celle-ci se réalise dans une solution Tris-HCl 1 M (pH 7,4), NaCl 1,5 M dans laquelle le gel est plongé pendant respectivement 30 min puis 15 min. L'ADN est finalement soumis à un transfert passif sur membrane de nylon (Nylon membranes positively charged, Roche, France, réf : 11417240001) par capillarité avec du SSC 20X stérile pendant une nuit suivant le montage présenté ci-contre (Fig. 76).

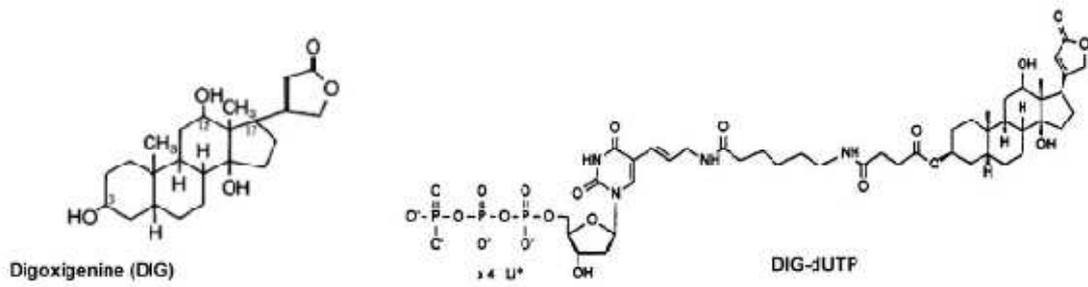


Figure 77 : Structure chimique de la digoxigénine et de la DIG-dUTP. (Source Roche).

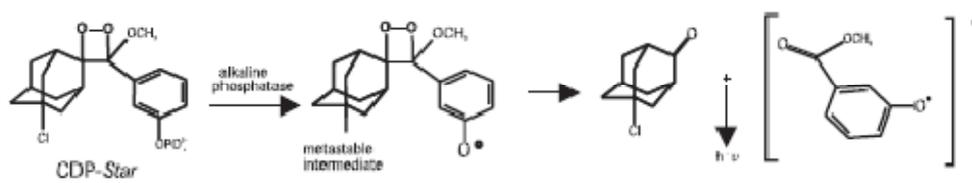


Figure 78 : Principe de la réaction du kit « CDP-Star, ready-to-use ». (Source : Roche).

Lorsque le transfert est terminé, le montage est défait puis le gel est observé sur une plaque UV (312 nm) afin de vérifier le transfert total de l'ADN à la membrane. Cette dernière, quant à elle, est plongée dans une solution de SSC 10X pendant 5 minutes puis placée dans une étuve à 120°C pendant 30 min pour assurer la fixation de l'ADN à la membrane.

b) Génération d'une sonde froide marquée à la digoxigénine

Le marquage de la sonde ADN utilisée pour l'hybridation sur membrane de nylon est réalisé à l'aide du kit « DIG DNA Labeling and Detection Kit » (Roche, France, réf : 11093657910 ; Fig. 77 ci-contre) suivant le protocole décrit par le fournisseur. La matrice ADN utilisée pour la synthèse de la sonde provenait d'amplicons purifiés sur gel.

c) Hybridation de la sonde

L'hybridation de la sonde à la membrane est en partie identique au protocole du kit ; seule la solution de pré-hybridation préparée au laboratoire en étant différente (SSC 5X), N-lauroylsarcosine 0,1% (w/v), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,02% (w/v), Blocking Reagent 1%)

d) Immuno-détection et révélation

Les dernières étapes consistant en la détection immunologique de l'ADN marqué par la sonde, sont réalisées à l'aide d'un Ac anti-digoxigénine couplé à une phosphatase alcaline. La révélation sur membrane est effectuée par deux approches basées sur l'apport d'un substrat à l'enzyme :

- La révélation par colorimétrie en utilisant le substrat « Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate » (NBT/BCIP) fourni dans le kit.
- La révélation par chemiluminescence, plus sensible que la précédente, à l'aide du kit « CDP-Star, Ready-to-use » (Fig. 78 ; Roche, France, réf : 12041677001). L'autoradiographie est effectuée sur « Lumi-Film, for chemiluminescent detection » (Roche, France, réf : 11666657001).

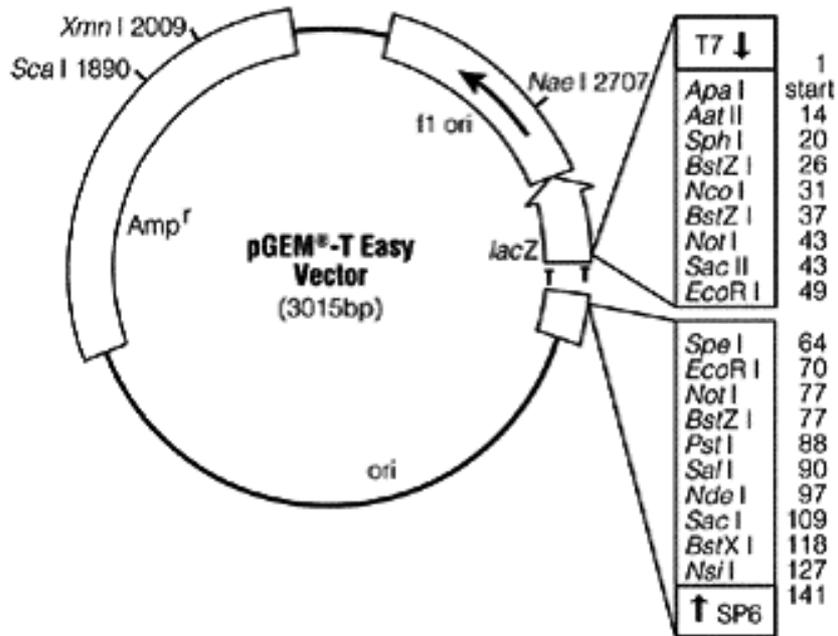


Figure 79 : Carte du vecteur pGEM®-T Easy Vector. (Source : Promega).

6. Clonage de fragments d'ADN en vue de leur séquençage

a) Principe

Certains amplifiats de PCR, purifiés et élués après extraction sur gel d'agarose, ont été ligaturés dans des « vecteurs T ». Ce nom est donné du fait de la présence de thymidine terminal aux deux extrémités 3' des vecteurs linéarisés. Ces extrémités «3'-T » préviennent ainsi d'une re-circularisation des vecteurs et fournissent des extrémités compatibles avec les produits PCR générés par certaines ADN polymérase ADN dépendante. En effet, ces dernières ajoutent un déoxyadénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. La liaison covalente d'un fragment d'ADN dans les vecteurs est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4, qui permet, en présence d'ATP et d'ions divalents, la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH et 5'phosphate des molécules d'acides nucléiques.

b) Méthode

Les clonages sont réalisés dans le pGEM®-T Easy Vector (Tab. 5 et Fig. 79). Ils permettent d'isoler les séquences codantes ou génomiques des *PtaFUT* nouvellement identifiées. Les constructions plasmidiques générées par cette méthode ont fait l'objet de séquençages afin de déterminer les séquences exactes des gènes clonés et leurs homologies avec les séquences obtenues par bioinformatique.

La méthode de ligature utilisée pour réaliser cette expérimentation est celle décrite dans le kit « pGEM®-T Easy Vector System II » (Promega, France, réf : A1380). Le choix d'une ligature suivant des rapports vecteur:insert variant de 1:1 à 1:3 durant une nuit à 4°C a permis l'obtention d'un plus grand nombre de bactéries recombinantes.

La transformation des bactéries est ensuite réalisée par choc thermique. Celui-ci a pour effet une perméabilisation momentanée de la paroi bactérienne et l'internalisation de l'ADN plasmidique dans le milieu intracellulaire bactérien. Pour opérer cette vectorisation, un volume de 20 µL (>10⁸cfu/µg) de suspension bactérienne (JM 109 Competent Cells, cf. I.2.a) est préalablement incubé 20 min sur lit de glace en présence de 10 ng de la solution de ligature. Les bactéries sont ensuite plongées dans un bain-marie à 42°C pendant 50 sec avant d'être placées à nouveau sur la glace pendant 2 min.

La pré-culture est réalisée par l'ajout de 380 μL de milieu LB aux bactéries suivi d'une incubation pendant 1 h 30 à 37°C sous agitation (250 rpm). Il y a ainsi expression du gène de résistance à l'antibiotique porté par le vecteur. L'étalement de 100 et 120 μL de pré-culture bactérienne est fait sur milieu LB solide en boîtes de Pétri (Annexe 3), supplémenté par l'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et les substrats 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal ; 195,78 μM) et isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG ; 0,5 mM). Les boîtes sont finalement placées dans un incubateur à 37°C pendant 12 h. Le criblage de colonies blanches par PCR à l'aide d'une amorce de l'ADN d'intérêt et d'une amorce du vecteur permet d'isoler les clones possédant la construction plasmidique souhaitée. Ces clones positifs sont ensuite mis en culture en milieu LB liquide (Annexe 3) supplémenté par l'ampicilline (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) afin de procéder à l'extraction et à la purification des plasmides d'intérêt en vue de leur séquençage (cf. III.1.g et h).

7. Clonage d'ADN en vecteurs d'expression à sites multiples de ligature

a) Principe

D'une règle générale, les vecteurs d'expression ne sont pas des « vecteurs T » et possèdent des sites multiples de ligature correspondant à des sites de restriction. L'insertion de fragments d'ADN dans ces zones offre ainsi le choix des enzymes permettant l'ouverture du vecteur, notamment pour conserver le cadre de lecture de la séquence codante à cloner.

b) Méthode

i. Préparation du vecteur

Pour présenter des extrémités compatibles, le vecteur est soumis à une ou deux digestion(s) enzymatique(s) *via* des enzyme(s) de restriction. Dans le cas d'un vecteur linéarisé *via* une seule enzyme de restriction, le groupe phosphate de l'extrémité 5' est éliminé afin d'éviter toute re-circularisation du vecteur. Cette déphosphorylation est effectuée avec une phosphatase alcaline recombinante d'*E. coli* suivant le protocole du fournisseur (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas, France, réf: EF0651, <http://www.fermentas.com>).

ii. Préparation de l'ADN à cloner

Après PCR et purification par électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment d'ADN d'intérêt flanqué de sites de restriction appropriés est cloné dans le pGEM®-T Easy (Promega) comme décrit en III.6.b. Il est ensuite extrait de ce vecteur par digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction qui lui sont spécifiques. Les produits sont finalement purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% pour éliminer le plasmide linéarisé.

iii. Clonage dans le vecteur d'expression

Le clonage dans le vecteur ouvert précédemment préparé, est réalisé comme suit : 50 ng de vecteur, X ng d'insert (rapport vecteur : insert de 1:3 à 1:10), 5 µL de tampon 2X Rapid Ligation Buffer (Tris-HCl 60mM pH 7.8, MgCl₂ 20mM, dithiothreitol (DTT) 20mM, adénosine triphosphate (ATP) 2mM, polyéthylène glycol (PEG) 10% ; Promega, France, réf : C671A), 3 unités de T4 DNA Ligase (Promega, France, réf : M1801), eau distillée stérile (qsp 10 µL). Le mélange réactionnel est placé à 4°C pendant une nuit.

Pour réaliser la vectorisation dans les bactéries, une incubation de 20 µL (>10⁸cfu/µg) de *E. coli* compétentes (JM 109 Competent Cells ; cf. I.2.a) pendant 20 min en présence de 4 µL de la solution de ligature est réalisée. La transformation de la suspension bactérienne est effectuée par choc thermique à 42°C pendant 50 sec puis les bactéries sont replacées sur lit de glace pendant 2 min. Une pré-culture est effectuée par ajout de 380 µL de milieu LB liquide (Annexe 3) et incubation 1 h 30 à 37°C à 250 rpm. Des volumes de 100 et 150 µL de celle-ci sont étalés sur milieu LB solide en boîtes de Pétri (Annexe 3) supplémenté par l'antibiotique de sélection porté par le vecteur. Les concentrations en antibiotiques utilisées dans le milieu LB sont les suivantes : ampicilline 100 µg/mL ou kanamycine 50 µg/mL ou zéocine 50 µg/mL. Ce dernier antibiotique nécessite cependant un milieu « LB^{1/2} salt » dont la composition est précisée en annexe 3.

Les colonies positives criblées par PCR sont mises en culture 12 h à 37°C dans du LB liquide afin de procéder à l'extraction et la purification des plasmides d'intérêts. Les constructions sont finalement vérifiées par séquençage.

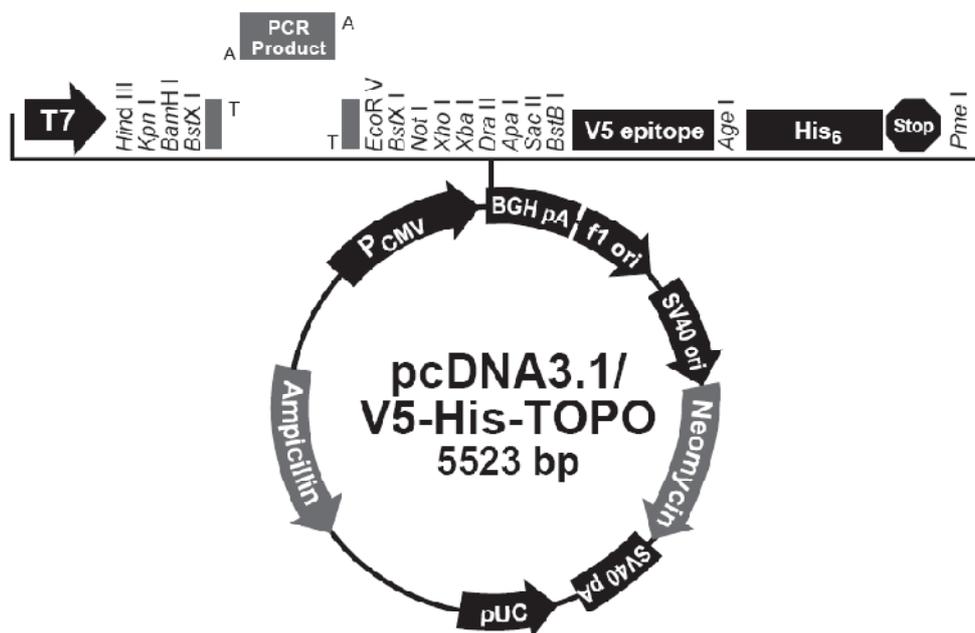


Figure 80 : Carte du vecteur pcDNA3.1/V5-His-TOPO. (Source : Invitrogen)

IV. Expression de protéines recombinantes en systèmes hétérologues

1. Expression d'*AtFUT1* et des *PtaFUT* en cellules COS-7

a) Clonage en vecteur d'expression pour cellules de Mammifères

Afin de procéder à l'expression des *PtaFUT* en cellules COS-7, le clonage préalable de leur séquence codante est réalisé dans le pcDNA3.1/V5-His-TOPO® (Tab. 5 et Fig. 80). C'est un « vecteur T » spécifique pour l'expression de gènes en cellules animales de Mammifères. Il permet un haut niveau d'expression de protéines recombinantes grâce au promoteur du CytoMegalovirus Humain (CMV) (Boshart *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987). Bien que ce vecteur possède un « tag » histidine, le codon STOP de chacune des séquences des gènes *PtaFUT* a été conservé.

La ligature des gènes d'intérêt ainsi que la transformation par choc thermique des bactéries compétentes (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, cf. I.2.a) sont réalisées suivant la méthode décrite par le fournisseur. Le criblage des colonies est réalisé par PCR à l'aide d'une amorce du gène et une amorce du vecteur afin d'identifier les clones possédant la séquence codante insérée dans le sens de lecture du vecteur. Après identification des clones positifs, leur culture est effectuée en milieu LB liquide (Annexe 3) supplémenté par l'ampicilline à 100 µg/mL pendant 12 h à 37°C. L'extraction des plasmides est opérée suivi de leur séquençage (cf. III.1.g et h) afin de vérifier la conservation du cadre de lecture du gène.

b) Transfection des cellules COS-7

Le « FuGENE®6 Transfection Reagent » (Roche, France, réf : 11815091001) est un composé lipidique, non liposomal, qui permet d'incorporer l'ADN plasmidique circulaire dans de nombreuses lignées de cellules animales. La transfection utilisée reste cependant transitoire. Le protocole de transfection décrit ci-après correspond uniquement aux étapes optimisées. Les différents essais pour arriver à celui-ci sont présentés dans la partie Résultats (Partie III, II.3.a).

Pour cette expérimentation, les cellules COS-7, en conditions stériles, sontensemencées 24 h avant la transfection en plaque 6 puits à raison de 10⁵ cellules/mL et 4 mL/puits dont un puits témoin est réservé aux cellules non transféctées. Après ce laps de temps, 2 µg de vecteurs en solution dans 10 µL d'eau ultra-pure sont utilisés (1 µg de vecteur

d'intérêt + 1 µg de vecteur contrôle interne codant la β-galactosidase). Cette solution d'ADN est préalablement stérilisée en répétant trois fois les incubations suivantes : 65°C pendant 5 min puis 5 min sur glace.

Lors de la préparation de l'agent de transfection, un ratio de 3:1 (volume de FuGENE®6 en µL : µg de vecteurs) est utilisé. Ainsi, 6 µL de FuGENE®6 sont dilués dans 94 µL de milieu DMEM-/- (Annexe 4), la solution est mélangée durant 1 sec au vortex puis incubée 5 min à TA. Les 10 µL de vecteurs stérilisés y sont ajoutés puis, après un mélange au vortex pendant 1 sec, le mélange réactionnel est incubé 15 min. Pendant ce temps d'incubation, le milieu DMEM+/+ (Annexe 4) est éliminé de chaque puits puis remplacé par 2 mL de ce même milieu auquel est ajouté le milieu de transfection précédemment préparé. Les cellules sont homogénéisées par la technique en croix puis placées 24 h à 37°C et 5% de CO₂ avant un renouvellement du milieu DMEM+/+. Le décollement des cellules, leur lyse et l'analyse des activités enzymatiques sont réalisés 24 h après ce nouveau changement de milieu de culture soit 48 h après transfection.

c) Décollement des cellules COS-7

Cette étape du protocole n'est réalisée que pour les cellules lysées par les méthodes chimique ou physique abordées après ce paragraphe. Les cellules lysées par méthode mécanique et physiologique n'ont en effet pas besoin d'être décollée préalablement. Ainsi, pour extraire les protéines recombinantes produites par les cellules COS-7 transfectées, le milieu de culture est dans un premier temps éliminé, puis les cellules sont lavées 2 fois au DMEM-/- (Annexe 4). Elles sont ensuite décollées par l'action de 5 mL de trypsine-EDTA durant 30 min à température ambiante sur agitateur orbital de plaques. Les cellules sont récupérées et mises dans des tubes à centrifuger contenant 6 mL de tampon phosphate salin (PBS) 1X pH 7,4. Après centrifugation (10 min, 1500 rpm, 4°C), le surnageant est éliminé par aspiration avec précaution. Quatre méthodes de lyse ont été testées pour l'extraction des protéines solubles :

Lyse par méthode chimique :

Le culot est resuspendu dans 100 µL de tampon de lyse (1% Triton X-100 ; 5 g/L acide désoxycholique ; 0,5 g/L SDS ; PBS 1X pH 7,4 ; cocktail d'antiprotéases 1%) puis mélangé toutes les 10 min durant 1 h à 37°C. Finalement, le lysat est centrifugé 30 sec à 400g à 4°C.

Pour s'affranchir du Triton X-100 et du SDS, le CHAPS (détergent zwitterionique non dénaturant) a aussi été utilisé suivant le même protocole que précédemment. La solution de lyse ainsi employée est constituée de : CHAPS 0,4%, saccharose 0,25 M, MOPS/KOH 50 mM pH 7,4, cocktail d'antiprotéases 1%)

Lyse par méthode physique :

Le culot est resuspendu dans 200 μ L de tampon phosphate (PBS 1X + cocktail d'antiprotéases 1%) puis sonifié. Plusieurs pulses de différents temps ont été pratiqués : une fois 1 sec, trois fois 1 sec, une fois 5 sec, une fois 10 sec. Le lysat est finalement mélangé au vortex puis centrifugé 30 sec à 400g à 4°C.

Lyse par méthode mécanique et physiologique :

Le milieu de culture (DMEM+/+, Annexe 4) des cellules COS-7 est éliminé puis les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X. Un volume de 500 μ L d'eau ultra-pure stérile est ajouté aux cellules et la destruction de celles-ci est réalisée par grattage à l'aide d'une pointe de micropipette. Après 30 min, le lysat est récupéré puis soumis à une centrifugation à 400g pendant 30 sec à 4°C.

d) Dosages des activités enzymatiques

i. Dosage β -galactosidase

Le dosage de l'activité β -galactosidase est réalisé sur le surnageant du lysat des cellules transfectées, non-transfectées et à partir d'une solution commerciale de cette même enzyme (activité enzymatique connue) dans le but de calculer l'activité β -galactosidase exprimée par les cellules COS-7 et de normaliser la réaction de co-transfection.

Pour chaque condition expérimentale, le mélange réactionnel est composé de 1 mM de $MgCl_2$, 3 mM de 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) et 0,76 mM de tampon phosphate pH 7,5 pour un volume final de 290 μ L. A ce mélange, sont ajoutés soit 10 μ L de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 dans le tube témoin négatif (=blanc), soit 10 μ L de β -galactosidase commerciale à 5×10^{-4} u/ μ L dans le tube témoin positif, soit 10 μ L du lysat cellulaire à tester pour les cellules transfectées ou soit 10 μ L du lysat cellulaire à tester pour les cellules non-transfectées. Le contenu de chaque tube, mélangé par pipetage, est incubé à 37°C pendant 45 min.

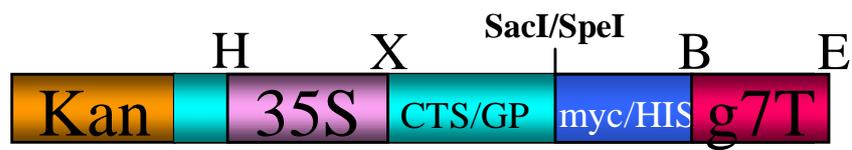


Figure 81 : Représentation schématique du vecteur p21GT

A la fin de la réaction, 500 μ L de tampon phosphate 0,1 M pH 7,5 sont ajoutés pour stopper l'activité enzymatique. Les échantillons sont finalement incubés à TA pendant 30 min avant lecture de la DO à 450 nm en utilisant le témoin négatif comme blanc.

ii. *Dosage XG α (1,2)-FucT*

Le dosage de l'activité XG α (1,2)-FucT a été réalisé à partir du surnageant du lysat des cellules transfectées et non transfectées (témoin). Pour chaque condition expérimentale, le mélange réactionnel est composé de 120 μ g de XGs non-fucosylés de tamarin ou de 500 μ g d'oligosaccharides de ce même substrat, 30 nmoles de GDP-Fucose, 20 mM de tampon MOPS (pH 6,8), 5mM de $MgCl_2$, 5 mM de DTT, 10 ou 50 μ g de protéines issues du lysat cellulaire. Des incubations de 1h et 12 h à 30°C sont réalisées avant de procéder à la congélation dans l'azote liquide et la lyophilisation des échantillons. Dans le cas des essais sur le polymère de XGs, les échantillons sont repris dans 100 μ L d'acétate de sodium (50 mM, pH 5,5) auxquels sont ajoutés 0,5 U d'une solution commerciale de cellulase de *Trichoderma viride* (Duchefa, France, réf : 9012-54-8). Après 24 h d'incubation à 37°C de ces derniers, ils sont congelés puis à nouveau lyophilisés. L'analyse des oligosaccharides fucosylés ou non est réalisée par spectrométrie de masse afin de déterminer la fonctionnalité de l'enzyme.

iii. *Dosage des protéines solubles d'après Bradford (1976)*

Une gamme étalon correspondant à des quantités de protéines allant de 0 à 10 μ g est réalisée en tube à partir d'albumine sérique bovine (BSA) à 100 μ g/mL et de 200 μ L de réactif de Bradford (Sigma, France, réf : B6916). Un ajout d'eau distillée à chaque tube permet d'atteindre un volume final de 1 mL par point de la gamme. Pour les échantillons à doser, 1 et 10 μ L de surnageant sont prélevés puis additionnés de 200 μ L de réactif de Bradford et de 799 μ L et 790 μ L d'eau distillée respectivement. Après une incubation de 15 min à TA et à l'obscurité, la lecture des DO se fait au spectrophotomètre à 595 nm.

2. Expression d'*AtFUT1* et des *PtaFUT* chez le tabac

a) Construction des vecteurs d'expression

Afin de déterminer l'activité des PtaFUT, leur séquence codante a été clonée dans un vecteur d'expression spécifique des plantes dicotylédones (p21GT, Tab. 5 et Fig. 81).

Chacune des séquences, additionnées de site de restriction à leurs extrémités, a été obtenue par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (Annexe 6). Les différents clonages sont réalisés suivant la méthode décrite en III.7.b. Les enzymes de restriction utilisées pour chaque insert sont :

- *XbaI* et *SpeI* pour *PtaFUT 1* et *4*
- *XbaI* et *XhoI* pour *PtaFUT 5* et *6*
- *XbaI* et *SacI* pour *PtaFUT 7* et *AtFUT1*

b) Transformation d'*A. tumefaciens* par électroporation

i. Principe

Cette technique permet la génération d'impulsions électriques courtes et contrôlées entraînant la perméabilisation de la paroi bactérienne. Ainsi, les différentes constructions plasmidiques réalisées précédemment ont pu être internalisées dans *A. tumefaciens* pour réaliser l'agro-infiltration du tabac.

ii. Méthode

Pour réaliser cette expérimentation, 100 µg d'ADN plasmidique en solution dans l'eau sont placés sur glace dans un tube stérile pour un volume maximum de 5 µL. Un volume de 20 µL de bactéries électrocompétentes décongelées ($10 \cdot 10^8$ cellules ; Annexe 5) y est ensuite ajouté. Après une incubation de 5 min, la suspension bactérienne est transférée dans une cuvette d'électroporation (« 1 mm electrode gap sterile », Eppendorf, France, réf : 4307000.569) préalablement refroidie à -20°C pendant 20 min. Cette dernière est positionnée dans l'électroporateur (Electroporator 2510, Eppendorf, France, réf : 4307000.658) puis l'impulsion électrique est générée (2,2 kV ; 5 ms). Un volume de 1 mL de milieu LB (Annexe 3) y est immédiatement ajouté pour resuspendre les bactéries.

La solution bactérienne ainsi constituée est placée dans un nouveau tube stérile puis agitée à 30°C pendant 3 h à 250 rpm. L'étalement de 20 µL de pré-culture sur milieu LB solide (Annexe 3) supplémenté avec de la Rifampicine (50 µg/mL), de la Gentamycine (20 µg/mL) et l'antibiotique de sélection approprié au vecteur, constitue la dernière étape avant le criblage par PCR des colonies positives. L'incubation des bactéries en boîte de Pétri se fait à 28°C durant 24 à 48 h.



Figure 82 : Présentation des principales étapes de la technique d'agro-infiltration du tabac. A : Blessure de l'épiderme inférieur de la feuille en un point à l'aide d'une aiguille. B : Injection de la suspension bactérienne à l'endroit de la blessure (sans aiguille). C : Diffusion de la suspension bactérienne au sein des mésophylles.

c) Transformation du tabac

La transformation du tabac est réalisée d'après la technique développée par Batoko *et al.* (2000) et reprise par Strasser *et al.* (2007) et Léonard *et al.* (2008).

A partir d'une colonie d'*A. tumefaciens* issue de chaque transformation, il est réalisé une culture dans 5 mL de milieu LB liquide (Annexe 3) supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine et 25 µg de gentamycine pendant 20-24h à 28°C sous agitation. Un volume de 300 µL de la culture est prélevé, centrifugé (5000g, 10 min, TA) puis deux lavages des bactéries sont effectués à l'aide du tampon d'infiltration (MES 50 mM, pH 5,6, 2 mM de phosphate de sodium, 0,5% de D-glucose (w/v) et 100 mM d'acétosyringone). Les bactéries sont finalement mises en suspension dans le même tampon afin d'obtenir une DO à 600 nm de 0,3.

Pour réaliser l'agro-infiltration, une blessure est provoquée au niveau de l'épiderme inférieur d'une feuille de tabac âgé de 6 semaines. Finalement, la solution bactérienne est injectée à l'aide d'une seringue jusqu'à ce qu'elle ne diffuse plus dans les mésophylles (Fig. 82).

d) Extraction des protéines produites

Après 48 h, les feuilles de tabac agro-infiltrées ou non (témoin) sont broyées dans l'azote liquide. La poudre obtenue est solubilisée dans 2 mL d'un tampon d'extraction froid (MOPS-KOH 0,1 M, saccharose 0,4 M, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM). Les broyats sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 5000g et 4°C puis placés sur glace.

e) Dosage des activités enzymatiques

Les dosages des protéines solubles sont réalisés suivant la même méthode que celle présentée en IV.1.d.iii. Il en est de même pour le dosage de l'activité α(1,2)-FucT (cf. IV.1.d.ii) excepté que celui-ci a été réalisé uniquement avec le polymère de XGs.

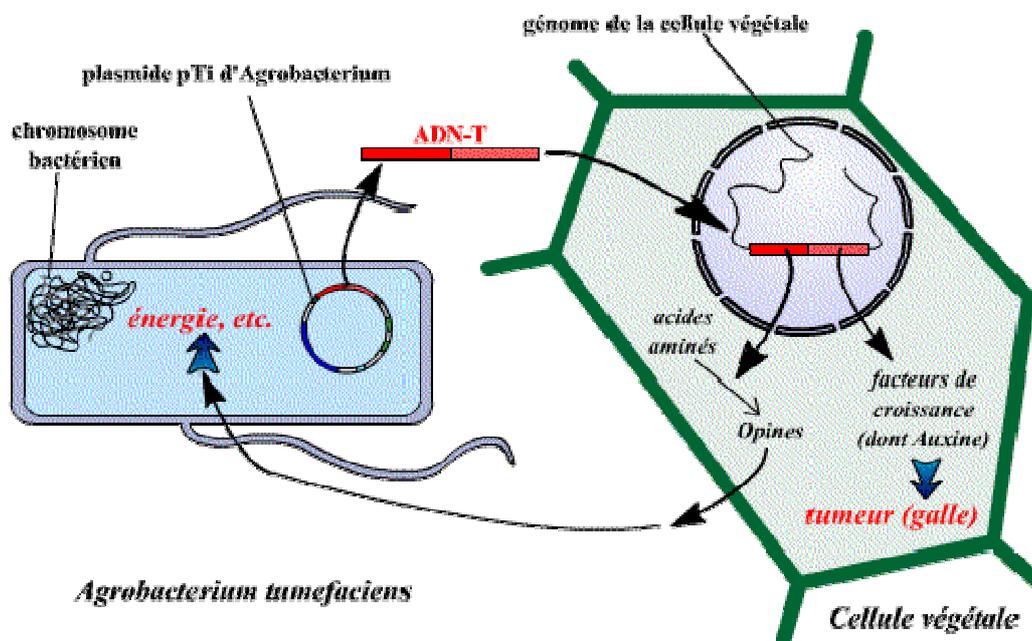


Figure 83 : Principe d'infection d'une cellule végétale par *A. tumefaciens*
 (Source : <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transgenese/agrobacterium>).

V. Modifications génétiques du peuplier

1. Principe

Cette technologie consiste en l'introduction dans le peuplier d'ADN recombinant. Elle peut servir soit (i) à l'expression d'un gène exogène codant une molécule nouvelle pour l'organisme, soit (ii) à la surproduction d'une protéine déjà présente dans l'organisme par expression des produits d'un gène hétérologue au gène endogène, soit (iii) à la sous-production voire l'inhibition totale de la production d'une protéine déjà présente dans l'organisme par expression des produits d'un gène homologue au gène endogène. Ce dernier point peut être réalisé soit par la technique RNAi par le biais d'ARNdb, soit par la technique « antisens » *via* de l'ARN simple brin (sb).

Parmi les différentes techniques existantes pour réaliser la transgénèse, la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* a été effectuée au cours de cette étude. Dans la nature, cette bactérie du sol est à l'origine de la « gale du collet » ou « Crown gall » (tumeur au niveau du collet chez certaines plantes). Elle fut identifiée la première fois par Smith et Townsend en 1907. Son mode d'action est une infection d'une zone blessée de la plante puis l'insertion aléatoire à ce niveau d'un fragment de son ADN (sous forme simple brin) au matériel chromosomique végétal. Cette portion d'ADN insérée (appelé ADN-T) est issu d'un plasmide nommé « plasmide Ti » et porte des gènes de virulence (*vir*) codant des phytohormones cytokinines et auxines responsables de la multiplication incontrôlée des cellules végétales ainsi que des opines (acides aminés rares) utilisés par la bactérie (Fig. 83). Aussi, pour assurer la transition de l'ADN entre les deux organismes, des séquences répétées (LB et RB) sont présentes à ses extrémités. Ce mécanisme a ainsi été utilisé par les chercheurs pour développer une nouvelle technique de transfert de l'ADN recombinant avec cependant quelques modifications par rapport au phénomène naturel. En effet, pour les expérimentations en laboratoire, l'ADN-T du plasmide Ti est remplacé par les gènes d'intérêt et de sélection. De plus, la bactérie porte non pas un mais deux plasmides : (1) le plasmide Ti dépourvu de l'ADN-T et (2) le plasmide Ti sans les gènes *vir* mais avec la construction d'intérêt. Le premier plasmide permettra ainsi le transfert du matériel nucléaire du second plasmide.

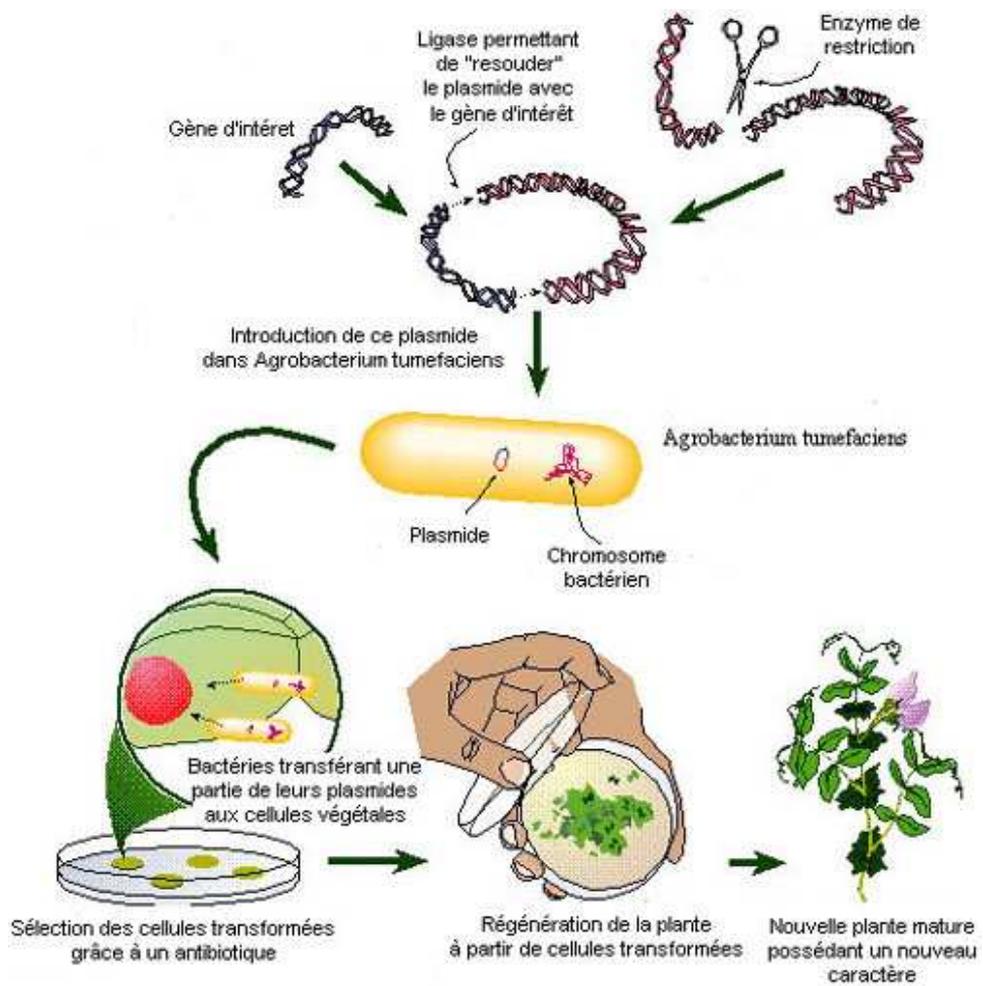


Figure 84 : Représentation schématique des principales étapes de transformation génétique d'une plante par *A. tumefaciens*. (Source : <http://www.chimie-sup.fr/OGM.htm>).

2. Méthode

Les différents milieux utilisés sont présentés en annexes 1 et 2. La manipulation se déroule sur plusieurs mois en conditions stériles mais les étapes à proprement parlé de transformation génétique du peuplier (Leplé *et al.*, 1992) ont lieu durant les 7 premiers jours.

La première étape consiste en la pré-culture du peuplier et des bactéries. Ainsi, des entre-nœuds (E-N) de peuplier d'environ 1 cm sont prélevés sur des vitro-plants âgés de 6 à 8 semaines (40 entre-nœuds/transformation) puis sont fendus longitudinalement sur la moitié de leur longueur et placés sur milieu M1 pour 68 h à l'obscurité. En parallèle, une souche bactérienne d'*A. tumefaciens* portant le gène d'intérêt est étalée en stries denses sur milieu LB (Annexe 3) contenant de la rifampicine (50 µg/mL), de la gentamycine (20 µg/mL) et de la kanamycine (50 µg/mL). Ce dernier antibiotique permet la sélection des bactéries possédant le vecteur d'intérêt avec la séquence d'ADN devant être intégrée au génome du peuplier (pMDC32, pORE-R3 ; Tab. 5). La culture bactérienne dure 68 h à 28°C. Un volume de 3 mL de MS30 (Annexes 1 et 2) est ensuite ajouté à la pré-culture des bactéries afin de les remettre en suspension par raclage à l'aide d'un râteau. Il est prélevé 2 mL de cette suspension bactérienne qui sont ajoutés dans un erlenmeyer contenant 75 mL de MS30 stérile additionnés d'acétosyringone (25 µM). Ce dernier est mis sous agitation douce (125 rpm) pendant 16 h à 24°C à l'obscurité. La suspension bactérienne est éliminée par aspiration puis les E-N sont récupérés et placés sur du papier absorbant stérile. Une fois séchés, les fragments de tige de peuplier sont posés sur milieu M1 (Annexes 1 et 2) en boîtes de Pétri pendant 48h à 24°C à l'obscurité. Ce laps de temps écoulé, les E-N sont transférés dans un nouvel erlenmeyer contenant 100 mL de MS30 additionné d'acide ascorbique (1,42 mM). Une agitation à 125 rpm pendant 5 minutes est réalisée et le milieu est éliminé par aspiration puis renouvelé (100 mL). Cette manipulation constitue le premier lavage et est répétée 4 fois. Après le dernier lavage, les fragments de tige sont séchés sur papier absorbant stérile et finalement disposés sur boîtes de Pétri (à raison de 15 explants/boîte) contenant le milieu M2 (Annexes 1 et 2) supplémenté par de la Céfotaxime (250 µg/mL), de la Carbenicilline (500 µg/mL) et l'antibiotique de sélection approprié à la construction génique (Hyg : 30 µg/mL ou Kan : 25 µg/mL ; cf. Tab. 5). La culture des E-N est de 2 à 3 semaines à l'obscurité en chambre de culture à 24°C. Suite à cette étape, la culture à l'obscurité laisse place à la culture des E-N à la lumière sur le même milieu mais supplémenté par une concentration doublée en l'antibiotique de sélection des plantes transformées (Hyg : 60 µg/mL ou Kan : 50 µg/mL).

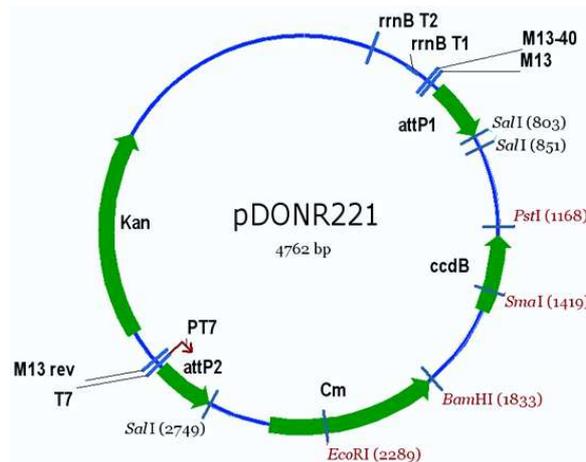
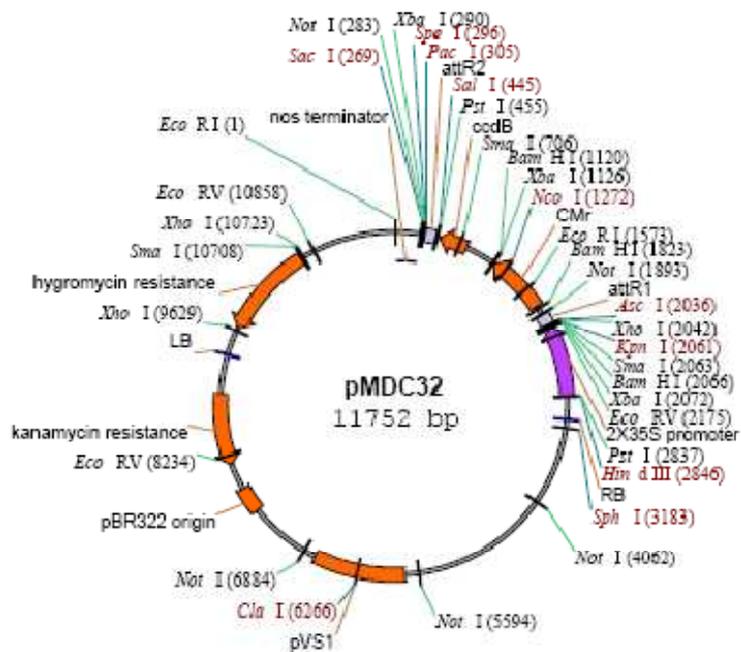


Figure 85 : Carte du vecteur pDONR221. (Source : <http://cnrgv.toulouse.inra.fr>).

A



B

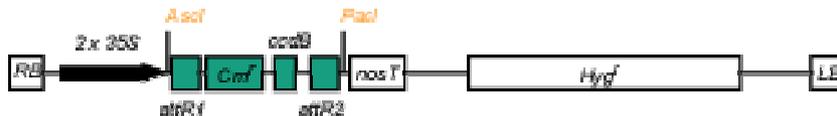


Figure 86 : A : Carte du vecteur pMDC32. B : Représentation schématique de la cassette du vecteur. (Source : <http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvectorf>).

Le renouvellement du milieu de culture est effectué toutes les 2 semaines jusqu'à l'apparition de cals verts d'environ 2 mm de diamètre. A ce stade, la régénération se met en place par l'excision des cals verts au fur et à mesure de leur apparition et par la disposition de ces derniers en boîtes de Pétri contenant le milieu M3 (Annexes 1 et 2) et les mêmes antibiotiques que précédemment. Ce milieu, renouvelé tous les 15 jours, est composé entre autre de thidiazuron (TDZ) permettant aux cals de bourgeonner. La concentration en TDZ est ensuite divisée par 10 lorsque les cals sont hérissés de bourgeons. Finalement, la régénération s'effectue par le repiquage des jeunes pousses sur milieu de multiplication (MS^{1/2}, annexes 1 et 2).

a) Surexpression d'*AtFUT1* chez le peuplier

Afin de réaliser le clonage d'*AtFUT1* dans un vecteur de transformation génétique du peuplier, la technologie « Gateway » a été utilisée. Celle-ci, réalisée à l'aide du kit « Gateway® Technologie with Clonase™ II suivant le protocole décrit par le fournisseur (Invitrogen, France, réf : 12535-029), permet d'insérer un fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur dit d'« entée » (pDONR221, Tab. 5 et Fig. 85). Par la suite, ce dernier sert lui-même à réinsérer ce fragment dans un vecteur dit de « destination » (pMDC32, Tab. 5 et Fig. 86). Le transfert, développé à partir des propriétés d'infection d'*E. Coli* par le bactériophage lambda, est réalisé par recombinaison site-spécifique (Landy, 1989). Ce type de clonage implique ainsi des amplicons de PCR portant les sites spécifiques de recombinaison LB et RB (Annexe 5 et 6).

Suite à l'insertion d'*AtFUT1* dans le vecteur pMDC32, la transformation d'*A. tumefasciens* est réalisée pour procéder à la transgénèse chez le peuplier (cf. V.2.a).

b) Sous-expression de *PtaFUT1* chez le peuplier par RNAi

i. Principe

Afin de réduire *in vivo* l'expression du gène *PtaFUT1*, la construction d'un vecteur RNAi a été réalisée. Pour générer ce type de vecteur, une partie de la séquence du gène doit y être insérée sous ses deux formes (sens : S ; antisens : AS), entrecoupées par une courte séquence d'ADN initialement présente au sein du vecteur. Par formation d'une boucle après transcription, celle-ci permet l'hybridation des deux brins d'ARN complémentaire S et AS (ARNdb). Ainsi, la présence dans une cellule de cet ARN conduit à la dégradation spécifique de l'ARN messager de séquence identique (Fig. 87).

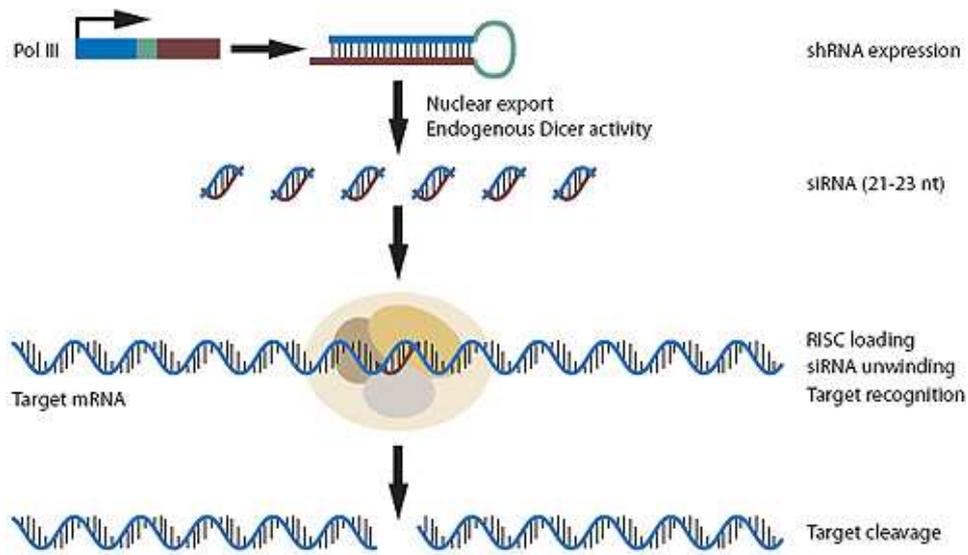
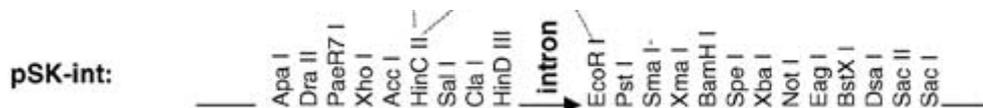


Figure 87 : Représentation schématique du principe de l'ARN interférent. (Source : *Invitrogen*).



B

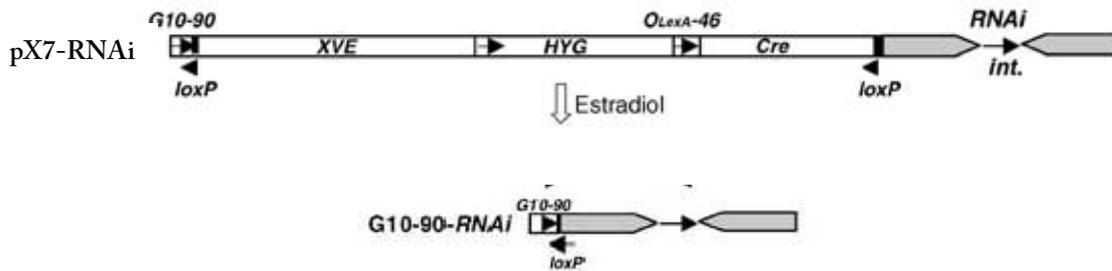


Figure 88 : Représentations schématiques du vecteur intermédiaire pSK-int contenant l'intron (A) et de la construction pX7-RNAi inducible par l'estradiol (B) (Source : *Guo et al., 2003*).

ii. Méthode

Génération des fragments S et AS *PtaFUT1* :

Les deux fragments d'ADN S et AS additionnés de sites de restriction sont obtenus par PCR (Annexe 7). Ces amplicons purifiés sont clonés dans le vecteur « pGEM®-T Easy » suivant la méthode décrite en III.6.b. Il s'ensuit leur extraction par digestions enzymatiques à l'aide d'enzymes de restriction (*XhoI* et *Sall* pour le fragment S, *EcoRI* et *SpeI* pour le fragment AS). Les produits sont finalement purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose pour éliminer le plasmide linéarisé.

Clonage des fragments S et AS dans le vecteur pSK-int (Tab. 5 et Fig. 88 A) :

Le clonage de chacun des fragments est réalisé de manière séquentielle. Avant chaque ligature, le vecteur pSK-int est ouvert par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction correspondantes à l'ADN à insérer, puis les extrémités générées sont déphosphorylées à l'aide d'une phosphatase alcaline suivant le protocole décrit par le fournisseur (FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas, France, réf : EF0651).

La ligature de chacune des séquences S et AS est effectuée à l'aide des mêmes réactifs et suivant le même protocole que celui décrit dans le kit « pGEM®-T Easy vector System II » (Promega, France). Seul le vecteur du kit est remplacé par le pSK-int. Le temps d'incubation est de 12 h à 4°C.

Clonage de la séquence complète S et AS dans le pX7-GFP (Tab. 5 et Fig. 88 B) :

La cassette RNAi réalisée précédemment est isolée du vecteur pSK-int par digestion enzymatique à l'aide des enzymes *XhoI* et *SpeI*. Cet ADN est inséré dans un vecteur d'expression pour transgénèse (pX7-GFP) inductible par le 17β-estradiol préalablement ouvert par ces mêmes enzymes. La ligature s'effectue comme pour le clonage dans le pSK-int. Le vecteur obtenu est utilisé pour la transformation génétique du peuplier *via A. tumefaciens*.

c) Localisation de l'expression des gènes *PtaFUT* chez le peuplier

i. Principe

L'étude des régions promotrices apportent des renseignements précis sur le profil d'expression des gènes. L'approche « gène rapporteur » permet ainsi de créer une construction au sein de laquelle le promoteur du gène d'intérêt est inséré en amont d'un gène dont

l'expression est repérable aisément. Pour réaliser cette technique, le gène codant la Green Fluorescent Protein (GFP) est utilisé. Son expression *in vivo* chez le peuplier induit une couleur verte sous microscope à fluorescence.

ii. Méthode

Les séquences de 1000 pb en amont des gènes *PtaFUT*, contenant potentiellement leur promoteur, ont été identifiées par bioinformatique puis obtenues par PCR. Chacune de ces séquences est clonée dans le « pGEM[®]-T Easy vector » suivant les recommandations du fournisseur. La digestion enzymatique de toutes ces séquences promotrices est ensuite réalisée sur plasmide avec les enzymes *NotI* et *SacII* (Promega). Les fragments libérés sont finalement clonés dans le vecteur pORE-R3 (Tab. 5) préalablement ouvert par ces mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé (cf. III.1.f du Matériels et Méthodes). Chaque clonage est réalisé à l'aide de la T4 DNA ligase du kit « pGEM[®]-T Easy vector System II » (Promega). Les constructions plasmidiques « séquences promotrices + GFP » sont utilisées pour la transgénèse du peuplier.

VI. Microscopie

1. Microscopie photonique

a) Préparation des échantillons

Les fragments de tiges de peuplier sélectionnées ont été placées dans de l'éthanol 70% pendant une semaine minimum. Les coupes semi-fines (entre 20 et 30 μm) ont été réalisées soit à l'aide d'un microtome à lame vibrante (VT 1100, Leica, France, <http://www.leica-microsystems.com>) pour les tiges de peuplier *in vitro* soit avec un microtome semi-automatique (RM 2125 RT, Leica, France) pour les tiges de peuplier de 2 ans.

a) Colorations

Les colorants sont des produits permettant de teindre une ou plusieurs structures de façon plus ou moins durable. Ils permettent ainsi de détecter au sein d'une coupe végétale, la présence de tel ou tel tissu ou polymère. Aussi, l'association de deux colorants ajoute une

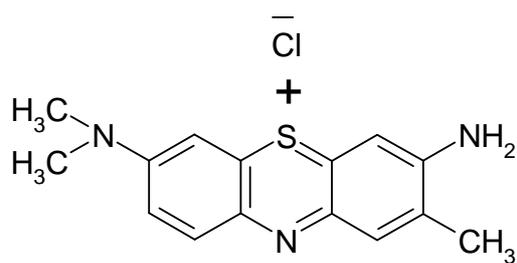


Figure 89 : Structure chimique du bleu de toluidine

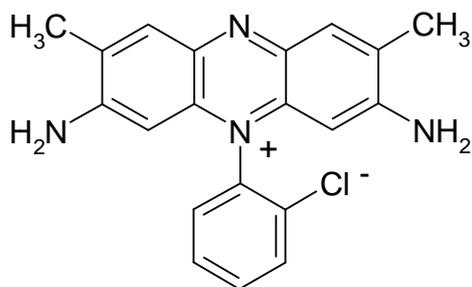


Figure 90 : Structure chimique de la safranine

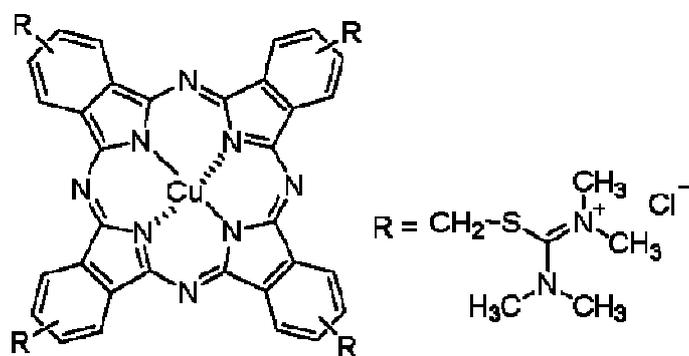


Figure 91 : Structure chimique du bleu alcian

distinction supplémentaire à la répartition des polymères au sein de la coupe végétale. Plusieurs techniques de coloration ont ainsi été utilisées pour l'identification et la distribution des lignines et de la cellulose.

i. Coloration au bleu de toluidine

Le bleu de toluidine (C.I. 52040, Fig : 89) ou chlorhydrate de triméthylthionine est un colorant sulfuré basique. Il génère une coloration métachromatique quelque soit le pH. Ce colorant a été utilisé pour visualiser les structures tissulaires des coupes semi-fines de tiges de peuplier enrésinées. Son utilisation sur ces coupes permet en effet de vérifier le bon positionnement de l'échantillon dans l'appareil de coupe ainsi que la localisation précise de la zone coupée.

La solution est préparée à 0,1% dans l'eau dont quelques gouttes sont versées sur les coupes placées sur lame. Après 30 sec, ces dernières sont lavées à l'eau ultra-pure et la lame séchée sur plaque chauffante. Ainsi, les tissus prennent différentes teintes de bleu au niveau des parois suivant leur composition et leur acidité. Une paroi lignifiée apparaît bleu foncée intense or une paroi riche en pectine (acide) est plus claire.

ii. Coloration au fasga

La coloration au fasga, mise en évidence par Tolivia et Tolivia en 1987, correspond à l'association de deux colorants :

- la safranine (C.I. 50240) qui colore en rouge le bois et le suber. Elle donne une coloration métachromatique (Fig. 90).
- le bleu alcian (C.I. 74240) qui est un colorant basique donnant une couleur bleue. Il se lie aux anions sulfates et carboxyliques des tissus grâce à des liaisons électrostatiques et permet la mise en évidence des glucides acides (Fig. 91).

Quelques gouttes de fasga dilué au ½ additionnées d'une goutte d'acide acétique sont déposées sur les coupes étalées sur lame. Pour assurer l'imprégnation des tissus par les colorants, les coupes doivent avoir été conservées dans une solution d'éthanol 70% au préalable. Les lames sont ensuite placées à l'obscurité toute la nuit en atmosphère humide puis sont lavées à l'eau distillée. Finalement, une lamelle est positionnée sur les coupes après avoir ajouté préalablement une goutte de PBS/glycérol (v/v).

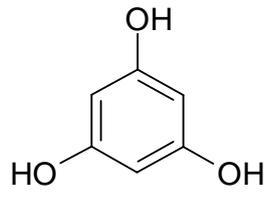


Figure 92 : Structure chimique de la phloroglucine

iii. Coloration au phloroglucine chlorhydrique

Cette coloration permet la mise évidence de la présence des lignines dans la paroi végétale. C'est une coloration fugace qui demande une observation rapide au microscope. Dans un premier temps, les coupes sont posées sur lame auxquelles quelques gouttes de phloroglucine 1% sont ajoutées (Fig. 92). Après 5 minutes à l'obscurité, quelques gouttes d'HCl à 18% sont ajoutées et une coloration rose est observée au niveau des zones lignifiées. Le montage s'effectue par ajout de PBS/glycerol entre lame et lamelle.

iv. Coloration de Maïlle

Cette méthode permet de colorer les lignines et de distinguer leur richesse en monolignols de type S (syringyl) ou de type G (guaiacyl). Les premières développent une couleur rouge et les secondes une couleur brune.

Après imprégnation des coupes et incubation de 10 min dans une solution de permanganate de potassium à 1%, cette dernière est éliminée et deux lavages à l'eau distillée sont effectués. Un ajout d'acide chlorhydrique à 18% pendant 2 min permet la décoloration des coupes. Finalement, les coupes sont traitées par de l'ammoniaque pur puis montées entre lame et lamelle en présence de PBS/glycérol (v/v). La conservation des coupes colorées est d'environ une journée.

2. Microscopie photonique à fluorescence

La technique d'immuno-détection (His *et al.*, 2001) a été utilisée pour localiser de manière spécifique et précise certains constituants pariétaux tels les XGs fucosylés et non fucosylés, les xylanes, les HGs, les RG-I, les extensines, les AGPs, et la cellulose. La réalisation de cette technique nécessite l'utilisation d'Ac primaires dirigés contre les molécules cibles présents au sein de l'échantillon végétal inclus. Après la reconnaissance de l'épitope par l'Ac, la révélation du complexe ainsi formé est assurée par un Ac secondaire (spécifique de l'Ac primaire) couplé à un fluorochrome ou à de l'or colloïdal.

a) Préparation des échantillons

Des fragments de tiges de peuplier *in vitro* d'environ 0,5 cm ont été fixés dans une solution permettant d'immobiliser les molécules *in situ* tout en préservant l'aspect structural

Tableau 7 : Caractéristiques des différents anticorps utilisés.

	Dénomination	Type de marquage/ Utilisation	Isotype	Type	Animal Source	Dilution	Fournisseur	Références
Anticorps primaires	LM1	Extensine, HRGP	IgM	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	PlantProbes	Smallwood et al., 1995
	LM5	(1,4)- β -D-galactane	IgG	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	PlantProbes	Jones et al., 1997
	LM6	(1,5)- α -L-arabinane	IgG	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	PlantProbes	Willats et al., 1998
	LM10	(1,4)- β -D-xylane	IgG2c	monoclonal	Rat	1/10 ^{ème}	PlantProbes	McCartney et al., 2005
	LM11	Xylane/arabinoxylane	IgM	monoclonal	Rat	1/10 ^{ème}	PlantProbes	McCartney et al., 2005
	LM15	Xyloglucane	IgG2c		Rat	1/5 ^{ème}	PlantProbes	Marcus et al., 2008
	JIM4	Arabinogalactan protéine (AGP)	IgM	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Knox et al., 1989
	JIM5	Homogalacturonane (partiellement méthyle-estérifié ou non estérifiés)	IgG2a	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Knox et al., 1990
	JIM7	Homogalacturonane (partiellement méthyle-estérifié)	IgA	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Knox et al., 1990
	JIM8	AGP		monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Pennell et al., 1991
	JIM13	Arabinogalactan/AGP	IgM	monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Knox et al., 1991
	JIM20	Extensine		monoclonal	Rat	1/5 ^{ème}	CarboSource	Smallwood et al., 1994
	CCRC-M1	α -L-xyloglucane fucosylé, rhamnogalacturonane	IgG1	monoclonal	Souris	1/5 ^{ème}	CarboSource	Puhlmann et al., 1994
CBM3a	Cellulose cristalline CBM		Protéine recombinante His-tagged		1/5 ^{ème}	PlantProbes	Blake et al., 2006	
Anticorps secondaires	Anti- polyHistidine	6X polyHistidine/ Ac intermédiaire	IgG2a	monoclonal	Souris	1/80 ^{ème}	Sigma	
	EM.GAM15	IgGFc de souris/ or colloïdal 15 nm			chèvre	1/20 ^{ème}	BBInternational	
	Anti-Mouse IgG-FITC	IgG de souris/ fluorescence			Mouton	1/20 ^{ème}	Sigma	
	EM.GAT10	IgG de rat/ or colloïdal 10 nm			Chèvre	1/20 ^{ème}	BBInternational	
	Anti-Rat IgG-FITC	IgG de rat/ fluorescence			Chèvre	1/20 ^{ème}	Sigma	

des tissus. Cette solution préparée extemporanément est composée de 50 mM de tampon phosphate pH 7.4, paraformaldéhyde 2% et glutaraldéhyde 0,56%.

La fixation à l'obscurité dure 45 min à TA. Six lavages de 10 min chacun sont ensuite effectués dans un tampon phosphate (phosphate de sodium 0,1 M ; saccharose 7,5%) pour éliminer le mélange fixateur. Le premier se faisant à TA puis les suivants sur glace.

b) Immuno-fluorescence

Après la fixation et les lavages des échantillons, la réalisation des coupes est effectuée à l'aide d'un cryostat (CM3050 S, Leica Microsystems, France). Des sections transversales de 25 μm sont ainsi obtenues puis récupérées dans le même tampon de lavage que précédemment. Cette étape permet d'éliminer le milieu d'enrobage servant à maintenir l'objet lors du fonctionnement de l'appareil. La saturation des sites de fixation aspécifique est ensuite réalisée dans la solution de blocage (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1%, BSA 2%) pendant 45 min. Trois rinçages dans le PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1% de 10 min sont ensuite suivis d'une incubation de 12 h en chambre humide avec l'Ac primaire (suivant la dilution décrite dans le tableau 7). Après quatre lavages dont un de 10 min par une solution PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,1% et trois de 10 min chacun par une solution PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,5%, les coupes sont incubées pendant 3 h avec l'Ac secondaire couplé à un fluorochrome. Suite à plusieurs autres lavages (PBS 1X pH 7,4, Tween 20 0,5% : 3 x 10 min ; eau ultra-pure : 2 x 10 min), les coupes marquées sont finalement observées au microscope à fluorescence (DM4000 B, Leica Microsystems, France) couplé à une caméra pour l'acquisition des images (DFC300FX, Leica Microsystems, France).

3. Microscopie électronique à balayage (MEB)

a) Préparation des échantillons

Des tiges de peuplier *in vitro* d'une longueur de 3 mm environ ont été utilisées pour les observations au microscope électronique à balayage. Ces dernières ont subi le même protocole de fixation que celles utilisées pour l'immuno-fluorescence (cf. VI.2.a) et ont été sectionnées transversalement sur une de leur extrémité à l'aide du même cryostat. Les fragments de tige ainsi obtenus ont été déshydratés par immersions successives dans des bains d'éthanol (30%, 50%, 70%, 90% pendant 10 min chacun puis 100%, 3 x 10 min). La déshydratation des échantillons est complétée par une dessiccation au point critique (Critical Point Dryer,

Balzers Union, Liechtenstein). Ces derniers sont immédiatement stockés dans un dessiccateur.

b) Observation

Les tiges de peuplier sont métallisées à l'or-palladium (17 nm d'épaisseur ; SCD 050, BAL-TEC, Liechtenstein) puis collées sur le porte-objet à l'aide d'un film carbone autocollant. L'observation est réalisée au MEB (Philips XL30).

4. Microscopie électronique à transmission (MET)

a) Préparation des échantillons

Des sections transversales de tiges d'1 mm d'épaisseur effectuées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir sont fixées et lavées dans les mêmes solutions que celles utilisées pour l'immuno-fluorescence et suivant les mêmes conditions (cf. VI.2.a). La déshydratation des échantillons par 6 bains successifs de 5 min dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (20%, 50%, 70%, 95% et 2 x 100%) constitue l'étape suivante. Aussitôt le dernier bain d'éthanol absolu réalisé, les échantillons sont imprégnés dans la résine LR White Medium (Pelco International, Canada, réf : 18181, <http://www.tedpella.com>) :

- 1^{er} et 2^{ème} bains : 33% LR White dans l'éthanol absolu pendant 2 x 30 min à 4°C.
- 3^{ème} et 4^{ème} bains : 66% LR White dans de l'éthanol absolu pendant 2 x 20 min à 4°C.
- 5^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} bains : 100% LR White pendant 2 x 1 h puis 1 nuit à 4°C.

Finalement, les coupes sont disposées à l'horizontal dans des gélules remplies de résine pure. Ces dernières sont rebouchées puis placées à 50°C pendant 24 h afin d'assurer la polymérisation. Les échantillons ainsi inclus ont été coupés à l'ultra-microtome (Om U3, Reichert, Autriche) pour obtenir des coupes semi-fines (quelques µm) et ultrafines (50-100 nm). Ces dernières sont récupérées sur grilles membranées en or (Pelco International, Canada, réf : 01810G-F) pour les expérimentations d'immuno-marquage.

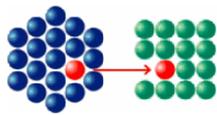
b) Immuno-marquage à l'or et observation

Le protocole employé pour ce marquage est le même que celui décrit pour l'immunofluorescence (cf. VI. 2. b) excepté que l'Ac secondaire n'est pas lié à un fluorochrome mais à une bille d'or. Cette dernière, opaque aux électrons, permet d'observer au

MET la localisation précise du complexe Ag-Ac sur coupes ultrafines. De plus, afin d'obtenir une meilleure résolution lors de l'observation des coupes, celles-ci sont contrastées au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle. L'analyse et l'acquisition des images ont été effectuées à l'aide d'un MET de 80 kV (JEM-100CX2, JEOL, France).

NOUVEAU CHAPITRE DE THESE

(ce chapitre écrit courant 2008 ne tient pas compte du travail réalisé durant l'année 2009)



Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr



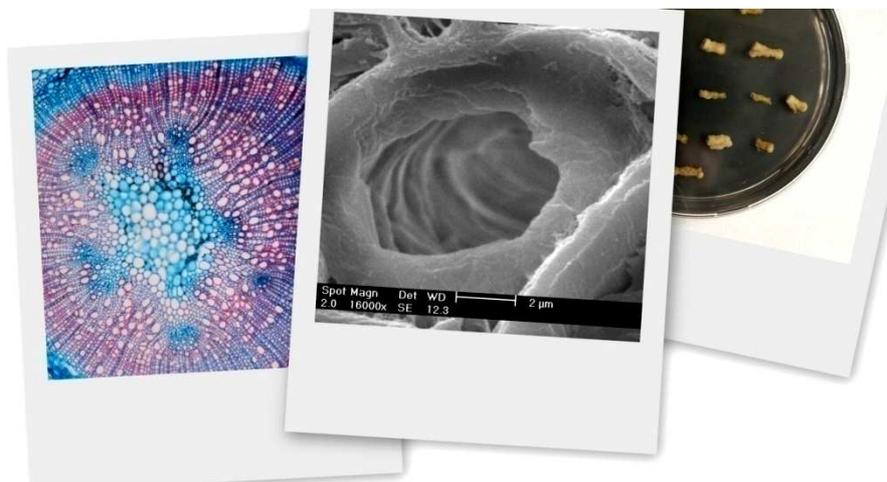
*Valorisation des compétences des docteurs
«un nouveau chapitre de la thèse®»*

Raphaël DECOU

*Ecole doctorale Sciences-Technologie-Santé
Université de Limoges-Faculté des Sciences et Techniques*

Mentor : Michelle DENIS-GAY

**Etude de la formation du bois de peuplier :
détermination du rôle de certains sucres de la paroi
végétale et application à un bois atypique.**



Date de présentation orale du « NCT » : 7 novembre 2008

Sujet académique de la thèse : Contribution à l'étude du rôle des xylanes et des xyloglucanes fucosylés au cours de la formation du bois. Application à la formation du bois de tension chez le peuplier (clone INRA 717-1-B4).

Directeurs de thèse : Guy COSTA et Sabine LHERNOULD

I. Cadre de la thèse

1. Contexte

Le Limousin, région au couvert forestier très important, développe et maintient une politique en faveur de la filière bois depuis les années 1960. Récemment, l'État et la Région ont conclu un contrat de progrès qui en définit les nouvelles orientations stratégiques pour 2007/2013. Celles-ci ont pour principal but le **développement durable de la filière bois** avec pour objectifs : la création d'emplois de qualité, le développement de la valeur ajoutée sur le territoire et la fédération des différents acteurs en un projet commun. Tous ces objectifs passent par différentes actions dont notamment le soutien de la Recherche/Développement et de l'innovation. La mise en place récente d'un pôle d'excellence « Forêt Bois » par le Conseil Régional Limousin et OSEO en est un parfait exemple.

Dans ce contexte, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges intègre très fortement cette politique régionale. Plus concrètement, plusieurs de ses axes de recherche se fondent sur la valorisation des sous-produits et coproduits du bois tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée. La mise au point de bioplastiques (biodégradables), la dépollution par les écorces des effluents industriels chargés en métaux lourds, la recherche de molécules végétales aux propriétés biologiques intéressantes en cosmétologie ainsi que des études fondamentales sur la formation du bois reflètent les compétences du laboratoire et leur synergie avec les objectifs régionaux.

De plus, au sein du LCSN (laboratoire pluridisciplinaire spécialisé dans la chimie des sucres) cohabitent recherches en chimie, biochimie et biologie. La complémentarité de ces disciplines est un atout pour le développement des recherches actuelles et pour l'innovation. Ainsi, plusieurs projets de créations d'entreprises accompagnés par l'Incubateur du Limousin A.I.L.E ont pu émerger de différents travaux de recherche dont un à ce jour a abouti à la création d'une entreprise.

Finalement, une des actions de soutien de la Région Limousin se matérialise par le financement de projets de thèses. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon doctorat.

2. Projet de thèse

Le projet de thèse que j'effectue au LCSN est axé sur une **recherche fondamentale focalisée sur l'étude de la paroi cellulaire végétale du bois**. Proposé par cette équipe, il a été élaboré à partir de recherches publiées dans la littérature et sur le niveau concurrentiel. En effet, beaucoup d'équipes nationales et internationales travaillent dans ce domaine ce qui oblige les équipes de taille modeste à bien cibler leur recherche pour ne pas se faire devancer par de grandes structures. Le choix du sujet de thèse a donc été orienté stratégiquement vers une faible concurrence, un domaine de recherche spécifique et bien évidemment suivant les compétences de l'équipe.

D'un point de vue scientifique, l'objectif est l'**étude du rôle des hémicelluloses** telles les xylanes et les xyloglucanes fucosylés (=sucres complexes) lors de la formation de la paroi secondaire des cellules du bois de peuplier avec un **intérêt plus particulier pour le bois de tension** (= bois atypique se formant en réponse à certaines contraintes environnementales telles le vent, une pente, etc). Plus précisément, ces sucres complexes subissent des modifications (biosynthèse ou remodelage) par des enzymes au sein de la paroi des cellules végétales. Mon but est donc de participer à la compréhension de ces mécanismes et leurs rôles dans la cohésion et l'arrangement des sucres au niveau de cette paroi. Ainsi, l'essentiel de mon travail repose sur :

- la recherche des gènes codant ces enzymes → analyse génétique par bioinformatique, isolement des gènes et clonages, séquençage, détermination du nombre de copies des gènes par Southern blot, ...

- l'analyse de l'activité et du niveau d'expression de ces gènes → expression des gènes dans des cellules animales et végétales, dosage des activités enzymatiques, RT PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), Northern blot.

- la modification génétique de peuplier (=transgénèse) → pour la surexpression ou sous-expression de ces gènes, pour l'analyse de leur promoteurs (=séquences régulatrices des gènes).

- la microscopie (électronique à balayage et à transmission) et l'immunolocalisation (détection de molécules cibles à l'aide d'anticorps) afin de visualiser la répartition des sucres d'intérêt au sein des cellules du bois de peuplier transgénétique et non-transgénétique.

Finalement, mise à part la compréhension de certains mécanismes fondamentaux du développement et de la maturation du bois, cette recherche permettra l'**acquisition de nouvelles enzymes de modifications des sucres**. Grâce à ces dernières, il pourra potentiellement être réalisé l'**élaboration de nouveaux bioplastiques** à partir des hémicelluloses

issues de sous-produits du bois (sciures). En effet, cette valorisation a été démontrée au LCSN tout en développant une chimie propre, s'affranchissant de l'utilisation de solvants toxiques.

II. Gestion de projet

1. Conduite de projet

A la suite de mes stages de Maîtrise et DEA orientés sur des sujets de physiologie et pathologie végétales à Nantes, j'ai débuté ma thèse en octobre 2005 sur une **nouvelle thématique de recherche**. L'équipe dans laquelle j'effectue mon doctorat s'est nouvellement constituée au sein du LCSN de Limoges en février 2004 avec l'arrivée du Dr Guy COSTA et du Dr Sabine LHERNOULD, directeur et co-directrice de ma thèse.

Dès mon arrivée, il s'est ainsi avéré nécessaire, avec la participation de mes encadrants, **de mettre en place l'activité « biologie moléculaire végétale »** au sein d'un laboratoire pluridisciplinaire orienté essentiellement chimie/biochimie des sucres. Pour ce faire, il m'a fallu cerner la problématique et les priorités de mon sujet de thèse afin de structurer les stratégies que nous voulions développer pour mener à bien ce projet. Une fois ce travail réalisé j'ai pu orienter, avec mes supérieurs, les choix des produits et matériels indispensables pour l'accomplissement de mes expérimentations tout en tenant compte : d'une part des équipements déjà présents au sein du laboratoire et d'autre part du coût de l'acquisition de ceux-ci. Finalement, les stratégies définies ont permis aussi la mise en évidence des besoins matériels occasionnels et des techniques manquantes pour notre activité. La nécessité d'utiliser des prestations de services s'est ainsi avérée obligatoire. Ce fut le cas par exemple pour le séquençage de mes séquences d'ADN car l'équipement pour cette expérimentation est très coûteux et très peu rentable pour un usage occasionnel. Aussi, la réalisation de mon projet de thèse nécessitait la mise en place de nouvelles techniques jamais réalisées au laboratoire comme par exemple la transgénèse sur le peuplier. Grâce aux réseaux développés par mes supérieurs, il a pu être établi et poursuivi des collaborations avec l'INRA d'Orléans, le laboratoire de physiologie moléculaire du transport des sucres chez les végétaux (PHYMOTS) - FRE 3091 de Poitiers, le « Department für Chemie der Universität für Bodenkultur » en Autriche (Vienne) et le laboratoire de génétique moléculaire animale (UMR 1061 INRA) de Limoges. Toutes ces collaborations m'ont été très utiles pour faire avancer mon projet, que ce

soit par échanges de conseils, prêts de matériel et acquisition de nouvelles techniques.

La gestion d'un projet de thèse passe aussi par les concertations entre les différents membres du laboratoire. C'est pourquoi, tout au long de mon doctorat, j'ai participé aux différentes réunions hebdomadaires. Deux types de réunion étaient ainsi réalisées : les réunions uniquement entre biologistes durant lesquelles je présentais les derniers résultats de la semaine et où les réorientations s'effectuaient si nécessaires ; les réunions pluridisciplinaires avec les chimistes, biochimistes et biologistes où chaque semaine à tour de rôle, deux étudiants présentaient leur travail des derniers mois. Ces réunions permettaient ainsi à chacun d'exposer ses résultats devant un public de différentes spécialités scientifiques et de mettre en relations ces multiples compétences pour des échanges parfois enrichissants, avec plus de recul scientifique.

Aussi, lors de tout projet de thèse en sciences, il est demandé au doctorant de réaliser son doctorat en un temps donné. En effet, j'ai bénéficié d'une bourse de la Région Limousin pour 3 ans maximum, le financement se terminant même si la thèse n'est pas encore finalisée. Il est donc nécessaire au doctorant ainsi qu'à l'équipe entière de déterminer les meilleures stratégies apportant des résultats dans ce laps de temps. Cependant, suivant les moyens financiers, matériels et humains et aussi suivant le projet de thèse, l'objectif de finir le projet en 3 ans s'avère parfois difficile. Ce fut le cas pour mon projet de thèse où j'ai été confronté au problème de gestion du temps. En effet, la vétusté ou le manque d'équipement, l'absence de techniciens, l'encadrement de stagiaires, la mise au point de nouvelles techniques ont été parfois des facteurs limitant à l'avancement de ma thèse. Ainsi, ne pouvant pas finir ma thèse dans les temps impartis, j'ai fait une demande de poste d'Attaché d'Enseignement et de Recherche pour l'année 2008-2009 afin de terminer mon projet tout en conservant un revenu et découvrir l'activité d'enseignement.

2. Coût du projet

Dépenses	2005/2008
Moyens humains :	
Doctorant	52215 €
Encadrement	54000 €
Déplacements/Congrès	5000 €
Expérimentations :	
Prestations	1000 €
Equipements	30000 €
Réactifs	27000 €
Fonctionnement	8700 €
Formations école doctorales	4300 €
Inscriptions en thèse	1300 €
TOTAL	183515 €

Ressources	2005/2008
Etat	125200 €
Conseil Régional	52215 €
Ecole Doctorale	4450 €
Société Française de Biologie Végétale	150 €
Fonds propres	1500 €
TOTAL	183515 €

III. Compétences acquises

1. Développement et mise au point de protocoles, collaborations techniques

Etant le seul doctorant en biologie au sein d'une nouvelle équipe du LCSN, j'ai dû remettre en route certaines techniques standards et mettre en place de nouvelles expérimentations. Dans certains cas, après l'évaluation et l'acquisition des réactifs et matériels nécessaires, j'ai pu réaliser mes protocoles expérimentaux et les optimiser. Cependant, certaines manipulations pourtant courantes m'ont créé des problèmes quant à leur efficacité. En effet, j'ai été confronté à certaines difficultés dont une en particulier qui consistait au clonage de gènes. Pendant un an environ, cette technique n'a pas fonctionné. Après beaucoup d'essais et l'élimination au fur et à mesure des causes de ce problème, je n'arrivais toujours pas à déterminer l'origine de ce dernier. J'ai ainsi fait appel à un enseignant-chercheur du Laboratoire de Biotechnologie de Limoges pour qu'il réalise en parallèle de mon travail une partie de mon protocole avec le matériel de son laboratoire. L'essai infructueux dans mon laboratoire et l'essai réussi de son côté m'ont permis de mettre en évidence l'étape critique du protocole expérimental. Il s'est avéré que l'origine du problème résidait dans un appareil défectueux (=plaque UV utilisée pour la détection de l'ADN) qui dégradait l'ADN et rendait impossible toute manipulation de clonage ultérieure. J'ai ainsi perdu beaucoup de temps sur ce point essentiel de mon travail car en amont de beaucoup de mes expérimentations.

2. Stratégies, risques et collaborations scientifiques

Comme cité précédemment, j'ai mis au point les techniques expérimentales avec parfois certaines difficultés. L'analyse de mes résultats (positifs ou négatifs) ainsi que l'analyse des données de la littérature m'ont amené à modifier les stratégies de mon projet de thèse. En effet, certains protocoles expérimentaux ont été abandonnés ou modifiés afin :

- de laisser place à des techniques plus efficaces et robustes,
- de ne pas se faire devancer par d'autres laboratoires dans le contexte concurrentiel actuel,
- de confirmer les hypothèses de recherche par tous les moyens à notre disposition.

C'est dans ce contexte que mes supérieurs et moi-même avons choisi par exemple de collaborer avec une chargée de recherche CNRS du laboratoire de Physiologie moléculaire du transport des sucres chez les végétaux (PHYMOTS) - FRE 3091 de Poitiers, spécialiste en microscopie. En effet, au regard de récents résultats d'une publication d'une équipe suédoise, il

est apparu en première approche que mes résultats obtenus au laboratoire étaient en contradiction avec ceux de cette équipe. C'est pourquoi, afin de vérifier mes résultats et potentiellement les confirmer, nous avons voulu nous rapprocher d'une personne spécialiste dans ce domaine de recherche. Cette collaboration très intéressante à travers un travail en commun et l'élaboration d'un certain nombre de techniques a ainsi conforté nos hypothèses et mes résultats. J'ai également acquis des techniques que je ne possédais pas. Toutefois, les résultats obtenus dans le cadre de cette collaboration ne remettent pas spécialement en cause ceux de l'équipe concurrente mais apportent des informations supplémentaires et de nouvelles pistes pour mon projet de thèse.

3. Encadrements

Dans le cadre de mon projet de thèse, j'ai réalisé l'encadrement technique de stagiaires de BTS, Licence Professionnelle, Master 2 Recherche et Professionnel. Cette expérience m'a ainsi permis de me confronter à la gestion de personnels et de déléguer une partie de mon travail. J'ai ainsi essayé par mes conseils et mes connaissances de leur apporter une partie des outils nécessaires à la réalisation de leur stage. Pour cela, j'ai dû former les stagiaires aux techniques et équipements utilisés dans le laboratoire et assurer le suivi de leurs expérimentations. Aussi, j'ai évalué leur autonomie au travail et déterminé le moment où ils étaient capables de réaliser seuls les expérimentations.

De plus, à l'occasion d'un de mes encadrements, j'ai pu réactualiser et perfectionner mes acquis en anglais avec l'arrivée au sein du laboratoire d'une étudiante polonaise en Master 2 Recherche. Cette dernière ne parlant pas français, j'ai réussi à retrouver mes connaissances de la langue anglaise, bien que lointaine pour moi et malgré mon manque d'assurance au début.

Toutes ces expériences d'encadrements ont été enrichissantes et utiles même si la formation des stagiaires demande une présence souvent continue.

4. Gestion du matériel, des réactifs, de la sécurité et des organismes vivants

Pour la réalisation de mon travail, j'utilise beaucoup de produits, réactifs et consommables qu'il faut réapprovisionner régulièrement. Notre équipe travaillant sans l'aide de techniciens, j'avais en charge la gestion des stocks. Cette tâche parfois « chronophage » m'a

obligé à tenir constant les stocks pour assurer la continuité de mon travail. Cependant, cette gestion m'est apparue difficile à certains moments lors par exemple de l'arrivée de nouveaux stagiaires. Il m'a fallu ainsi les sensibiliser dès le début sur ce point afin qu'ils me tiennent au courant du niveau d'utilisation des produits pour aviser une nouvelle commande. De plus, les produits utilisés en biologie étant souvent excessivement chers, je devais faire la demande de devis auprès de différents fournisseurs afin de faire jouer la concurrence. Il m'était aussi nécessaire d'assurer certaines rencontres avec les commerciaux afin de prendre connaissance des derniers outils (équipements, réactifs, kits biologiques) présents sur le marché, de négocier les futures commandes à venir et de veiller au maintien en état de marche des équipements du laboratoire.

De plus, au sein du laboratoire, j'ai contribué à la mise en place de la gestion des déchets chimiques et biologiques afin de respecter les règles de sécurité au laboratoire. Le passage d'étudiants dans le laboratoire ainsi que pour toutes autres personnes travaillant dans ces locaux nécessitaient l'élaboration d'un minimum de règles à respecter. Par exemple, l'emploi du bromure d'éthidium (=produit cancérigène) très courant dans mes analyses demande une vigilance accrue afin d'éviter tout contact avec la peau et toute inhalation de vapeurs de ce produit. C'est pourquoi, après recherche des équipements de protection nécessaires, j'ai pu instaurer des règles de sécurité (port de gants spécifiques, gestion des déchets, ...) pour toute manipulation du bromure d'éthidium par les différents utilisateurs du laboratoire.

Finalement, lors de mon projet de thèse, j'ai utilisé différents organismes biologiques tels les plants de peuplier *in vitro*, les cellules animales, etc. J'ai ainsi assuré l'entretien de ceux-ci, avec parfois l'aide des stagiaires ou de mes collègues afin de maintenir vivantes toutes ces cultures.

5. Valorisation des résultats

L'un des objectifs du doctorat est l'obtention de résultats permettant de faire évoluer les connaissances dans tel ou tel domaine de recherche. Après cette acquisition de résultats, le jeune chercheur doit faire part à la communauté scientifique de ses découvertes (dans la mesure du possible) par le biais de communication écrites (posters, articles) ou orales (communications orales lors de congrès, interviews). La réalisation de ces différents types de communication implique des choix tant au niveau de la pertinence des résultats qu'au niveau

de la formalisation pédagogique. En effet, l'objectif est de faire passer un message clair et concis tout en ayant la prudence de ne pas dévoiler des résultats qui peuvent faire l'objet de publications ultérieures. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai réalisé des posters pour différents congrès afin de mettre en avant mes travaux et ceux du laboratoire et faire découvrir nos compétences scientifiques. J'ai ainsi participé à 5 congrès dont un international en Suède (Orléans, Le Croisic, Limoges, Umeå, Tours). Ceci par exemple m'a valu le prix du meilleur poster lors de la journée de l'IFR GEIST (Institut Fédératif de Recherche Génomique-Environnement-Santé-Technologies) à Limoges.

IV. Conclusion

1. Bilan du projet de thèse

La réalisation de mon projet de thèse s'est avérée et s'avère toujours délicate quant aux objectifs fixés en début de doctorat. En effet, je n'ai pour l'instant pas obtenu tous les résultats escomptés ce qui m'oblige à prolonger la durée de ma thèse. Néanmoins, j'espère vivement que mes résultats actuels et à venir me permettront de présenter un travail de thèse complet qui contribuera à l'avancée scientifique dans ce domaine de recherche. Aussi, j'espère que les techniques que j'ai pu développer au laboratoire ainsi que le matériel biologique que je n'ai pu exploiter serviront à d'autres doctorants ou stagiaires et faciliteront leur travail. Pour conclure, la réalisation de mon projet de thèse m'a permis l'apprentissage de nouvelles techniques qui je souhaite me seront utiles pour l'élaboration de mes projets futurs.

2. Projet professionnel

Les motivations et les perspectives sur la thèse et l'« après thèse » sont régulièrement demandées avant et pendant le doctorat. Pour ma part, j'ai toujours eu pour objectif de réaliser mon projet de thèse dans le but de créer par la suite une entreprise en relation avec la biologie ou les biotechnologies. En effet, cette perspective est pour moi très importante car elle me permettrait de travailler dans un domaine qui me plaît tout en créant et développant mon propre travail. De plus, les aspects administratifs, commerciaux et de gestion me plaisent beaucoup ce qui je pense est essentiel dans le développement d'un tel projet.

Ainsi, tout au long de mon doctorat j'ai pu déterminer de plus en plus précisément mes priorités professionnelles que ce soit au travers la réalisation de mon projet de thèse ou des différentes formations que j'ai suivi en complément de celui-ci. En effet, dans le cadre des formations optionnelles de l'Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé de Limoges, j'ai toujours orienté mes choix vers des formations axées « entreprise » telles : marketing, gestion de projet, entrepreneuriat... et campus entrepreneur. Cette dernière formation est en fait un concours où les différentes équipes doivent imaginer un projet de création d'entreprise et en tester la faisabilité. La réalisation de ce projet se déroule sur 7-8 mois et est complétée de plusieurs formations comme Plan d'affaire, Etude de rentabilité, Protection industrielle et intellectuelle, etc. Toutes ces expériences ont ainsi conforté mon désir de création d'entreprise et j'ai pu me rendre compte que l'aspect uniquement recherche au sein d'un laboratoire ne correspond pas à mes attentes professionnelles. C'est pourquoi, je souhaite réaliser un travail qui aborde des domaines de compétences très différents et variés ne m'obligeant pas à rester dans un seul et même endroit avec les mêmes activités.

Cependant, je sais qu'il est difficile de créer son entreprise et que cela implique une forte motivation et de solides connaissances entrepreneuriales pour assurer la pérennité du projet. C'est pour ces raisons que je ne me focalise pas sur une création d'entreprise sitôt mon doctorat achevé. Je préfère me laisser du temps pour faire murir mon projet et acquérir l'assurance nécessaire pour me lancer sur cette voie. Ainsi, j'ai envisagé de travailler dans le secteur privé après mon doctorat pour mieux appréhender le fonctionnement d'une entreprise et pouvoir effectuer de la recherche appliquée. Toutefois, le choix de la société où je postulerais sera tout de même orienté biotechnologie et je porterai une attention plus particulière pour les petites sociétés. Aussi, la fonction de commercial en équipement ou réactifs pour laboratoire n'est pas à exclure car j'ai toujours apprécié ce métier.

Je pense à ce jour que j'ai, durant mon projet de thèse, développé des compétences autres que scientifiques qui me seront utiles pour un projet de création d'entreprise. La réalisation de mon projet de thèse m'a ainsi permis de conforter mes ambitions et surtout de déterminer ce pour quoi je ne suis pas fait. En revanche, malgré mon envie et ma projection de créer une entreprise, je suis conscient que les expériences acquises et celles à venir peuvent modifier ou faire évoluer cet objectif. C'est pourquoi je souhaite me laisser le plus d'ouvertures professionnelles possibles.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau 8 : Composition des solutions mères utilisées pour la culture du peuplier.

<u>Vitamines B (100X)</u>		<u>Oligo-éléments (1000X)</u>	
acide nicotinique	812,28 µM	H ₃ BO ₃	100 mM
pyridoxine hydrochloride	486,38 µM	MnSO ₄ , H ₂ O	100 mM
thiamine hydrochloride	296,47 µM	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	36,86 mM
pantothénate de calcium	209,85 µM	KI	5 mM
L-cystéine chlorhydrate	569,38 µM	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1 mM
Biotine	4,09 µM	CuSO ₄ , 5H ₂ O	1 mM
		CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,1 mM
<u>Macro-éléments (10X)</u>		<u>Fer (100X)</u>	
NH ₄ NO ₃	206,15 mM	Ethylenediaminetetraacetic acid iron(III) sodium salt	10,90 mM
KNO ₃	187,93 mM		
CaCl ₂ , 2H ₂ O	29,93 mM		
MgSO ₄ , 7H ₂ O	15,01 mM		
KH ₂ PO ₄	12,49 mM		
<u>Myo-inositol (100X)</u>		<u>L-Glutamine (100X)</u>	
Myo-inositol	55,50 mM	L-Glutamine	136,85 mM
<u>MES (100X)</u>		<u>ANA (1000X)</u>	
2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid	128,07 mM	a-Naphtalene Acetic Acid	10 mM
<u>2-iP (1000X)</u>		<u>TDZ (1000X)</u>	
6-(γ,γ-Dimethylallylamino)purine	5 mM	Thidiazuron	100 µM

La composition des milieux à partir des solutions mères ci-dessus est présentée dans le tableau 9 en annexe 2.

Annexe 2

Tableau 9 : Composition des milieux de culture du peuplier utilisés à la fois pour la micropopagation (MS_{1/2}) et la transgénèse (M1, M2, M3, MS30).

		Types de milieux					
		MS1/2	M1	M2	M3	MS30	
Solutions mères à ajouter au milieu	Avant autoclavage	Macroéléments (10X)	50 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
		Oligoéléments (1000X)	1 mL				
		NaFe-EDTA (100X)	10 mL				
		Myo-inositol (100X)	10 mL				
		M.E.S (100X)		10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
		Vitamines (100X)	10 mL				
		L-Glutamine (100X)	10 mL				
		Saccharose	20 g	30 g	30 g	30 g	30 g
		Agar	7 g	7 g	7 g	7 g	7 g
		H ₂ O qsp	1000 mL				
	pH		5,9	5,8	5,8	5,8	5,9
	Après autoclavage	2ip (1000X)		1 mL	1 mL		
		ANA (1000X)		1 mL	1 mL		
		TDZ (1000X)				1 mL	
		Céfotaxime (250 mg/mL)			1 mL	1 mL	
		Carbénicilline (500 mg/mL)			1 mL	1 mL	
Antibiotique de sélection du végétal (1000X)					1 mL		

Annexe 3

Préparation du milieu LB

Ce milieu est préparé en dissolvant dans 950 mL d'eau distillée :

- 10 g de Bacto™ peptone (BD Biosciences, France, réf : 211677, <http://www.bd.com>)
- 5 g de Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences, France, réf : 212750)
- 171,12 mM de NaCl

Le pH est ajusté à 7,0 puis le volume à 1 L. La solution est autoclavée pendant 20 min à 120°C. Dans le cas d'un milieu LB solide pour boîtes de Pétri, de l'agar (« Micro agar », Duchefa, France, réf : M1002.1000, <http://www.duchefa.com>) est ajouté au milieu juste avant l'autoclavage à raison de 8 g/L. L'incorporation d'antibiotiques au milieu de culture solide est réalisée après autoclavage lorsque le milieu est à 50-60°C.

Le cas particulier de la zéocine, antibiotique dépendant du pH et de la concentration en sel, nécessite un milieu LB « ½ Salt » dont la concentration en NaCl est divisée par deux soit 85,56 mM.

Milieu de conservation des bactéries

Les souches bactériennes, pour être conservées et stockées, sont placées dans des cryotubes en présence de glycérol. Celui-ci est un cryoprotecteur permettant d'éviter la formation de cristaux de glace susceptible d'altérer les cellules. La « solution stock » est constituée de 15% de glycérol pour 85% de culture bactérienne liquide de 12 h. Chaque clone peut ainsi être stocké à -80°C pendant plusieurs mois.

Annexe 4

Milieu de culture des cellules COS-7

Le milieu utilisé est le Dulbecco's modified Eagle's medium (Smith *et al.*, 1960) nommé DMEM-/- (Eurobio, France, réf: CM1DME68-01). Pour constituer le milieu DMEM+/, il est supplémenté par :

- 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (Eurobio, France, réf: CSTAAN00-0U)
- 1 mM de Pyruvate de Sodium (Eurobio, France, réf: CSTVAT00-0U)
- 100 UI/mL de Penicilline et 100 µg/mL de Streptomycine (Eurobio, France, réf: CABPES01-0U)
- 15% de Serum de Veau Fœtal décomplémenté (Eurobio, France, réf: CVFSVF00-01)

Annexe 5

Préparation de bactéries électrocompétentes

Dans un erlenmeyer, 500 mL de milieu LB sont inoculés par un aliquot de culture d'*Agrobacterium tumefaciens* en phase exponentielle puis mis sous agitation à 250 rpm durant une nuit à +30°C. Après 12 h, les bactéries sont centrifugées (3000g, 10 min, 4°C) et le surnageant est éliminé. Le culot est repris en deux fois par 20 puis 480 mL d'eau à 4°C stérile glycérolée à 10%. Les bactéries sont centrifugées (3000g, 10 min, 4°C). Les mêmes étapes de lavage sont réitérées. Les cellules, débarrassées du surnageant, sont mises en suspension dans 2 mL d'eau froide (4°C) stérile glycérolée à 10% puis centrifugées (3000g, 5 min, 4°C). Une dernière re-suspension est effectuée dans 0,2 mL d'une solution à 4°C stérile de sorbitol 1 M. La concentration bactérienne finale doit être approximativement de $5 \cdot 10^{10}$ cellules/mL. La solution bactérienne est aliquotée par tube de 40 µL et stockée à -80°C.

Annexe 6

Tableau 10: Séquences des amorces utilisées pour la PCR (Fw : forward ; Rv : Reverse)

Nom des amorces	Séquences
<i>Amorces des gènes AtFUT et PtaFUT :</i>	
AtFUT1fn	5'-ATGGATCAGAATTCGTACAGGAGAAGATCG-3'
AtFUT1fr	5'-CATACTAGCTTAAGTCCCCAGCTGATATCC-3'
PtaFUT1lfn	5'-ATGGATCTGAAATCTTCCACAAGGAGG-3'
PtaFUT1fr	5'-TCAACCACCTTCAGACCCCAGCTGATA-3'
PtaFUT2Fw	5'-ATGTATCAGAACCCATCATTTCG-3'
PtaFUT2Rv	5'-CTATAGCTGCAACTCCTGATG-3'
PtaFUT3Fw	5'-ATGTCTGACATGGTTTCAAATG-3'
PtaFUT3Rv	5'-AACGAGCTTTAATCCCCATTCC-3'
PtaFUT4Fw	5'-ATGGATATTTTTCAAATGGAAAG-3'
PtaFUT4Rv	5'-CTAAAGTTGCTTAGCATTAAACAGC-3'
PtaFUT5Fw	5'-ATGCTCAGTTCATTGTCGTGG-3'
PtaFUT5Rv	5'-CTACAATCGTTTATGATCATTA AAAAAGC-3'
PtaFUT6Fw	5'-ATGGCTTACAGAAGCTCAACTTTTG-3'
PtaFUT6Rv	5'-TTAATCATTAAACAAGCTTTATTCCC-3'
PtaFUT7Fw	5'-ATGGAAATTTTTGAAGTAGCGAAGG-3'
PtaFUT7Rv	5'-TCAAACCAGCTTTAATCCGTTCTTTTCG-3'
 <i>Amorces d'AtFUT1 et PtaFUT1 pour le clonage dans le vecteur pour cellules COS-7 (pcDNA3.1/V5) :</i>	
AtFUT13.1V5Fw	5'-CACCATGGATCAGAATTCGTACAGGAGAAG-3'
AtFUT13.1V5Rv	5'-AAATACTAGCTTAAGTCCCCAGCTGATATC-3'
PtaFUT13.1V5Fw	5'-CACCATGGATCTGAAATCTTCCACAAGGAGG-3'
PtaFUT13.1V5Rv	5'-AAAAACCACCTTCAGACCCCAGCTGAT-3'
 <i>Amorces d'AtFUT1 pour le vecteur de transgénèse du peuplier (pMDC32 ; surexpression) :</i>	
AttB1AtFUT1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGATCAGAATTCGTACAGG-3'
AttB2AtFUT1	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATACTAGCTTAAGTCCCC-3'
 <i>Amorces pour les promoteurs 1000pb des PtaFUT pour le pGEM-Teasy vector :</i>	
PromPtaFUT1Fw	5'-GTTTTTCAGCTAAGTTGGG-3'
PromPtaFUT1Rv	5'-TCAATTC AATTC AATTCTGC-3'
PromPtaFUT2Fw	5'-TATGGACAACCATATCAGG-3'
PromPtaFUT2Rv	5'-AATCAATATCATGAAAGACAC-3'
PromPtaFUT3Fw	5'-TTGGCTAACAATTCAAGG-3'
PromPtaFUT3Rv	5'-CTTAGAAGTTGTGAATTTTTTCATGCC-3'
PromPtaFUT4Fw	5'-ATCGGGAACACTTTACTGC-3'
PromPtaFUT4Rv	5'-GATTTCTATACAAAGTAATCTC-3'
PromPtaFUT5Fw	5'-TCAGGACAATATTGCAGG-3'
PromPtaFUT5Rv	5'-GCAAAAACCTTAAAGGAAGAC-3'
PromPtaFUT6Fw	5'-TGTC AAACGACTACAATCG-3'
PromPtaFUT6Rv	5'-GGAGAGCATGTATAGCAG-3'
PromPtaFUT7Fw	5'-CATCACCCGTTAATGACG-3'
PromPtaFUT7Rv	5'-GATTTCTGTCTGAGCTTC-3'

Suite page suivante

Amorces de *PtaFUT1* pour le vecteur RNAi (psK-int):

SensPtaFUT1Xho1Fw	5'-CCGCTCGAGCGGACGTTACCCAGATC-3'
SensPtaFUT1Sal1Rv	5'-CCGCGGCCGCTATGGCCAAGACGTCGACGCCAAGAAGCCCTCCAA-3'
AntiSensPtaFUT1EcoR1Fw	5'-CGGAATTCGCAAGAAGCCCTCCAA-3'
AntiSensPtaFUT1Spe1Rv	5'-GGACTAGTCCACGTTACCCAGATCTTT-3'

Amorces des sondes *PtaFUT* pour le Southern blot

PtaFUT1SouthRv :	5'TACAGTCAGTCAAACCTATTTTGTTC-3'
SouthPtaFUT4Fw	5'-CCTTGGTTGATTCTGAAGTC-3'
SouthPtaFUT4Rv	5'-CCAATCTTCTGATCTGCACTGG-3'
18S Fw	5'-GGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3'
18S Rv	5'-TCAGTGTAGCGCGCTGCGGC-3'

Amorces des vecteurs (pGEM-Teasy, pcDNA3.1/V5, pORE-R3, p21GT, pMDC32) :

T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13Fw	5'-GTA AACGACGGCCAG-3'
M13Rv	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pGEMT/M13Fw	5'-GTCGTGACTGGGAAAACCTGGCG-3'
pGEMT/M13Rv	5'-GTCATAGCTGTTTCTGTGTGA-3'
p21GTFw	5'-ACTATCCTTCGCAAGACC-3'
p21GTRv	5'-GATATAGCTAGCTGTTCG-3'
pMDC32Fw	5'-TTTGGAGAGGACCTCGAC-3'
pMDC32Rv	5'-GATAATCATCGCAAGACCG-3'
pORE-R3Rv	5'-AGAATTGGGACAACCTCCAG-3'

Amorces d'*AtFUT1* et des *PtaFUT* pour le vecteur

pORE-R3 (région promotrice + GFP) :

AtFUT1Xba1Fw	5'-GCTCTAGAGCATGGATCAGAATTCGTA-3'
AtFUT1Spe1Rv	5'-GGACTAGTCCCTCATACTAGCTTAAGTC-3'
AtFUT1Sac1Rv	5'-TGCGAGCTCGGCTACTAGCTTAAGTCC-3'
PtaFUT1Xba1fw	5'-GCTCTAGAGCATGGATCTGAAATCTTC-3'
PtaFUT1Spe1rv	5'-GGACTAGTCCCTATAAGTCATCGTGATC-3'
PtaFUT1Spe1Rv	5'-CGGACTAGTCCGTAAGTCATCGTGATCATC-3'
PtaFUT4Spe1Rv	5'-CGGACTAGTCCGAAGTTGCTTAGCATTAAA-3'
PtaFUT4Xba1Fw	5'-GCTCTAGAGCATGGATATTTTCAAATG-3'
PtaFUT5Xba1Fw	5'-GCTCTAGAGCATGCTCAGTTCATTGTTCG-3'
PtaFUT6Xba1Fw	5'-GCTCTAGAGCATGGCTTACAGAAGCTCA-3'
PtaFUT7Xba1Fw	5'-GCTCTAGAGCATGGAAATTTTGAAGTA-3'
PtaFUT5Xho1Rv	5'-CCGCTCGAGCGCAATCGTTTATGATC-3'
PtaFUT6Xho1Rv	5'-CCGCTCGAGCGGATCATTAAACAAGCTT-3'
PtaFUT7Sac1Rv	5'-TGCGAGCTCGGCAACCGTCTTTAATCCGT-3'
Not1PtaFUT13Fw	5'-ATCGATGCGGCCGATGCAATTAACCC-3'
Xba1PtaFUT13Rv	5'-ATCGATTCTAGACTAAGCTCTAGCATTCTCC-3'

Annexe 7

Une réaction de PCR est généralement réalisée dans 25 ou 50 μL de mélange réactionnel dont sa composition est la suivante :

- eau ultra-pure stérile
- tampon spécifique à l'enzyme
- matrice ADN (ADNc, ADNg, ADN plasmidique)
- chacune des deux amorces spécifiques de la séquence à amplifier
- dNTPs
- ADN polymérase

Ces PCR sont effectuées en microtubes 0,2 mL dans un thermocycleur [« *GeneAmp System 9600* » (Perkin Elmer Applied Biosystems, France) ou « *Mastercycler gradient* » (Eppendorf, France)] suivant des programmes d'amplification spécifiques du type d'expérimentation réalisée. Néanmoins, la technique de PCR se décline en plusieurs phases :

- dénaturation initiale de l'ADN
- **dénaturation de l'ADN en simples brins**
- **hybridation des amorces**
- **polymérisation à partir des amorces des brins inverses complémentaires des brins matrice (élongation)**
- élongation finale pour achever les synthèses incomplètes

Répétition n fois du cycle permettant l'augmentation exponentielle du nombre de copies du fragment d'ADN

Au cours des réactions de PCR, la température d'hybridation a été calculée d'après le T_m des amorces, moins 5°C (cf. Annexe 6).

Pour la température d'élongation, la température correspondait à celle recommandé par le fournisseur.

Le mélange réactionnel est ensuite conservé à 4°C en vue d'autres applications.

BIBLIOGRAPHIE

- ABE, H. & NAKAI, T. (1999). Effect of the water status within a tree on tracheid morphogenesis in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Trees - Structure and Function* 14, 124-129.
- ABOUGHE ANGONE, S., BARDOR, M., NGUEMA-ONA, E., RIHOUEY, C., ISHII, T., LEROUGE, P. & DRIOUICH, A. (2009). Structural characterization of cell wall polysaccharides from two plant species endemic to Central Africa, *Fleurya aestuans* and *Phragmenthera capitata*. *Carbohydr Polym* 75, 104-109.
- ALMÉRAS, T., THIBAUT, A. & GRIL, J. (2005). Effect of circumferential heterogeneity of wood maturation strain, modulus of elasticity and radial growth on the regulation of stem orientation in trees. *Trees - Structure and Function* 19, 457-467.
- ALMÉRAS, T., YOSHIDA, M. & OKUYAMA, T. (2006). The generation of longitudinal maturation stress in wood is not dependent on diurnal changes in diameter of trunk. *Journal of Wood Science* 52, 452-455.
- ALONI, R. (1991). Wood formation in deciduous hardwood trees. In *Physiology of Trees* (ed. A. S. Raghavendra), pp. 175-197. John Wiley, New York.
- ANDERSSON-GUNNERÅS, S., HELLGREN, J.M., BJORKLUND, S., REGAN, S., MORITZ, T. & SUNDBERG, B. (2003). Asymmetric expression of a poplar ACC oxidase controls ethylene production during gravitational induction of tension wood. *Plant J* 34, 339-349.
- ANDERSSON-GUNNERÅS, S., MELLEROWICZ, E.J., LOVE, J., SEGERMAN, B., OHMIYA, Y., COUTINHO, P.M., NILSSON, P., HENRISSAT, B., MORITZ, T. & SUNDBERG, B. (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* 45, 144-165.
- ANDERSSON, S.I., SAMUELSON, O., ISHIHARA, M. & SHIMIZU, K. (1983). Structure of the reducing end-groups in spruce xylan. *Carbohydr Res* 111, 283-288.
- ANISIMOVA, M. & GASCUEL, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55, 539-552.
- ARAKI, N., FUJITA, M., SAIKI, H. & HARADA, H. (1983). Transition of fiber wall structure from normal wood to tension wood in certain species having gelatinous fibers of S1+G and S1+S2+S3+G types. *Journal of the Japan Wood Research Society* 29, 491-499.
- ARCHER, R. (1986). *Growth Stresses and Strains in Trees*. Springer Verlag, New York.
- AREND, M. (2008). Immunolocalization of (1,4)- β -galactan in tension wood fibers of poplar. *Tree Physiol* 28, 1263-1267.
- ARGANBRIGHT, D.G., BENSEND, D.W. & MANWILLER, F.G. (1970). Influence of gelatinous fibers on the shrinkage of silver maple. *Wood Sci* 3, 83-89.
- ASPEBORG, H., SCHRADER, J., COUTINHO, P.M., STAM, M., KALLAS, A., DJERBI, S., NILSSON, P., DENMAN, S., AMINI, B., STERKY, F., MASTER, E., SANDBERG, G., MELLEROWICZ, E., SUNDBERG, B., HENRISSAT, B. & TEERI, T.T. (2005). Carbohydrate-Active Enzymes involved in the secondary cell wall biogenesis in hybrid aspen. *Plant Physiol* 137, 983-997.
- ASPINALL, G.O. (1980). Chemistry of cell wall polysaccharides. In *The Biochemistry of Plants*, vol. 3 (ed. E. J. Preiss), pp. 473-500. Academic Press, New York.

- AUGUR, C., BENHAMOU, N., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. (1993). Purification, characterization, and cell wall localization of an α -fucosidase that inactivates a xyloglucan oligosaccharin. *Plant J* 3, 415-426.
- AUGUR, C., STIEFEL, V., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P. & PUIGDOMENECH, P. (1995). Molecular cloning and pattern of expression of an α -L-fucosidase gene from pea seedlings. *J Biol Chem* 270, 24839-24843.
- AWANO, T., TAKABE, K. & FUJITA, M. (2002). Xylan deposition on secondary wall of *Fagus crenata* fiber. *Protoplasma* 219, 106-115.
- BAILLERES, H., CASTAN, M., MONTIES, B., POLLET, B. & LAPIERRE, C. (1997). Lignin structure in *Buxus sempervirens* reaction wood. *Phytochemistry* 44, 35-39.
- BAILLÈRES, H., CHANSON, B., FOURNIER, M., TOLLIER, M.T. & MONTIES, B. (1995). Wood structure, chemical composition and growth strains in *Eucalyptus* clones. *Ann. For. Sci.* 52, 157-172.
- BALUSKA, F., SAMAJ, J., WOJTASZEK, P., VOLKMANN, D. & MENZEL, D. (2003). Cytoskeleton-plasma membrane-cell wall continuum in plants. Emerging links revisited. *Plant Physiol* 133, 482-491.
- BAMBER, R.K. (1979). The origin of growth stresses. *Forpride Digest* 8, 75-79.
- BAMBER, R.K. (2001). A general theory for the origin of growth stresses in reaction wood: how trees stay upright. *LAWA J* 22, 205-212.
- BAREFOOT, A. (1963). Selected wood characteristics of young yellow-poplar. Part II: shrinkage of normal and abnormal wood. *Forest Products Journal* 13, 443-448.
- BATOKO, H., ZHENG, H.Q., HAWES, C. & MOORE, I. (2000). A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* 12, 2201-2217.
- BAYDOUN, E.A., WALDRON, K.W. & BRETT, C.T. (1989). The interaction of xylosyltransferase and glucuronyltransferase involved in glucuronoxylan synthesis in pea (*Pisum sativum*) epicotyls. *Biochem J* 257, 853-858.
- BAYDOUN, E.A.H. & BRETT, C.T. (1997). Distribution of xylosyltransferases and glucuronyltransferase within the Golgi apparatus in etiolated pea (*Pisum sativum* L.) epicotyls. *J Exp Bot* 48, 1209-1214.
- BJORKLUND, S., ANTTI, H., UDDESTRAND, I., MORITZ, T. & SUNDBERG, B. (2007). Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* 52, 499-511.
- BLAKE, A.W., MCCARTNEY, L., FLINT, J.E., BOLAM, D.N., BORASTON, A.B., GILBERT, H.J. & KNOX, J.P. (2006). Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J Biol Chem* 281, 29321-29329.
- BLANCAFLOR, E.B. & MASSON, P.H. (2003). Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiol* 133, 1677-1690.

- BLANCHETTE, R.A., OBST, J.R. & TIMELL, T.E. (1994). Biodegradation of compression wood and tension wood by white and brown rot fungi. *Holzforschung* 48, 34-42.
- BLEE, K.A., WHEATLEY, E.R., BONHAM, V.A., MITCHELL, G.P., ROBERTSON, D., SLABAS, A.R., BURRELL, M.M., WOJTASZEK, P. & BOLWELL, G.P. (2001). Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* 212, 404-415.
- BOSHART, M., WEBER, F. & JAHN, G. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521-530.
- BOUQUIN, T., MATTSSON, O., NAESTED, H., FOSTER, R. & MUNDY, J. (2003). The Arabidopsis *lue1* mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J Cell Sci* 116, 791-801.
- BOURQUIN, V., NISHIKUBO, N., ABE, H., BRUMER, H., DENMAN, S., EKLUND, M., CHRISTIERNIN, M., TEERI, T.T., SUNDBERG, B. & MELLEROWICZ, E.J. (2002). Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *Plant Cell* 14, 3073-3088.
- BOWLING, A.J. & VAUGHN, K. C. (2008). Structural and immunocytochemical characterization of the adhesive tendril of Virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia* [L.] Planch.). *Protoplasma* 232, 153-163.
- BOYD, J.D. (1972). Tree growth stresses - Part V: evidence of an origin in differentiation and lignification. *Wood Sci. Technol.* 6, 251-262.
- BOYD, J.D. (1977). Interpretation of X-ray diffractograms of wood for assessments of microfibril angles in fibre cell walls. *Wood Sci. Technol.* 11, 93-114.
- BOYD, J.D. (1985). The key factor in growth stress generation in trees lignification or crystallisation? *IAWA Bull* 6, 139-150.
- BRETON, C., ORIOL, R. & IMBERTY, A. (1998). Conserved structural features in eukaryotic and prokaryotic fucosyltransferases. *Glycobiology* 8, 87-94.
- BRETT, C. & WALDRON, K. (1996). Physiology and biochemistry of plant cell walls. *Topics in Plant Functional Biology. 2nd Ed*, 4-43.
- BRETT, C.T., HEALY, S.A., McDONALD, M.S., MACGREGOR, C. & BAYDOUN, E.A.H. (1997). Binding of nascent glucuronoxylan to the cell walls of pea seedlings. *Int J Biol Macromol* 21, 169-173.
- BROWN, C.L. (1964). The influence of external pressure on the differentiation of cells and tissues cultured in vitro. In *The formation of wood in forest trees* (ed. M. Zimmermann), pp. 389-404. Academic Press.
- BROWN, D.M., GOUBET, F., WONG, V.W., GOODACRE, R., STEPHENS, E., DUPREE, P. & TURNER, S.R. (2007). Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *Plant J* 52, 1154-1168.

- BROWN, D.M., ZEEF, L.A.H., ELLIS, J., GOODACRE, R. & TURNER, S.R. (2005). Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *Plant Cell* 17, 2281-2295.
- BRUMMELL, D.A., CAMIRANDE, A. & MACLACHLAN, G.A. (1990). Differential distribution of xyloglucan glycosyl transferases in pea Golgi dictyosomes and secretory vesicles. *J Cell Sci* 96, 705-710.
- BUCKERIDGE, M.S., CROMBIE, H.J., MENDES, C.J.M., REID, J.S.G., GIDLEY, M.J. & VIEIRA, C.C.J. (1997). A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. *Carbohydr Res* 303, 233-237.
- BUCKERIDGE, M.S., PESSOA DOS SANTOS, H. & TINE, M.A.S. (2000). Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiol Biochem* 38, 141-156.
- BUCKERIDGE, M.S., ROCHA, D.C., REID, J.S.G. & DIETRICH, S.C. (1992). Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiol Plant* 86, 145-151.
- BURGERT, I. & FRATZL, P. (2009). Plants control the properties and actuation of their organs through the orientation of cellulose fibrils in their cell walls. *Integr Comp Biol* 49, 69-79.
- BURK, D.H. & YE, Z.-H. (2002). Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. *Plant Cell* 14, 2145-2160.
- BURTON, R.A., FARROKHI, N., BACIC, A. & FINCHER, G. (2005). Plant cell wall polysaccharide biosynthesis: real progress in the identification of participating genes. *Planta* 221, 309-312.
- CAMIRAND, A., BRUMMELL, D. & MACLACHLAN, G. (1987). Fucosylation of xyloglucan: localization of the transferase in dictyosomes of pea stem cells. *Plant Physiol* 84, 753-756.
- CAMIRAND, A. & MACLACHLAN, G. (1986). Biosynthesis of the fucose-containing xyloglucan nonasaccharide by pea microsomal membranes. *Plant Physiol* 82, 379-383.
- CAMPBELL, J.A., DAVIES, G.J., BULONE, V. & HENRISSAT, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities [1]. *Biochem J* 326, 929-939.
- CAMPBELL, J.A., DAVIES, G.J., BULONE, V. & HENRISSAT, B. (1998). Correction: a classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities (Biochem J (1997) 326 (929-939)). *Biochem J* 329, 719.
- CARPITA, N.C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 445-476.
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* 3, 1-30.
- CASPERS, M.P., LOK, F., SINJORGIO, K.M., VAN ZEIJL, M.J., NIELSEN, K.A. & CAMERON-MILLS, V. (2001). Synthesis, processing and export of cytoplasmic endo- β -1,4-xylanase from barley aleurone during germination. *Plant J* 26, 191-204.
- CAVALIER, D.M. & KEEGSTRA, K. (2006). Two xyloglucan xylosyltransferases catalyze the addition of multiple xylosyl residues to cellohexaose. *J Biol Chem* 281, 34197-34207.

- CAVALIER, D.M., LEROUXEL, O., NEUMETZLER, L., YAMAUCHI, K., REINECKE, A., FRESHOUR, G., ZABOTINA, O.A., HAHN, M.G., BURGERT, I., PAULY, M., RAIKHEL, N.V. & KEEGSTRA, K. (2008). Disrupting two *Arabidopsis thaliana* xylosyltransferase genes results in plants deficient in xyloglucan, a major primary cell wall component. *Plant Cell* 20, 1519-1537.
- CHAFFEY, N. (2000). Microfibril orientation in wood cells: new angles on an old topic. *Trends Plant Sci* 5, 360-362.
- CHAFFEY, N., BARLOW, P. & SUNDBERG, B. (2002). Understanding the role of the cytoskeleton in wood formation in angiosperm trees: hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. tremuloides*) as the model species. *Tree Physiol* 22, 239-249.
- CHAMBAT, G., KARMOUS, M., COSTES, M., PICARD, M. & JOSELEAU, J.-P. (2005). Variation of xyloglucan substitution pattern affects the sorption on celluloses with different degrees of crystallinity. *Cellulose* 12, 117-125.
- CHANG, S.-S., CLAIR, B., RUELLE, J., BEAUCHENE, J., DI RENZO, F., QUIGNARD, F., ZHAO, G.-J., YAMAMOTO, H. & GRIL, J. (2009). Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees. *J. Exp. Bot.* 60, 3023-3030.
- CHANSON, B. (1989). Quelques aspects de la croissance secondaire des végétaux ligneux. In *Premier Séminaire ASMA (« Architecture, Structure et Mécanique de l'Arbre »)*, pp. 29-50, Université de Montpellier.
- CHAZALET, V., UEHARA, K., GEREMIA, R.A. & BRETON, C. (2001). Identification of essential amino acids in the *Azorhizobium caulinodans* fucosyltransferase NodZ. *J Bacteriol* 183, 7067-7075.
- CHEVENET, F., BRUN, C., BANULS, A.L., JACQ, B. & CHRISTEN, R. (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7, 439.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- CLAIR, B., ALMERAS, T. & SUGIYAMA, J. (2006a). Compression stress in opposite wood of angiosperms: observations in chestnut, mani and poplar. *Ann. For. Sci.* 63, 507-510.
- CLAIR, B., ALMÉRAS, T., YAMAMOTO, H., OKUYAMA, T. & SUGIYAMA, J. (2006b). Mechanical behavior of cellulose microfibrils in tension wood, in relation with maturation stress generation. *Biophys J* 91, 1128-1135.
- CLAIR, B., GRIL, J., DI RENZO, F., YAMAMOTO, H. & QUIGNARD, F. (2008). Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood. *Biomacromolecules* 9, 494-498.
- CLAIR, B., RUELLE, J., BEAUCHENE, J., PREVOST, M.F. & FOURNIER, F. (2006c). Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species. 1. Occurrence and efficiency of the G-layer. *LAWAJ* 27, 329-338.
- CLAIR, B., RUELLE, J. & THIBAUT, B. (2003). Relationship between growth stress, mechanical-physical properties and proportion of fibre with gelatinous layer in chestnut (*Castanea Sativa* Mill.). *Holzforschung* 57, 189-195.

- CLAIR, B. & THIBAUT, B. (2001). Shrinkage of the gelatinous layer of poplar and beech tension wood. *LAWAJ* 22, 121-131.
- CLAIR, B., THIBAUT, B. & SUGIYAMA, J. (2005). On the detachment of the gelatinous layer in tension wood fiber. *Journal of Wood Science* 51, 218-221.
- CLARKE, J.L. & WATKINS, W.M. (1997). Three different endogenous alpha-L-fucosyltransferases expressed in COS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 400-406.
- COCURON, J.C., LEROUXEL, O., DRAKAKAKI, G., ALONSO, A.P., LIEPMAN, A.H., KEEGSTR, K., RAIKHEL, N. & WILKERSON, C.G. (2007). A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a β -1,4 glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8550-8555.
- COSGROVE, D.J. (1997). Cellular mechanisms underlying growth asymmetry during stem gravitropism. *Planta* 203, 130-135.
- COUTAND, C., JAOUEN, G. & MOULIA, B. (2003). Kinematic analysis and modeling of the gravitropic response of artificially tilted poplars. In *4th Plant Biomechanics Conference* (ed. F. W. Telewski and F. W. Ewers), East Lansing (Mi), USA.
- COUTAND, C., JERONIMIDIS, G., CHANSON, B. & LOUP, C. (2004). Comparison of mechanical properties of tension and opposite wood in *Populus*. *Wood Sci. Technol.* 38, 11-24.
- COUTINHO, P.M., DELEURY, E., DAVIES, G.J. & HENRISSAT, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328, 307-317.
- CROMBIE, H.J., CHENGAPPA, S., HELLYER, A. & REID, J.S. (1998). A xyloglucan oligosaccharide-active, transglycosylating β -D-glucosidase from the cotyledons of nasturtium (*Tropaeolum majus* L) seedlings-purification, properties and characterization of a cDNA clone. *Plant J* 15, 27-38.
- CRONSHAW, J. & MOREY, P.R. (1968). The effect of plant growth substances on the development of tension wood in horizontally inclined stems of *Acer rubrum* seedlings. *Protoplasma* 65, 379-391.
- DADSWELL, H.E. & WARDROP, A.B. (1955). The structure and properties of tension wood. *Holzforschung* 9, 97-104.
- DANIEL, G., FILONOVA, L., KALLAS, Å.M. & TEERI, T.T. (2006). Morphological and chemical characterisation of the G-layer in tension wood fibres of *Populus tremula* and *Betula verrucosa*: labelling with cellulose-binding module CBM1_{HjCel7A} and fluorescence and FE-SEM microscopy. *Holzforschung* 60, 618-624.
- DAVIDSON, T.C., NEWMAN, R.H. & RYAN, M.J. (2004). Variations in the fibre repeat between samples of cellulose I from different sources. *Carbohydr Res* 339, 2889-2893.
- DE ALCÂNTARA, P.H.N., MARTIM, L., SILVA, C.O., DIETRICH, S.M.C. & BUCKERIDGE, M.S. (2006). Purification of a β -galactosidase from cotyledons of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae). Enzyme properties and biological function. *Plant Physiol Biochem* 44, 619-627.
- DE LA TORRE, F., SAMPEDRO, J., ZARRA, I. & REVILLA, G. (2002). *AtFXG1*, an Arabidopsis gene encoding α -L-fucosidase active against fucosylated xyloglucan oligosaccharides. *Plant Physiol* 128, 247-255.

- DE VRIES, J.A., ROMBOUTS, F.M., VORAGEN, A.G. J. & PILNIK, W. (1982). Enzymatic degradation of apple pectins. *Carbohydr Polym* 2, 25-33.
- DECOU, R., LHERNOULD, S., LAURANS, F., SULPICE, E., LEPLE, J.C., DEJARDIN, A., PILATE, G. & COSTA, G. (2009). Cloning and expression analysis of a wood-associated xylosidase gene (PtaBXL1) in poplar tension wood. *Phytochemistry* 70, 163-172.
- DEJARDIN, A., LEPLE, J.C., LESAGE-DESCAUSES, M.C., COSTA, G. & PILATE, G. (2004). Expressed sequence tags from poplar wood tissues - A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biol.* 6, 55-64.
- DEREEPER, A., GUIGNON, V., BLANC, G., AUDIC, S., BUFFET, S., CHEVENET, F., DUFAYARD, J. F., GUINDON, S., LEFORT, V., LESCOT, M., CLAVERIE, J.M. & GASCUEL, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36, 465-469.
- DONALDSON, L. (2007). Cellulose microfibril aggregates and their size variation with cell wall type. *Wood Sci. Technol.* 41, 443-460.
- DU, S., UNO, H. & YAMAMOTO, F. (2004). Roles of auxin and gibberellin in gravity-induced tension wood formation in *Aesculus turbinata* seedlings. *LAWAJ* 25, 337-347.
- DU, S. & YAMAMOTO, F. (2003). Ethylene evolution changes in the stems of *Metasequoia glyptostroboides* and *Aesculus turbinata* seedlings in relation to gravity-induced reaction wood formation. *Trees - Structure and Function* 17, 522-528.
- DU, S. & YAMAMOTO, F. (2007). An overview of the biology of reaction wood formation. *J Integr Plant Biol* 49, 131-143.
- DUNKLEY, T.P.J., HESTER, S., SHADFORTH, I.P., RUNIONS, J., WEIMAR, T., HANTON, S.L., GRIFFIN, J.L., BESSANT, C., BRANDIZZI, F., HAWES, C., WATSON, R.B., DUPREE, P. & LILLEY, K.S. (2006). Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci* 103, 6518-6523.
- EBRINGEROVÁ, A. & HEINZE, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol Rapid Commun* 21, 542-556.
- EBRINGEROVÁ, A., HROMÁDKOVÁ, Z. & HEINZE, T. (2005). Hemicellulose. *Adv Polym Sci* 186, 1-67.
- EDWARDS, M., BOWMAN, Y., DEA, I. & REID, J. (1988). A β -D-galactosidase from nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) cotyledons. Purification, properties, and demonstration that xyloglucan is the natural substrate. *J Biol Chem* 263, 4333-4337.
- EDWARDS, M.E., DICKSON, C.A., CHENGAPPA, S., SIDEBOTTOM, C., GIDLEY, M.J. & REID, J.S.G. (1999). Molecular characterisation of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant J* 19, 691-697.
- EGELUND, J., OBEL, N., ULVSKOV, P., GESHI, N., PAULY, M., BACIC, A. & PETERSEN, B. (2007). Molecular characterization of two *Arabidopsis thaliana* glycosyltransferase mutants, *rra1* and *rra2*, which have a reduced residual arabinose content in a polymer tightly associated with the cellulosic wall residue. *Plant Mol Biol* 64, 439-451.

- ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., LAFITTE, C., MAZAU, D., TOPPAN, A. & TOUZE, A. (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions: II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. *Plant Physiol* 64, 320-326.
- EVTUGUIN, D.V., TOMÁS, J., SILVA, A.S. & NETO, C.P. (2003). Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydr Res* 338, 597-604.
- FAIK, A., BAR-PELED, M., DEROCHE, A.E., ZENG, W., PERRIN, R. M., WILKERSON, C., RAIKHEL, N.V. & KEEGSTRA, K. (2000). Biochemical characterization and molecular cloning of an α -1,2-fucosyltransferase that catalyzes the last step of cell wall xyloglucan biosynthesis in pea. *J Biol Chem* 275, 15082-15090.
- FAIK, A., CHILESHE, C., STERLING, J. & MACLACHLAN, G. (1997). Xyloglucan galactosyl- and fucosyltransferase activities from pea epicotyl microsomes. *Plant Physiol* 114, 245-254.
- FAIK, A., PRICE, N.J., RAIKHEL, N.V. & KEEGSTRA, K. (2002). An Arabidopsis gene encoding an α -xylosyltransferase involved in xyloglucan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7797-7802.
- FANG, C.H., CLAIR, B., GRIL, J. & ALMÉRAS, T. (2007). Transverse shrinkage in G-fibers as a function of cell wall layering and growth strain. *Wood Sci. Technol.* 41, 659-671.
- FANG, C.H., CLAIR, B., GRIL, J. & LIU, S. Q. (2008a). Growth stresses are highly controlled by the amount of G-layer in poplar tension wood. *LAWA J* 29, 237-246.
- FANG, C.H., GUIBAL, D., CLAIR, B., GRIL, J., LIU, Y. M. & LIU, S. Q. (2008b). Relationships between growth stress and wood properties in poplar I-69 (*Populus deltoides* Bartr. cv. "Lux ex" I-69/55). *Ann. For. Sci.* 65, 1-16.
- FISHER, J.B. & MARLER, T.E. (2006). Eccentric growth but no compression wood in a horizontal stem of *Cycas micronesica* (Cycadales). *LAWA J* 27, 377-382.
- FISHER, J.B. & MUELLER, R.J. (1983). Reaction anatomy and reorientation in leaning stems of balsa (*Ochroma*) and papaya (*Carica*). *Can. J. Bot.* 61, 880-887.
- FISHER, J.B. & STEVENSON, J.W. (1981). Occurrence of reaction wood in branches of dicotyledons and its role in tree architecture. *Bot. Gaz.* 142, 82-95.
- FOSTER, T.J., ABLETT, S., MCCANN, M.C. & GIDLEY, M.J. (1996). Mobility-resolved ¹³C-NMR spectroscopy of primary plant cell walls. *Biopolymers* 39, 51-66.
- FOURNIER, M., CHANSON, B., THIBAUT, B. & GUITARD, D. (1994). Measurements of residual growth strains at the stem surface. Observations on different species. *Ann. For. Sci.* 51, 249-266.
- FOURNIER, M., CLAIR, B., JAOUEN, G., RUELLE, J. & PREVOST, M.F. (2003). Biomechanis and height growth strategies in a tropical rainforest sapling community. A key role of tree pre-stresses ? In *4th Plant Biomechanics Conference* (ed. F. W. Telewski), pp. 15, East Lansing, U.S.A.
- FOURNIER, M. & GUITARD, D. (1994). Les contraintes de croissance générées par la différenciation cellulaire. *Acta Bot Gallica* 140, 389-394.

- FOURNIER, M., STOKES, A., COUTAND, C., FOURCAUD, T. & MOULIA, B. (2006). Tree biomechanics and growth strategies in the context of forest functional ecology. In *Ecology and biomechanics: a mechanical approach to the ecology of animals and plants*. (ed. A. Herrel, T. Speck and N. Rowe), pp. 1-34. Boca Raton : CRC Press Florida, USA.
- FRY, S.C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.* 40, 1-11.
- FRY, S.C. (2004). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol* 161, 641-675.
- FRY, S.C., MOHLER, K.E., NESSELRODE, B.H.W.A. & FRANKOVÁ, L. (2008). Mixed-linkage β -glucan: xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from *Equisetum* (horsetails) and charophytic algae. *Plant J* 55, 240-252.
- FRY, S.C., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., HAYASHI, T., JOSELEAU, J.-P., KATO, Y., LORENCES, E.P., MACLACHLAN, G.A., MCNEIL, M., MORT, A.J., REID, J.S.G., SEITZ, H.U., SELVENDRAN, R.R., VORAGEN, A.G.J. & WHITE, A.R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89, 1-3.
- FUNADA, R., MIURA, T., SHIMIZU, Y., KINASE, T., NAKABA, S., KUBO, T. & SANO, Y. (2008). Gibberellin-induced formation of tension wood in angiosperm trees. *Planta* 227, 1409-1414.
- FURUYA, N., TAKAHASHI, S. & MIYAZAKI, M. (1970). The chemical compositions of gelatinous layer from the tension wood of *Populus euro-america*. *Mokuzai Gakkaishi* 16, 26-30.
- GEER, L.Y., DOMRACHEV, M., LIPMAN, D.J. & BRYANT, S.H. (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res* 12, 1619-1623.
- GEISLER-LEE, J., GEISLER, M., COUTINHO, P.M., SEGERMAN, B., NISHIKUBO, N., TAKAHASHI, J., ASPEBORG, H., DJERBI, S., MASTER, E., ANDERSSON-GUNNERAS, S., SUNDBERG, B., KARPINSKI, S., TEERI, T.T., KLECZKOWSKI, L.A., HENRISSAT, B. & MELLEROWICZ, E.J. (2006). Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analyses. *Plant Physiol* 140, 946-962.
- GIBEAUT, D.M., PAULY, M., BACIC, A. & FINCHER, G.B. (2005). Changes in cell wall polysaccharides in developing barley (*Hordeum vulgare*) coleoptiles. *Planta* 221, 729-738.
- GIERLINGER, N. & SCHWANNINGER, M. (2006). Chemical imaging of poplar wood cell walls by Confocal Raman Microscopy. *Plant Physiol* 140, 1246-1254.
- GLUZMAN, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- GORSHKOVA, T. & MORVAN, C. (2006). Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres: role of galactans. *Planta* 223, 149-158.
- GOSWAMI, L., DUNLOP, J.W., JUNGNIKL, K., EDER, M., GIERLINGER, N., COUTAND, C., JERONIMIDIS, G., FRATZL, P. & BURGERT, I. (2008). Stress generation in the tension wood of poplar is based on the lateral swelling power of the G-layer. *Plant J* 56, 531-538.

- GOUJON, T., FERRET, V., MILA, I., POLLET, B., RUEL, K., BURLAT, V., JOSELEAU, J.-P., BARRIERE, Y., LAPIERRE, C. & JOUANIN, L. (2003). Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* 217, 218-228.
- GRABBER, J.H., RALPH, J., LAPIERRE, C. & BARRIERE, Y. (2004). Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *C. R. Biologies* 327, 455-465.
- GRAY-MITSUMUNE, M., BLOMQUIST, K., MCQUEEN-MASON, S., TEERI, T.T., SUNDBERG, B. & MELLEROWICZ, E.J. (2008). Ectopic expression of a wood-abundant expansin PttEXPA1 promotes cell expansion in primary and secondary tissues in aspen. *Plant Biotechnol J* 6, 62-72.
- GRAY-MITSUMUNE, M., MELLEROWICZ, E.J., ABE, H., SCHRADER, J., WINZÉLL, A., STERKY, F., BLOMQUIST, K., MCQUEEN-MASON, S., TEERI, T.T. & SUNDBERG, B. (2004). Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the α -expansin gene family. *Plant Physiol* 135, 1552-1564.
- GRAY, W.M., KEPINSKI, S., ROUSE, D., LEYSER, O. & ESTELLE, M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 271-276.
- GREGORY, A.C., SMITH, C., KERRY, M.E., WHEATLEY, E.R. & BOLWELL, G.P. (2002). Comparative subcellular immunolocalization of polypeptides associated with xylan and callose synthases in French bean (*Phaseolus vulgaris*) during secondary wall formation. *Phytochemistry* 59, 249-59.
- GRIL, J. (2006). Equipe "Mécanique de l'arbre et du bois". Rapport d'activités 2003-2006, pp. 54. Laboratoire de Mécanique et Génie Civil. UMR 5508, Montpellier.
- GRIL, J. & THIBAUT, B. (1994). Tree mechanics and wood mechanics: relating hygrothermal recovery of green wood to the maturation process. *Ann. For. Sci.* 51, 329-336.
- GRÖNDAHL, M. & GATENHOLM, P. (2005). Role of acetyl substitution in hardwood xylan. In *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility* (ed. S. Dumitriu), pp. 509-514. Marcel Dekker Inc., New York.
- GRZESKOWIAK, V., SASSUS, F. & FOURNIER, M. (1996). Coloration macroscopique, retraits longitudinaux de maturation et de séchage du bois de tension du peuplier (*Populus euramericana* cv I.214). *Ann. For. Sci.* 53, 1083-1097.
- GUILLEN, R., YORK, W.S., PAULY, M., AN, J., IMPALLOMENI, G., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1995). Metabolism of xyloglucan generates xylose-deficient oligosaccharide subunits of this polysaccharide in etiolated peas. *Carbohydr Res* 277, 291-311.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52, 696-704.
- GUO, H.-S., FEI, J.-F., XIE, Q. & CHUA, N.-H. (2003). A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *Plant J* 34, 383-392.
- HA, M.A., APPERLEY, D.C. & JARVIS, M.C. (1997). Molecular rigidity in dry and hydrated onion cell walls. *Plant Physiol* 115, 593-598.

- HANTUS, S., PAULY, M., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. & YORK, W.S. (1997). Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. *Carbohydr Res* 304, 11-20.
- HAYASHI, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 139-168.
- HAYASHI, T. & MACLACHLAN, G. (1984). Pea xyloglucan and cellulose : I. Macromolecular organization. *Plant Physiol* 75, 596-604.
- HAYASHI, T., MARSDEN, M.P.F. & DELMER, D.P. (1987). Pea xyloglucan and cellulose: VI. Xyloglucan-cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. *Plant Physiol* 83, 384-389.
- HAYASHI, T. & MATSUDA, K. (1981). Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Occurrence and some properties of xyloglucan 4- β -D-glucosyltransferase and 6- α -D-xylosyltransferase. *J Biol Chem* 256, 11117-11122.
- HAYASHI, T. & TAKEDA, T. (1994). Compositional analysis of the oligosaccharide units of xyloglucans from suspension-cultured poplar cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1707-1708.
- HAYASHI, T., TAKEDA, T., OGAWA, K. & MITSUSHI, Y. (1994). Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. *Plant Cell Physiol* 35, 893-899.
- HAZEN, S.P., SCOTT-CRAIG, J. S. & WALTON, J.D. (2002). Cellulose synthase-like genes of rice. *Plant Physiol* 128, 336-340.
- HEINRICH, I., GÄRTNER, H. & MONBARON, M. (2007). Tension wood formed in *Fagus sylvatica* and *Alnus glutinosa* after simulated mass movement events. *IAWA J* 28, 39-48.
- HEJNOWICZ, Z. (1997). Gravitropism in herbs and trees: a major role for the redistribution of tissue and growth stresses. *Planta* 203, 136-146.
- HELLGREN, J.M., OLOFSSON, K. & SUNDBERG, B. (2004). Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol* 135, 212-220.
- HENRISSAT, B. & DAVIES, G.J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiol* 124, 1515-1519.
- HIS, I., DRIOUCH, A., NICOL, F., JAUNEAU, A. & HÖFTE, H. (2001). Altered pectin composition in primary cell walls of korrigan , a dwarf mutant of Arabidopsis deficient in a membrane-bound endo-1,4- β -glucanase. *Planta* 212, 348-358.
- HISAMATSU, M., IMPALLOMENI, G., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1991). A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with two alpha-L-fucosyl residues. *Carbohydr Res* 211, 117-129.
- HISAMATSU, M., YORK, W.S., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. (1992). Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. *Carbohydr Res* 227, 45-71.
- HOFFMAN, M., JIA, Z., PENA, M.J., CASH, M., HARPER, A., BLACKBURN, A.R., DARVILL, A. & YORK, W.S. (2005). Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass *Asteridae*. *Carbohydr Res* 340, 1826-40.

- HRMOVA, M., FARKAS, V., LAHNSTEIN, J. & FINCHER, G.B. (2007). A barley xyloglucan xyloglucosyl transferase covalently links xyloglucan, cellulosic substrates, and (1,3;1,4)- β -D-glucans. *J Biol Chem* 282, 12951-12962.
- HUISMAN, M.M.H., WEEL, K.G.C., SCHOLS, H.A. & VORAGEN, A.G.J. (2000). Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units *Carbohydr Polym* 42, 185-191
- IGLESIAS, N., ABELENDA, J.A., RODINO, M., SAMPEDRO, J., REVILLA, G. & ZARRA, I. (2006). Apoplastic glycosidases active against xyloglucan oligosaccharides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47, 55-63.
- IYAMA, K., LAM, T. & STONE, B.A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* 104, 315-320.
- INGBER, D.E. (2003a). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* 116, 1157-1173.
- INGBER, D.E. (2003b). Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* 116, 1397-1408.
- ISHIMIZU, T., HASHIMOTO, C., TAKEDA, R., FUJII, K. & HASE, S. (2007). A Novel α (1,2)-L-fucosidase acting on xyloglucan oligosaccharides is associated with endo- β -mannosidase. *J Biochem* 142, 721-729.
- JACQUIOT, J. & TRENARD, Y. (1974). Note sur la présence de trachéides à parois gélatineuses dans des bois résineux. *Holzforschung* 28, 74-76.
- JAOUEN, G. (2007). Etude des stratégies biomécaniques de croissance des jeunes arbres en peuplement hétérogène tropical humide. Biologie végétale et forestière thesis, Henri Poincaré.
- JIA, Z., CASH, M., DARVILL, A.G. & YORK, W.S. (2005). NMR characterization of endogenously O-acetylated oligosaccharides isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) xyloglucan. *Carbohydr Res* 340, 1818-1825.
- JIA, Z., QIN, Q., DARVILL, A.G. & YORK, W.S. (2003). Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. *Carbohydr Res* 338, 1197-1208.
- JIANG, S., XU, K., WANG, Y.-Z., REN, Y.-P. & GU, S. (2008). Role of GA₃, GA₄ and uniconazole-P in controlling gravitropism and tension wood formation in *Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. seedlings. *J Integr Plant Biol* 50, 19-28.
- JOHANSSON, M.H. & SAMUELSON, O. (1977). Reducing end groups in birch xylan and their alkaline degradation. *Wood Sci. Technol.* 11, 251-263.
- JOHNSON, K.L., JONES, B.J., BACIC, A. & SCHULTZ, C.J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol* 133, 1911-1925.
- JONES, L., SEYMOUR, G.B. & KNOX, J.P. (1997). Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- β -D-galactan. *Plant Physiol* 113, 1405-1412.

- JOSELEAU, J.P., IMAI, T., KURODA, K. & RUEL, K. (2004). Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* 219, 338-345.
- JOUREZ, B. (1997a). Le bois de tension 1. Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 1, 100-112.
- JOUREZ, B. (1997b). Le bois de tension 2. Evaluation quantitative, formation et rôle dans l'arbre. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 1, 167-177.
- JOUREZ, B. & AVELLA-SHAW, T. (2003). Effect of gravitational stimulus duration on tension wood formation in young stems of poplar (*P. euramericana* cv 'Ghoy'). *Ann. For. Sci.* 60, 31-41.
- JOUREZ, B., RIBOUX, A. & LECLERCQ, A. (2001). Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). *LAWA J* 22, 133-157.
- JOUREZ, B., VAIANOPOULOS, C. & HÉBERT, J. (2003). Effect of intensity of gravitational stimulus artificially induced on growth and tension wood formation in young shoots of poplar (*P. euramericana* cv 'Ghoy'). *Ann. For. Sci.* 60, 789-802.
- KARPINSKA, B., KARLSSON, M., SRIVASTAVA, M., STENBERG, A., SCHRADER, J., STERKY, F., BHALERAO, R. & WINGSLE, G. (2004). MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen. *Plant Mol Biol* 56, 255-270.
- KATEMBE, W.J., SWATZELL, L.J., MAKAROFF, C.A. & KISS, J.Z. (1997). Immunolocalization of integrin-like proteins in *Arabidopsis* and *Chara*. *Physiol Plant* 99, 7-14.
- KATZ, B.Z., ZAMIR, E., BERSHADSKY, A., KAM, Z., YAMADA, K.M. & GEIGER, B. (2000). Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 11, 1047-1060.
- KEEGSTRA, K. & RAIKHEL, N. (2001). Plant glycosyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 4, 219-224.
- KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W. D. & ALBERSHEIM, P. (1973). The structure of plant cell walls: III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiol* 51, 188-197.
- KENNEDY, R.W. & FARRAR, J.L. (1965). Induction of tension wood with the antiauxin 2,3,5-triiodobenzoic acid [32]. *Nature* 208, 406-407.
- KHAN, A.W., LAMB, K.A. & OVEREND, P. (1990). Comparison of natural hemicellulose and chemically acetylated xylan as substrates for the determination of acetyl-xylan esterase activity in *Aspergilli*. *Enzyme Microb Technol* 12, 127-131.
- KIEFER, L.L., YORK, W.S., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1990). Structural characterization of an arabinose-containing heptadecasaccharide enzymically isolated from sycamore extracellular xyloglucan. *Carbohydr Res* 197, 139-158.
- KIEFER, L L., YORK, W.S., DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. (1989). Xyloglucan isolated from suspension-cultured sycamore cell walls is O-acetylated. *Phytochemistry* 28, 2105-2107.
- KNOX, J., DAY, S. & ROBERTS, K. (1989). A set of cell surface glycoproteins forms an early position, but not cell type, in the root apical carota *L. Development* 106, 47-56.

- KNOX, J.P., LINSTEAD, P., KING, J., COOPER, C. & ROBERTS, K. (1990). Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* 181, 512-521.
- KNOX, J.P., LINSTEAD, P.J., PEART, J., COOPER, C. & ROBERTS, K. (1991). Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins [from carrot] and their relation to root tissue pattern formation. *Plant Physiol Biochem* 1, 317-326.
- KOHORN, B.D. (2000). Plasma membrane-cell wall contacts. *Plant Physiol* 124, 31-38.
- KOHORN, B.D. (2001). WAKs: cell wall associated kinases. *Curr Opin Cell Biol* 13, 529-533.
- KONISHI, T., OHMIYA, Y. & HAYASHI, T. (2004). Evidence that sucrose loaded into the phloem of a poplar leaf is used directly by sucrose synthase associated with various β -glucan synthases in the stem. *Plant Physiol* 134, 1146-1152.
- KUBLER, H. (1987). Growth stresses in trees and related wood properties. *Forest Products Abstracts* 10, 61-119.
- KUČERA, L.J. & PHILIPSON, W.R. (1978). Growth eccentricity and reaction anatomy in branchwood of *Pseudowintera colorata*. *Amer. J. Bot.* 65, 601-607.
- KULKARNI, N., SHENDYE, A. & RAO, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 23, 411-456.
- KURASAWA, K., MATSUI, A., YOKOYAMA, R., KURIYAMA, T., YOSHIZUMI, T., MATSUI, M., SUWABE, K., WATANABE, M. & NISHITANI, K. (2009). The *AtXTH28* gene, a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, is involved in automatic self-pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 50, 413-422.
- LAFARGUETTE, F., LEPLÉ, J.C., DÉJARDIN, A., LAURANS, F., COSTA, G., LESAGE-DESCAUSES, M.C. & PILATE, G. (2004). Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytol* 164, 107-121.
- LANDY, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58, 913-941.
- LAXENAIRE, M. & CHANSON, A. (1988). [Vapors: a historical approach]. *Ann Med Psychol (Paris)* 146, 637-644.
- LEE, C., O'NEILL, M.A., TSUMURAYA, Y., DARVILL, A.G. & YE, Z.-H. (2007a). The *irregular xylem9* mutant is deficient in xylan xylosyltransferase activity. *Plant Cell Physiol.* 48, 1624-1634.
- LEE, C., ZHONG, R., RICHARDSON, E.A., HIMMELSBACH, D.S., MCPHAIL, B.T. & YE, Z.-H. (2007b). The *PARVUS* gene is expressed in cells undergoing secondary wall thickening and is essential for glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 48, 1659-1672.
- LEE, K. J.D., SAKATA, Y., MAU, S.-L., PETTOLINO, F., BACIC, A., QUATRANO, R.S., KNIGHT, C. D. & KNOX, J. P. (2005). Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17, 3051-3065.
- LEHRINGER, C., GIERLINGER, N. & KOCH, G. (2008). Topochemical investigation on tension wood fibres of *Acer spp.*, *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. *Holzforschung* 62, 255-263.

- LEONARD, R., PABST, M., BONDILI, J.S., CHAMBAT, G., VEIT, C., STRASSER, R. & ALTMANN, F. (2008). Identification of an Arabidopsis gene encoding a GH95 $\alpha(1,2)$ -fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides. *Phytochemistry* 69, 1983-1988.
- LEPLE, J., BRASILEIRO, A., MICHEL, M., DELMOTTE, F. & JOUANIN, L. (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* 11, 137-141.
- LEVY, S., MACLACHLAN, G. & STAEHELIN, L.A. (1997). Xyloglucan sidechains modulate binding to cellulose during in vitro binding assays as predicted by conformational dynamics simulations. *Plant J* 11, 373-386.
- LEVY, S., YORK, W.S., STUIKE-PRILL, R., MEYER, B. & STAEHELIN, L.A. (1991). Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. *Plant J* 1, 195-215.
- LI, X., CORDERO, I., CAPLAN, J., MOLHOJ, M. & REITER, W.-D. (2004). Molecular analysis of 10 coding regions from Arabidopsis that are homologous to the MUR3 xyloglucan galactosyltransferase. *Plant Physiol* 134, 940-950.
- LITTLE, C.H.A. & PHARIS, R.P. (1995). Hormonal control of radial and longitudinal growth in the tree stem. In *Plant Stems: Physiology and Functional Morphology* (ed. B. L. Gartner), pp. 281-319. Academic Press, San Diego.
- LITTLE, C.H.A. & SAVIDGE, R.A. (1987). 7. The role of plant growth regulators in forest tree cambial growth. *Plant Growth Regul* 6, 137-169.
- LOVE, J., BJÖRKLUND, S., VAHALA, J., HERTZBERG, M., KANGASJÄRVI, J. & SUNDBERG, B. R. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc Natl Acad Sci* 106, 5984-5989.
- LOW, A. (1964). Compression wood in conifers : a review of literature. *Forestry Abstracts* 25, 1-14.
- LU, S., SUN, Y.-H., SHI, R., CLARK, C., LI, L. & CHIANG, V.L. (2005). Novel and Mechanical Stress-Responsive MicroRNAs in *Populus trichocarpa* That Are Absent from Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2186-2203.
- MACQUET, A., RALET, M.C., KRONENBERGER, J., MARION-POLL, A. & NORTH, H.M. (2007). *In situ*, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol* 48, 984-999.
- MADSON, M., DUNAND, C., LI, X., VERMA, R., VANZIN, G.F., CAPLAN, J., SHOUE, D.A., CARPITA, N.C. & REITER, W.-D. (2003). The MUR3 gene of Arabidopsis encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins. *Plant Cell* 15, 1662-1670.
- MARCHLER-BAUER, A., ANDERSON, J.B., CHERUKURI, P.F., DEWEESE-SCOTT, C., GEER, L.Y., GWADZ, M., HE, S., HURWITZ, D.I., JACKSON, J.D., KE, Z., LANCZYCKI, C.J., LIEBERT, C.A., LIU, C., LU, F., MARCHLER, G.H., MULLOKANDOV, M., SHOEMAKER, B.A., SIMONYAN, V., SONG, J.S., THIESSEN, P.A., YAMASHITA, R.A., YIN, J.J., ZHANG, D. & BRYANT, S.H. (2005). CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 33, 192-196.

- MARCHLER-BAUER, A., ANDERSON, J.B., DERBYSHIRE, M.K., DEWEESE-SCOTT, C., GONZALES, N.R., GWADZ, M., HAO, L., HE, S., HURWITZ, D.I., JACKSON, J.D., KE, Z., KRYLOV, D., LANCZYCKI, C.J., LIEBERT, C.A., LIU, C., LU, F., LU, S., MARCHLER, G.H., MULLOKANDOV, M., SONG, J.S., THANKI, N., YAMASHITA, R.A., YIN, J. J., ZHANG, D. & BRYANT, S.H. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 35, 237-240.
- MARCHLER-BAUER, A. & BRYANT, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32, 327-331.
- MARCUS, S.E., VERHERTBRUGGEN, Y., HERVE, C., ORDAZ-ORTIZ, J.J., FARKAS, V., PEDERSEN, H.L., WILLATS, W.G. & KNOX, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol* 8, 60.
- MARUYAMA, K., GOTO, C., NUMATA, M., SUZUKI, T., NAKAGAWA, Y., HOSHINO, T. & UCHIYAMA, T. (1996). O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry* 41, 1309-1314.
- MCCARTNEY, L., MARCUS, S.E. & KNOX, J.P. (2005). Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* 53, 543-546.
- MCNEIL, M., DARVILL, A.G., FRY, S.C. & ALBERSHEIM, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem* 53, 625-663.
- MELLEROWICZ, E.J., BAUCHER, M., SUNDBERG, B. & BOERJAN, W. (2001). Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol Biol* 47, 239-274.
- MELLEROWICZ, E.J., IMMERZEEL, P. & HAYASHI, T. (2008). Xyloglucan: the molecular muscle of trees. *Ann Bot (Lond)* 102, 659-665.
- MELOCHE, C., KNOX, J. & VAUGHN, K. (2007). A cortical band of gelatinous fibers causes the coiling of redvine tendrils: a model based upon cytochemical and immunocytochemical studies. *Planta* 225, 485-498.
- MEŠKAUSKAS, A., FRAZER, L.N. & MOORE, D. (1999). Mathematical modelling of morphogenesis in fungi: a key role for curvature compensation ('autotropism') in the local curvature distribution model. *New Phytol* 143, 387-399.
- MEYLAN, B.A. (1981). Reaction wood in *Pseudowintera colorata* — A vessel-less dicotyledon. *Wood Sci. Technol.* 15, 81-92.
- MICHAILIDIS, G., ARGIRIOU, A., DARZENTAS, N. & TSAFTARIS, A. (2009). Analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) genes from allotetraploid (*Gossypium hirsutum*) cotton and its diploid progenitors expressed during fiber elongation. *J Plant Physiol* 166, 403-416.
- MINIC, Z. (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* 227, 723-740.
- MINIC, Z. & JOUANIN, L. (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44, 435-49.
- MINIC, Z., RIHOUEY, C., DO, C.T., LEROUGE, P. & JOUANIN, L. (2004). Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135, 867-878.

- MITCHELL, R.A.C., DUPREE, P. & SHEWRY, P.R. (2007). A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan. *Plant Physiol* 144, 43-53.
- MITSUDA, N., IWASE, A., YAMAMOTO, H., YOSHIDA, M., SEKI, M., SHINOZAKI, K. & OHMETAKAGI, M. (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 270-280.
- MOINE, C. (2005). Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois : obtention de matériaux plastiques par modification des xyloxyanes. Chimie appliquée – Chimie des Substances Naturelles thesis, Université de Limoges.
- MONROE, J.D., GARCIA-CAZARIN, M.L., POLIQUIN, K.A. & AIVANO, S.K. (2003). Antisense *Arabidopsis* plants indicate that an apoplastic α -xylosidase and α -glucosidase are encoded by the same gene *Plant Physiol Biochem* 41, 877-885.
- MOORE, P., SWORDS, K., LYNCH, M. & STAEHELIN, L. (1991). Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell Biol.* 112, 589-602.
- MOYLE, R., SCHRADER, J., STENBERG, A., OLSSON, O., SAXENA, S., SANDBERG, G. & BHALERAO, R.P. (2002). Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the *Aux/IAA* gene family in hybrid aspen. *Plant J* 31, 675-685.
- MÜLLER, M., BURGHAMMER, M. & SUGIYAMA, J. (2006). Direct investigation of the structural properties of tension wood cellulose microfibrils using microbeam X-ray fibre diffraction. *Holzforschung* 60, 474-479.
- MURAKAMI, Y., FUNADA, R., SANO, Y. & OHTANI, J. (1999). The differentiation of contact cells and isolation cells in the xylem ray parenchyma of *Populus maximowiczii*. *Ann Bot* 84, 429-435.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- NECESANY, V. (1955). Prirodovedeckí sborník ostravského kraje. *Opava* 16, 184-202.
- NELSON, J.A., REYNOLDS-KOHLER, C. & SMITH, B.A. (1987). Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 7, 4125-4129.
- NIEMANN, C., CARPITA, N.C. & WHISTLER, R.L. (1997). Arabinose-containing oligosaccharides from tamarind xyloglucan. *Starch - Stärke* 49, 154-159.
- NILSSON, J., KARLBERG, A., ANTTI, H., LOPEZ-VERNAZ, M., MELLEROWICZ, E., PERROT-RECHENMANN, C., SANDBERG, G. & BHALERAO, R.P. (2008). Dissecting the molecular basis of the regulation of wood formation by auxin in hybrid aspen. *Plant Cell* 20, 843-855.
- NISHIKUBO, N., AWANO, T., BANASIAK, A., BOURQUIN, V., IBATULLIN, F., FUNADA, R., BRUMER, H., TEERI, T.T., HAYASHI, T., SUNDBERG, B. & MELLEROWICZ, E.J. (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.

- NORBERG, P.H. & MEIER, H. (1966). Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibers of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* 20, 174-178.
- NUMAN, M.T. & BHOSLE, N.B. (2006). α -L-arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33, 247-260.
- OBEL, N., NEUMETZLER, L. & PAULY, M. (2007). Hemicelluloses and cell expansion. In *The Expanding Cell*, pp. 57-88.
- OKUMURA, S., HARADA, H. & SAIKI, H. (1977). Thickness variation of the G-layer along a mature and a differentiating tension wood fiber in *Populus euramericana*. *Wood Sci. Technol.* 11, 23-32.
- OKUYAMA, T., YAMAMOTO, H., YOSHIDA, M., HATTORI, Y. & ARCHER, R. (1994). Growth stresses in tension wood: role of microfibrils and lignification. *Ann. For. Sci.* 51, 291-300.
- OKUYAMA, T. & YOSHIDA, M. (1995). An estimation of the turgor pressure change as one of the factors of growth stress generation in cell walls : diurnal change of tangential strain of inner bark *Journal of the Japan Wood Research Society* 41, 1070-1078.
- ONAKA, F. (1949). Studies on compression and tension wood. *Wood Research* 1, 1-88.
- ORIOU, R., MOLLICONE, R., CAILLEAU, A., BALANZINO, L. & BRETON, C. (1999). Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. *Glycobiology* 9, 323-334.
- PAULY, M., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. & YORK, W.S. (1999). Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant J* 20, 629-639.
- PAULY, M., QIN, Q., GREENE, H., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A. & YORK, W. S. (2001). Changes in the structure of xyloglucan during cell elongation. *Planta* 212, 842-850.
- PAUX, E., CAROCHA, V., MARQUES, C., SOUSA, A.M. D., BORRALHO, N., SIVADON, P. & GRIMA-PETTENATI, J. (2005). Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol* 167, 89-100.
- PEÑA, M.J., DARVILL, A.G., EBERHARD, S., YORK, W.S. & O'NEILL, M.A. (2008). Moss and liverwort xyloglucans contain galacturonic acid and are structurally distinct from the xyloglucans synthesized by hornworts and vascular plants. *Glycobiology* 18, 891-904.
- PEÑA, M.J., RYDEN, P., MADSON, M., SMITH, A.C. & CARPITA, N.C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth. *Plant Physiol* 134, 443-451.
- PEÑA, M.J., ZHONG, R., ZHOU, G.K., RICHARDSON, E.A., O'NEILL, M.A., DARVILL, A.G., YORK, W.S. & YEB, Z.H. (2007). *Arabidopsis* irregular xylem8 and irregular xylem9: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell* 19, 549-563.
- PENNELL, R.I., JANNICHE, L., KJELLBOM, P., SCOFIELD, G.N., PEART, J.M. & ROBERTS, K. (1991). Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell* 3, 1317-1326.
- PERRIN, R., WILKERSON, C. & KEEGSTRA, K. (2001). Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic era. *Plant Mol Biol* 47, 115-130.

- PERRIN, R.M., DEROCHE, A.E., BAR-PELED, M., ZENG, W., NORAMBUENA, L., ORELLANA, A., RAIKHEL, N.V. & KEEGSTRA, K. (1999). Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* 284, 1976-1979.
- PERRIN, R.M., JIA, Z., WAGNER, T.A., O'NEILL, M.A., SARRIA, R., YORK, W.S., RAIKHEL, N.V. & KEEGSTRA, K. (2003). Analysis of xyloglucan fucosylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132, 768-778.
- PERSSON, S., CAFFALL, K.H., FRESHOUR, G., HILLEY, M.T., BAUER, S., POINDEXTER, P., HAHN, M.G., MOHNEN, D. & SOMERVILLE, C. (2007). The *Arabidopsis irregular xylem8* mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *Plant Cell* 19, 237-255.
- PILATE, G., CHABBERT, B., CATHALA, B., YOSHINAGA, A., LEPLÉ, J.C., LAURANS, F., LAPIERRE, C. & RUEL, K. (2004a). Lignification and tension wood. *C. R. Biologies* 327, 889-901.
- PILATE, G., DÉJARDIN, A., LAURANS, F. & LEPLÉ, J.C. (2004b). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytol* 164, 63-72.
- PLOMION, C., LÉPROVOST, G. & STOKES, A. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol* 127, 1513-1523.
- PRODHAN, A.K.M.A., OHTANI, J., FUNADA, R., ABE, H. & FUKAZAWA, K. (1995). Ultrastructural investigation of tension wood fibre in *Fraxinus mandshurica* Rupr. var. *japonica* Maxim. *Ann Bot* 75, 311-317.
- PUHLMANN, J., BUCHELI, E., SWAIN, M.J., DUNNING, N., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G. & HAHN, M.G. (1994). Generation of monoclonal antibodies against plant cell-wall polysaccharides. I. Characterization of a monoclonal antibody to a terminal α -(1 \rightarrow 2)-linked fucosyl-containing epitope. *Plant Physiol* 104, 699-710.
- QIU, D., WILSON, I.W., GAN, S., WASHUSEN, R., MORAN, G.F. & SOUTHERTON, S.G. (2008). Gene expression in *Eucalyptus* branch wood with marked variation in cellulose microfibril orientation and lacking G-layers. *New Phytol* 179, 94-103.
- RAY, B., LOUETIER-BOURHIS, C., LANGE, C., CONDAMINE, E., DRIOUICH, A. & LEROUGE, P. (2004). Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterisation of a novel xyloglucan motif. *Carbohydr Res* 339, 201-208.
- RAY, P. (1980). Cooperative action of β -glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. *Biochim Biophys Acta* 629, 431-444.
- REID, J. (1985). Cell wall storage carbohydrates in seeds: biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". *Adv. Bot. Res.* 11, 125-155.
- REIS, D. & VIAN, B. (2004). Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. *C. R. Biologies* 327, 785-790.
- REITER, W.-D., CHAPPLE, C.C.S. & SOMERVILLE, C.R. (1993). Altered growth and cell walls in a fucose-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Science* 261, 1032-1035.

- REITER, W.D. (2002). Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Cell Biol* 5, 536-542.
- REITER, W.D., CHAPPLE, C.C.S. & SOMERVILLE, C.R. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J* 12, 335-345.
- RICHMOND, T.A. & SOMERVILLE, C.R. (2000). The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol* 124, 495-498.
- RICHMOND, T.A. & SOMERVILLE, C.R. (2001). Integrative approaches to determining Csl function. *Plant Mol Biol* 47, 131-143.
- ROBARDS, A.W. (1965). Tension wood and eccentric growth in crack willow (*Salix fragilis*, L.). *Ann Bot* 29, 419-431.
- ROBARDS, A.W. (1966). The application of the modified sine rule to tension wood production and eccentric growth in the stem of crack willow (*Salix fragilis* L.). *Ann Bot* 30, 513-523.
- ROSE, J.K.C., BRAAM, J., FRY, S.C. & NISHITANI, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol* 43, 1421-1435.
- RUEL, K., CHEVALIER-BILLOSTA, V., GUITTEMIN, F., SIERRA, J.B. & JOSELEAU, J.P. (2006). The wood cell wall at the ultrastructural scale formation and topochemical organization. *Maderas: Ciencia y Tecnologia* 8, 107-116.
- RUELLE, J., CLAIR, B., BEAUCHENE, J., PREVOST, M.F. & FOURNIER, M. (2006). Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 2. Comparison of some anatomical and ultrastructural criteria. *LAWAJ* 27, 341-376.
- RUELLE, J., YAMAMOTO, H. & THIBAUT, B. (2007a). Growth stresses and cellulose structural parameters in tension and normal wood from three tropical rainforest angiosperm species. *BioResources* 2, 235-251.
- RUELLE, J., YOSHIDA, M., CLAIR, B. & THIBAUT, B. (2007b). Peculiar tension wood structure in *Laetia procera* (Poepp.) Eichl. (Flacourtiaceae). *Trees - Structure and Function* 21, 345-355.
- RUMYANTSEVA, N.I. (2005). Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 70, 1073-1085.
- SAIKI, H. & ONO, K. (1971). Cell wall organization of gelatinous fibers in tension wood. *Bull. Kyoto Univ.* 42, 210-220.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. & VANDAMME, E.J. (1993). Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39, 213-294.
- SALISBURY, F.B. (1993). Gravitropism: changing ideas. *Hortic Rev* 15, 233-278.
- SALNIKOV, V., AGEEVA, M. & GORSHKOVA, T. (2008). Homofusion of Golgi secretory vesicles in flax phloem fibers during formation of the gelatinous secondary cell wall. *Protoplasma* 233, 269-273.

- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- SARRIA, R., WAGNER, T.A., O'NEILL, M.A., FAIK, A., WILKERSON, C.G., KEEGSTRA, K. & RAIKHEL, N.V. (2001). Characterization of a family of Arabidopsis genes related to xyloglucan fucosyltransferase1. *Plant Physiol* 127, 1595-1606.
- SEIFERT, G.J. (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr Opin Plant Biol* 7, 277-284.
- SHATALOV, A.A., EVTUGUIN, D.V. & PASCOAL NETO, C. (1999). (2-O- α -D-galactopyranosyl-4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydr Res* 320, 93-99.
- SHIMIZU, K. (1991). Chemistry of hemicelluloses. In *Wood and Cellulosic Chemistry*. (ed. D. N.-S. Hon and N. Shirashi), pp. 182-196. Marcel Dekker, New York.
- SHIMIZU, K., ISHIHARA, M. & ISHIHARA, T. (1976). Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. II. The oligosaccharides from the hydrolysate of a hardwood xylan by the intracellular xylanase. *Mokuzai Gakkaishi* 22, 618-625.
- SHOWALTER, A.M., BELL, J.N., CRAMER, C.L., BAILEY, J.A., VARNER, J.E. & LAMB, C.J. (1985). Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6551-6555.
- SJODIN, A., STREET, N.R., SANDBERG, G., GUSTAFSSON, P. & JANSSON, S. (2009). The *Populus* Genome Integrative Explorer (PopGenIE): a new resource for exploring the *Populus* genome. *New Phytol* 182(4), 1013-1025.
- SKAAR, C. (1988). Wood-Water Relations. In *Springer Series in Wood Science* (ed. T. Timell), pp. 283. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SMALLWOOD, M., BEVEN, A., NEILL, S.J., PEART, J., ROBERTS, K. & KNOX, J.P. (1994). Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *Plant J* 5, 237-246.
- SMALLWOOD, M., MARTIN, H. & KNOX, J.P. (1995). An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* 196, 510-522.
- SMITH, D.L. & GROSS, K.C. (2000). A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol* 123, 1173-1183.
- SMITH, E.F. & TOWNSEND, C.O. (1907). A plant-tumor of bacterial origina. *Science* 25, 671-673.
- SMITH, J.D., FREEMAN, G., VOGT, M. & DULBECCO, R. (1960). The nucleic acid of polyoma virus. *Virology* 12, 185-196.
- STERKY, F., BHALERAO, R.R., UNNEBERG, P., SEGERMAN, B., NILSSON, P., BRUNNER, A.M., CHARBONNEL-CAMPAA, L., LINDVALL, J.J., TANDRE, K., STRAUSS, S.H., SUNDBERG, B., GUSTAFSSON, P., UHLEN, M., BHALERAO, R.P., NILSSON, O., SANDBERG, G., KARLSSON, J., LUNDEBERG, J. & JANSSON, S. (2004). A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13951-13956.

- STRASSER, R., BONDILI, J. S., SCHOBERER, J., SVOBODA, B., LIEBMINGER, E., GLÖSSL, J., ALTMANN, F., STEINKELLNER, H. & MACH, L. (2007). Enzymatic properties and subcellular localization of *Arabidopsis* β -N-acetylhexosaminidases. *Plant Physiol* 145, 5-16.
- SUNNA, A. & ANTRANIKIAN, G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17, 39-67.
- SUZUKI, M., KATO, A., NAGATA, N. & KOMEDA, Y. (2002). A xylanase, AtXyn1, is predominantly expressed in vascular bundles, and four putative xylanase genes were identified in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Cell Physiol* 43, 759-767.
- TAKAHASHI, T., IKEDA, Y., TATEISHI, A., YAMAGUCHI, Y., ISHIKAWA, M. & TANIGUCHI, N. (2000). A sequence motif involved in the donor substrate binding by α (1,6)-fucosyltransferase: the role of the conserved arginine residues. *Glycobiology* 10, 503-510.
- TAKEDA, T., FURUTA, Y., AWANO, T., MIZUNO, K., MITSUISHI, Y. & HAYASHI, T. (2002). Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9055-9060.
- TARRAGÓ, T., MARTÍNEZ, I., TORRENT, M., CODINA, A., GIRALT, E., PUIGDOMÈNECH, P. & LUDEVID, D. (2003). The *ful1* gene product (20 kDa FUC1) of *Pisum sativum* has no α -L-fucosidase activity. *Plant Mol Biol* 51, 877-884.
- TELEMAN, A., LUNDQVIST, J., TJERNELD, F. & STALBRAND, H. (2000). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydr Res* 329, 807-815.
- TERASHIMA, N. (1990). A new mechanism for formation of a structurally ordered protolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. *J Pulp Paper Sci* 16, 150-155.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- THOMPSON, J.E. & FRY, S.C. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta* 211, 275-86.
- TIMELL, T. (1969). The chemical composition of tension wood. *Sven papperstidn* 72, 173-18.
- TIMELL, T.E. (1986). *Compression wood in gymnosperms*. Springer-Verlag, New York.
- TINE, M.A., CORTELAZZO, A.L. & BUCKERIDGE, M.S. (2000). Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*). *Plant Sci* 154, 117-126.
- TIWARI, S.B., WANG, X.J., HAGEN, G. & GUILFOYLE, T.J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13, 2809-2822.
- TUOMINEN, H., SITBON, F., JACOBSSON, C., SANDBERG, G., OLSSON, O. & SUNDBERG, B. (1995). Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol* 109, 1179-1189.

- TUSKAN, G. A., DIFAZIO, S., JANSSON, S., BOHLMANN, J., GRIGORIEV, I., HELLSTEN, U., PUTNAM, M., RALPH, S., ROMBAUTS, S., SALAMOV, A., SCHEIN, J., STERCK, L., AERTS, A., BHALERAO, R. R., BHALERAO, R. P., BLAUDEZ, D., BOERJAN, W., BRUN, A., BRUNNER, A., BUSOV, V., CAMPBELL, M., CARLSON, J., CHALOT, M., CHAPMAN, J., CHEN, G. L., COOPER, D., COUTINHO, P. M., COUTURIER, J., COVERT, S., CRONK, Q., CUNNINGHAM, R., DAVIS, J., DEGROEVE, S., DÉJARDIN, A., DEPAMPHILIS, C., DETTER, J., DIRKS, B., DUBCHAK, I., DUPLESSIS, S., EHLTING, J., ELLIS, B., GENDLER, K., GOODSTEIN, D., GRIBSKOV, M., GRIMWOOD, J., GROOVER, A., GUNTER, L., HAMBERGER, B., HEINZE, B., HELARIUTTA, Y., HENRISSAT, B., HOLLIGAN, D., HOLT, R., HUANG, W., ISLAM-FARIDI, N., JONES, S., JONES-RHOADES, M., JORGENSEN, R., JOSHI, C., KANGASJÄRVI, J., KARLSSON, J., KELLEHER, C., KIRKPATRICK, R., KIRST, M., KOHLER, A., KALLURI, U., LARIMER, F., LEEBENS-MACK, J., LEPLÂ©, J. C., LOCASCIO, P., LOU, Y., LUCAS, S., MARTIN, F., MONTANINI, B., NAPOLI, C., NELSON, D. R., NELSON, C., NIEMINEN, K., NILSSON, O., PEREDA, V., PETER, G., PHILIPPE, R., PILATE, G., POLIAKOV, A., RAZUMOVSKAYA, J., RICHARDSON, P., RINALDI, C., RITLAND, K., ROUZÉ, P., RYABOY, D., SCHMUTZ, J., SCHRADER, J., SEGERMAN, B., SHIN, H., SIDDIQUI, A., STERKY, F., TERRY, A., TSAI, C. J., UBERBACHER, E., UNNEBERG, P., et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596-1604.
- VANZIN, G.F., MADSON, M., CARPITA, N.C., RAIKHEL, N.V., KEEGSTRA, K. & REITER, W.-D. (2002). The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3340-3345.
- VIERHUIS, E., YORK, W.S., KOLLI, V.S., VINCKEN, J., SCHOLS, H.A., VAN ALEBEEK, G.W. & VORAGEN, A.G. (2001). Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. *Carbohydr Res* 332, 285-297.
- VINCKEN, J.P., YORK, W.S., BELDMAN, G. & VORAGEN, A. (1997). Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol* 114, 9-13.
- WANG, Y., GRIL, J. & SUGIYAMA, J. (2009). Variation in xylem formation of *Viburnum odoratissimum* var. awabuki: growth strain and related anatomical features of branches exhibiting unusual eccentric growth. *Tree Physiol* 29, 707-713.
- WARDROP, A. (1965). The formation and function of reaction wood. In *Cellular ultrastructure of woody plants* (ed. W. J. Cote). Syracuse Univ. Press, New York.
- WARDROP, A.B. & DADSWELL, H.E. (1955). The nature of tension wood. IV. Variation in cell wall organization of tension wood fibres. *Aust. J. Bot.* 1, 1-16.
- WASHUSEN, R. & EVANS, R. (2001). The association between cellulose crystallite width and tension wood occurrence in *Eucalyptus globulus*. *IAWA J* 22, 235-243.
- WASHUSEN, R. & ILIC, J. (2001). Relationship between transverse shrinkage and tension wood from three provenances of *Eucalyptus globulus* Labill. *Holz als Roh- und Werkstoff* 59, 85-93.

- WASHUSEN, R., ILIC, J. & WAUGH, G. (2003). The relationship between longitudinal growth strain and the occurrence of gelatinous fibers in 10 and 11-year-old *Eucalyptus globulus* Labill. *Holz als Roh- und Werkstoff* 61, 299-303.
- WENDE, G. & FRY, S.C. (1997). 2-O- β -D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry* 44, 1019-1030.
- WILLATS, W.G., MARCUS, S.E. & KNOX, J.P. (1998). Generation of monoclonal antibody specific to (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinan. *Carbohydr Res* 308, 149-152.
- WOODCOCK, D.W. (1992). The rain on the plain: are there vegetation-climate feedbacks? *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 97, 191-201.
- YAMAMOTO, H. (1998). Generation mechanism of growth stresses in wood cell walls: roles of lignin deposition and cellulose microfibril during cell wall maturation. *Wood Sci. Technol.* 32, 171-182.
- YAMAMOTO, H., ABE, K., ARAKAWA, Y., OKUYAMA, T. & GRIL, J. (2005). Role of the gelatinous layer (G-layer) on the origin of the physical properties of the tension wood of *Acer sieboldianum*. *Journal of Wood Science* 51, 222-233.
- YENNAWAR, N.H., LI, A.C., DUDZINSKI, D.M., TABUCHI, A. & COSGROVE, D.J. (2006). Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a β -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 14664-14671.
- YOKOYAMA, R. & NISHITANI, K. (2001). Endoxyloglucan transferase is localized both in the cell plate and in the secretory pathway destined for the apoplast in tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 42, 292-300.
- YORK, W.S., IMPALLOMENI, G., HISAMATSU, M., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1995). Eleven newly characterized xyloglucan oligoglycosyl alditols: the specific effects of sidechain structure and location on ^1H NMR chemical shifts. *Carbohydr Res* 267, 79-104.
- YORK, W.S., KUMAR KOLLI, V.S., ORLANDO, R., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. (1996). The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. *Carbohydr Res* 285, 99-128.
- YORK, W.S. & O'NEILL, M.A. (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up? *Curr Opin Plant Biol* 11, 258-265.
- YOSHIDA, M., OHTA, H. & OKUYAMA, T. (2002a). Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Journal of Wood Science* 48, 99-105.
- YOSHIDA, M., OHTA, H., YAMAMOTO, H. & OKUYAMA, T. (2002b). Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of yellow poplar, *Liriodendron tulipifera* Linn. *Trees - Structure and Function* 16, 457-464.
- YOSHIDA, M., OKUDA, T. & OKUYAMA, T. (2000). Tension wood and growth stress induced by artificial inclination in *Liriodendron tulipifera* Linn. and *Prunus spachiana* Kitamura f. *ascendens* Kitamura. *Ann. For. Sci.* 57, 739-746.
- YOSHIZAWA, N., SATOH, M., YOKOTA, S. & IDEI, T. (1993). Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. *LAWAJ* 14, 139-151.

- ZABLACKIS, E., YORK, W.S., PAULY, M., HANTUS, S., REITER, W.-D., CHAPPLE, C.C.S., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A. (1996). Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. *Science* 272, 1808-1810.
- ZABOTINA, O.A., VAN DE VEN, W.T.G., FRESHOUR, G., DRAKAKAKI, G., CAVALIER, D., MOUILLE, G., HAHN, M.G., KEEGSTRA, K. & RAIKHEL, N.V. (2008). *Arabidopsis* XXT5 gene encodes a putative α -1,6-xylosyltransferase that is involved in xyloglucan biosynthesis. *Plant J* 56, 101-115.
- ZELNY, R., LEONARD, R., DORFNER, G., DALIK, T., KOLARICH, D. & ALTMANN, F. (2006). Molecular cloning and characterization of a plant α 1,3/4-fucosidase based on sequence tags from almond fucosidase I. *Phytochemistry* 67, 641-648.
- ZENG, W., CHATTERJEE, M. & FAIK, A. (2008). UDP-xylose-stimulated glucuronyltransferase activity in wheat microsomal membranes: characterization and role in glucurono(arabino)xylan biosynthesis. *Plant Physiol* 147, 78-91.
- ZHONG, R., BURK, D.H., MORRISON, W.H.I. & YE, Z.-H. (2002). A kinesin-like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength. *Plant Cell* 14, 3101-3117.
- ZHONG, R., LEE, C., ZHOU, J., MCCARTHY, R.L. & YE, Z.-H. (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2763-2782.
- ZHONG, R., PENA, M.J., ZHOU, G.K., NAIRN, C.J., WOOD-JONES, A., RICHARDSON, E.A., MORRISON, W.H., 3RD, DARVILL, A.G., YORK, W.S. & YE, Z.H. (2005). *Arabidopsis* fragile fiber8, which encodes a putative glucuronyltransferase, is essential for normal secondary wall synthesis. *Plant Cell* 17, 3390-408.
- ZHONG, R., RICHARDSON, E. & YE, Z.-H. (2007a). Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta* 225, 1603-1611.
- ZHONG, R., RICHARDSON, E.A. & YE, Z.-H. (2007b). The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2776-2792.
- ZHOU, G.-K., ZHONG, R., HIMMELSBACH, D.S., MCPHAIL, B.T. & YE, Z.-H. (2007). Molecular Characterization of PoGT8D and PoGT43B, Two Secondary Wall-Associated Glycosyltransferases in Poplar. *Plant Cell Physiol.* 48, 689-699.
- ZIMMERMANN, M.H., WARDROP, A.B. & TOMLINSON, P.B. (1968). Tension wood in aerial roots of *Ficus benjamina* L. *Wood Sci. Technol.* 2, 95-104.
- ZYKWINSKA, A., GAILLARD, C., BULÉON, A., PONTOIRE, B., GARNIER, C., THIBAUT, J.F. & RALET, M. C. (2007). Assessment of *in vitro* binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and x-ray diffraction methods. *Biomacromolecules* 8, 223-232.
- ZYKWINSKA, A.W., RALET, M.C.J., GARNIER, C.D. & THIBAUT, J.F. (2005). Evidence for *in vitro* binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiol* 139, 397-407.

RESUME

La xylogénèse conduit entre autres à la formation de fibres et de vaisseaux impliquant une cascade d'évènements dont notamment la mise en place d'une paroi secondaire. Cependant, sous les effets de contraintes environnementales (vent, pente), une nouvelle architecture de cette paroi est observée. Celle-ci va influencer directement sur les propriétés mécaniques et la qualité du bois. Afin de restaurer la verticalité de leur tige, les angiospermes ligneuses développent en effet un bois particulier appelé le « bois de tension » qui se caractérise par la formation d'une strate atypique : la « couche gélatineuse ». Par des techniques de biochimie et de biologie moléculaire chez le peuplier hybride (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4), et afin de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ce bois, nous avons cherché à isoler et caractériser deux groupes d'enzymes –des $\beta(1,4)$ -xylosidases et des $\alpha(1,2)$ -fucosyltransférases– impliqués dans le réarrangement et la biosynthèse des xylanes et xyloglucanes respectivement. Deux de ces enzymes, PtaBXL1 et PtaFUT1, apparaissent ainsi sous-exprimées spécifiquement dans la zone de bois de tension. En parallèle, nous avons développé un modèle d'étude *in vitro* de formation du bois de tension dans le but de réaliser un état des lieux par immunohistochimie et diverses colorations des différents polymères pouvant être impliqués dans la formation et les propriétés mécaniques de ce bois particulier. Des AGPs et des RG-I ont ainsi été trouvés au sein de la couche G, ce qui suggère leur participation au développement des forces de tension dans le redressement des tiges.

ABSTRACT

Xylogenesis leads among others to the formation of fibers and vessels which involves a cascade of events including the establishment of a secondary wall. However, under the effects of environmental constraints (wind, slope), a new architecture of this wall is observed. This last one will directly affect the mechanical properties and wood quality. In order to reinstate verticality of their stems, the woody angiosperms develop a particular wood called “tension wood” which is characterized by the formation of an atypical layer : the “gelatinous layer”. By techniques of biochemistry and molecular biology on the hybrid poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4), and in order to highlight some molecular mechanisms involved in the formation of this wood, we have sought to isolate and characterize two groups of enzymes – $\beta(1,4)$ -xylosidases and $\alpha(1,2)$ -fucosyltransferases– involved in the rearrangement and the biosynthesis of xylans and xyloglucans respectively. Two of these enzymes, PtaBXL1 and PtaFUT1, appear down-regulated specifically in tension wood. In parallel, we developed a study model *in vitro* of formation of tension wood in order to carry out an inventory by immunohistochemistry and various staining of the different polymers that may be involved in the formation and mechanical properties of this particular wood. Also, AGPs and RG-I has been found in G layer, which suggests their participation in the development of tension forces in straightening of stems.