

**UNIVERSITE DE LILLE 1 : SCIENCES ET TECHNOLOGIES
UFR DE BIOLOGIE**



Laboratoire de Stress Abiotiques
et Différenciation des Végétaux Cultivés
UMR USTL-INRA N° 1281, UFR Biologie
59655 Villeneuve d'Ascq



UMR 614 INRA-URCA
Fractionnement des AgroRessources
(FARE), 51686 Reims

THESE

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

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

Spécialité : Stratégie d'Exploitation des Fonctions Biologiques

Frédérique NOLIN

**Hétérogénéité et spécificité de la lignification chez le lin (*Linum
usitatissimum* L): Etudes microscopiques et biochimiques de la
polymérisation des lignines**

Soutenue le 11 Juin 2009, devant le jury composé de :

M. HILBERT J. -L.	Professeur, Université de Lille I	Président
M. MESNARD F.	MCF, HDR, Université Picardie Jules Verne	Rapporteur
Mme BAUCHER M.	Maître de recherche FNRS, Université Libre de Bruxelles	Rapporteur
Mme CABANE M.	MCF, Université Henri Poincaré Nancy I	Examineur
Mme CHABBERT B.	Chargé de recherche (CR1), INRA, Reims	Directrice de thèse
M. HAWKINS S.	Professeur, Université de Lille I	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens en tout premier lieu à remercier M. R. Douillard qui m'a accueillie dans son laboratoire. Mes remerciements vont ensuite à mes deux directeurs de thèse B. Chabbert et S. Hawkins pour leurs corrections et les longues soirées et week end passés afin d'obtenir le meilleur.

Merci à M^{me} Marie Baucher d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi que M. François Mesnard d'avoir bien voulu être lui aussi rapporteur de cette thèse. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à M. Jean-Louis Hilbert d'avoir présidé le jury de cette thèse. Je remercie également M^{me} Mireille Cabané de prendre de son temps pour examiner ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à l'équipe du Pr. Kurt Fagerstedt de l'Université d'Helsinki en Finlande pour m'avoir si bien accueillie durant cette short mission. La Finlande restera dans ma mémoire pour ses paysages, ses habitants si accueillants et le mois fructueux à Viiki 3 en présence des Eija et Ville. Merci à tous pour l'aide que vous m'avez apportée.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée au laboratoire de l'INRA de Reims, David, Anouck et Laurence pour n'en citer que quelques uns. Merci à B. Batailler de l'INRA de Bordeaux et L. Wortham de l'INSERM de Reims pour leur gentillesse et leur aide précieuse en microscopie.

Un grand remerciement à M. Christophe Clément, pour m'avoir initiée à la recherche et soutenue tout au long de ses années. Merci, Christophe pour ton aide, ta compréhension et ton réconfort. Un grand merci également au laboratoire d'Oenologie de Reims où j'effectue actuellement mon poste d'ATER. Merci à M. P. Jeandet, pour son aide et la grande liberté qu'il m'a accordée pour les recherches que je voulais entreprendre. Merci aux filles (Sandrine, Sandra, Alex et Doriane) pour votre soutien et aide à tous les niveaux.

Enfin, je tiens à remercier mes proches qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse. Merci pour tout, je n'aurais pas pu tout faire sans vous.

A mes parents,

A mon doudou d'amour

Synthèse Bibliographique	1
I/ Le lin	2
1) Description	2
1-1/ Systématique	2
1-2/ Morphologie et anatomie	2
1-3/ Développement du lin	4
2) Applications	4
2-1/ Utilisation des Graines	4
2-2/ Utilisation des fibres	5
II/ La paroi	6
1) Organisation	7
1-1/ La lamelle moyenne	7
1-2/ Paroi Primaire	7
1-3/ Paroi Secondaire	8
2) Composition	9
2-1/ Cellulose	9
2-2/ Pectines	10
a) Homogalacturonanes	11
b) Les arabinanes, galactanes, et arabinogalactanes	11
c) Rhamnogalacturonanes	12
2-3/ Hémicelluloses	13
a) Xyloglucanes	14
b) Xylanes et mannanes	14
2-4 /Protéines pariétales	15
a) HRGP : Hydroxyproline rich protein	16
α) Extensines	16
β) AGP : Arabinogalactan protein	16
c) PRP : Prolin rich protein	17
b) GRP	17
2-5/ Les lignines	18
a) Composition et structure	19
b) Hétérogénéité	20

3) Dynamique d'assemblage du réseau pariétal	20
III/Lignification des parois	23
1) Dynamique et organisation spatiale	23
2) Voie de biosynthèse des monolignols	24
3) Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la paroi	28
4) Précurseurs de la polymérisation	30
4-1) Coniferine	31
4-2) Syringine	32
4-3) Le coniféraldéhyde glucoside	32
4-4) Les β -glucosidases	33
5) Polymérisation des monolignols	34
5-1) Laccases	35
a) Structure	36
b) Rôles présumés chez les champignons et chez les plantes	36
c) Implication dans la lignification	37
5-2) Peroxydases	38
a) Définition	38
b) Classe III	39
α) Une famille multigénique	39
β) Structure cristalline	40
γ) Mécanisme catalytique	41
δ) Rôles	42
• Le métabolisme de l'auxine	43
• La reticulation des parois	44
• La lignification	45
• Formation des ROS	47
5-3) L'eau oxygénée	47
a) Métabolisme	49
b) Régulation et transport	49
c) Rôles	50
Objectif du travail de recherche	51

Ch 1 : Distribution du précurseur potentiel	54
Anatomie du xylème de lin : une exception	55
Detailed analyses reveal structural similarities between flax and coniferin lignin	58
Introduction	58
Materials and methods	60
Results and discussion	65
References	66
Ch 2 : Monolignol Oxidases	81
Characterization of cell-wall peroxidases in flax stem tissues	82
Introduction	82
Materials and methods	85
Results	88
Discussion	93
References	97
Ch 3 : Distribution subcellulaire de H₂O₂	103
Distinct patterns of hydrogen peroxide distribution in the xylem cells and hypolignified bast fibres of flax stems	104
Introduction	104
Materials and methods	107
Results	108
Discussion	120
References	126
Ch 4 : Limitations architecturales à la lignification des fibres	132
How gelatinous are secondary cell walls of flax fibres ?	133

Introduction	133
Materials and methods	135
Results and discussion	136
References	141

Discussion générale/conclusion/perspectives 143

Discussion générale	144
I/ Qualité de la lignine de lin et distribution des précurseurs candidats	145
II/Oxydases de la polymérisation oxydative	148
III/ Distribution du peroxyde d'hydrogène, substrat des peroxydases	150
IV/ Limitations architecturales à la lignification des fibres	151
Conclusions-Perspectives	153

Annexe 157

Publication acceptée (Plant physiology and biochemistry)	158
Caffeoyl coenzyme a O-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell wall architecture in flax secondary xylem	

Bibliographie 169

Abbreviations :

ABC : ATP-Binding Cassette
ADN : Acide DesoxyriboNucleique
AG : Arabinogalactanes
AGP : Arabinogalactan protein
AIA : Acide indole acétique
APX : Ascorbates peroxydases
C3H : p-Coumarate 3-hydroxylase
C4H : Cinnamate 4-hydroxylase
C4L : 4-Coumarate : CoA ligase
Ca5H : Coniféraldéhyde 5 Hydroxylase
CAGT : Alcool coniférylique
glucosyltransférase
CCoAOMT : Caféoyl-CoA
methyltransferase
CCP : peroxydases à cytochrome C
CCR : Cinnamoyl-CoA-reductase
COMT : Acide 5-hydroxyferulique O-
MéthyTransférase
DHP : DehydroPolymer
F5H : Ferulate 5 hydroxylase
FLAs : Fascicline Like AGP
G : Gaïacyle
Gal : Galactose
GalA : Acide α -D-galacturonique
Glc : Glucose
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
GPX : Glutathion peroxydase
GRP : Glycin rich protein
H : p-Hydroxyphenyl
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogene

HCT : HydroxyCinnamoyl Transferase
HG : Homogalacturonanes
HRGPs : Hydroxyproline rich protein
HRPC : HorseRadish Peroxidase isosyme
de type C
Hyp : Hydroxyproline
LCC : Lignine Carbohydrates Complexes
IEF : IsoElectroFocalisation
MYB : MYeloBlastosis
PAL : L-phénylalanine ammonia lyase
PGAs : Acides polygalacturoniques
pI : point isoelectrique
PME : Pectines methylestérases
PNP : PeaNut Peroxidase
POD : Peroxydases
Pro : Proline
PRP : Prolin rich protein
RG-I : Rhamnogalacturonanes de type I
ROS : Reactive oxygen species
S : Syringyle
SAD : Sinapyl alcohol deshydrogenase
SND : Secondary Wall-Associated NAC
Domain Protein
Ser : Serine
SOD : Superoxide dismutases
Thr : Threonine
VDNs : Vascular Related NAC Domain
XTHs : Xyloglucanes transglucosylase
/hydrolases
WAKs : Wall Associated Kinases

Synthèse Bibliographique

I/ Le lin

1) Description

1-1/ Systématique

Le lin est une Angiosperme dicotylédone annuelle de la famille des Linaceae du genre *Linum* qui compte environ 200 espèces (Diederichsen, 2007). Sur la base de critères morphologiques, Linnaeus (1753) a distingué 4 variétés de lin cultivé parmi lesquelles *Linum usitatissimum* est la plus cultivée aujourd'hui. L'espèce *usitatissimum* regroupe deux grands types de variétés destinées à la production de graines ou de fibres (Millam et al., 2005). Les variétés de lins graines ont une tige relativement courte à ramifications secondaires nombreuses, tandis que les variétés de lin fibres possèdent une tige plus élevée et moins ramifiée. En France c'est le lin fibres qui est le plus cultivé avec 68000 ha en 2008 alors que le lin graines ne représente qu'environ 15000 ha de la surface cultivée. Une situation inverse est observée en Amérique du Nord où la production de lin graine constitue l'essentiel de la production en lin. La production française du lin fibres représente 39 % de l'offre mondiale.

1-2/ Morphologie et anatomie

L'inflorescence est en forme de cyme qui porte plusieurs fleurs bleues ou blanches. Les fleurs (Fig. 1) sont pour la plupart hermaphrodites, le nombre de fécondation croisée est généralement inférieur à 1%. La pollinisation du lin par les insectes est possible mais rare, le pollen étant collant. Après fécondation, l'ovaire se transforme en un fruit, ou capsule, constitué de cinq loges contenant au maximum 10 graines. Ces graines, de forme ovale, ont une surface lisse colorée du brun-rouge au jaune clair et une longueur de 3 à 6.4 mm (Fig. 2).



Fig.1 : Fleur de lin (www.visoflora.com)



Fig. 2 : Graines de lin (www.creapharma.ch)

Le lin possède une courte racine pivotante pourvue de radicelles fibreuses de longueur variable allant jusqu'à 120 cm. Les feuilles disposées tout le long de la tige dressée sont simples et sessiles et d'une longueur de 25 mm environ. La tige est plus ou moins ramifiée selon la densité de semis. Pour une densité de semis de 2000 graines/m² la taille des lins fibres (Fig. 3) varie entre 0.8 et 1.2 m alors qu'elle atteint 0.5 à 0.7 m pour les lins graines (Fig. 3) semés à 400 graines/m² (Casa et al., 1999). Une coupe transversale de la tige permet de

distinguer, de l'extérieur vers l'intérieur, différents tissus répartis de manière concentrique : l'épiderme et le parenchyme cortical, les faisceaux de fibres externes ou périphloémiennes puis le phloème, le cambium et le xylème avec éventuellement présence de moelle selon l'âge de la tige.

Le tissu interne de la tige est essentiellement constitué par du xylème secondaire, formé à partir des initiales cambiales. Les types cellulaires présents (vaisseaux, fibres, rayons) sont communs aux bois d'Angiospermes. Néanmoins l'anatomie du xylème révèle, en coupe transversale une certaine homogénéité cellulaire par rapport à d'autres espèces à fibres comme le chanvre où les vaisseaux sont clairement distingués (Day et al., 2009)

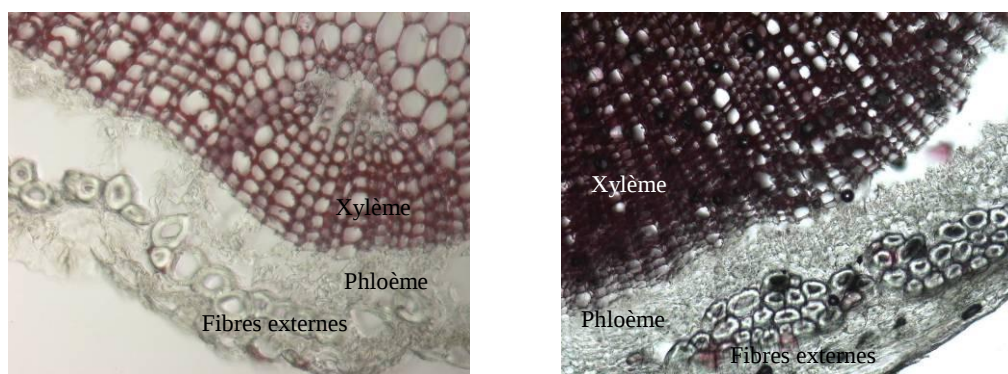


Fig. 3 : Coupe transversale de tige de lin colorée au phloroglucinol-HCl (lin graines cv. Barbara à gauche et lin fibres cv. Diane à droite, au stade floraison)

Les fibres de sclérenchyme sont situées entre le parenchyme et le xylème, et assurent une fonction de soutien (McDougall et al., 1993). Une tige comporte trente à quarante faisceaux de fibres (composé de 10 à 40 fibres) disposés parallèlement à l'axe de la tige (Esau, 1943). La longueur des fibres varie entre 10 et 150 mm (Lourd, 1964), et leur diamètre varie de 8 à 30 microns. A maturité des plantes, les fibres représentent environ 25% de la masse sèche des tiges. La formation des fibres intervient tout au long de la croissance de la plante à partir de méristèmes primaires disposés en périphérie des tissus conducteurs. La croissance des fibres procède en deux étapes. La croissance primaire apicale des cellules qui permet l'extension des fibres intervient essentiellement jusqu'au stade floraison puis diminue (Jacquemart et Fourcroy, 1961). La croissance secondaire responsable de l'épaississement de la fibre se traduit par la mise en place d'une paroi secondaire majoritairement constituée de cellulose dont la synthèse est maximale au moment de la floraison et se poursuit pendant la fructification. Les fibres de lin sont ainsi constituées de 70 à 80 % de cellulose et contrairement au xylème, ne sont que très faiblement lignifiées (1.5 à 4.55 % de la matière sèche) (Roach et Deyholos, 2007).

1-3/ Développement du lin

La culture du lin s'étale sur une période de 100 jours environ après la levée des semis. Chez les variétés de lin fibres, cinq étapes principales peuvent être distinguées en relation avec le développement des fibres périphloëmiennes (Morvan et al., 1989).

- 1) de la levée à 15 cm (Fig. 4).
- 2) de 15 cm à la floraison : à l'issue de cette phase végétative, le lin atteint 80 cm de haut et présente une grande sensibilité à la verse (Fig. 4).
- 3) de floraison au début de la fructification.
- 4) de capsules vertes à capsules jaunes. Durant cette phase de formation des graines, la maturation des fibres périphloëmiennes se poursuit (Fig. 4).
- 5) de capsules jaunes à capsules brunes. Phase qui correspond à la maturation des graines (Day, 2004), (Fig. 4).



Fig. 4 : Stades de développement du lin (végétatif, floraison, capsules vertes et brunes)

2) Applications

2-1/ Utilisation des Graines

Les graines renferment de l'huile (30-40%), des protéines (20-25%) et des fibres alimentaires (20-28%). Le lin graines est traditionnellement cultivé pour son huile. Les utilisations de l'huile de lin dérivent de sa richesse en acides gras polyinsaturés, en particulier en acides linoléique et linoléique. La présence de ces acides gras confère à l'huile de lin des propriétés d'usages dans le domaine non alimentaires (peinture, encre...). Par ailleurs, le premier moteur à huile du nom de son inventeur, Rudolph Diesel en 1891, a été conçu pour fonctionner à l'huile de lin.

Les graines sont essentiellement utilisées dans l'alimentation animale sous forme de tourteaux dégraissés. Dans le domaine de l'alimentation humaine, les utilisations de l'huile de lin sont également en expansion (Fig. 5). En effet, cette huile qui renferme plusieurs vitamines (A, B, D, E), des minéraux, des acides aminés et les acides gras de type oméga 3 est considérée dans de nombreux pays comme un "aliment santé" (Abbadi et al., 2004 ; Coskuner et Kanababa, 2007). Parallèlement, diverses études s'intéressent au rôle préventif des phyto-oestrogènes dérivant des lignanes. Ces composés phénoliques qui sont relativement abondants dans la graine de lin auraient un rôle protecteur vis-à-vis de certaines pathologies (Dodin et al., 2005 ; Thompson et al., 2005). Les graines contiennent également 5-8% de fibres mucilagineuses qui ont des propriétés similaires à la gomme arabique (Rebolé et al., 2002).



Fig. 5 : Utilisations des lins grains (huile (www.vajra.be) et pain (www.multimarques.com))

2-2/ Utilisation des fibres

Les usages textiles des fibres remontent à 10 000 ans. Les égyptiens les utilisaient pour leurs vêtements mais aussi pour confectionner les bandelettes des momies (Oplinger et al., 1989). Au début du 20^{ème} siècle cette culture décline du fait de la production du coton et des fibres synthétiques. Il est toujours utilisé de nos jours mais est considéré comme un tissu noble et très robuste qui demeure cher par rapport au coton et autres tissus synthétiques. A l'instar de fibres végétales comme le chanvre, le sisal..., les fibres de lin dont la qualité moindre n'autorise pas une utilisation dans le textile, sont de plus en plus utilisés dans d'autres domaines (Fig. 6). Ceci explique que, depuis le début des années 1990, la demande croissante de fibres de meilleure qualité dans le textile et les nouvelles utilisations ont stimulé l'intérêt et le regain de recherche pour cette culture notamment dans le domaine des matériaux composites et la production de papiers spéciaux (Akin et al., 2005). On les retrouve de plus en plus dans des matériaux composites destinés à la construction de pièces automobile. En 1998, le constructeur automobile Mercedes Benz associé à Bayer utilise des composites renforcés

par des fibres de lin et de sisal pour les garnitures intérieures des portières. Depuis d'autres marques automobiles ont également retenu ces fibres dans la fabrication de panneaux de portes ou bien encore l'habillage du coffre. La plupart de ces produits sont réalisés par thermoformage à partir de mélanges de fibres plastiques et naturelles (lin, chanvre, ramie) ou par compression de résines phénoliques et de fibres. Aujourd'hui les fibres de lin sont utilisées dans la composition des cadres composites des vélos du fait de leur faible densité et de leur résistance aux vibrations.



Fig. 6 : Utilisation des fibres de lin (textile, corde (www.inakis.fr), isolation, agrocomposite (www.ouestbateaux.com))

De par leur bonne résistance à la rupture et leur faible densité, les fibres de lin, en particulier les résidus de l'industrie textile, sont transformés en matériaux isolants (Fig. 6). En effet, les fibres de lin possèdent des propriétés d'insonorisations importantes tout en apportant une régulation thermique.

Les propriétés/qualités (notamment physico-chimiques et mécaniques) des fibres périploëmiennes de lin dépendent de leurs caractéristiques morphologiques (ratio longueur/diamètre) ainsi que de la composition et l'architecture de la paroi cellulaire.

II/ La paroi

Les cellules animales et végétales sont constituées d'un cytoplasme limité par une membrane plasmique, mais seules les cellules végétales sont entourées par une paroi (Mc Cann et Roberts, 1991). La paroi forme une matrice continue extracellulaire. Cette continuité a de nombreuses implications pour la signalisation cellulaire, la communication, le transport et l'orientation de la croissance cellulaire (Mc Cann et Roberts, 1994). Les rôles de la paroi sont multiples et fonction de l'âge. Chez les cellules jeunes, la paroi présente une certaine plasticité autorisant l'élongation cellulaire. Dans les cellules matures elle assure essentiellement un rôle de soutien et de protection sous la forme principalement d'une barrière physique à l'intrusion des pathogènes.

1) Organisation

La paroi est constituée de différentes couches: la lamelle moyenne commune à la cellule contiguë, la paroi primaire et la paroi secondaire, disposées de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (Fig. 7).

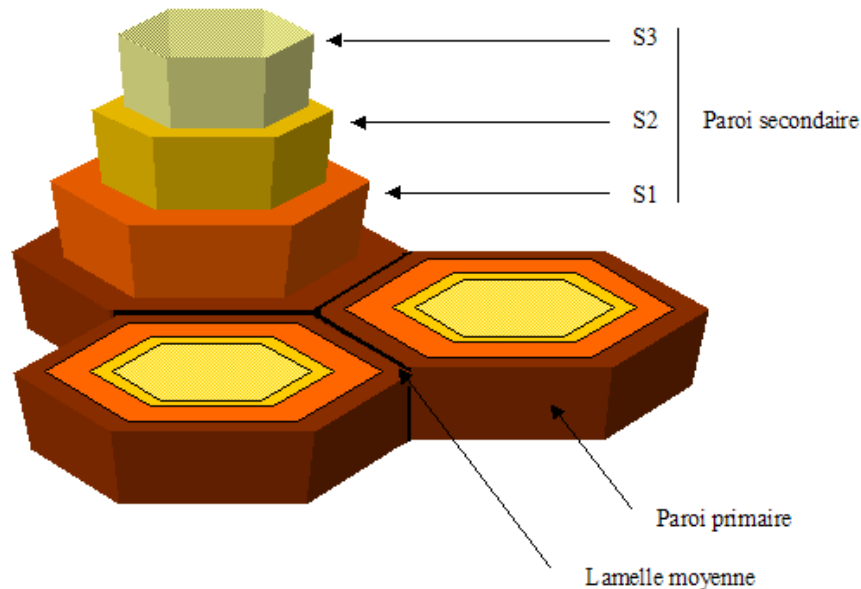


Fig. 7 : Les différents constituants la paroi (www.spectrosciences.com).

1-1/ La lamelle moyenne

La lamelle moyenne se forme au moment de la division cellulaire formant ainsi une cloison séparant deux cellules filles. Cette couche pariétale est riche en substance pectique. De part et d'autre de la lamelle moyenne sont mis en place la paroi primaire puis, selon la nature des tissus et des cellules, la paroi secondaire.

1-2/ Paroi Primaire

La paroi primaire, commune à toutes les cellules végétales, est un réseau lâche de microfibrilles de cellulose, englobée dans une matrice amorphe fortement hydratée de polysaccharides et de protéines. Formée au cours de la croissance cellulaire, elle est suffisamment élastique pour assurer l'élongation des cellules tout en restant résistante à la pression de turgescence. La paroi primaire comprend trois domaines structuraux qui interagissent entre eux. Le premier domaine est un composite de cellulose-xyloglucane qui représente environ 50 % de la masse pariétale. Celui-ci est inclus dans le deuxième domaine constitué d'une matrice de polysaccharide pectique qui représente 30 % de la masse pariétale. Le troisième domaine correspond aux protéines structurales. Les proportions entre ces différents composants varient selon les espèces considérées. Chez les dicotylédones telles que

le lin (Fig. 8 I), la paroi primaire renferme environ 40% de pectines, 15% de cellulose, 25% d'hémicelluloses et jusqu'à 15% de protéines structurales (Zabackis et al., 1995).

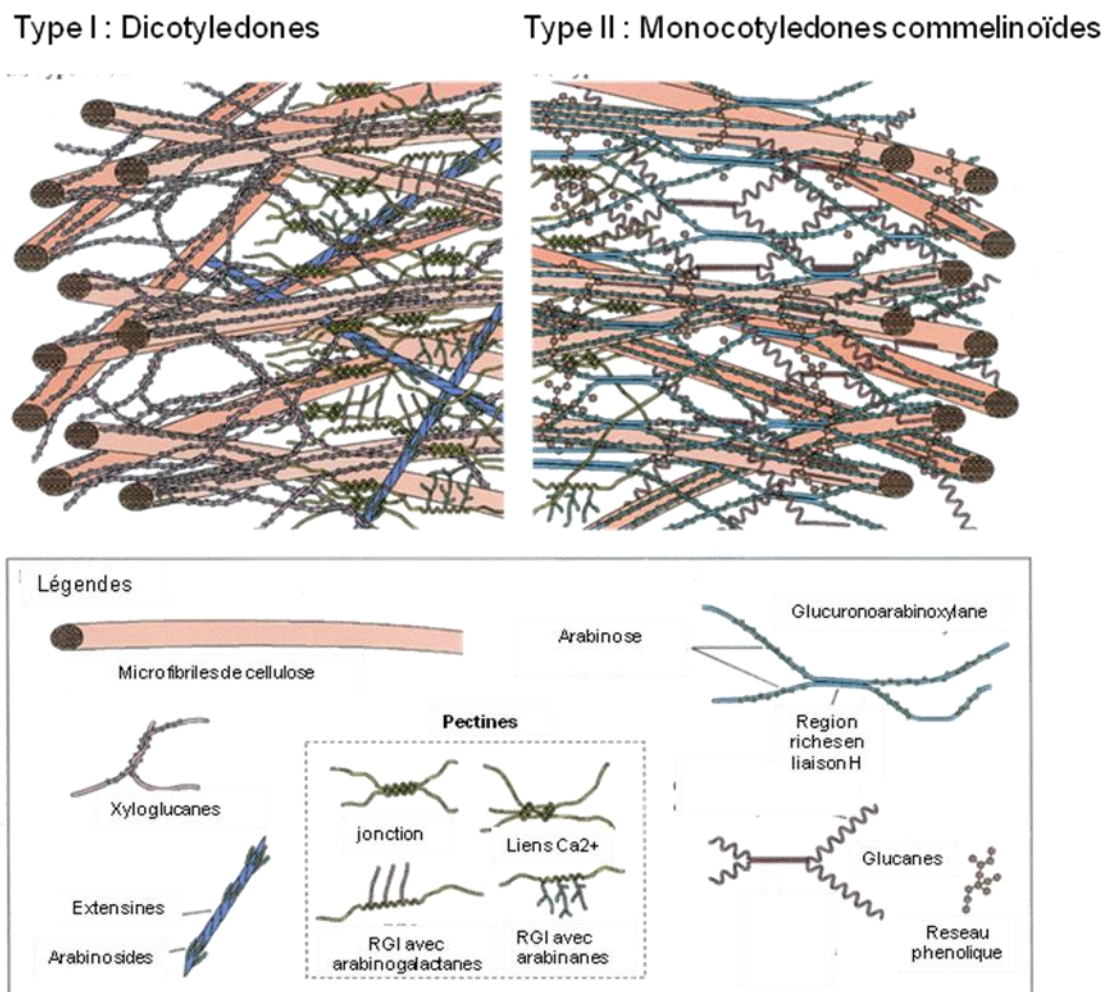


Fig. 8 : Modèles tridimensionnels des 2 types de parois primaires (Carpita et McCann, 2000)

Ce type de parois primaires dit de type I se distingue des parois primaires de type II (Fig. 8II), spécifiques des Poacées (Monocotylédones Commelinoïdes) (Carpita et Gibeaut, 1993). Le type II se caractérise par une faible proportion de pectines et protéines pariétales et la présence d'acides hydroxycinnamiques (Morreel et al., 2004). De plus, la cellulose est principalement associée à des glucuronoarabinoxylanes.

Selon le type cellulaire et/ou l'âge de la cellule, les parois primaires sont susceptibles d'être lignifiées.

1-3/ Paroi Secondaire

Les parois secondaires sont caractéristiques des tissus ou cellules de soutien (fibres) et de conduction (vaisseaux) chez les végétaux supérieurs et constituent l'essentiel de la masse du xylème (bois). La paroi secondaire s'intercale entre le plasmalème et la paroi primaire au

moment de l'arrêt de l'élongation cellulaire. De part leur rigidité, ces parois contribuent aux rôles de soutien et/ou de conduction des cellules correspondantes, autorisant ainsi le transport de la sève brute dans le bois (Mellerowicz et al., 2001). La paroi secondaire est beaucoup plus épaisse que la paroi primaire (d'un facteur 100 environ) et serait moins hydratée.

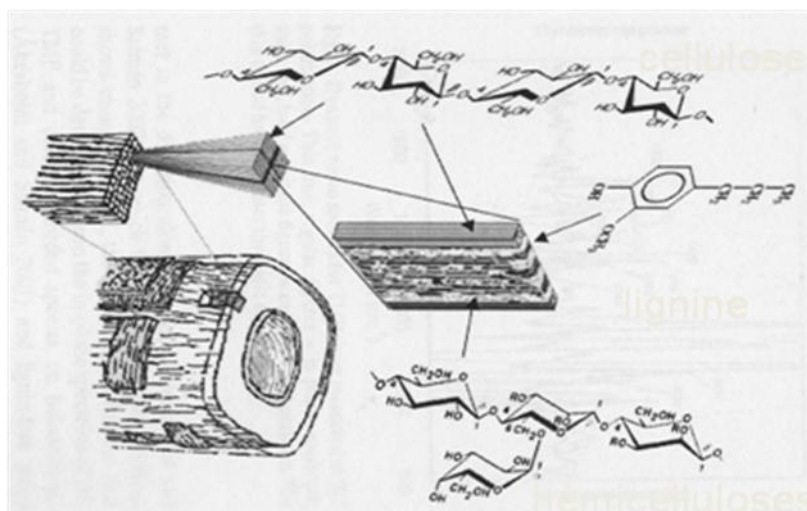


Fig. 9 : Schéma de la paroi secondaire, d'après Akerholm et Salmen, 2003

Le constituant majoritaire de cette couche pariétale est la cellulose dont les microfibrilles sont disposées selon une orientation définie par rapport à l'axe de la cellule. La variation de l'angle formé par les microfibrilles permet de distinguer trois sous-couches successives dans la paroi secondaire: S1 (adjacente à la paroi primaire), S2 et S3, cette dernière n'étant pas toujours présente (Fengel et Wegener, 1984). A maturité de la cellule, la cellulose est enrobée dans une matrice hémicellulosique généralement lignifiée où les pectines sont minoritaires. Les fibres de sclérenchyme sont dotées d'une paroi secondaire très épaisse, où l'épaisseur chez le lin et le chanvre peut atteindre 15-25 μm (Girault et al., 2000).

2) Composition

2-1/ Cellulose

La cellulose est le polymère majoritaire de la biosphère végétale, avec une production annuelle estimée à 180 milliards de tonnes (Englehardt, 1995). Cette macromolécule représente 20 à 30 % de la paroi primaire et 40 à 90 % de la paroi secondaire (Preston, 1986). La biosynthèse de la cellulose est effectuée au niveau de la membrane plasmique par un complexe enzymatique formé de protéines transmembranaires, les cellulose synthases (CeS), qui se déplacent à travers la membrane plasmique (Paredez et al., 2006) sous la forme de 6 particules arrangées de manière hexagonales formant une rosette (Lindeboom et al., 2008). Ces enzymes catalysent la fixation d'un résidu glucose via l'UDP-glucose (substrat), issu du

cytoplasme, sur l'extrémité réductrice de la chaîne en construction (Williamson et al., 2001). Cet assemblage polysaccharidique est constitué d'un motif de base, le cellobiose (deux D-glucopyranose reliés par une liaison osidique β (1 $\rightarrow$ 4)). Les chaînes de cellulose sont maintenues par des liaisons hydrogène et par des forces de Van der Waals pour former les microfibrilles (Nishiyama et al., 2002, 2003). Il en résulte un assemblage cristallin de plusieurs chaînes (Fig. 10). Chaque microfibrille correspondrait à 36 chaînes individuelles, néanmoins ce nombre pourrait varier entre 15 à 25 (paroi primaire) et atteindre 200 chaînes dans les parois secondaires (Kuga et Brown, 1991 ; Kennedy et al., 2007). Les zones cristallines alternent avec des domaines amorphes en proportion variable selon l'espèce et le type cellulaire. Il existe plusieurs formes de cellulose dont la cellulose I ou native qui possède deux formes cristallines les types α et β (Attala, 1984 ; Brown, 1996). C'est le type β qui prédomine chez les végétaux supérieurs.

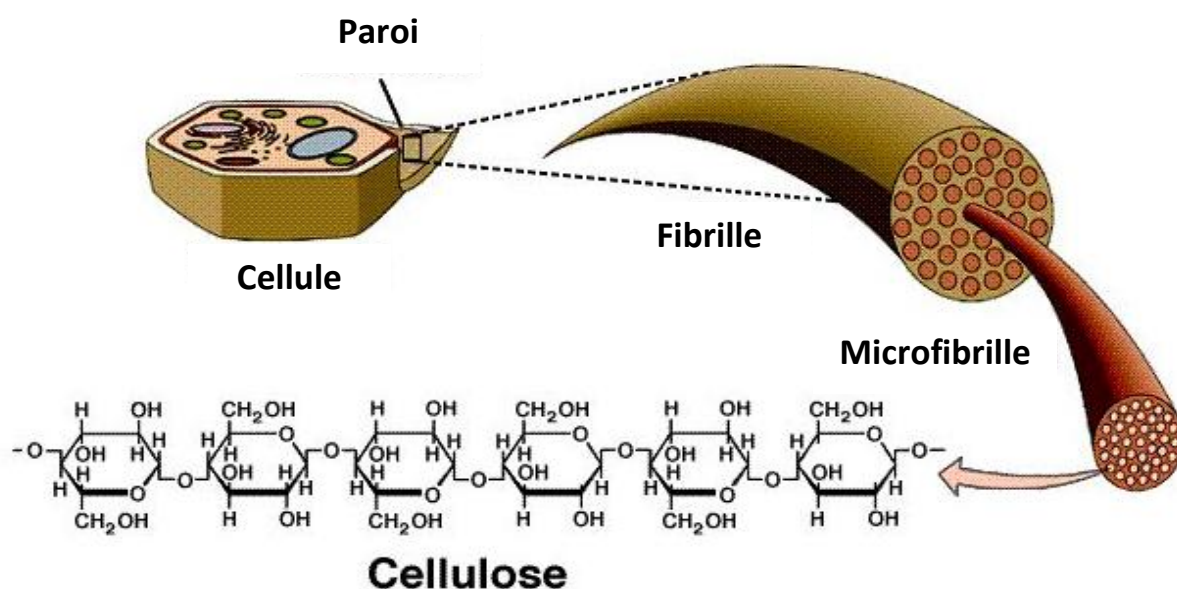


Fig. 10 : Cellulose et son organisation (<http://www.ualr.edu/botany>)

Une des caractéristiques des parois secondaires de fibres de lin est leur richesse en cellulose (près de 80%) par rapport au xylème dont la teneur en cellulose varie de 35 à 55% (Buranov et Mazza, 2008). La cellulose des fibres de lin, essentiellement sous forme I β (plus de 60%), présente un degré de cristallinité élevé en comparaison du xylème ou d'autres fibres longues. Ce taux de cristallinité est proche de 65, 50, et 40 % respectivement dans les fibres de lin, chanvre et kénaf (Bonatti et al., 2004 ; Muller et al., 1998, 2000 ; Sturcova et al., 2004). Dans le cas du lin, les microfibrilles sont déposées par la paroi secondaire des fibres de lin en formant un angle inférieur à 10°C par rapport à l'axe de la cellule.

Les pectines sont des polysaccharides hétérogènes, branchés et fortement hydratés, dont le motif unitaire principal est l'acide D-galacturonique. Ces polysaccharides sont synthétisés dans l'appareil de Golgi et exportés vers la paroi. Des glycosyltransférases seraient impliquées dans la synthèse des pectines par exemple pour le transfert d'acide galacturonique (Bouton et al., 2002). Les pectines dites "lisses" (homogalacturonanes) sont généralement distinguées des pectines ramifiées ou "chevelues" (rhamnogalacturonanes de type I et de type II). D'autres pectines minoritaires (arabinanes, galactanes, arabinogalactanes) sont également présentes. Les pectines ont de nombreux rôles. Elles apportent notamment des surfaces chargées qui permettent la modulation du pH dans la paroi et la balance ionique, régulant ainsi l'adhésion cellulaire dans la lamelle moyenne. Elles servent également de molécule de reconnaissance dans la signalisation cellulaire et les mécanismes de défense (Carpita et Gibeaut, 1993).

a) Homogalacturonanes

Les homogalacturonanes (HG), également désignés par acides polygalacturoniques (PGAs) sont principalement constitués d'acide α -D-galacturonique (GalA) (environ 200) non branchés et disposés en hélice. Ces chaînes hélicoïdales peuvent établir des liaisons avec des Ca^{2+} pour former les structures dites en "boîtes à œuf" (Lacoux, 2002). Les PGAs sont les pectines majoritaires des fibres de lin à maturité et sont principalement localisés au niveau du complexe lamelle moyenne-paroi primaire (Morvan et al., 2003) ainsi que dans les jonctions cellulaires mais ne sont pas présents au niveau de la paroi secondaire (His et al., 2001)

b) Les arabinanes, galactanes, et arabinogalactanes

Ces types de pectines sont composés de monosaccharides neutres tels que le galactose et l'arabinose (Fig. 11). Les arabinanes sont une succession d'arabinose le plus souvent liés en (1-5) formant de courtes chaînes en hélices. Les galactanes sont des chaînes de galactose lié en β (1-4). Les galactanes, sont particulièrement abondants au début du développement de la fibre de lin (3 à 7% de la matière sèche des fibres ce qui constitue 40 à 80 % des polymères non cellulosique) et participeraient à l'orientation des microfibrilles de cellulose au cours de l'épaississement de la paroi secondaire (Gorshkova et Morvan, 2006). Les arabinogalactanes (AG) sont regroupés en deux familles. D'une part, les arabinogalactanes de type I (AG-I) sont composés d'une chaîne de (1-4) β -galactane avec principalement des unités t-arabinosyl sur le O-3 des résidus galactoses. D'autre part, les arabinogalactanes de type II (AG-II) sont constitués d'une chaîne principale de (1-3) β -galactanes substituées en position O-6 par des chaînes (1-6) β -Galactane ou (1-4) β -Galactane (Carpita, 1996). Les (1-4) β -Galactanes sont localisés dans la zone proche de la membrane plasmique (His et al., 2001)

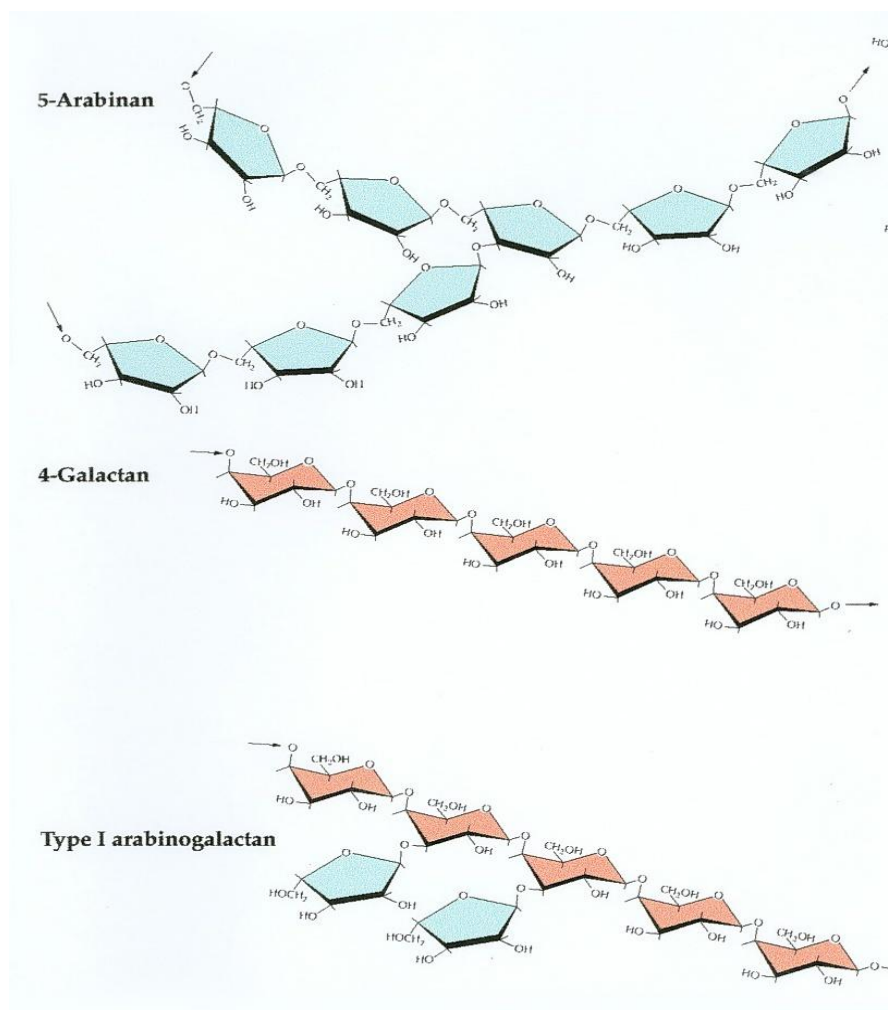


Fig. 11 : Arabinanes, galactanes, et arabinogalactanes (Carpita et McCann, 2000)

c) Rhamnogalacturonanes

Les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I), (Fig. 12), sont des hétéropolymères de (1-2) α -L-rhamnosyl-(1-4) α -D-GalA répétés (Lau et al., 1985). Les unités rhamnosyl peuvent être interrompues par de longues séquences d'homogalacturonanes (Jarvis, 1984). Dans les fibres de lins en cours de développement le dépôt des pectines de types rhamnogalactanes consiste en 55-85% de galactose (Hotte et Deyholos, 2008). En particulier, le squelette RG-I est substitué par des chaînes de galactanes de longueur variable (Gur'janov et al., 2007). Les RG-I associés aux galactanes ou arabinanes sont localisés de manière abondante dans toute la paroi secondaire des fibres matures (His et al., 2001).

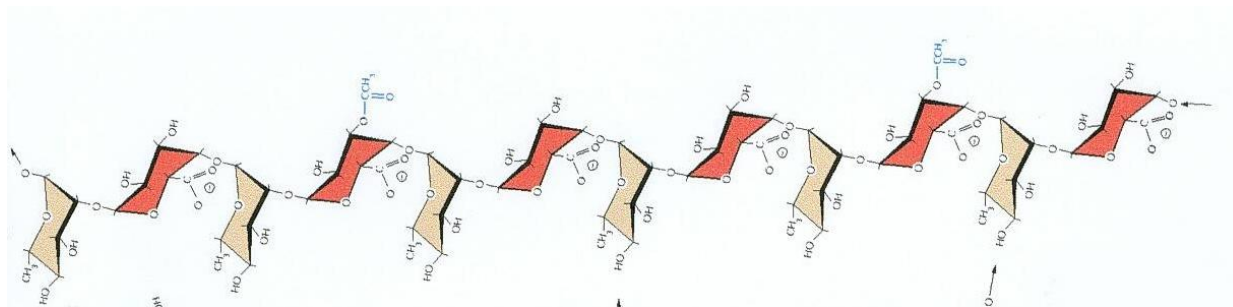


Fig. 12 : RG-I (Carpita et McCann, 2000) La couleur rose pâle correspondant au α -L-rha et la couleur rouge au α -D-GalA

Les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II), (Fig. 13), présentent une grande diversité structurale (nature des oses et type de liaisons) (Darvill et al., 1978). Ils se caractérisent par une faible masse moléculaire et un faible degré de polymérisation (Brett et Waldron, 1996). Leur chaîne principale est un motif répété de 8 (1-4) α -GalA séparé par un trisaccharide riche en rhamnose (Vidal et al., 2000).

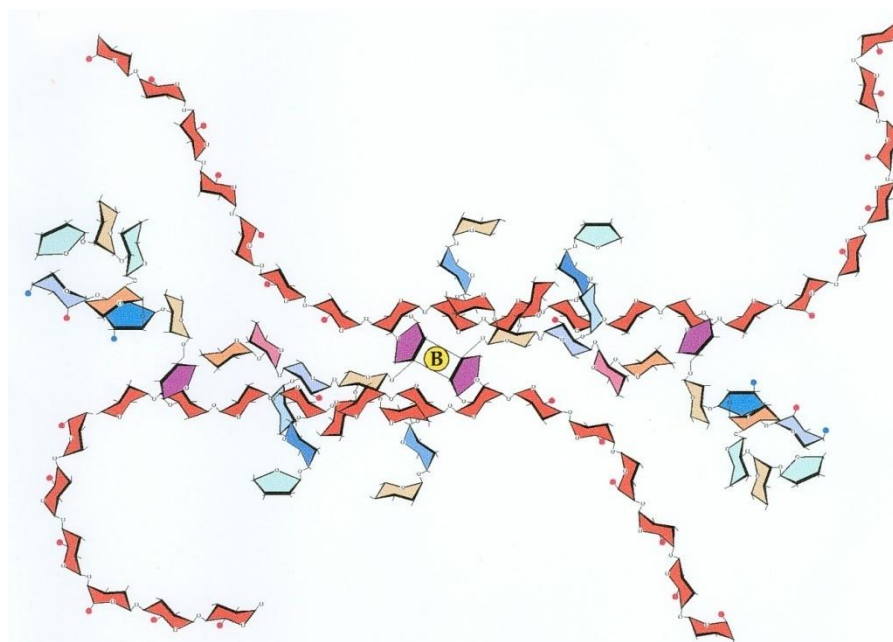


Fig. 13 : RG-II (Carpita et McCann, 2000) La couleur rouge correspond aux groupes méthyle, la couleur bleu aux groupements acétyle et la couleur violette aux apioses.

Les RG-II sont susceptibles de former des dimères en s'associant de manière covalente via des liaisons diester établies avec un ion bore (Ridley et al., 2001). Des motifs RG-II ont été détectés en faible quantité dans les fibres de lin par immunocytochimie (Morvan et al., 2003).

2-3/ Hémicelluloses

Ces polysaccharides représentent environ 30 % de la matière sèche de la paroi primaire et 10 à 30 % de la matière sèche de la paroi secondaire (Carpita et Gibeaut, 1993). Synthétisées dans l'appareil de Golgi, les hémicelluloses sont ensuite excrétées dans la matrice extracellulaire (Carpita, 1996). Chez le lin, la teneur des fibres périphloëmiennes en hémicelluloses (11-18% ; Baley et al., 2002) est généralement inférieure à celles du xylème (13 à 26% ; Buranov et Mazza, 2008).

a) Xyloglucanes

Les xyloglucanes (Fig. 14) sont essentiellement présents dans la paroi primaire des dicotylédones et sont généralement absents des parois secondaires. Les xyloglucanes sont des chaînes linéaires de (1-4) β -D-glucose dont 70-80 % de glucose sont liés à des unités α -D-Xylose en position O-6 (Mc Cann et Roberts, 1994). Certaines unités xylose sont substituées par de courte chaîne à 1, 2 ou 3 unités arabinoses et galactoses, le galactose pouvant être substitué par du fucose. Les xyloglucanes seraient localisés dans les zones amorphes des microfibrilles de cellulose. Le mode d'assemblage des chaînes de cellulose pourrait être influencé par la disponibilité des xyloglucanes sur les sites d'assemblages (Hayashi et al., 1987)

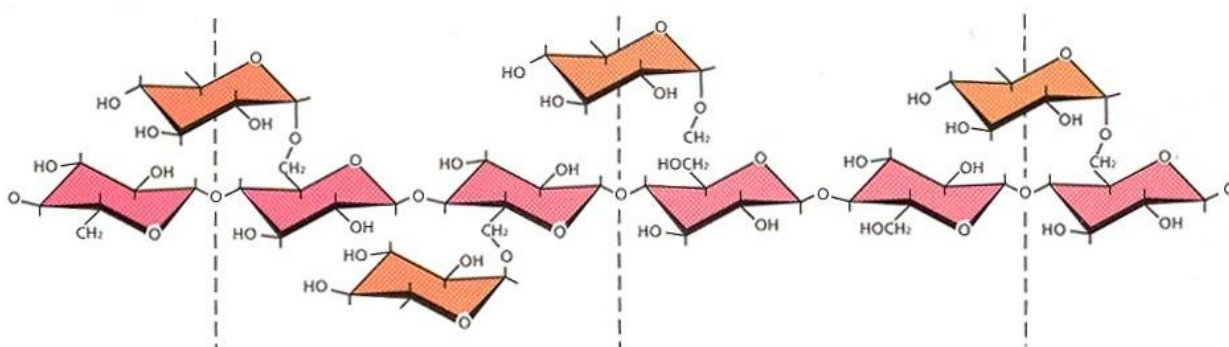


Fig. 14 : Xyloglucanes (Carpita et McCann, 2000).

Les D-Xylosyl sont ajoutés à 3 unités glycosyls contiguës de la chaîne principale pour produire un heptasaccharide

b) Xylanes et Mannanes

Les xylanes sont les hémicelluloses majoritaires des parois secondaires chez les Angiospermes (15 à 30%). Ce sont des chaînes linéaires de (1-4) β -Xylose qui selon les espèces varient par la nature et la proportion des substitutions (acétyle, acide glucuronique, arabinose). Les arabinoxylanes riches en substitution arabinose sont caractéristiques des graminées ; dans le cas des Angiospermes dicotylédones, les principales décorations de la chaîne de xylane sont des acides glucuroniques ou acide 4-O-méthyl glucuronique liés en O-2

au D-xylose (glucuronoxylanes) (Fig. 15) . Dans les parois secondaires les hémicelluloses les plus représentées sont les glucuronoxylanes (Brett et Waldron, 1996).

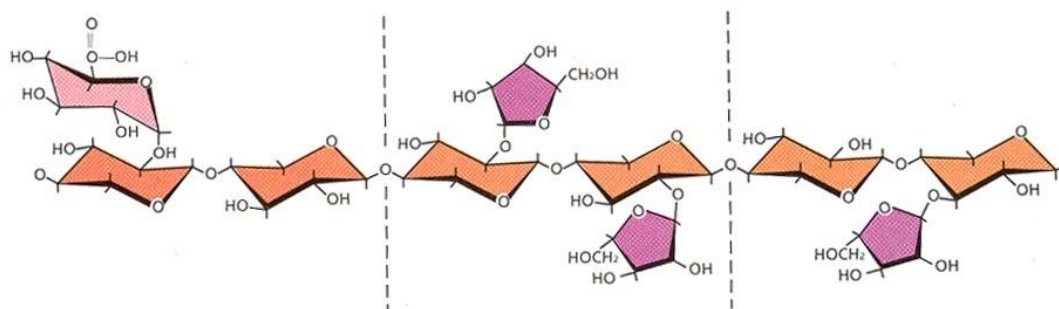


Fig. 15 : Glucuronarabinoxylanes (Carpita et McCann, 2000). L-Ara des GAXs attachés en position O₂

Les mannanes sont les hémicelluloses majoritaires des Gymnospermes (10-20 % en masse) et sont très faiblement représentés chez les Angiospermes (moins de 5%). La chaîne principale est formée d'unités mannose et glucose liés en β (1 $\rightarrow$ 4) dont la proportion varie selon l'origine botanique. Les chaînes peuvent être ramifiées par des unités de galactose (galactoglucomannanes) ou des résidus acétyles (acétylglucomannanes). (Carpita et McCann, 2000)

Les hémicelluloses des fibres externes de lin sont majoritairement des β (1 $\rightarrow$ 4) glucomannanes (Fig. 16) à l'inverse des polysaccharides non cellulotiques du xylème qui renferment principalement des méthylglucuronoxylanes. (Mc Dougall, 1993 ; Gorshkova et al., 1996 ; Akin D. E. et al., 1996 ; Morvan et al., 2003).

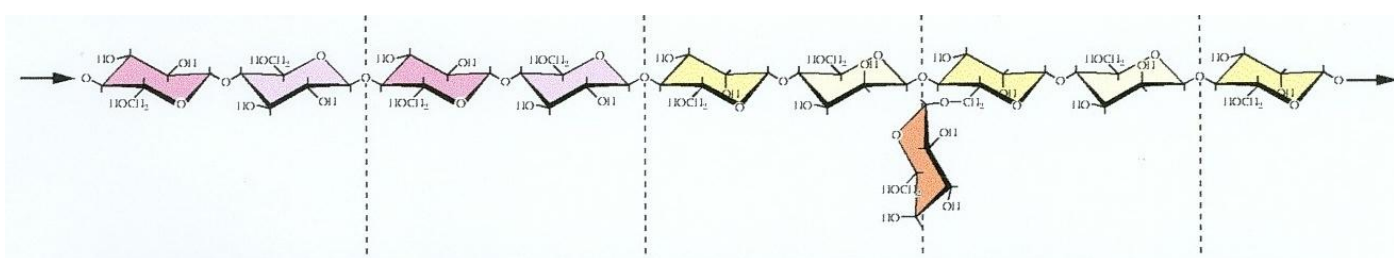


Fig. 16 : (Galacto)Glucomannanes (Carpita et McCann, 2000). (1-4) D-Man et (1-4) D-Glc avec différentes quantités de D-Gal terminaux ajoutés en position 0-6 des unités mannose

2-4 /Protéines pariétales.

Les protéines pariétales représentent moins de 10% des parois primaires et secondaires. Certaines protéines pariétales enzymatiques ou non sont impliquées dans la maturation et le développement de la paroi. D'autres protéines participent au réseau pariétal. Ces protéines de structure sont caractérisées par la prédominance de certains acides aminés

tels que les hydroxyproline/proline (Hyp/Pro), serine/threonine (Ser/Thr) et glycine et sont réparties en i) Hydroxyproline rich protein (HRGPs) incluant extensines et Arabinogalactan rich protein (AGPs) ; glycoprotéines structurales rencontrées principalement dans la paroi primaire ii) Proline rich protein (PRPs) et iii) les Glycin rich protein (GRPs) qui seraient plutôt localisées dans la paroi secondaire.

a) HRGP : Hydroxyproline rich protein

α) Extensines

Les extensines (Fig. 17) sont codées par une famille multigénique (22 gènes chez *Arabidopsis thaliana*). Ces protéines comportent une région répétitive riche en Proline/Hyp dont le principal motif est Ser(Hyp)₄ séparé par Val, Tyr, Lys et His. Les extensines sont modérément glycosylées avec de petits arabinosides. La plupart sont insolubles dans la paroi par l'établissement de liaisons covalentes interchaînes et/ou d'autres composants pariétaux (Otte et Barz, 2000 ; Deepack et al., 2007).

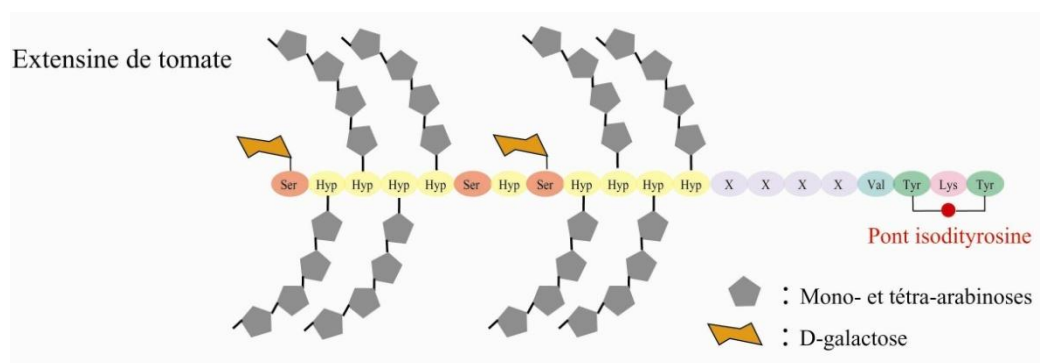


Fig. 17 : Extensine de tomate (Carpita et McCann, 2000)

β) AGP : Arabinogalactan protein

Les AGPs (Fig. 18) sont des protéoglycanes fortement glycosylés (jusqu'à 95 % de carbohydrates). Elles seraient localisées dans les parois, mais aussi dans les vésicules du Golgi et la membrane plasmique. Elles sont caractérisées par une richesse en Pro(Hyp), Ala et Ser/Thr, sans motifs commun mais possédant des domaines similaires aux PRPs et extensines (Carpita et Mc Cann, 2000). De nombreuses AGPs ont une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui leur confère une certaine mobilité latérale au sein de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Chatterjee et Mayor, 2001). D'autres AGPs chimériques possèdent un domaine fascicline like supplémentaire : les Fascicline Like AGP (FLAs) (22 gènes chez *Arabidopsis thaliana*). Elles seraient potentiellement impliquées dans l'adhésion cellulaire (Schultz et al., 2002) Les AGPs ont été mises en évidence dans les parois secondaires riches

en cellulose tels que le lin, le chanvre ou encore les parois du bois de réaction de peuplier (Knox, 1997 ; Girault et al., 2000 ; Roach et Deyholos, 2007)

Les AGPs pourraient avoir de multiples fonctions dans la communication, la formation d'un tampon entre la paroi et la membrane plasmique ou bien encore des rôles de communications.

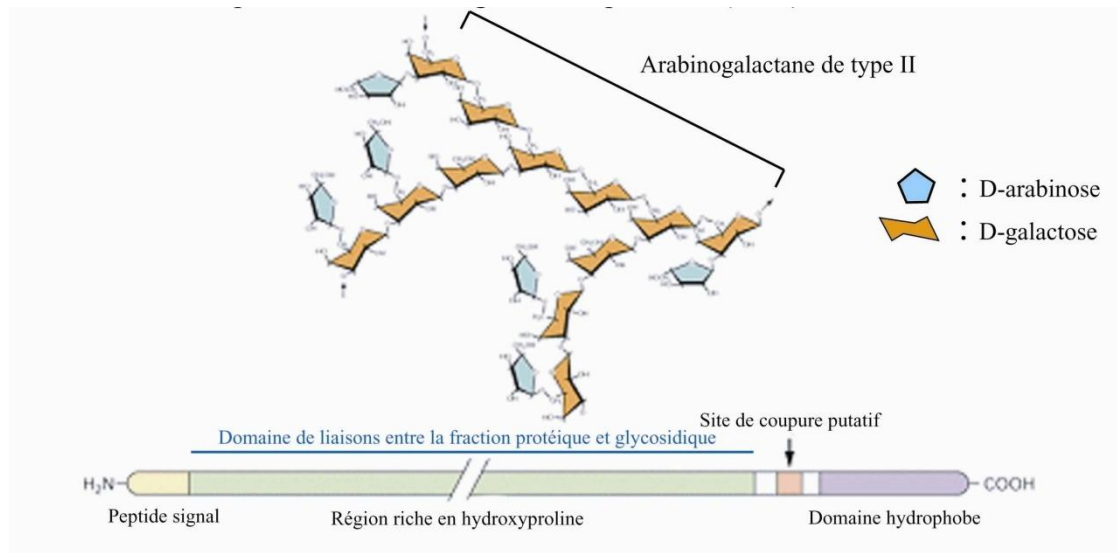


Fig. 18 : Structure putative des AGPs (Carpita et McCann, 2000)

b) PRP : Prolin rich protein

Les PRPs (Fig. 19) sont composées au moins d'une répétition décamerique d'acides aminés : Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys-Pro-Hyp-Val-Glu-Lys (Datta et al., 1989). Ces protéines, codées par une famille multigénique, sont faiblement ou non glycosylées.

PRP de soja



Fig. 19 : Structure d'une PRP de Soja (Carpita et McCann, 2000)

c) GRP : Glycin rich protein

Les GRPs (Fig. 20) contiennent plus de 70 % de glycine et sont dépourvues de séquence riche en proline. Les séquences répétées correspondent à la formule $(Gly)_nX$ où X peut être n'importe quel acide aminé et n est compris entre 1 et 5. Ces protéines ne sont pas glycosylées et peuvent être réticulées. Les GRPs interagissent avec les kinases associées à la paroi WAKs (Wall Associated Kinases). Ce sont des protéines transmembranaires qui possèdent un domaine Serine/Threonine kinase cytoplasmique et un domaine extracellulaire.

Les WAKs sont liées à la paroi par une association covalente avec les pectines. La capacité des WAKs de se lier à la fois aux GRPs et aux pectines peut être reliée aux rôles de régulation dans l'expansion cellulaire.

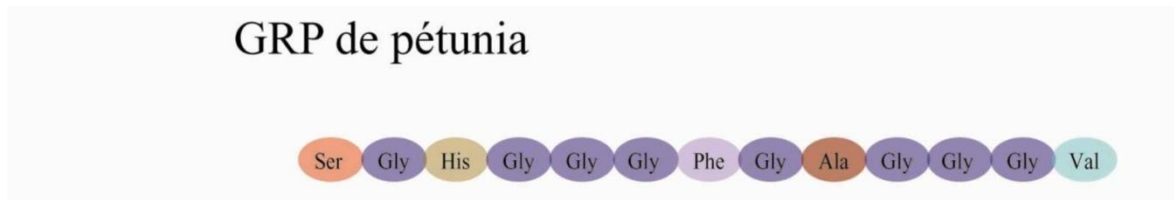


Fig. 20 : Structure d'une GRP (Carpita et McCann, 2000)

En fonction du type cellulaire, la paroi de certaines plantes peut contenir des composés phénoliques, en particulier les lignines.

2-5/ Lignines

La lignine (Fig. 21) est un polymère phénolique rencontré chez tous les organismes végétaux vascularisés (Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes). Elle représente environ 30 % du carbone organique de la biosphère. La lignine contribue à la rigidité des parois, et à l'imperméabilité des structures pariétales permettant le transport efficace de l'eau et des solutés via le système vasculaire (Boerjan et al., 2003). Elle peut également être synthétisée en réponse à des stress biotiques ou abiotiques créant alors une barrière physique limitant la pénétration des agents pathogènes ainsi que les échanges avec le milieu externe (Lacombe et al., 2000)

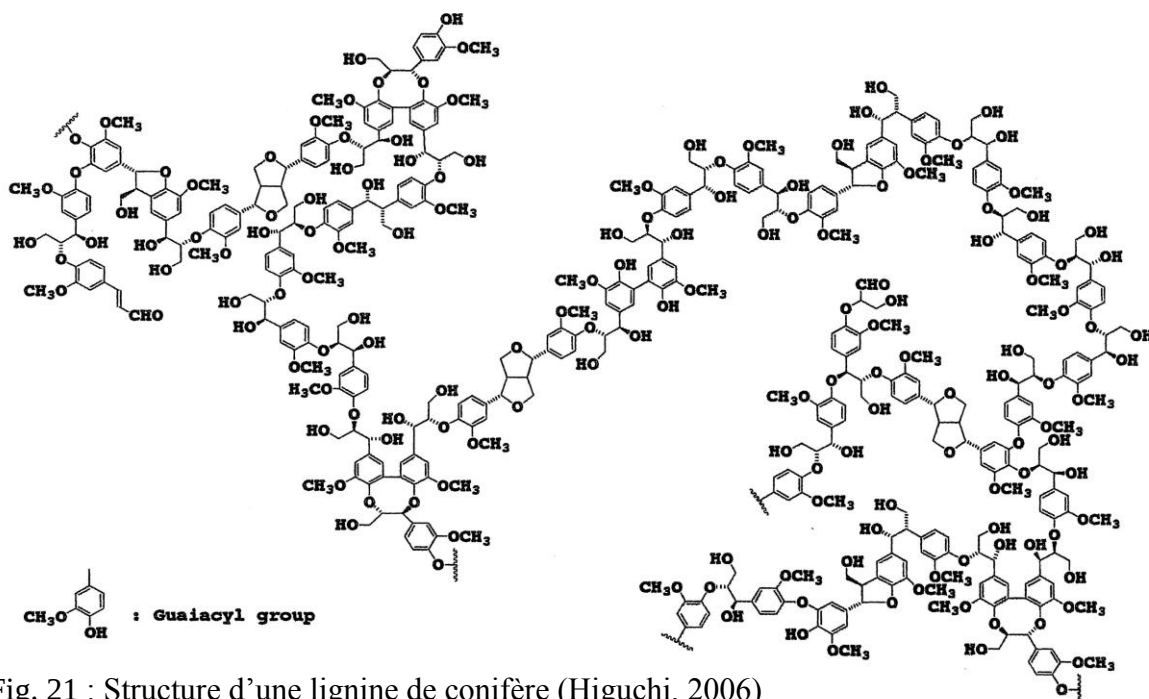


Fig. 21 : Structure d'une lignine de conifère (Higuchi, 2006)

a) Composition et structure

Ce complexe tridimensionnel aromatique résulte de la polymérisation oxydative de différentes unités monomériques dérivant de la phénylalanine. Cette polymérisation intervient au niveau de la matrice polysaccharidique pariétale contrairement aux polysaccharides non cellulosiques. La lignine résulte principalement de la polymérisation de trois alcools hydroxycinnamyls différant par leur degré de méthylation : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et enfin l'alcool synapyls. Ces monolignols donnent respectivement les unités *p*-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S) (Sarkanen et Ludwig, 1971), (Fig. 22). Ces sous unités sont associées lors du processus de la lignification par des réactions de couplages radicalaires donnant lieu à des liaisons multiples (Fig. 23). La liaison la plus fréquente est généralement de type alkyle-aryle éther (β -O-4, dite «non-condensée»). Ces structures sont les plus faciles à cliver chimiquement. Les autres liaisons, dites «condensées» sont beaucoup plus résistantes à la dégradation chimique ; elles regroupent les liaisons β -5, β - β , 5-5, 5-O-4 ou encore β -1 (Boerjan et al., 2003). Les liaisons biphenyles 5-5, particulièrement résistantes, impliquent les C5 du cycle aromatique des unités guaiacyls (Rolando et al., 2004)

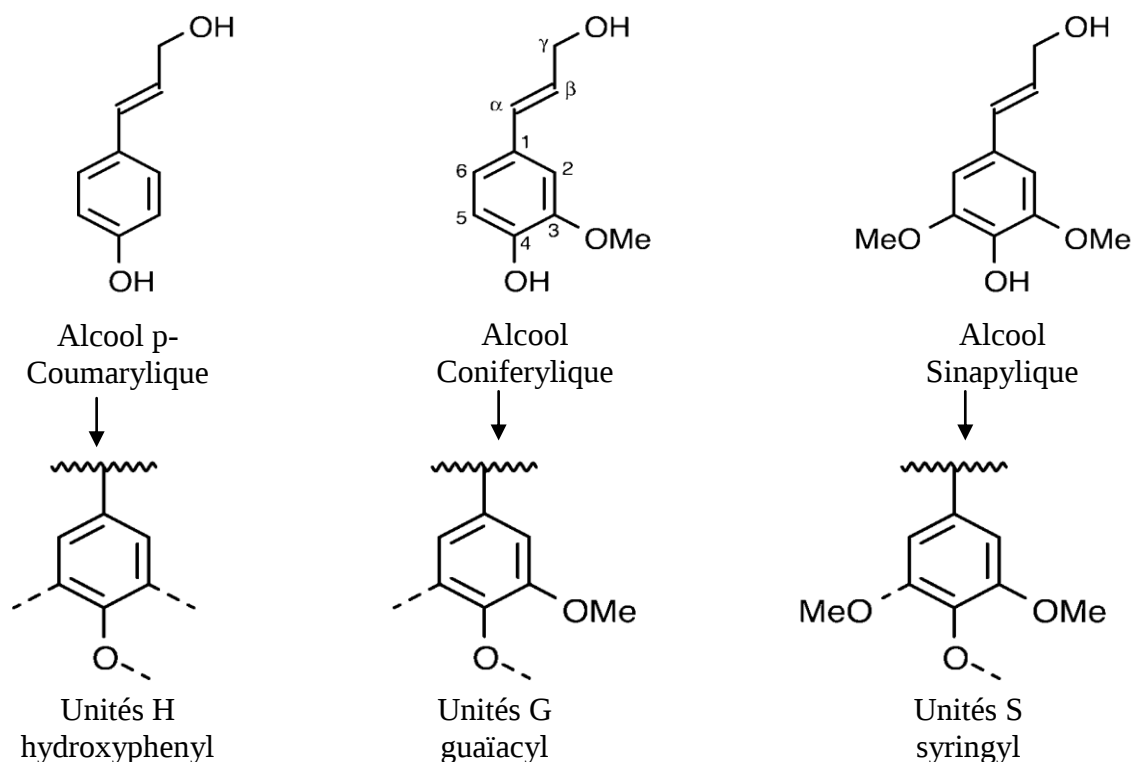


Fig. 22 : Structures des trois alcools et leur sous unités qui en dérivent. D'après Ralph et al., 2004.

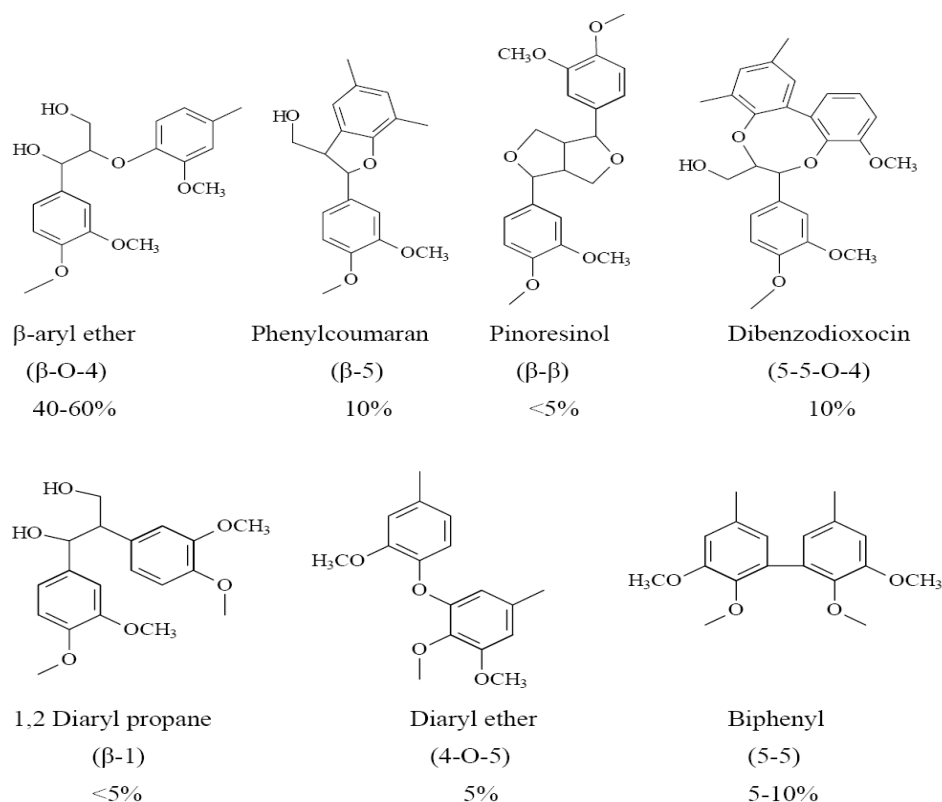


Fig. 23 : Les différents types de liaisons présentes dans la lignine d'après Higuchi (2006)

b) Hétérogénéité

La quantité et la composition des lignines est variable selon l'espèce, le type cellulaire, les couches pariétales individuelles (S1, S2 ou S3), les stades de développement ou bien encore les conditions environnementales (Lewis, 1999 ; Lewis et al., 1999).

Au sein du règne végétal, trois types de lignines peuvent être distinguées. Les lignines des Gymnospermes sont constituées essentiellement de G. Chez les Angiospermes, les lignines sont constituées d'un mélange de G et S en proportions variables. Ainsi la lignine de lin est caractérisée par la prédominance d'unité G (Akin et al., 1996 ; Gorshkova et al., 2000 ; Day et al., 2005). Ce dépôt de lignine intervient dans toute l'épaisseur des parois cellulaires du xylème, mais ne concerne que les ciments intercellulaires des fibres périphloëmiennes. Par contre chez le lin, Day et al., en 2005, montre par immunolocalisation que la lignine est présente dans la lamelle moyenne, la paroi I ainsi que dans la couche S1 de la paroi II. Les proportions relatives des liaisons intermonomères varient en lien avec la composition en monomère.

3) Dynamique d'assemblage du réseau pariétal

L'évolution de la nature chimique et de l'architecture de la paroi est étroitement associée aux différentes phases de la vie de la cellule. On peut dégager trois moments clés : l'expansion, l'épaississement et enfin la lignification.

L'élongation cellulaire se traduit par des changements structuraux de la paroi. En effet, au cours de l'expansion (augmentation de la taille de la cellule en 2 ou 3 dimensions) ou de l'élongation (expansion entravée en 1 dimension), l'architecture pariétale existante doit évoluer afin d'augmenter la surface de la paroi par l'incorporation de nouveaux constituants. L'architecture de la paroi doit donc être extensible via des mécanismes de relâchement de la matrice pariétale permettant la séparation des microfibrilles et l'insertion de polymères nouvellement synthétisés. Les cellules peuvent augmenter de 10, 100 voir même 1000 fois leur longueur originelle. L'orientation des microfibrilles participe au contrôle de l'axe de croissance cellulaire et détermine alors le plan d'élongation (Carpita et McCann, 2000). Au cours de l'élongation cellulaire, les microfibrilles sont disposées transversalement à l'axe principal de la cellule dans la paroi primaire. Les interactions avec les xyloglucanes verrouillent l'échafaudage de cellulose, et contribuent à maintenir une certaine distance entre les microfibrilles.

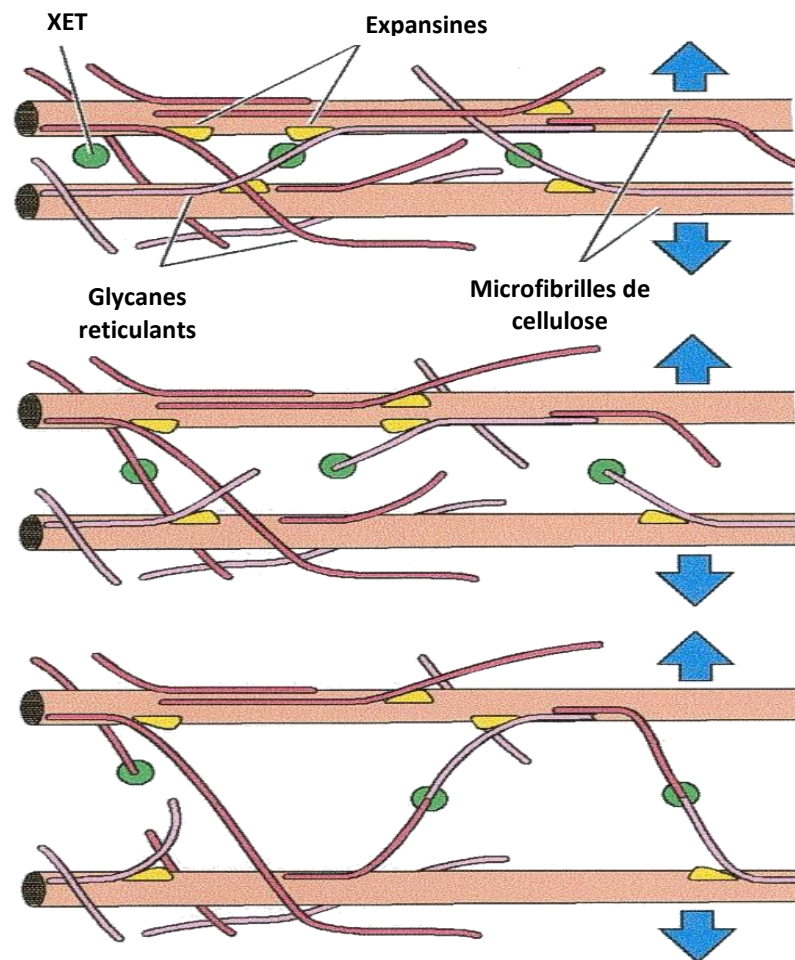


Fig. 24 : Assemblage dynamique de la paroi (Carpita et McCann, 2000)

Conjointement à l'assemblage de ces structures, une certaine plasticité de la paroi est nécessaire à l'élongation de la cellule (Fig. 24). Cette relative élasticité est assurée par différentes protéines, enzymatiques ou non, mais également par une diminution du pH de la paroi en concomitance avec le déplacement des ions calcium. Des protéines non enzymatiques comme les expansines α et β sont notamment impliquées dans la rupture des liaisons hydrogènes entre la cellulose et les hémicelluloses (glucanes/xyloglucanes) (Cosgrove, 2000). La dissociation des assemblages xyloglucanes/microfibrilles de cellulose est considérée comme une étape limitée à la phase de croissance.

Les xyloglucanes endotransglucosylase/hydrolases (XTHs) sont des enzymes spécifiques du réarrangement des xyloglucanes. Ces protéines assurent deux fonctions : premièrement, une activité de xyloglucane hydrolase (qui coupe la chaîne principale du xyloglucane, et deuxièmement une activité de xyloglucane endotransglucosylation (qui permet de relier l'extrémité nouvellement libérée à une autre chaîne de xyloglucane) (Rose et al., 2002). Ces fonctions assurent la transglycolysation des xyloglucanes et facilitent le glissement des microfibrilles de cellulose nécessaires à l'expansion cellulaire.

Les XET (l'activité endotransglucosylation des XTHs) permettent le réalignement des chaînes de xyloglucanes dans différentes strates pendant la croissance mais également lors de l'incorporation de nouveaux éléments constitutifs des parois (Carpita et McCann, 2000).

A l'arrêt de l'élongation cellulaire, l'architecture de la paroi primaire est verrouillée via l'établissement de liaisons intra-pariétales. En particulier, l'insertion des extensines et la réticulation des PRPs via des peroxydases forment un cadre hétéropeptidique qui bloque les microfibrilles de cellulose au sein du réseau tri dimensionnel de la paroi (Schnabelrauch et al., 1996). Ces associations confèrent une rigidité additionnelle à la paroi susceptible de restreindre l'expansion cellulaire. D'autres protéines enzymatiques, telles que les pectines méthylestérases (PME) permettent de modifier le niveau de compaction du réseau pectique par déméthylation des pectines, limitant alors l'expansion cellulaire (Wakabayashi et al., 2003). De plus, les extensines peuvent également moduler le réseau « gel » formé par les pectines via le motif Tyr-Lys-Tyr-Lys, capable d'interagir avec les RG-I. D'autres protéines seraient nécessaires au blocage des extensines elles mêmes (Chen et Varner, 1985).

A l'arrêt de la croissance de la paroi primaire, la paroi secondaire est mise en place par dépôt de cellulose, hémicellulose, protéines et de composés phénoliques tels que la lignine. Le dépôt de lignine dans une matrice préexistante donne lieu à l'établissement de différents types

d'interactions covalentes entre ce polymère phénolique et les autres constituants. Les liaisons covalentes entre la lignine et les polysides forment des structures communément désignées LCC (Lignine Carbohydrates Complexes). Ces liaisons peuvent impliquer des liaisons benzyl éther, benzyl ester et les liaisons glycosidiques entre les lignines et les hémicelluloses (Aimi et al., 2005). L'ensemble de ces liaisons ester et/ou éther contribue à la réticulation des polymères pariétaux en permettant la formation des ponts entre les polysides pariétaux et/ou entre les lignines et les polysides, ce qui accroît la rigidité de la paroi. La structure et l'association des polysides avec la lignine varient en fonction de différents facteurs biologiques, du type tissulaire ou de l'espèce considérée et sont susceptibles de participer à la dynamique de la paroi (Barakat, 2007).

La biosynthèse des constituants pariétaux et leur assemblage dans les parois sont soumis à de nombreux facteurs de régulation. L'ensemble de ces événements suppose un mécanisme de contrôle très évolué.

III/Lignification des parois

1) Dynamique et organisation spatiale

Le dépôt et la composition (incorporation relative des différents monolignols) de la lignine est programmé à la fois temporellement et spatialement (Terashima et al., 1993 ; Boerjan et al., 2003), (Fig. 25). La nature de la matrice polysaccharidique et l'orientation des microfibrilles influencent le dépôt de lignine (Taylor et al., 1992).

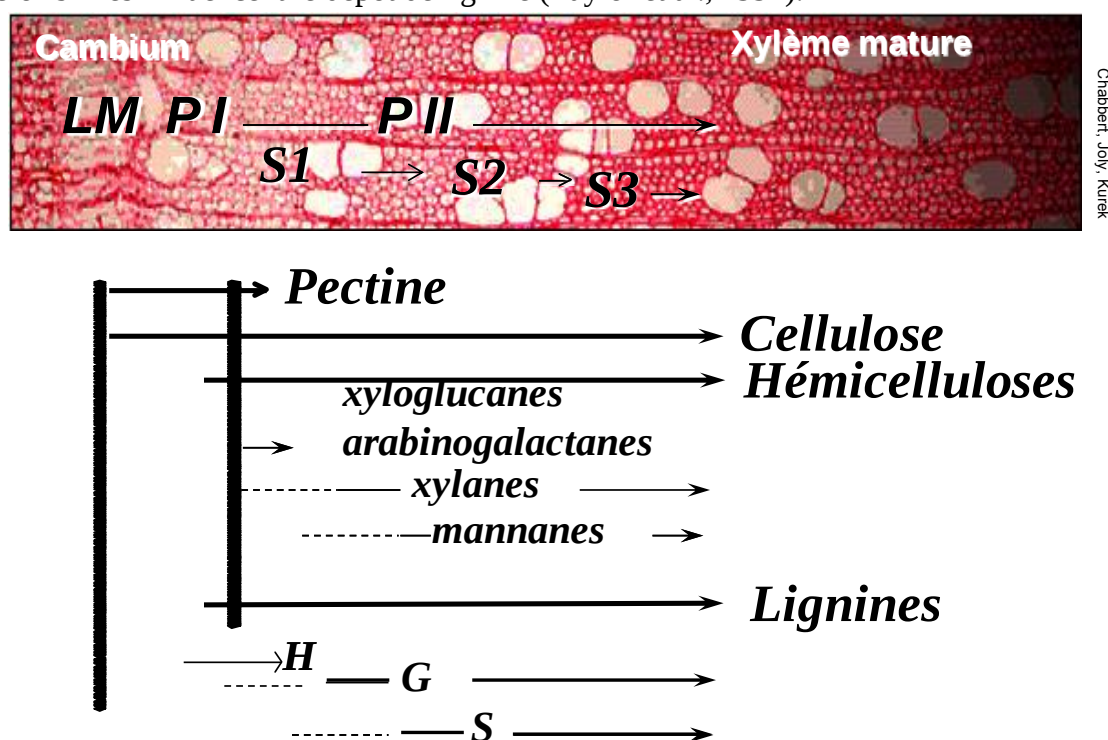


Fig. 25 : Organisation spatiale de lignification dans la paroi

Dans les bois durs, la synthèse des lignines est initiée au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire des coins de cellules au moment de la formation des couches pariétales S1 et S2 de la paroi secondaire. Ce dépôt de lignine s'étend ensuite vers la paroi secondaire (après la formation de S3) (Terashima et al., 1993 ; Boerjan et al., 2003). La lignification des parois des vaisseaux commence au stade jeune de la différenciation du xylème alors que la lignification des fibres a lieu lors des stades intermédiaire et âgé.

Des expérimentations en autoradiographie ont montré que les 3 unités de monolignols (H, G, S) sont incorporées à différents stades de la formation de la paroi. Les unités H sont principalement retrouvées dans les coins de cellules et la lamelle moyenne pendant la formation de la couche S1. Le dépôt de la lignine de type G a lieu tout au long du développement du stade jeune jusqu'au stade âgé. Les unités S sont incorporées ultérieurement, en particulier dans les fibres secondaires de la paroi lorsque la formation de la couche interne de la paroi secondaire a déjà commencé (Fukushima et Terashima, 1990). Il en résulte un gradient de composition et de teneur en lignines.

2) Voie de biosynthèse des monolignols

La biosynthèse des lignines implique différentes étapes (Fig. 26). Les nombreux travaux réalisés au cours de ces 20 dernières années ont apporté des avancées significatives dans la connaissance de ces voies de biosynthèse. Les premiers schémas de biosynthèse des monolignols mentionnaient la synthèse des esters CoA hydroxycinnamoyls, précurseurs communs des flavonoïdes, lignines, coumarines et autres composés phénoliques de faibles poids moléculaires via la voie des phénylpropanoïdes (Hahlbrock et Scheel, 1989). Ces esters CoA hydroxycinnamoyls sont ensuite canalisés dans la voie des lignines pour produire les monolignols G et S. Vers le milieu des années 1990, la découverte d'une nouvelle OMT, la CCoAOMT a contribué à modifier ce schéma en révélant une voie alternative conduisant aux unités G (Van Doorselaere et al., 1995). Puis dans les années 2000, il a été montré que la F5H était nécessaire à la synthèse des unités S (Chen et al., 1999). Plus récemment Franke et al. en 2002 ont montré que la C3H est responsable de l'hydroxylation en position méta de l'acide *p*-coumarique.

La structure générale de la voie de biosynthèse des monolignols à partir de la phénylalanine (Fig. 23) est maintenant relativement bien comprise.

La première étape est la désamination non oxydative de la phénylalanine par la **PAL** ; EC 4.3.1.4 (L-phénylalanine ammonia lyase), localisée dans le xylème en différenciation (Rasmussen et Dixon, 1999). L'acide cinnamique ainsi formé est le substrat pour une des premières cytochromes P450 Monooxygénases identifiées, la **C4H** (cinnamate 4-hydroxylase)

The diagram illustrates the metabolic pathways of phenylalanine, showing its conversion to various aromatic compounds and their subsequent roles in the synthesis of flavonoids, lignins, and sinapoyl derivatives.

Phenylalanine Metabolism:

- Phenylalanine** is converted to **Cinnamic acid** by the enzyme **PAL**.
- Cinnamic acid** is converted to **p-Coumaric acid** by the enzyme **C4H**.
- p-Coumaric acid** is converted to **p-Coumaroyl CoA** by the enzyme **4CL**.
- p-Coumaroyl CoA** is converted to **p-Coumaraldehyde** by the enzyme **CCR**.
- p-Coumaraldehyde** is converted to **p-Coumaryl alcohol** by the enzyme **CAD**.

Flavonoid Pathway:

- p-Coumaroyl CoA** is converted to **Flavonoids**, **Isoflavonoids**, **Anthocyanins**, and **Stilbenes**.

Lignin Pathway:

- p-Coumaroyl CoA** is converted to **Lignins**.

Sinapoyl Derivative Pathway:

- p-Coumaric acid** is converted to **Caffeic acid** by the enzyme **4CL**.
- Caffeic acid** is converted to **Ferulic acid** by the enzyme **COMT I**.
- Ferulic acid** is converted to **5-Hydroxy-ferulic acid** by the enzyme **F5H**.
- 5-Hydroxy-ferulic acid** is converted to **Sinapic acid** by the enzyme **COMT I**.
- Sinapic acid** is converted to **Sinapoyl derivatives**.

Shikimate Pathway:

- Shikimate** is converted to **Shikimate** by the enzyme **HCT**.
- Shikimate** is converted to **Shikimate** by the enzyme **HCT**.
- Shikimate** is converted to **Shikimate** by the enzyme **HCT**.

- 25 -

C4L (4-Coumarate : CoA ligase) en formant une liaison thioester avec le CoA (Whetten, 1998). Le dérivé *p*-coumaroyl CoA est ensuite estérifié par les acides shikimique ou quinique via une **HCT** (HydroxyCinnamoyl Transferase). Les HCTs appartiennent à la superfamille des acyltransférases dépendantes des esters de CoA "BAHD"(basée sur le nom des 4 premiers membres d'acétyltransférase isolés d'espèces végétales que sont **BEAT** (Benzylalcohol Oacétyltransférase), **AHCT** (Anthocyanin Ohydroxycinnamoyltransférase), **HCBT** (Anthranilate *N*- hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase), **DAT** (Deacetylvindoline 4-*O*-acétyltransférase) qui catalysent la trans-estérification de groupement acyles sur des molécules de faibles poids moléculaires (Hoffmann, 2003). La prochaine étape est l'hydroxylation en position 3 (ou méta) des intermédiaires phénoliques ie formation de caféoylCoA à partir des esters shikimiques et quinique d'acide *p*-coumarique (Schoch et al., 2001 ; Franke et al., 2002). Cette hydroxylation est principalement catalysée par une enzyme de la famille CYP98 des cytochromes P450, la **C3H** (*p*-coumarate 3-hydroxylase). Le caféoyl CoA est ensuite méthylé par une **CCoAOMT** (caféoyl-CoA-méthyltransferase) pour former le féruloyl-CoA (Ye et Varner, 1995). Celui-ci est ensuite réduit en coniféraldéhyde par la **CCR** (cinnamoyl-CoA-reductase) en présence de NADPH. Cette étape constitue un des points de contrôle du flux de carbone vers les lignines (Lacombe et al., 2000).

La **F5H** (Ferulate 5 hydroxylase) catalyse l'hydroxylation en position 5 du noyau aromatique pour donner soit l'acide 5 hydroxy férulique (à partir de l'acide férulique) soit le 5 hydroxy coniféraldéhyde (à partir du coniféraldéhyde) (Chapple et al., 1992 ; Meyer et al., 1996). Cependant Fukushima et al. (1997) suggèrent que le meilleur substrat de la F5H serait l'alcool coniférylique plutôt que l'acide férulique. Cette enzyme pourrait donc être désignée par Ca5H (Coniféraldéhyde 5 Hydroxylase). Les produits catalysés par la F5H, le 5-hydroxyconiféraldéhyde et l'alcool 5-hydroxyconiférylique sont de bons substrats pour la **COMT** pour former le sinapaldéhyde (Boerjan et al., 2003).

Les aldéhydes (coniféraldéhyde et sinapaldéhyde) sont ensuite réduits en alcool cinnamylique (monolignols) par la **CAD** (cinnamyl alcohol déshydrogénase). Chez les Gymnospermes comme l'épicéa, la CAD a une meilleure affinité pour le *p*-coumaraldéhyde et le coniféraldéhyde. En revanche la présence, chez les Angiospermes, de diverses isoformes capables de réduire le sinapaldéhyde est en accord avec le fait que ces espèces forment des lignines de type G-S. Une enzyme utilisant préférentiellement le sinapaldéhyde (SAD) a été caractérisée chez le peuplier tremble (Li et al., 2001). La SAD est co-exprimée avec la F5H et la COMT et est co-localisée avec la lignine S (Boerjan et al. 2003). La CAD est

principalement exprimée dans les régions en cours de lignification : les fibres phloémiennes, le xylème en différenciation, les rayons, et le cambium vasculaire (Hawkins et al., 1997).

Gene(s)	Lignine Totale	H	G	S	S/G	References
Sous expression PAL	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution/ Augmentation	Baucher et al., 2003 ; Chen et al., 2006; Grabber et al., 2007
Sur expression PAL	Augmentation	nd	Augmentation/ Non modifié	Diminution / Non modifié	Diminution / Non modifié	Baucher et al., 2003
Sous expression C4H	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution	Baucher et al., 2003 ; Chen et al., 2006
Augmentation C4H	Non modifié	nd	Non modifié	Non modifié	Non modifié	Baucher et al., 2003
Sous expression 4CL	Diminution	Augmentation	Diminution	Diminution	Non modifié	Baucher et al., 2003
Sous expression HCT	Diminution	Augmentation	Diminution	Diminution	Augmentation	Chen et al., 2006 ; Hoffmann et al., 2004; Besseau et al., 2007
Sous expression C3H	Diminution	Augmentation	Diminution	Diminution	Nd	Baucher et al., 2003 ; Abdulrazzak et al., 2006
Sous expression CCOAOMT	Diminution	Augmentation	Diminution	Diminution / Non modifié	Diminution / Non modifié / Augmentation	Baucher et al., 2003 ; Chen et al., 2006 ; Do et al., 2007
Sous expression CCR	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution	Diminution/ Augmentation	Baucher et al., 2003 ; Mir Derikvand et al., 2008 ; Leplé et al., 2007
Sous expression F5H	Diminution/ Non modifié	nd	Augmentation	Diminution	Diminution	Chapple et al., 1992 ; Baucher et al., 2003 ; Chen et al., 2006
Sur expression F5H	Diminution / Non modifié	nd	Diminution	Augmentation	Augmentation	Baucher et al., 2003
Sous expression COMT	Diminution / Non modifié / Augmentation	nd	Diminution/ Augmentation	Diminution	Diminution	Baucher et al., 2003 ; Chen et al., 2006 ; Do et al., 2007
Sur expression COMT	Non modifié	nd	Non modifié	Non modifié	Non modifié	Baucher et al., 2003
Sous expression CAD	Diminution/no change	nd	Augmentation/ Non modifié	Diminution / Non modifié	Diminution / Non modifié	Baucher et al., 2003 ; Sibout et al., 2005
Sous expression 4CL et F5H	Diminution	nd	nd	Nd	Augmentation	Baucher et al., 2003
Sous expression CCOAOMT et COMT	Diminution / Non modifié	nd	Diminution / Non modifié	Diminution	Diminution	Baucher et al., 2003 ; Do et al., 2007
Sous expression CCR et COMT	Diminution	nd	nd	Nd	Augmentation	Baucher et al., 2003
Sous expression CCR et CAD	Diminution	nd	Diminution	Diminution	Augmentation	Baucher et al., 2003
Sous expression COMT, CCR et CAD	Diminution	nd	nd	Nd	Nd	Baucher et al., 2003

Tableau 1 : Effets sur le contenu et la composition des lignines chez différents mutant et plantes transgéniques dont la biosynthèse des monolignols a été altérée par rapport au sauvage. D’après Vanholme et al., 2008

Des avancées considérables ont été apportées par ces études moléculaires et ont permis d’approfondir nos connaissances sur la voie de biosynthèse des monolignols. Toutefois, la modulation de l’expression des gènes conduit parfois à des résultats contradictoires (Tableau

1). Ceci est probablement en lien avec l'existence de familles multigéniques pour la plupart de ces enzymes et la régulation de cette voie complexe par divers facteurs.

3) Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de la paroi

Les facteurs de transcription MYB (dérive du nom du virus MYeloBlastosis) sont notamment connus pour leur implication dans la régulation de la voie de biosynthèse des lignines (Fig. 27). En effet, les facteurs MYB pourraient être des activateurs de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes conduisant aux monolignols (Sablowski et al., 1994 ; Tamagnone et al., 1998 ; Deluc et al., 2006). Certains facteurs MYB comme PtMYB4 chez le pin ou encore EgMYB2 chez l'eucalyptus sont associés à la fois à la formation du bois mais également à la biosynthèse de la lignine (Patzlaff et al., 2003 a ; Goicoechea et al., 2005). De plus il a été montré que la surexpression du facteur MYB85, homologue du MYB1 du pin, conduit à une induction des gènes de la voie de biosynthèse de la lignine ainsi qu'à un dépôt ectopique de celle-ci (Patzlaff et al., 2003b). Ces éléments renforcent le fait que les facteurs MYB seraient des régulateurs importants de la voie de biosynthèse de la paroi secondaire (Zhong et al., 2008).

Genes	Nom	Localisation	Repression dominante	Surexpression	Reference
NST1	At2g46770	Anthère, xylème, fibres interfasciculaires et autre organes	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire dans l'endothecium	Dépôt ectopique de parois secondaires	Mitsuda et al., Plant Cell, 2005, 17, 2993-3006
NST2	At3g61910	Anthère et autres organes	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire dans l'endothecium ;	Dépôt ectopique de parois secondaire	Mitsuda et al., Plant Cell, 2005, 17, 2993-3006
SND1/ NST3	At1g32770	fibres interfasciculaires, fibres xylémiques	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire dans les fibres	Dépôt ectopique de parois secondaires	Zhong et al., Plant Cell, 2006, 18, 3158-3170 ; Mitsuda et al., Plant Cell, 2007, 19, 270-280 ; Zhong et al., Planta, 2007, 225, 1603-1611.
VDN6	At5g62380	Métaxylème dans les racines principales	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire dans le métaxylème	Dépôt ectopique de parois secondaires	Kubo et al., Genes Dev., 2005, 19, 1855-1860.
VDN7	At1g71930	Protoxylème dans les racines principales	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire dans le protoxylème	Dépôt ectopique de parois secondaires	Kubo et al., Genes Dev., 2005, 19, 1855-1860.
MYB26	At3g13890	Anthère	Perte de l'épaississement de la paroi secondaire dans l'endothecium	Dépôt ectopique de parois secondaires	Yang et al., Plant Cell, 2007, 19, 534-548 Zhong et al., Plant cell, 2007,
MYB46	At5g12870	fibres interfasciculaires, fibres xylémiques, vaisseaux	Répression de l'épaississement de la paroi secondaire chez les fibres et les vaisseaux	Dépôt ectopique de parois secondaires	Zhong et al., Plant cell, 2007,
PtMYB4 (Pin)	-	Xylème secondaire	Non déterminé	Dépôt ectopique de lignine	Patzlaff et al., Plant J., 2003, 36, 743-754.
EgMYB2 (Eucalyptus)	-	Xylème secondaire	Non déterminé	Altération de lignine et augmentation de l'épaisseur de la paroi secondaire des fibres et des vaisseaux	Goicoechea et al., Plant J., 2005, 43, 553-567
NTLIM1 (tabac)	-	Prédominant dans les tiges	Réduction de la quantité de lignine dans le xylème des tiges	Non déterminé	Kawaoka et al., Plant J., 2000, 22, 289-301

Fig. 27 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle (Zhong et Ye, 2007)

D'autres facteurs interviendraient dans la régulation de la synthèse de la lignine. Les facteurs LIM ont été également proposés puisque leur répression chez le tabac conduit à l'inhibition de la voie de biosynthèse des monolignols (Kawaoka et al., 2000).

Des régulations semblables existent lors de la mise en place des parois (Fig. 27), ceci suppose une expression coordonnée des gènes participant à la construction des briques élémentaires de ces parois et un contrôle de la compartimentation de ces événements (Zhong et Ye, 2007). Plusieurs études ont notamment montré que différents facteurs de transcription, formant un véritable réseau transcriptionnel, assurent la régulation de la biosynthèse de la paroi secondaire des tissus conducteurs et de soutien. C'est dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana* que ce réseau a été mis en évidence. En effet, différentes protéines, SND1 (Secondary Wall-Associated NAC Domain Protein1, également appelé NST3) et NST1 (NAC secondary wall thickening promoting factor 1) agissent sur les parois secondaires des fibres, l'inhibition conjointe de leurs expression induit une perte totale de l'épaisseur de la paroi secondaire des fibres mais n'affecte en rien les vaisseaux (Mitsuda et al., 2007). Dans ce réseau, apparaît également NST2 qui lorsqu'il est sur-exprimé (idem pour NST1) se traduit par un dépôt ectopique de paroi secondaire au niveau du parenchyme (Mitsuda et al., 2005). D'autres facteurs tels que les VDNs (Vascular Related NAC Domain) seraient spécifiques des vaisseaux, une répression de VDN6 et VDN7 induit respectivement une perturbation du développement du métaxylème et du protoxylème (Kubo et al., 2005).

Plusieurs facteurs MYBs participent à la régulation de la biosynthèse des parois secondaires (MYB26, MYB46 chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple). D'autres facteurs ont été découverts chez d'autres espèces (MYB103, 83, 20). Ces facteurs MYB seraient eux même régulés par SND1. L'hypothèse d'une hiérarchie des facteurs de transcription au sein du réseau a été récemment proposée. Le facteur SND1 serait à la tête de cette hiérarchie en raison de sa capacité à activer le programme entier de développement de la paroi secondaire (Zhong et al., 2008)

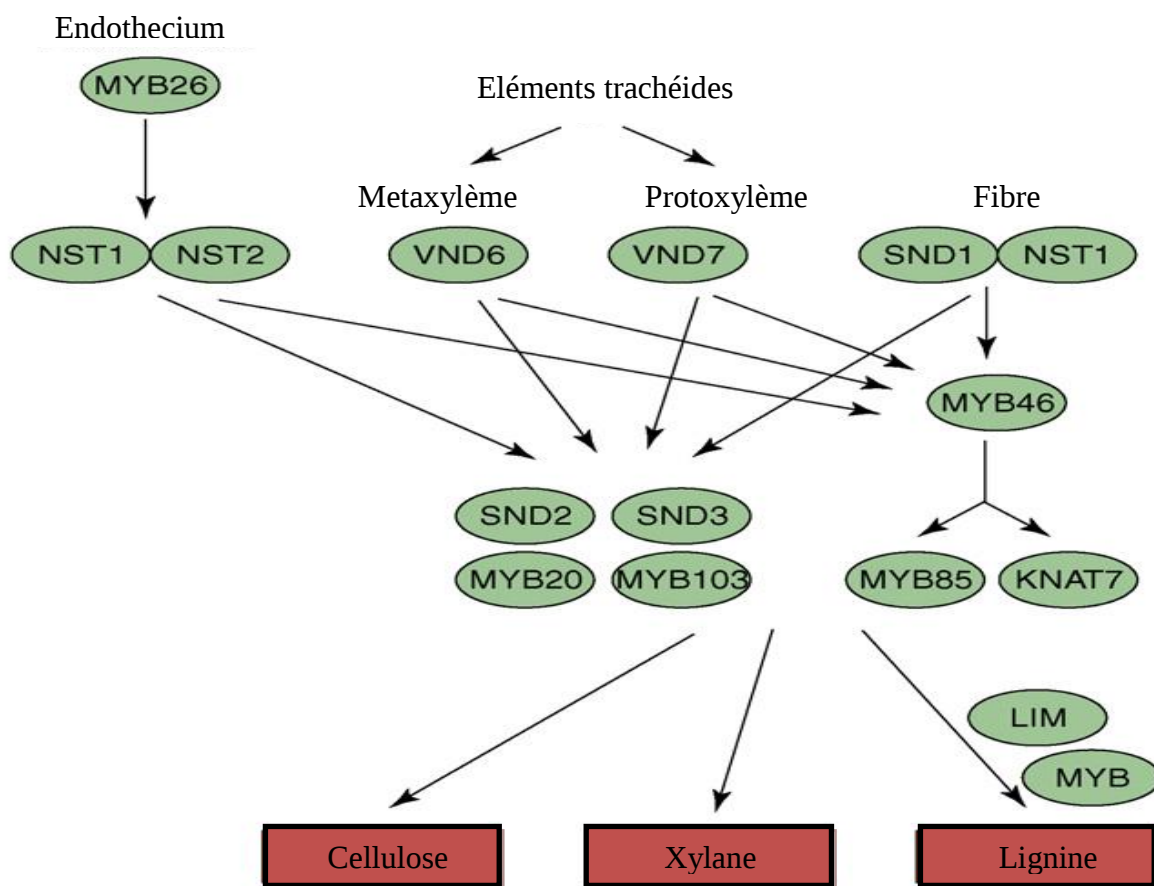


Fig. 28 : Schéma de la hiérarchie des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la paroi secondaire des fibres, éléments trachéides et endothécium. D'après Zhong et Ye, 2007)

La régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des autres composants de la paroi secondaire est nettement moins connue. Cependant, il semblerait que là aussi, les facteurs de transcription MYB soient des activateurs directs de l'expression des gènes de biosynthèse de la cellulose et des xylanes (Fig. 28). Le facteur MYB103 induirait notamment l'expression de gènes de la biosynthèse de la cellulose. La répression des facteurs SND2, SND3, MYB103 et MYB85 aboutit à une réduction de la quantité de cellulose et de xylanes (Zhong et al., 2008).

4) Précurseurs de polymérisation

Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des monolignols, composés toxiques pour la cellule, ont été localisées dans le cytoplasme et le système endomembranaire. Cependant leur polymérisation initiée via l'action d'enzyme d'oxydation a lieu dans la paroi. Dans ce contexte, les dérivés glycosylés tels que la coniférine et la syringine seraient une alternative autorisant un transport jusqu'au site de polymérisation sous une forme compatible avec le métabolisme cellulaire. Différents travaux basés principalement sur l'incorporation de coniférine radiomarquée ont permis de montrer chez plusieurs espèces que ces composés sont des acteurs de la formation des lignines du xylème (Terashima et al, 1986). Les monolignols

glucosides seraient les formes requises pour le transport vers la paroi et les β -glucosidases pariétales assureraient la libération des monolignols.

4.1) Coniférine

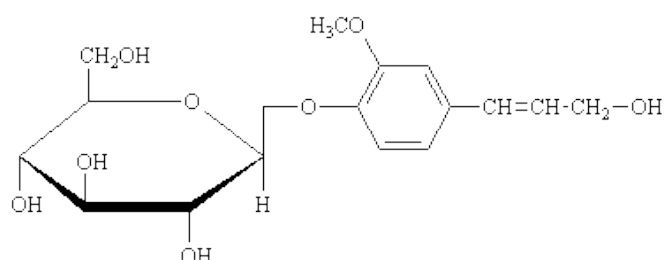


Fig. 29 : Coniférine

La coniférine (Fig. 29) est principalement accumulée chez les Gymnospermes dans le cambium au moment de la reprise de l'activité de la division cellulaire au printemps. Sa présence n'a été toutefois rapportée que chez de rares Angiospermes comme le magnolia (Tsuji et Fukushima, 2004). La coniférine est synthétisée à partir de l'alcool coniférylique et de l'uridine 5'-diphosphate glucose (Fig. 30). Cette réaction est catalysée par une CAGT (EC 2.4.1.111.) ie Uridine 5'-diphosphate glucose : alcool coniférylique glucosyltransférase selon le schéma suivant

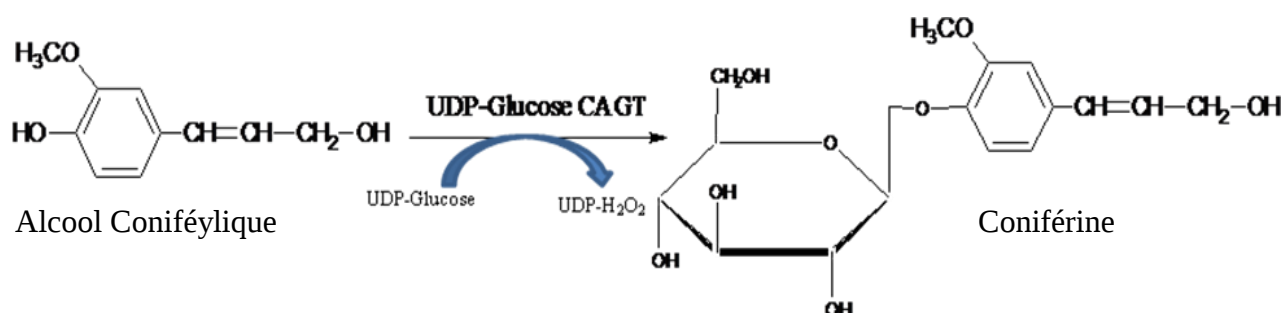


Fig. 30 : Synthèse de la coniférine à partir de l'alcool coniférylique d'après Savidge et Föster, 1998

L'UDP-glucose CAGT est spécifique de l'alcool coniférylique. C'est une enzyme soluble dans le cytoplasme (Schmid et al., 1982). La coniférine serait alors transportée par le biais des vésicules du Golgi (Pickett-Heaps, 1968) au cours du développement du xylème jusqu'à la paroi secondaire où des glucosidases spécifiques libéreraient le glucose générant ainsi l'alcool coniférylique pour la lignification dans l'apoplaste (Freudenberg, 1959). Cependant le mécanisme d'exportation des monolignols depuis leur site de synthèse dans le cytoplasme à leur site de polymérisation dans l'apoplaste est très peu connu (Ehltng et al., 2005).

4.2) Syringine

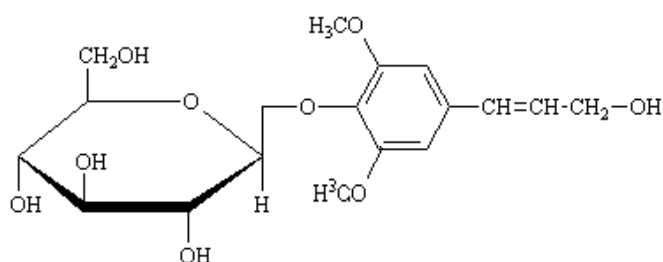


Fig. 31 : Syringine

Comme la coniférine, la syringine (Fig. 31) est principalement rencontrée chez les conifères mais en moindre proportion. Whetten et Sederoff (1995) ont pu isoler la syringine à partir d'Epicéa à raison de 1,5 mg/g bois environ contre 60 mg/g bois de coniférine. La syringine, ie le glucoside de l'alcool sinapylique ne diffère de la coniférine que par la présence d'un groupement méthoxyl sur la position 4 du cycle phényle (Dharmawardhana et al., 1995). Très peu d'informations sont disponibles sur cette forme supposée de stockage de l'alcool sinapylique. Néanmoins l'hypothèse du transport de la syringine via les rayons du parenchyme a été avancée (Tsuji et Fukushima, 2004). Il est cependant de plus en plus admis que la biosynthèse des lignines S proviendrait en majorité de la conversion des unités G en unités S via l'alcool cinnamylique, (Li et al., 2000 ; Matsui et al., 2000 ; Li et al., 2001) de ce fait la syringine n'aurait pas une implication majeure dans la biosynthèse des lignines.

4.3) Coniféraldéhyde glucoside

Des travaux récents montrent que le coniféraldéhyde glucoside (Fig. 32) est crucial pour la biosynthèse de la lignine, en particulier la lignine de type S chez les Angiospermes. En effet, jusqu'à présent la coniférine est largement répandue chez les Gymnospermes mais seule une petite proportion des Angiospermes ont un pool de coniférine endogène (Tsuji et Fukushima, 2004). La plupart de la coniférine est oxydée directement en coniféraldéhyde glucoside qui aurait deux actions principales. D'une part, il serait réduit en alcool coniférylique en vue de sa polymérisation. D'autre part il serait dérivé en sinapaldéhyde qui sera ensuite réduit en alcool puis incorporé pour former la lignine de type S (Tsuji et al, 2004)

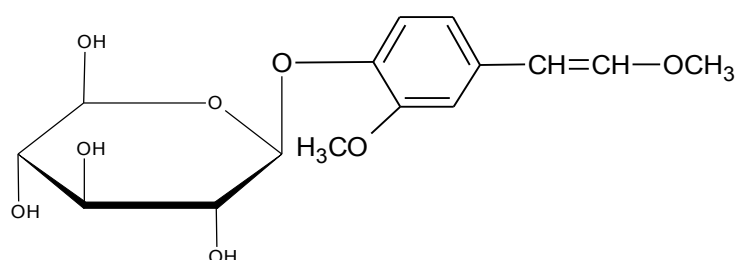


Fig. 32 : Coniféraldéhyde glucoside d'après Tsuji et al., 2005

4.4) Les β -glucosidases

Les β -glucosidases (E.C. 3.2.1.21) constituent un large groupe d'enzymes présentes chez de nombreux organismes. La principale réaction catalysée par cette classe d'enzyme est le clivage hydrolytique des liaisons β -glycosidiques ceci implique donc rôle potentiel dans le transport de précurseurs de la lignine. Le substrat dépend de la nature, de la fonction et de la localisation de l'enzyme (Daroit et al., 2007). Chez *Pinus Contorta*, une β -glucosidase spécifique de la coniférine a pu être isolée à partir du xylème (Dharmawardhana et al., 1995 ; 1999). La protéine native (isolée à partir du xylème) est un dimère dont la taille des sous unités est de 28kDa. La distribution tissulaire de l'activité coniférine β -glucosidase correspond à celle des peroxydases ; ces deux activités sont localisées dans la zone en cours de lignification du xylème secondaire (Dharmawardhana et al., 1995), où les concentrations en coniférine sont par ailleurs reportées comme étant les plus élevées (Savidge, 1989). La β -glucosidase spécifique de la coniférine serait localisée dans l'apoplaste (Samuels et al., 2002). Des analyses phylogénétiques chez *Arabidopsis thaliana* ont montré que trois β -glucosidases (BGLU45, 46 et 47) étaient dans le même cluster que celle de *Pinus Concorata*. Les tests d'affinités sur BGLU45 et 46 ont montré qu'une d'entre elle (BGLU45) présente une forte affinité pour la coniférine et, en moindre proportion, la syringine ; la deuxième (BGLU46) utilise un large spectre de substrats dont la coniférine et la syringine (Escamilla-Treviño et al., 2006). Les travaux de Tsuji en 2005 montrent cependant qu'une β -glucosidase de *Ginkgo biloba* L. a une affinité pour le coniféraldéhyde glucoside dix fois supérieure à l'affinité pour la coniférine. Le coniféraldéhyde glucoside serait un composé qui en plus de la coniférine pourrait être impliqué dans la biosynthèse de la lignine. Une voie alternative est alors proposée en tenant compte du coniféraldéhyde glucoside. La coniférine serait transformée en coniféraldéhyde via le coniféraldéhyde glucoside. Le coniféraldéhyde glucoside serait déglucosylé par la β -glucosidase et libérerait ainsi du coniféraldéhyde (cf fig. 33). Le coniféraldéhyde glucoside constituerait alors une forme de transport alors que la coniférine serait plus une forme de stockage. Toute fois leur compartiment cellulaire de stockage n'est pas déterminé et est un challenge à conduire (Tsuji et al., 2005)

Une voie similaire pourrait exister chez les Angiospermes. En effet, chez le magnolia le coniféraldéhyde et/ou le coniféraldéhyde glucoside serait crucial dans la biosynthèse de la lignine et notamment des unités S. (Tsuji et al., 2004).

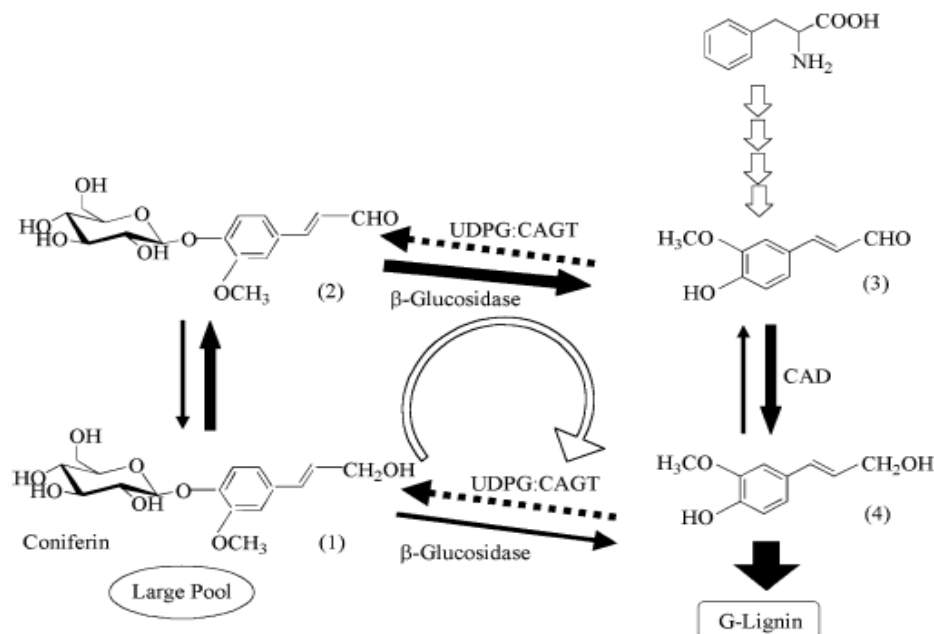


Fig. 33 : Mécanisme proposé d'incorporation de la coniférine dans la voie de biosynthèse d'un Gymnosperme (Tsuji et al., 2005). 1 : Coniférine, 2 : coniféraldéhyde glucoside, 3 : coniféraldéhyde, 4 : alcool coniférylique

Cependant, plusieurs questions restent non résolues. Le mode de transport des monolignols vers leur site de polymérisation (ie la paroi) reste toujours inconnu. En effet, le transport via les vésicules de Golgi est depuis longtemps proposé toutefois un mécanisme actif par les transporteurs ABC qui exporteraient les monolignols à travers la membrane plasmique est aussi suggéré au cours du développement de la paroi secondaire. Les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) sont des protéines codées par une grande famille de gènes (129 chez *Arabidopsis thaliana*). Ces gènes ont été identifiés chez de nombreux organismes végétaux. Les gènes des transporteurs ABC sont relativement abondants dans le xylème primaire en maturation (Samuels et al., 2002). Des gènes de transporteur ABC ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* comme étant exprimés de manière coordonnée avec les gènes de la voie métabolique des phénylpropanoïdes (Ehlting et al., 2005). Cependant l'inhibition de gènes ABC aurait un effet sur le transport de l'auxine mais pas de phénotype révélant une diminution en lignine (Kaneda et al., 2008). Ces auteurs, utilisant des approches combinant autoradiographie et microscopie, proposent que le transport des monolignols ferait intervenir des transporteurs membranaires inconnus plutôt qu'un transport actif chez *Pinus concorta*.

Dans la mesure où deux formes seraient dédiées au stockage (coniférine) et au transport (coniféraldéhyde), il reste à préciser quels sont les facteurs déterminants de la conversion de la coniférine en coniféraldéhyde glucoside et/ou en alcool coniférylique.

5) Polymérisation des monolignols

La lignine est formée par la polymérisation déshydrogénative aléatoire des monolignols (Sarkanen et al., 1991). Ce mécanisme est initié par l'oxydation enzymatique des monolignols en radicaux phénolyles lesquels polymérisent ensuite selon des mécanismes radicalaires non enzymatiques (Fig. 35). La nature des enzymes impliquées dans cette étape d'oxydation est encore aujourd'hui débattue mais deux classes d'enzymes différentes les laccases et les peroxydases restent les principales candidates (Whetten et Sederoff, 1995 ; Koutaniemi et al., 2007).

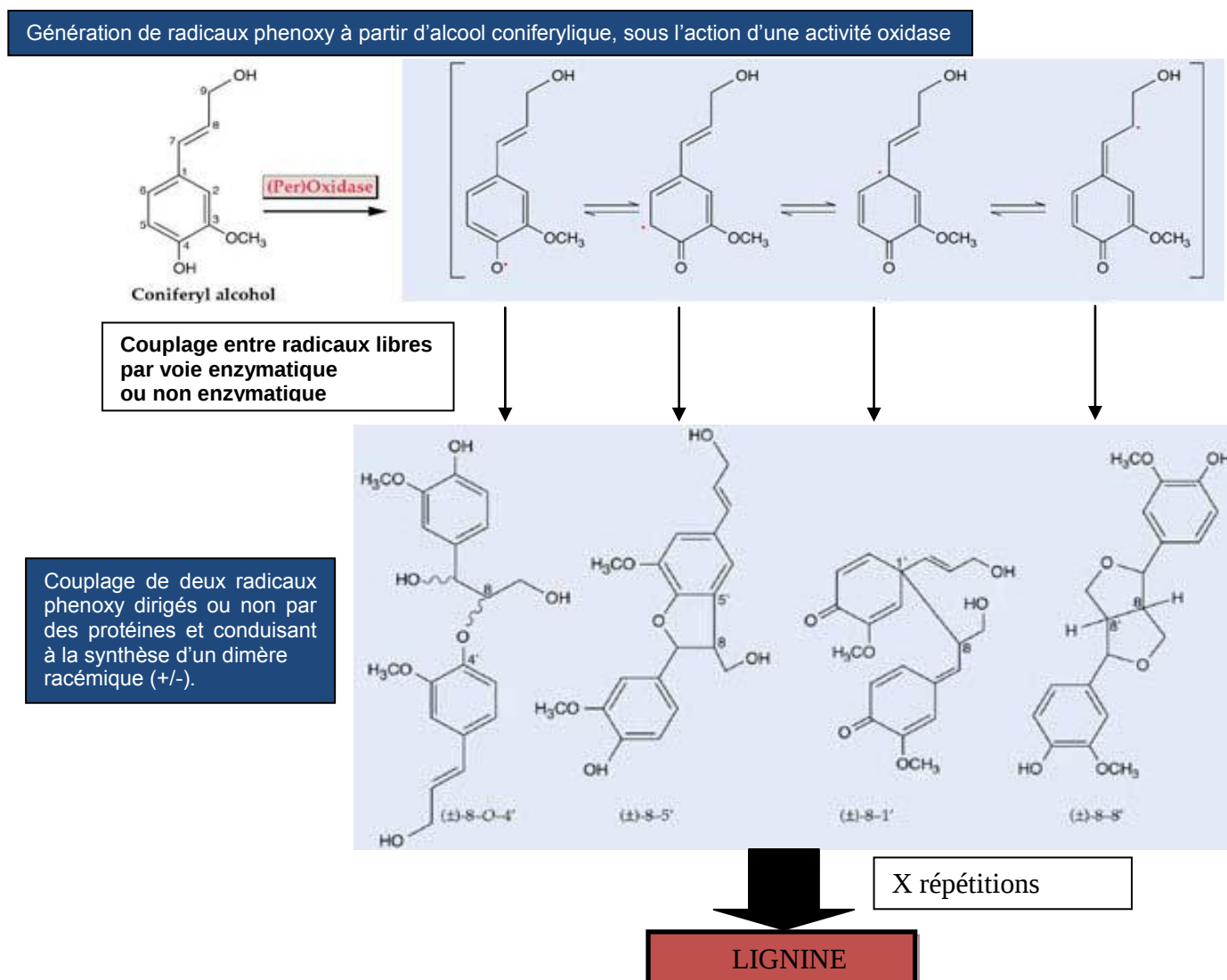


Fig. 34 : Proposition d'un modèle de polymérisation des monomères de la lignine dans la matrice extracellulaire D'après Hoffman, 2003 et Buchannan, 2001)

5.1) Laccases

De nombreuses interrogations sur le rôle ou les rôles précis des laccases dans la lignification subsistent encore.

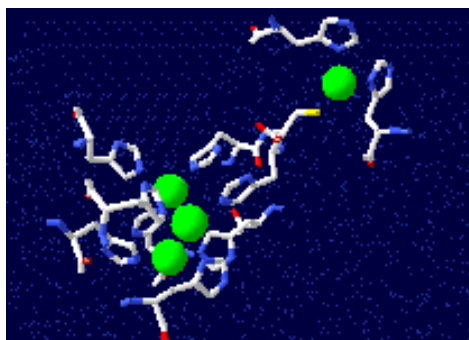


Fig. 35 : Schéma d'une laccase montrant les 4 cuivres dans leur site actif

a) Structure

Les laccases ou p-diphenol O_2 oxydoreductases EC 1.10.3.2. sont très répandues chez les champignons mais sont moins caractérisées chez les plantes (Mayer et Staples, 2002). Les laccases font partie d'un groupe appelé "Blue copper oxydases" qui compte deux autres enzymes que sont les ascorbates oxydases rencontrées essentiellement chez les plantes et les ceuoplasmines dans le règne des animaux vertébrés (O'Malley et al., 1993).

Cette métalloprotéine monomérique (52 à 110 kDa) comporte quatre ions Cu (II) lui conférant une couleur bleue caractéristique (Fig. 35). Les ions cupriques participent au transfert d'électrons de l'oxygène moléculaire qui est alors réduit pour former de l'eau. La réduction est couplée à une oxydation monoelectronique d'un composé phénolique menant à la formation de semi-quinones à radical libre extrêmement réactif et susceptible d'interagir avec de nombreux composés (Dean et Eriksson, 1994). Les laccases sont des protéines glycosylées, la proportion en polysaccharide variant de 10 à 45% de la protéine.

b) Rôles présumés chez les champignons et les végétaux

Chez les champignons plusieurs fonctions sont imputées aux laccases. Les laccases fongiques participeraient à l'oxydation de différents composés phénoliques et seraient capables d'altérer la lignine. Elles interviendraient dans les phénomènes de dégradation de composés toxiques comme les phytoalexines ou des polluants environnementaux (Mayer et Staples, 2002) ou bien encore comme une alternative aux voies de respiration classique dans le cas de la sénescence. Elles catalyseraient la dernière étape de la formation des pigments qui sont à rapprocher des mélanines (la mélanine de la paroi des rhizomes, qui est un composé hydrophobe) (Dean et Eriksson, 1994).

Les fonctions biologiques des laccases dans les plantes seraient associées à de nombreux métabolismes. Les laccases chez les plantes joueraient un rôle dans le mécanisme métabolisme du fer, notamment dans l'efficacité de l'absorption du fer dans les tissus au cours

de la lignification (Hoopes and Dean, 2004), les mécanismes de défense en réponse au stress comme la salinité (Liang et al., 2006a) contribuant ainsi à une meilleure adaptation des végétaux à leur milieu environnant. Récemment, il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* qu'un gène de laccase TT10 est impliqué dans la formation des anthocyanidines ou tanins et dans la polymérisation oxydative des flavonoïdes (Pourcel et al., 2005). Les laccases sont généralement considérées comme des enzymes pariétales, en accord avec la présence de peptide signal dans la zone N terminal qui permet l'excrétion de ces protéines et leur adressage vers la paroi (Caparróz-Ruiz et al., 2006). Certaines laccases sont secrétées dans l'apoplaste alors que d'autres sont intracellulaires ie dans le réticulum endoplasmique ou les peroxysomes (Gavanholt et Larsen, 2002). Cette compartimentation spatiale pourrait être associée à des fonctions différentes (Cai et al., 2006).

c) Implication dans la lignification

Le rôle des laccases dans les processus de lignification a été proposé par Freudenberg en 1958. De nombreuses études ont par la suite tenté d'étayer cette hypothèse. L'immunolocalisation des laccases chez le sycamore (*Acer pseudoplatanus*) montre une étroite association spatiale de ces enzymes avec les processus de lignification (Driouich et al., 1992). En effet, les gènes des laccases sont fortement exprimés dans les tissus lignifiés chez *Pinus taeda* (Sato et al., 2001). De plus les laccases isolées de différentes plantes sont capables de polymériser *in vitro* les monolignols (Bao et al, 1993). Toutefois, l'oxydation des monolignols par les laccases ne permettrait pas d'aboutir à des molécules de degré de polymérisation élevé. Les laccases seraient responsables de l'initiation de la polymérisation des oligolignols qui seraient ensuite utilisés par les peroxydases pour former des macromolécules hautement condensées ie lignine (Dean et Eriksson, 1994). La laccase pourrait également avoir une contribution majeure dans la lignification des couches pariétales où les concentrations en lignine sont élevées. A un certain niveau de lignification, l'hydrophobicité de la lamelle moyenne ne permettrait pas le passage de l'eau oxygénée alors que l'oxygène pourrait diffuser et serait donc disponible (Gavnholt et Larsen, 2002).

Afin de mieux comprendre le rôle des laccases dans la lignification l'utilisation des stratégies de sur- ou sous-expression ont été mises en oeuvre ces dernières années chez le peuplier (Ranocha et al., 2002). Toutefois les résultats obtenus à ce jour ne permettent pas de trancher sur le rôle des laccases dans la formation de la lignine. En effet, malgré l'obtention de phénotypes, ie forte altération de la paroi des fibres xylemiennes et déformation des fibres, une altération dans la quantité et la composition de la lignine n'a jamais été observée (Ranocha et al., 2002). Une activité résiduelle de laccase serait suffisante pour assurer la

polymérisation des monolignols. Par ailleurs en raison de la multigénicité de cette famille (17 gènes chez *Arabidopsis* et chez le riz, 8 pour le pin), une compensation fonctionnelle par d'autres laccases et/ou oxydases ne peut être exclue. Cependant des travaux récents portant sur l'étude d'un mutant *Arabidopsis thaliana* Atlac15/TT10 révèle une diminution de 30% de la quantité de lignine extraite des graines et une augmentation de 59% de la quantité des proanthocyanidines (Liang et al., 2006b). Ce serait alors la première preuve génétique de l'implication d'une laccase dans la synthèse des lignines.

5.2) Peroxydases

a) Définition

Les peroxydases sont des protéines enzymatiques à groupement prosthétique : elles possèdent un hème ou ferroporphyrine (FeIII), (Fig. 36). La porphyrine désigne un noyau tétra pyrrolique, dont la principale origine est l'acide- δ aminolevulinique formé à partir du succinyl CoA et de la glycine. Le fer des protéines dites hémiques est chélaté à la fois par 2 liaisons fournies par la protéine et les 4 atomes d'azote appartenant à la porphyrine (Pelmont, 1995).

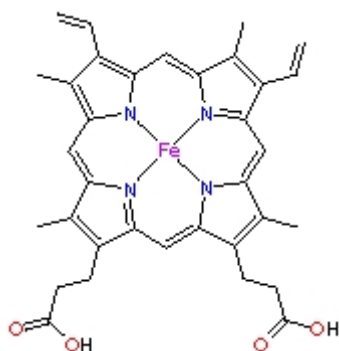


Fig. 36 : Hème des peroxydases

Les peroxydases sont classées en deux superfamilles. La première est constituée par des enzymes animales telles que la peroxydase glutathione, les myeloperoxydase ou encore les peroxydases thyroïde. La deuxième superfamille regroupe des peroxydases présentes chez les animaux, les plantes, les bactéries, les champignons et levures (Higara et al., 2001). Elle se répartit en 3 classes distinctes selon leur alignement de séquence et leur origine biologique (Welinder, 1992). En effet, l'examen de la séquence en acides aminés des ascorbates peroxydases (APX) et de leur structure 3D montre que ces protéines sont proches des peroxydases à cytochrome C (CCP) de la levure et s'apparentent à des séquences codées par des gènes dupliqués de peroxydases bactériennes (Welinder, 1992 ; Jespersen et al., 1997). Ce groupe d'enzymes ayant différentes origines représente la classe I (EC 1.1.11.5/6/11). La classe II (EC 1.11.1.13/14) est d'origine fongique et inclut les peroxydases dégradant la

lignine (Howes et al., 1999). Le dernier groupe de la superfamille, les peroxydases sécrétées dans l'espace extracellulaire ou dans la vacuole, désignent la classe III majoritaire chez les plantes.

b) Classe III (EC 1.11.1.7)

Ces enzymes sont constituées d'approximativement 300 acides aminés et sont en majorité N-glycosylées (Welinder, 1992) (Fig. 37). Elles sont dirigées vers le réticulum endoplasmique grâce à un peptide signal N terminal ; certaines d'entre elles possèdent une extension de leur C terminal pour un adressage vers la vacuole (Tognolli et al., 2002).

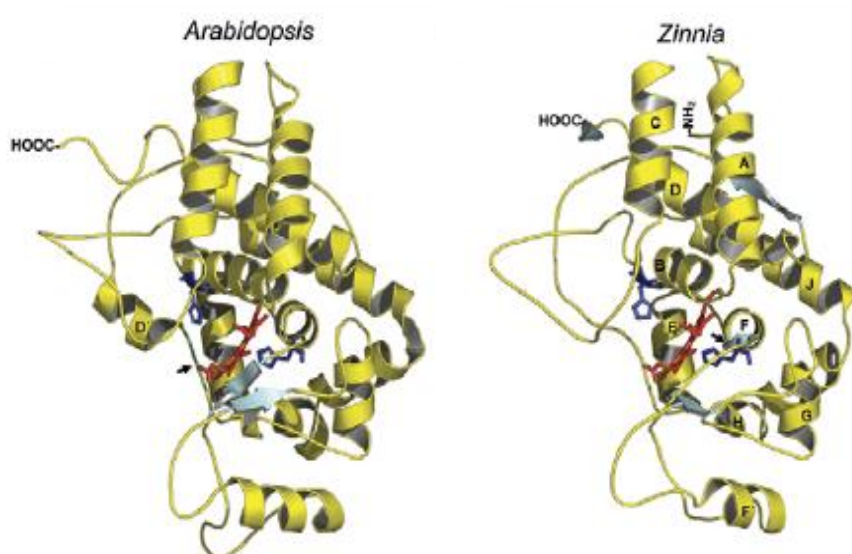


Fig. 37 : Prédiction de structure de peroxydases d'*A. thaliana* et *Z. elegans* d'après Ros-Barcelo et al., 2007.

α) Une famille multigénique

Les peroxydases végétales sont codées par une grande famille multigénique, 73 gènes dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (Tognolli et al., 2002 ; Welinder et al., 2002), 138 gènes dans le génome du riz *Oryza sativa* (Passardi et al., 2004) et 82 pour le peuplier *Populus trichocarpa* (Sasaki et al., 2007). Cette multigénicité a pour origine la duplication de gènes par divers mécanismes comme des crossing-over inégaux, des événements de traduction différents, la duplication de longs segments chromosomiques ou encore la polyploïdisation (Zhang, 2003). La conservation des gènes dupliqués peut être expliquée par l'acquisition de nouveaux profils d'expression (ie à des moments différents du stade de développement ou tissus spécifique) pour un gène dupliqué (sub-fonctionnalisation) ou par l'acquisition d'une nouvelle fonction (néo-fonctionnalisation) dans la protéine permettant les

mutations ou les duplications au niveau de l'ADN pendant l'évolution (Passardi et al., 2005). La séquence codante de la plupart des gènes de peroxydase est entrecoupée de 3 introns à des positions parfaitement conservées mais dont la taille est très variable, ce qui suggère un ancêtre commun avec un profil de 3 introns et 4 exons (Tognolli et al., 2002).

β) Structure cristalline

L'élucidation de la structure cristalline des peroxydases de classe III est relativement récente (Fig. 38). La première structure cristalline a été obtenue en 1996 dans le cas de peroxydase de cacahuète (PeaNut Peroxidase = PNP) par l'équipe de Schuller et al. (résolution de structure de 2.7 Å), Gajhede et al (1997) déterminent ensuite celle de la peroxydase de raifort isosyme C (HorseRadish Peroxidase isosyme de type C = HRP C) de 2.15 Å, une des enzymes les plus étudiées.

Comme l'ensemble des peroxydases (PODs), celles de la classe III possèdent 10 hélices α notées de A-J (Schuller et al., 1996). Les deux peroxydases, PNP et HRP C comportent 3 hélices supplémentaires D', F' et F'' par rapport aux classes I et II (Gajhede et al., 1997). Une boucle unique entre les hélices F et G contient les hélices F' et F'' qui sont liées par un pont disulfure (Howes et al., 1999). Les peroxydases de classe II et III contiennent en tout 4 ponts disulfures mais leur localisation est différente (Schuller et al., 1996)

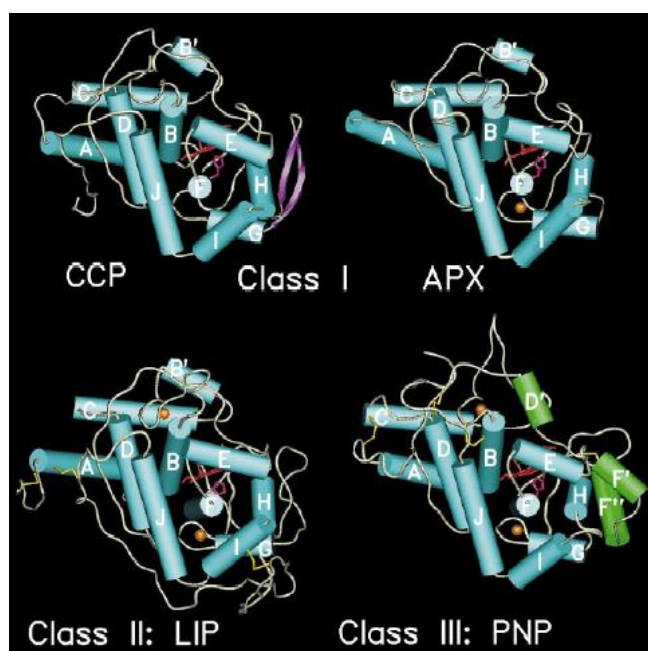


Fig. 38 : Structure cristalline des trois classes de peroxydases d'après Schuller et al., 1996

La « poche » distale dont la disposition clé est conservée chez toutes les peroxydases correspond aux résidus catalytiques Arg38 et His42 (Fig. 39). Une autre structure également conservée est le réseau de liaison à l'hydrogène qui s'étend de l'His42 jusqu'à Asn70 et à partir du Glu64 jusqu'au site de liaison avec le calcium distal.

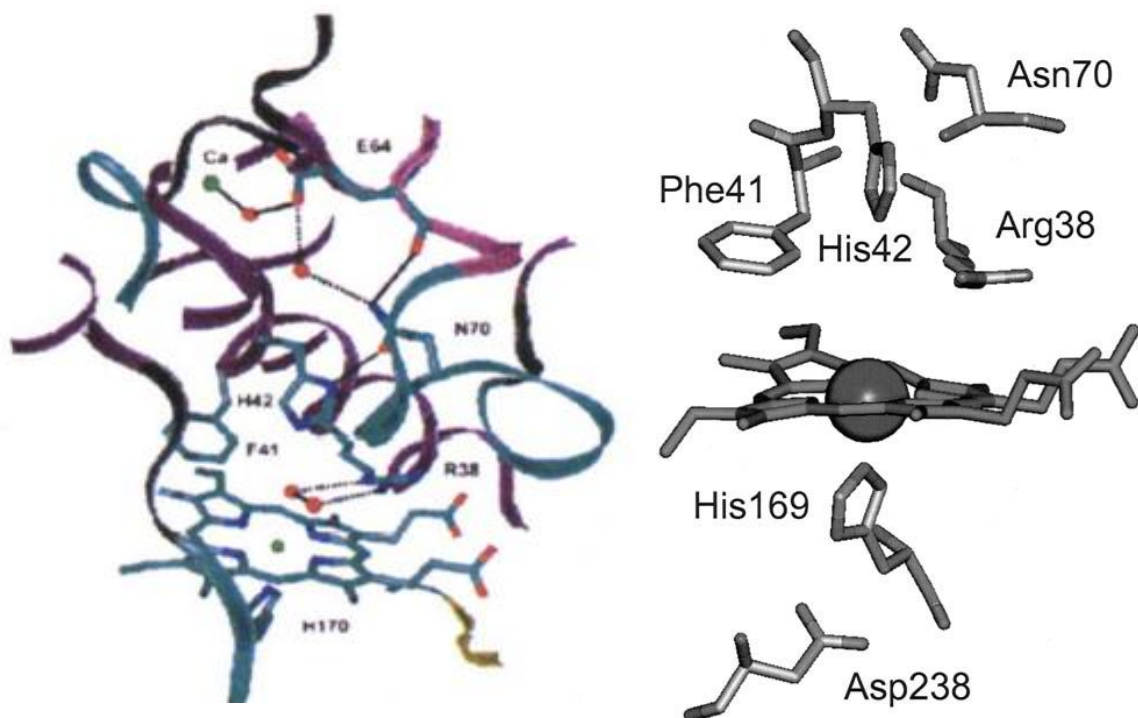
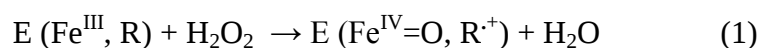


Fig. 39 : Structure de la poche de l'hème et du réseau de liaison à l'hydrogène d'après Gajhede et al. 1997 et Veitch, 2004.

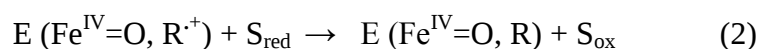
Le calcium est en effet requis pour la formation de l'environnement de l'hème, et son absence affecterait la performance catalytique de l'enzyme. Deux sites calcium, un distal et un proximal par rapport à l'hème (penta-coordonné chez HRP) sont présents comme dans la classe II. Le site calcium est structurellement couplé au site actif via l'Asp43 qui fournit deux ligands à l'ion et qui est adjacent en séquence à l'His42.

γ) Mécanisme catalytique

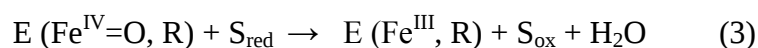
La fonction première des peroxydases est généralement attribuée à la transformation de l'eau oxygénée en molécules d'eau. Ces enzymes catalysent la réduction d' H_2O_2 en utilisant les électrons de molécules donneuses comme les composés phénoliques, les précurseurs des lignines, l'auxine ou les métabolites secondaires (Passardi et al, 2005), (Fig. 40).



Composé I



Composé II



Peroxydases Classe III

Nom	R	S red	S ox
HRPC	prophyrine	Amines aromatiques Indoles, phenols et sulphonates	Produits radicalaires correspondants, dimères et oligomères

Fig. 40 : Equations générales du cycle catalytique des peroxydases hémiques (Smith et Veitch, 1998). (R: site du cation radical ; S : Substrat ie red pour réduit et ox pour oxydation du substrat réduit)

Ces équations sont assez conservées chez les peroxydases. Les deux résidus Arg38 et His42 sont impliqués dans la catalyse acide-base et le clivage de la liaison O-O du peroxyde pendant la formation du composé I. Cependant l'Arg38 n'apparaît pas nécessaire pour sa formation mais améliore l'efficacité de la réaction et l'affinité des liaisons pour le peroxyde (Rodriguez-lopez et al., 1996). L'His 42 intervient comme l'accepteur de base lors de la formation du composé I. Le rôle de l'Asn 70 est de maintenir la basicité de cette histidine distale (Nagano et al., 1996).

δ) Rôles

Les peroxydases de la classe III sont réparties en 3 groupes, les formes dites solubles et les formes dites pariétales incluant les PODs associées par des liaisons ioniques et les POD reliées par des liaisons covalentes aux parois végétales (Ridge et Osborne, 1971). Du fait de leur grand nombre d'isoformes (classé selon leur point isoelectrique) et d'une régulation très hétérogène de leur expression (Passardi et al., 2005), les peroxydases de la classe III participent à de nombreux phénomènes physiologiques (Fig. 41) tels que la régulation de la croissance et de l'expansion cellulaire (Klotz et al., 1998 ; Dunand et al., 2003), la détoxification du peroxyde d'hydrogène, le métabolisme des phytohormones comme l'auxine, la synthèse de lignine et de subérine mais également la réponse aux stress comme les attaques de pathogènes et les maladies (Schopfer, 2001) ou encore les blessures (Park et al., 2003). Il

est très difficile d'affecter une peroxydase précise à l'un de ces phénomènes. En raison de leur homologie de séquence (40-60%), les relations structures/propriétés restent souvent difficiles à établir (Lagrimini et al., 1997 b)).

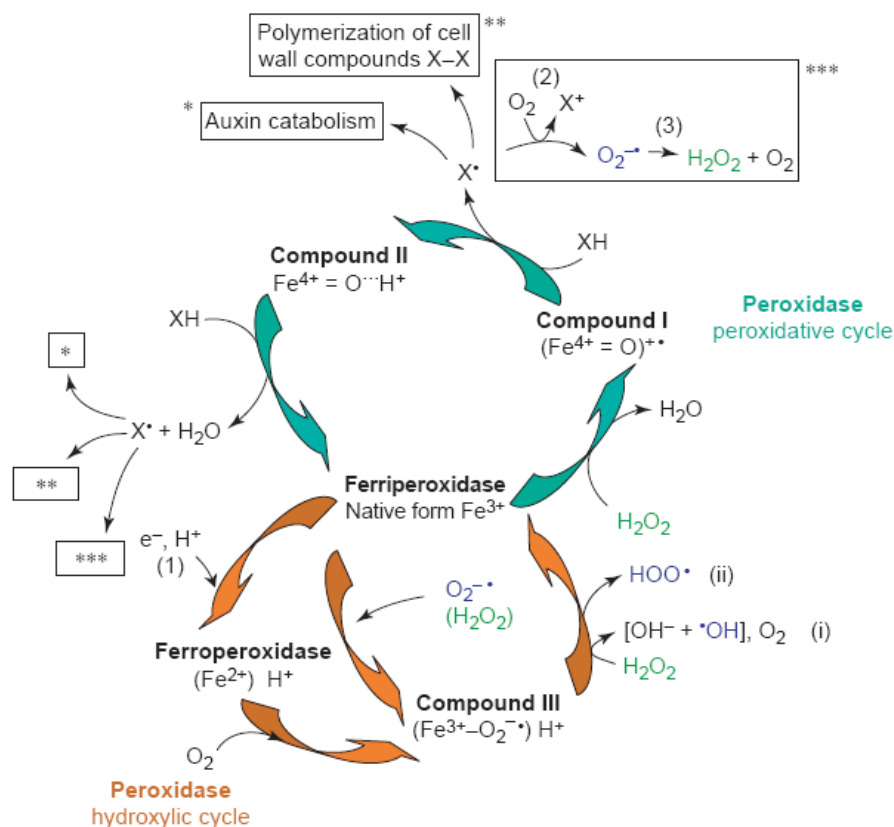


Fig. 41 : Différentes actions des peroxydases de classe III (Passardi et al., 2004)

- Le métabolisme de l'auxine

L'auxine est considérée comme une phytohormone clé dans le contrôle de l'élongation et de la division cellulaire, la différenciation vasculaire, l'initiation des racines et des bourgeons latéraux (Lee et al., 2002). L'implication des peroxydases dans le métabolisme de l'auxine a été suggérée à plusieurs reprises. Ainsi la peroxydase de tabac s'est avérée très efficace dans le catabolisme de l'AIA (acide indole acétique) (Gazaryan et Lagrimini, 1996). Une peroxydase purifiée de raifort catalyse également la décarboxylation oxydative de l'AIA *in vitro* conduisant à son inactivation (Grambow et Langenbeck-Schwich, 1983). De plus, Sitbon (1999) révèle qu'un fort taux d'AIA dans les plants de tabacs transgéniques surproduisant l'AIA via l'induction de la synthèse d'éthylène, augmente l'activité des peroxydases ainsi que le dépôt de lignine. Plus récemment, la sur-expression d'une peroxydase anionique de tabac conduit à une diminution de la croissance et de la masse

racinaire de plus de 50% à floraison (Lagrimini et al., 1997 a), phénotype déjà rencontré suite à une réduction du flux d'auxine (Romano et al., 1991).

- La réticulation des parois

Les peroxydases participent au contrôle de l'élongation cellulaire (Fig. 42) en catalysant la formation de liaisons covalentes entre différents résidus des constituants de la paroi primaire.

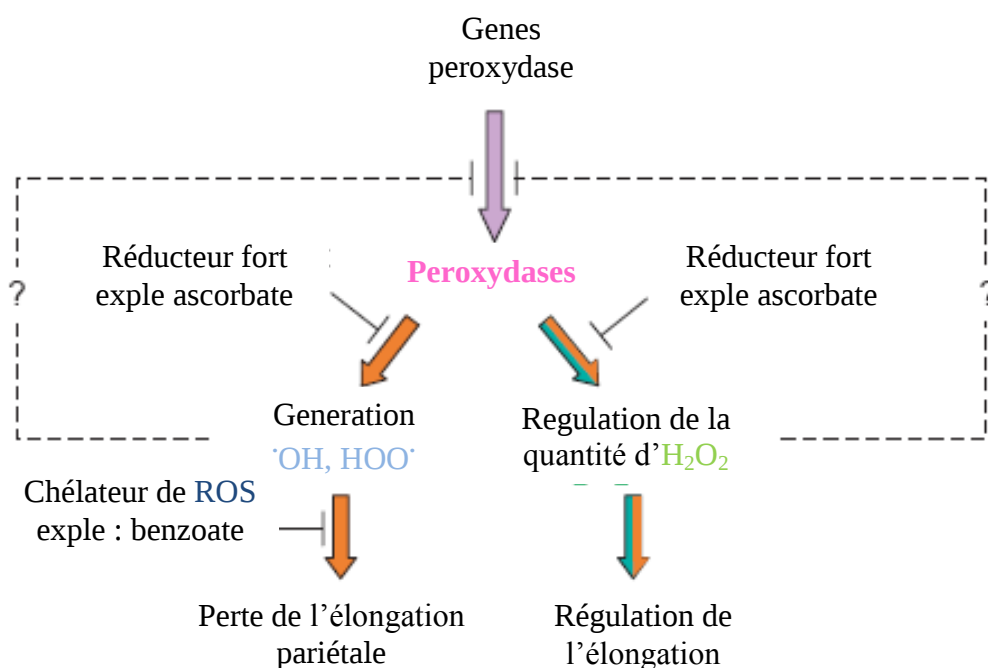


Fig. 42 : Rôle des peroxydases dans le processus d'élongation cellulaire d'après Passardi et al., 2004

La réticulation des polymères pariétaux se traduit par une rigidification de la paroi et joue un rôle déterminant dans le contrôle de l'extensibilité de la paroi et de la cellule (Kamisaka, 1990). Les peroxydases peuvent en particulier créer des ponts covalents entre les résidus hydroxyproline des extensines, principales glycoprotéines de la paroi primaire de type I (Brownleader et al., 1995). Les peroxydases impliquées dans les phénomènes de réticulations (Fig. 43) avec les extensines ont été isolées de cultures de tomate (Schnabelrauch et al., 1996), de moutarde (*Sinapsis alba*) (Alconada-Magliano et Casal, 1998), de vigne (*Vitis vinifera*) (Jackson et al., 2001) et du lupin (*Lupinus albus*) (Price et al., 2003). Les peroxydases de tomate montrent une forte activité non seulement avec les extensines de tomate mais aussi avec les extensines d'autres plantes. Lors des phénomènes de réticulation, les pectines joueraient le rôle d'ancre pour les peroxydases, pour créer un réseau dense et solide dans la paroi. Ces interactions ont deux fonctions principales structure et défense (Passardi et al., 2005).

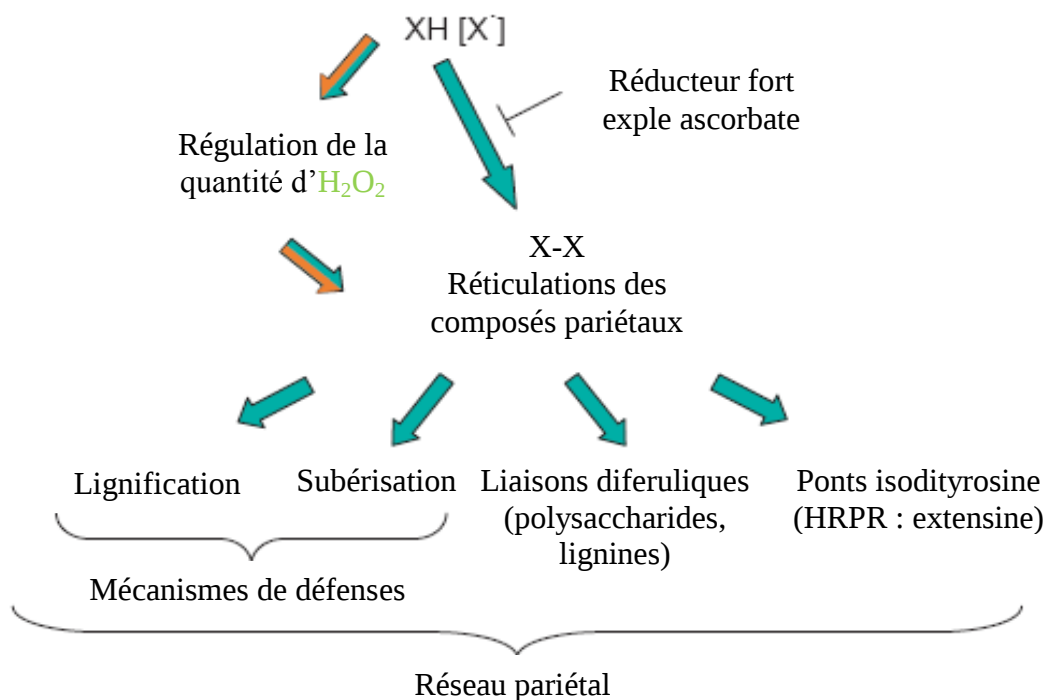


Fig. 43 : Peroxydases (flèches vertes) impliquées dans les mécanismes de réticulations d'après Passardi et al., 2004

Dans le cas des parois de type II (graminées) ou certaines dicotylédones (épinard, betterave) caractérisées par la présence d'acides hydroxycinnamiques, les peroxydases seraient également impliquées dans la formation de dimères féruliques assurant un pontage inter-caténaire des polysaccharides (arabinoxylanes ou pectines selon l'espèce). De plus au cours de la lignification, la formation de ces ponts diféruliques entre les polysaccharides et lignines contribueraient à densifier le réseau pariétal. (Wallace et Fry, 1995, Ralph et al., 1994).

- La lignification

Les peroxydases sont nécessaires pour oxyder les précurseurs de l'alcool cinnamylique en radicaux phénoxyles qui seront alors polymérisés dans la paroi pour former les macromolécules de lignines (Lewis et Yamamoto, 1990). Les peroxydases impliquées dans la biosynthèse des lignines sont classées selon leur point isoélectrique (pI) : acide ($pI < 7$) et basique ($pI > 7$) (Sasaki et al., 2004).

La paroi est le site principal de la localisation des peroxydases de la classe III, les APX/GPX se trouvent dans le cytosol/chloroplastes. Des observations en microscopie électronique ont montré que, dans certains tissus la majorité des peroxydases extracellulaires se trouve dans la lamelle moyenne et les coins de cellules indiquant une migration de la protéine de près de 100 nm ou plus (Mäder, 1992 ; Crèveœur et al., 1997). Les peroxydases sont également présentes dans la vacuole mais en plus faible quantité par rapport à la paroi (Mäder, 1992).

Différents éléments permettent de suggérer que les peroxydases sont impliquées dans la voie de biosynthèse des lignines et notamment lors de la dernière étape de la polymérisation de la lignine (Harkin et Obst, 1973). Des études histochimiques participent à la démonstration de l'implication des peroxydases liées aux parois dans cette dernière étape, notamment par la découverte qu'un substrat spécifique : la syringaldazine (analogue d'un monomère de lignine) réagit de manière particulière avec les peroxydases pariétales impliquées dans le processus de lignification (Catesson et al., 1978). Par la suite d'autres études histochimiques (Goldberg et al., 1983) puis biochimiques (Imberty et al., 1985) ont montrées que des peroxydases anioniques avec une forte activité syringaldazine oxydase sont impliquées dans la dernière étape de la lignification chez le peuplier. Dans les tissus de peuplier, l'activité totale des peroxydases est la plus forte au mois de juin, lorsque la lignification est en cours et certaines isosymes anioniques sont produites pendant cette période dans les bourgeons (Nishida et al., 1991), ou encore les systèmes cellulaires tels que Zinnia. Plus récemment, des études visant à moduler l'expression des gènes codant pour les peroxydases ont été réalisées. Dans certains cas, la réduction d'une peroxydase anionique n'a eu aucun impact sur la quantité de la lignine (Lagrimini et al., 1997 b) ; McIntyre et al., 1996). Cependant, une sous expression d'une isosyme anionique chez un hybride de peuplier tremble (prxA3a) s'est traduit par une diminution de la quantité de lignine et une modification de sa composition, notamment une augmentation des unités S (Li et al., 2003). De même, la sous-expression d'une isosyme anionique de tabac (TP60) s'accompagne d'une réduction de 40 à 50% de la quantité de lignine, les quantités de G et S diminuant de manière équivalente (Blee et al., 2003). Inversement la teneur en lignine est augmentée de 40 à 220% dans la feuille dans le cas d'une sur-expression d'une peroxydase cationique de tomate (tpx1) (El Mansouri et al., 1999). D'autres études montrent également un impact d'une sous-expression d'une peroxydase cationique de légume de fourrage (*Stylosanthes humilis*) sur la teneur en lignine chez le peuplier (diminution de 10-20% de la quantité de lignine) et le tabac (diminution de 23%) (Tijen et al., 2001 ; Zehila et al., 1999). Christensen et al. (1998) ont montré la participation des peroxydases anioniques et cationiques dans la lignification chez le peuplier. La lignification du xylème secondaire peut ainsi être accomplie par la coordination de plusieurs isosymes de peroxydases (Sasaki et al., 2006). L'ensemble de ces données révèle que différents types de peroxydases sont impliqués dans la lignification.

Les deux types, anioniques et cationiques, sont capables d'oxyder l'alcool *p*-coumarylique et l'alcool coniférylique. Toutefois, les peroxydases acides (anioniques) sont généralement peu efficaces envers l'alcool sinapylique (Dean et al., 1994 ; Christensen et al.,

1998, 2001). L'oxydation de l'alcool sinapylique par les peroxydases acides ou neutres est entravée de manière stérique du fait d'interactions hydrophobes défavorables entre les groupements méthoxyles de l'alcool et les résidus conservés I-138 et P-139 situés au niveau du site de liaison du substrat avec l'enzyme (Østergaard et al., 2000). En revanche la capacité des peroxydases basiques à oxyder l'alcool sinapylique est reconnu par plusieurs auteurs (Quiroga et al., 2000 ; Ros-Barceló et Pomar, 2001 ; Sasaki et al., 2004, 2006). Cette observation pourrait expliquer pourquoi la suppression de l'expression de gène peroxydases basiques par la stratégie antisens induit une diminution à la fois des lignines G et S dans les plants transgéniques (Blee et al., 2003) alors qu'une suppression de peroxydases acides (Li et al., 2003) ne produit qu'une diminution de la quantité des G (Gabaldón et al., 2005).

- Formation des ROS (reactive oxygen species)

Récemment, la description précise d'un cycle hydroxylique *in vivo* a ouvert la possibilité d'une nouvelle gamme de fonctions pour les peroxydases (Fig. 44). Dans ce cycle alternatif, les peroxydases natives peuvent être converties en oxyferroperoxydases (également connu sous le nom de composés III) de deux manières différentes, qui peuvent alors conduire à la formation de divers ROS (Passardi et al., 2005). Ces espèces participent à de nombreux métabolismes chez les végétaux, dont la transmission des signaux en réponse à des stress (dont la « poussée oxydative »).

Les peroxydases peuvent donc être considérées comme des enzymes bi-fonctionnelles qui peuvent oxyder divers substrats en présence d' H_2O_2 mais aussi produire des ROS.

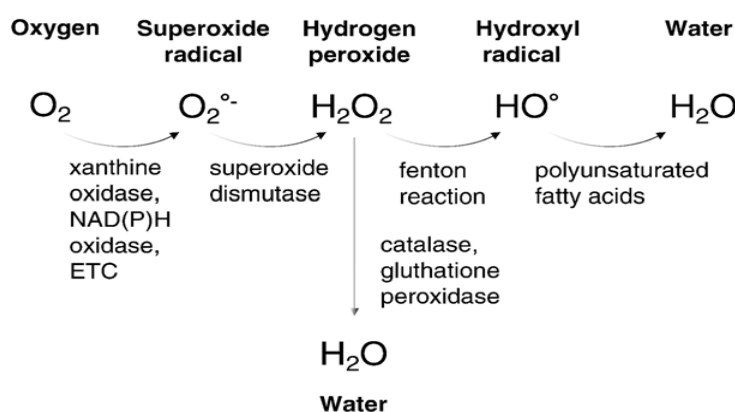


Fig. 44 : Cycle des ROS d'après Bienert et al., 2006

5.3- L'eau oxygénée

L' H_2O_2 appartient à une vaste gamme de catalyseurs chimiques, dont celui des peroxydases, dotés de propriétés à la fois réductrices et oxydantes, et communément désignés par les espèces réactives de l'oxygène (ou Reactive Oxygen Species, ROS). Depuis longtemps, l' H_2O_2 est considérée comme une menace à l'homéostasie cellulaire mais de

récents travaux montrent qu'elle aurait une fonction de molécule signal participant au contrôle de différents processus essentiels chez les végétaux (Bienert et al., 2006). L'eau oxygénée serait produite principalement dans les peroxysomes, les chloroplastes et les mitochondries (Mittler et al., 2004) mais également dans l'apoplaste et dans le cytoplasme.

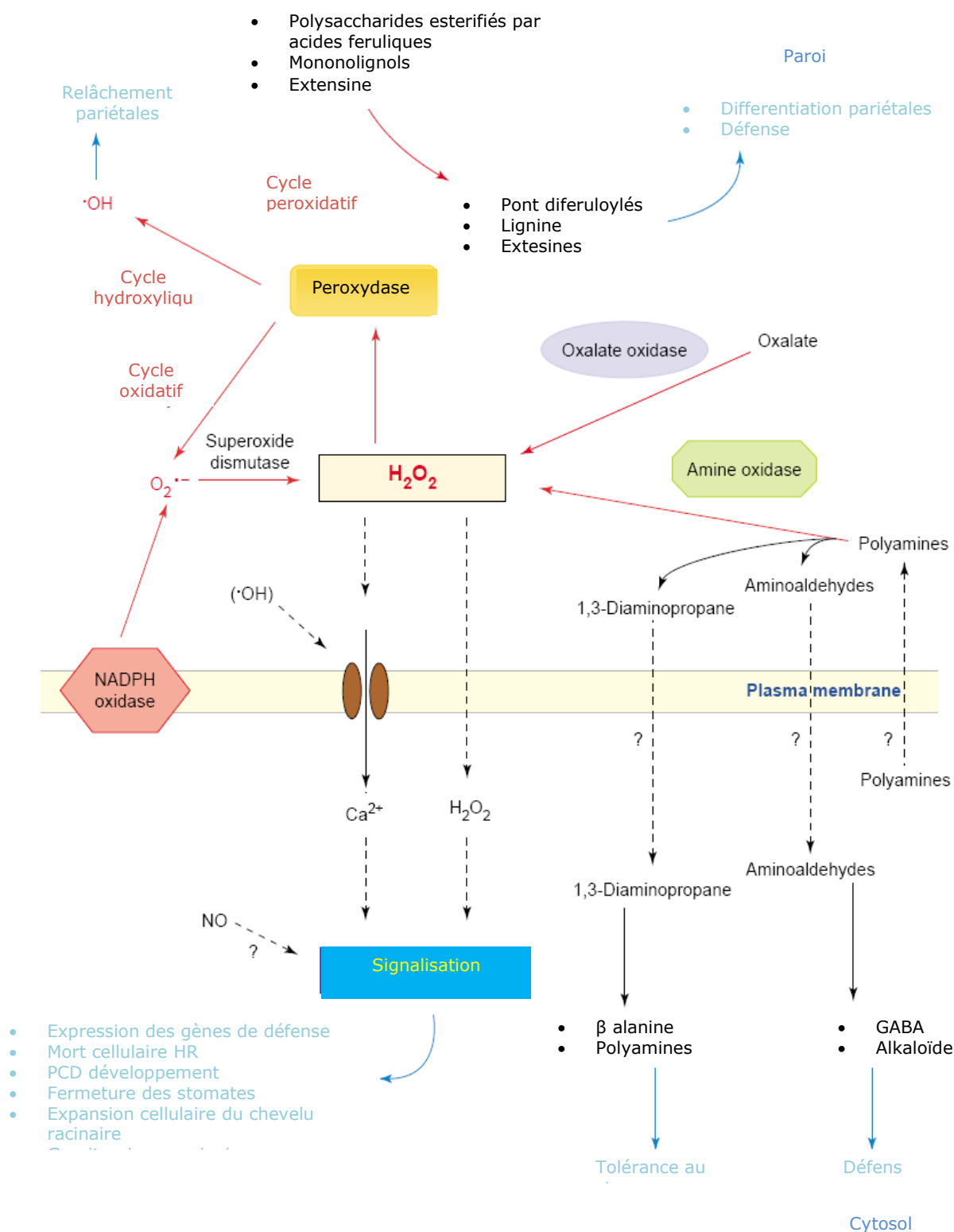


Fig. 45 : Métabolisme et rôle de l'eau oxygénée d'après Cona et al., 2006

a) Métabolisme

Le métabolisme et les fonctions de l'eau oxygénée sont complexes (Fig. 45). L' H_2O_2 peut être générée par de nombreux systèmes enzymatiques qui sont plus ou moins connus. Les peroxysomes sont des organelles de la respiration subcellulaire qui contiennent des catalases et des flavines oxydases productrices d' H_2O_2 (DelRio et al., 1992). Le principal processus métabolique responsable de la génération d' H_2O_2 dans les différents types de peroxysomes est la photorespiration grâce à la glycolate oxydase mais aussi la β -oxydation d'acides gras, les flavines oxydases et la disponibilité en ion superoxide $\text{O}_2^{\cdot-}$ (DelRio et al., 2006). En effet, les peroxysomes peuvent générer des quantités importantes d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ à partir duquel l' H_2O_2 est produit par les superoxide dismutases (SOD) peroxysomales (DelRio et al., 2002). Plusieurs systèmes enzymatiques sont proposés pour générer l' H_2O_2 dans l'apoplaste. Les peroxydases sont proposées pour produire l' H_2O_2 via l'utilisation de NAD(P)H oxydase (Baker et al., 2000) ou pendant l'autoxydation de l'alcool coniférylique qui conduit à l'activité oxydase inhabituelle de la classe III des peroxydases "lignifiantes" (Pomar et al., 2002), par les germines-like oxalate oxydases (Caliskan et al., 1998) ou bien encore les amines oxydases (Hu et al., 2005). La plupart des données se rapportant à ce métabolisme ont été obtenues dans l'étude des mécanismes de défense des plantes à la suite de stress biotique ou abiotique (c'est la poussée oxydative = oxidative burst). En effet, les systèmes enzymatiques conduisant à la synthèse de l'eau oxygénée sont généralement stimulés en réponse à ces stress (Liu et al., 1999).

b) Régulation et transport

L' H_2O_2 est relativement stable (par rapport aux autres ROS radicalaires comme le radical hydroxyl ou l'ion superoxide $\cdot$); sa concentration dans les tissus végétaux est comprise entre le micromolaire et le millimolaire en fonction de la nature des compartiments cellulaires (Cheeseman, 2006). Les plantes sont plus tolérantes que les animaux à l' H_2O_2 et leur système anti-oxydant assure le contrôle de la quantité d'eau oxygénée plutôt que son élimination totale (Foyer et Noctor, 2000). Les plantes possèdent un fort pouvoir tampon redox et contiennent une grande quantité d'anti-oxydants hydrophiles tels que l'ascorbate et le glutathion (Pastori et Foyer, 2002). Ces composés sont utilisés par des peroxydases (ascorbate peroxydase : APX ; glutathion peroxydase : GPX) pour éliminer l'eau oxygénée en conditions de stress abiotique. Plusieurs systèmes enzymatiques impliquent des peroxydases. Deux formes de transports de l'eau oxygénée ont été proposées. Dans l'apoplaste il serait transporté jusqu'au cytoplasme via les aquaporines (Pastori et Foyer, 2002). Dans le cas des peroxysomes, chloroplastes ou encore les mitochondries, le transport procède par un

phénomène de diffusion libre à travers la bicouche lipidique de la membrane ; ce mécanisme serait régulé par les changements de la composition lipidique. Des protéines canaux faciliteraient cette diffusion (Bienert et al., 2006).

c) Rôles

De nombreux rôles sont imputés à l'eau oxygénée notamment dans le développement et la prolifération cellulaire, la réponse à différents stress, mais également dans la lignification ou encore dans la mort cellulaire programmée (ou apoptose chez les végétaux). C'est également une molécule signal notamment lors du gravitropisme de la racine, qui agit en aval de la transduction de signal pour l'auxine ou encore en tant que messager secondaire du calcium.

La production d' H_2O_2 est détectée dans les cellules du xylème en cours de lignification (Olson et Varner, 1993 et Czaninski et al., 1993). L'eau oxygénée peut contribuer à la différenciation du xylème et sa lignification par différents mécanismes. La production d' H_2O_2 est maintenue à de fortes concentrations dans les tissus du xylème en cours de lignification où il intervient en tant que catalyseur de la polymérisation oxydative des alcools coumarique, coniférylique et sinapylique en lignine. En outre, l' H_2O_2 constitue un métabolite signal (Cona et al., 2006), qui active la transcription des enzymes de la voie de biosynthèse des lignines telles que la PAL (Desikan et al., 1998) et les peroxydases (Wu et al., 1997). De cette façon l' H_2O_2 a un rôle initiateur dans la formation de la paroi secondaire et intervient dans la mort cellulaire programmée au niveau des cellules du xylème en différenciation (Fukuda 1996). Les cellules du parenchyme non lignifié ont été proposées comme le site de production d' H_2O_2 nécessaire pour activer la transcription et la polymérisation des alcools dans les parois secondaires voisines des vaisseaux en cours d'apoptose (Ros-Barceló, 2005).

Objectif du travail de recherche

Le lin cultivé (*Linum usitatissimum*) est une plante d'intérêt économique au niveau national. La France est en effet le premier producteur européen de lin à fibres et le troisième producteur au niveau mondial, après l'ex URSS et la Chine. Le lin « fibres » est cultivé pour la production de fibres longues aux propriétés remarquables (finesse, résistance aux tensions, nervosité). Au-delà des applications traditionnelles dans le domaine textile, ces fibres, disposées en périphérie de la tige de lin suscitent un intérêt croissant dans le développement de matériaux composites. Leurs propriétés mécaniques et physico-chimiques exceptionnelles non seulement reposent sur des caractéristiques morphologiques mais sont également étroitement dépendantes de l'architecture cellulosique et de l'organisation des polymères pariétaux dans la paroi de la fibre de lin. Cette organisation pariétale résulte de l'établissement de différents types d'interactions entre les polymères constitutifs, et se traduit donc par une structure viscoélastique complexe.

Une meilleure connaissance de la relation structure/propriétés des fibres est une étape déterminante dans la maîtrise de la qualité de ces structures pour envisager un usage raisonné dans des domaines d'application diversifiés. L'un des points clé de cette qualité réside dans la particularité des fibres de lin, à savoir leur faible teneur en lignine et la distribution de ce polymère au sein des couches pariétales formant la fibre. En effet, ce dépôt de lignine est susceptible de modifier sensiblement le comportement des fibres lors de leur extraction et par la même leur propriétés d'usage. Selon les applications envisagées, la lignine peut être un facteur entravant la séparabilité des fibres regroupées en faisceau cohésif dans la tige (ex fibre textile) mais pourrait contribuer à renforcer un faisceau dont le comportement mécanique repose principalement sur la richesse en cellulose (ex : matériaux composites). Une « gestion » contrôlée de ces lignines au sein des fibres apparaît déterminante pour optimiser les caractéristiques physico chimiques des fibres de lin et leurs propriétés d'usage.

Dans la tige de lin, la lignine représente moins de 4% de lignine dans les fibres externes contrairement au xylème qui renferme environ 25% de lignine. En outre la lignine de lin est caractérisée par la prédominance d'unités gäiacycle et de liaisons de type condensée (Day et al., 2005). Différents niveaux de contrôle sont susceptibles d'affecter le degré et le type de lignification dans les tissus végétaux. Au-delà des phénomènes de régulation de l'expression des gènes conduisant à la synthèse des unités constitutives des lignines, un niveau de contrôle

de ce processus peut s'appliquer à la dernière étape de biosynthèse des lignines : la polymérisation des monomères constitutifs. Cette étape, qui intervient au niveau de la paroi implique différents acteurs dont la disponibilité, la distribution et le rôle dans la lignification ne sont pas encore entièrement précisés.

L'un des principaux objectifs de cette étude est d'apporter des éléments de réponse sur les possibles contrôles de la polymérisation des lignines chez le lin, espèce qui offre une hétérogénéité tissulaire remarquable au regard des teneurs en lignines. Plus précisément, nous avons tenté d'évaluer les points suivants:

1) Distribution des précurseurs potentiels au regard de la qualité des lignines

Afin de visualiser une éventuelle hétérogénéité dans la disponibilité en monolignols entre les fibres périphloëmiennes et le xylème, nous avons dans un premier temps examiné la structure fine des lignines en lien avec l'anatomie du xylème puis examiné la distribution de la coniférine dans les tissus caulinaires au moyen d'approches immunocytochimiques. Compte tenu de la richesse des lignines de lin en unité coniférylique, nous avons centré notre étude sur ce dérivé glycosylé de l'alcool coniférylique, par ailleurs proposé comme le précurseur probable des monomères de lignines (Tsuji et al., 2004).

2) Monolignols oxydases

La dernière étape de la biosynthèse de la lignine consiste dans l'oxydation enzymatique des monolignols en radicaux phénoxyl, ces radicaux polymérisent au sein de la paroi cellulaire selon des mécanismes radicalaires non enzymatiques. L'oxydation enzymatique des monolignols est catalysée par des laccases (Liang et al., 2006) et/ou par des peroxydases ces dernières exigeant la présence de H_2O_2 (Sasaki et al., 2004, 2006).

Après avoir détecté par histochimie une activité essentiellement peroxydasique dans les tissus caulinaires, (ceci étant en accord avec les travaux réalisés par MC Dougall sur les tissus du lin, (Mc Dougall 1992)) nous avons caractérisé les peroxydases pariétales obtenues à partir de tissus riches en fibres périphloëmiennes ou de xylème, et examiné le potentiel de ces peroxydases à oxyder les monolignols.

3) Distribution subcellulaire de l' H_2O_2

La présence d'eau oxygénée a souvent été associée aux tissus en lignification (Olson et Varner, 1993 ; Czaninski et al., 1993). Nous avons examiné la distribution de ce composé en microscopie électronique afin d'étudier la disponibilité de l'eau oxygénée dans les tissus de tige de lin (fibres et xylème) à différents stades de différenciation.

4) Limitations organisationnelles à la lignification des fibres

Dans cette dernière partie, nous avons engagé une étude préliminaire de l'impact du

réseau pariétal sur la polymérisation des lignines. L'épaississement des fibres, initié au niveau snap-point, correspond à un dépôt rapide de cellulose très cristalline. Il en résulte un réseau particulièrement dense qui, de par l'absence de lignines et la prépondérance de la cellulose confèrerait aux fibres un caractère « gélatineux » similaire à l'aspect des parois formées dans le bois de tension. Afin d'examiner l'effet limitant de ce réseau cristallin à la pénétration et la progression d'enzymes telles que les peroxydases, nous avons examiné indirectement la distribution de l'eau par observation du comportement des fibres en ESEM. Conjointement une approche visant à comparer le degré de pénétration de polymères fluorescents a été abordée.

Ch 1 : Distribution du précurseur potentiel

Anatomie du xylème de lin : une exception

Detailed analyses reveal structural similarities
between flax and coniferin lignin (article en preparation)

Anatomie du xylème de lin : une exception

Contrairement aux fibres externes de lin qui ont donné lieu à de nombreux travaux en raison de leur importance dans l'industrie textile et plus récemment dans le développement de matériaux agrocomposites, le xylème de la tige de lin n'a été que peu étudié.

Day et al. (2009) remarquent que le bois présente une anatomie relativement homogène; les vaisseaux sont difficilement distinguables des fibres dans l'ensemble du xylème et ce même en utilisant les techniques de microspectroscopie UV.

Afin de mieux appréhender l'anatomie particulière du xylème de la tige lin, des coupes longitudinales ont été observées en microscopie électronique à balayage. Ces clichés montrent que très peu de vaisseaux sont présents dans la tige de lin à l'inverse des éléments trachéides, associés aux fibres trachéides (Fig. 1). Cette anatomie, proche des Gymnospermes posséderait des caractéristiques des Angiospermes primitifs. En effet, les vaisseaux sont absents du bois de Gymnosperme et sont peu abondants chez le lin (Fig.1). Les conifères possèdent des éléments trachéides. Dans le xylème de lin, des éléments vasocentriques trachéides aux ponctuations circulaires sont clairement distingués (Fig. 1 B) ainsi que des fibres trachéides provenant du dimorphisme des trachéides (Fig. 1 A et B) (Carlquist, 2001). Contrairement aux trachéides des vaisseaux des dicotylédones, les ouvertures ne sont pas elliptiques, mais sont arrondies avec un centre elliptique (Fig 1 C). Les vaisseaux observés en coupe longitudinale sont essentiellement spiralés (Fig. 1D) ou scalariformes (Fig. 1 E et F). Les vaisseaux scalariformes sont les structures des Angiospermes primitifs ne possédant pas de réels vaisseaux (Carlquist, 2001). Afin de préciser ces observations, des macérations ont été réalisées avec pour objectifs l'individualisation des cellules du bois et la visualisation des éléments trachéides non perforés (Carlquist, 2001). Les observations des cellules obtenues après macération sont réalisées en microscopie électronique à balayage (Fig. 2). En accord avec l'examen des coupes transversales de tige, les vaisseaux sont peu nombreux (Fig. 2 A et B.) contrairement aux éléments trachéides (Fig. 2 C) et fibres trachéides (Fig. 2 D). L'anatomie du xylème incluant des trachéides, des vaisseaux scalariformes et une faible proportion de vaisseaux classiquement rencontrés chez les dicotylédones suggère donc que le lin serait une Angiosperme primitive.

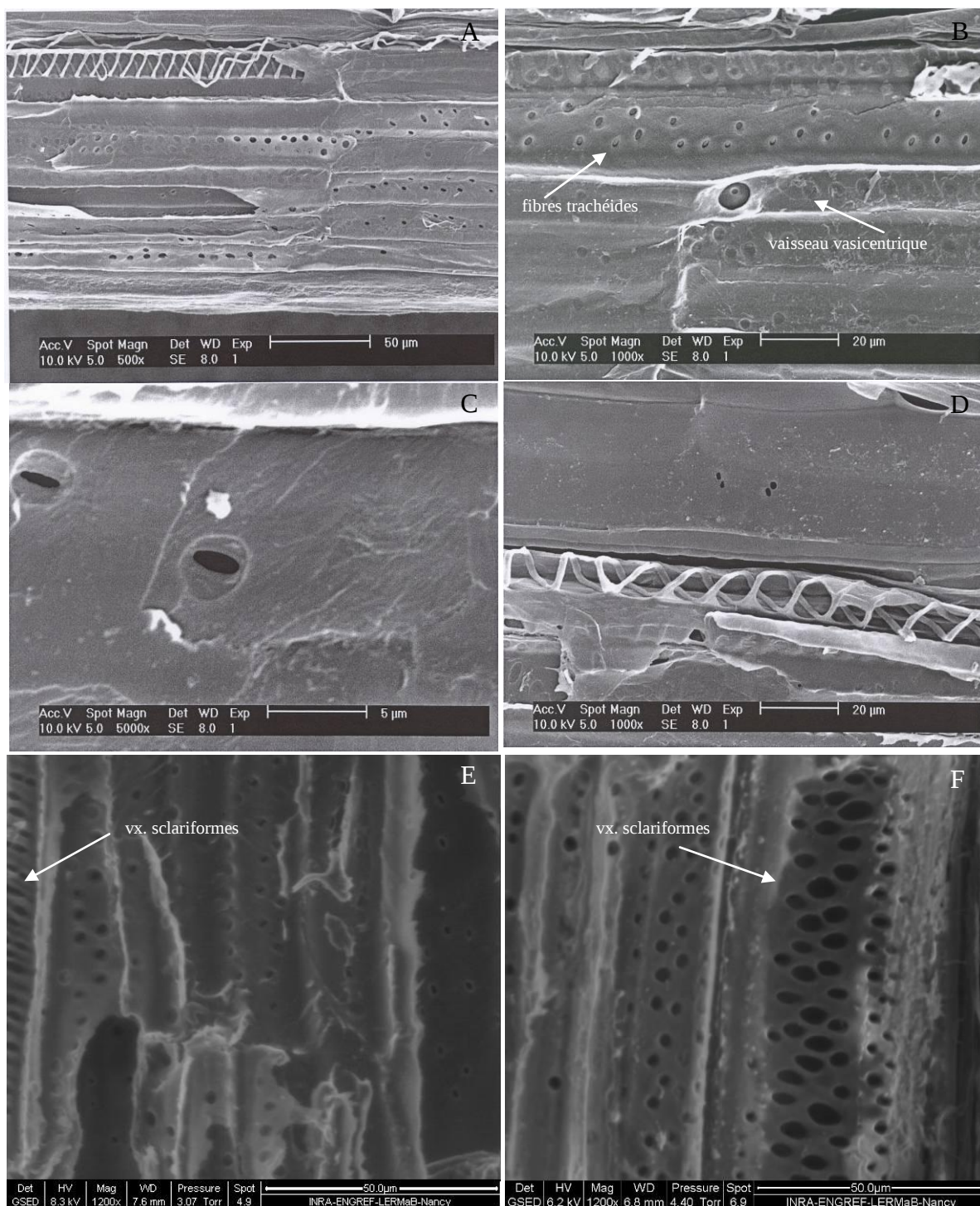


Fig. 1 : Coupes longitudinales de tiges de lin observe en MEB.

A : Vue d'ensemble d'un fragment de la tige ; B : Fibres trachéides et vaisseaux vasicentriques ; C : Vue agrandie des ponctuations des fibres trachéides ; D : Vue agrandie d'un vaisseau spiralé ; E : Vue d'ensemble d'un fragment de tige montrant la présence de vaisseau scalariforme; F : Vue agrandie d'un vaisseau scalariforme.

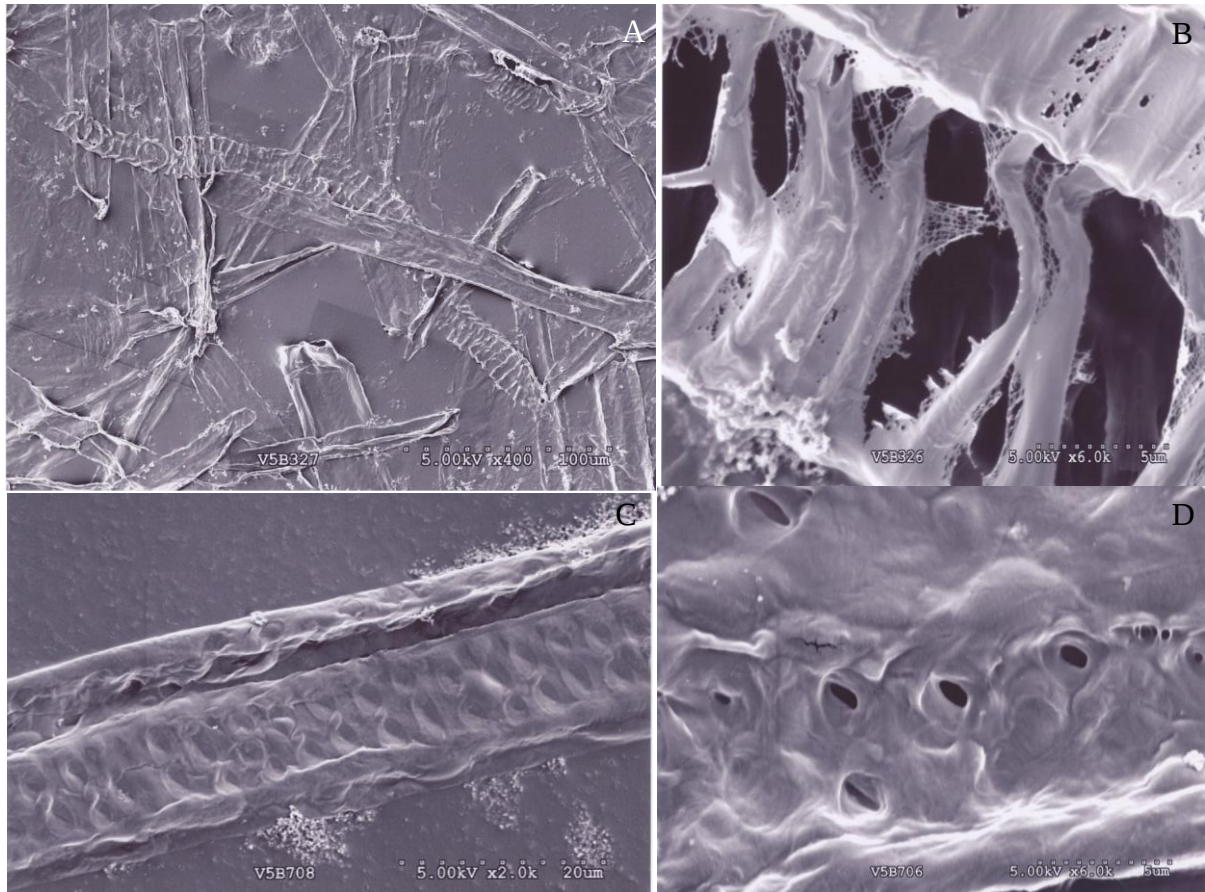


Fig. 2 : Cellules obtenues par macération des tiges xylème de lin au stade floraison observées en MEB.

A : Vue globale des cellules ; B : Vue agrandie d'un vaisseau ; C : Vue agrandie des trachéides vasicentriques ; D : Vue agrandie des fibres trachéides

Detailed analyses reveal structural similarities between flax and conifer lignin

F. NOLIN^{1,2} ; E. M. KUKKOLA³ ; D. CRÔNIER¹ ; C. LAPIERRE⁴ ; K. V. FAGERSTEDT³ ; S. HAWKINS² ; B. CHABBERT¹

1. UMR 614 INRA-URCA, Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE), Equipe Structures et Propriétés des Parois secondaires, 51686 Reims, France
2. UMR 1281 USTL-INRA, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés. UFR Biologie. Bât SN2. 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France.
3. Department of Biosciences, Division of Plant Physiology, Helsinki University, PO Box 56, 00014 Helsinki, Finland
4. Laboratoire de chimie biologique, INRA, Centre de Grignon, F-78850 Thierval-Grignon, France

Introduction

Lignin is a cell wall phenolic polymer which results from the oxidative polymerization of monolignols, namely p-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols that give rise to p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) moieties in the polymer (Sarkanen and Ludwig, 1971). The quantity and monomer composition of lignins is highly variable according to species, cell types, individual wall layers (S1, S2 or S3), stages of development or even environmental conditions (Lewis et al., 1999). The amount of lignin in woody gymnosperms can reach 30% of dry matter while lower proportions are generally determined in angiosperms

(Peter & Neale, 2004). Angiosperm lignins are composed of S and G units, together with trace amounts of H units whereas gymnosperm lignins are mostly made of G units, together with low levels of H units.

Monolignols are derived from phenylalanine and are synthesized by a complex cascade of reactions involving many enzymes (Boudet, 2007). The lignin building units are polymerized in the preexisting polysaccharide-rich cell walls. Polymerization is initiated by oxidative enzymes that convert monolignols into phenoxyl radicals. Association of the radicals then proceeds via non enzymatic coupling reactions into multiple inter-monomer bonds. The most frequent inter-unit bond in native lignins is the β -O-4 linkage which is considered as a non-condensed linkage, as opposed to condensed bonds (β -5, 5-5, β - β , 4-O-5 and β -1 bonds), that are more resistant to chemical degradation. The proportion of the various linkages depends on the proportion of H, G and S units. For example, lignins mainly composed of G units contain more β -5, 5-5 and 4-O-5 bonds than syringyl-guaiacyl lignin types because of the availability of the aromatic C-5 position for coupling. The availability of the C-5 position in G lignin is also associated with specific lignin substructures such as dibenzodioxocine, an 8-ring lignin substructure (Ralph et al., 2004). Dibenzodioxocine, identified by Karhunen et al. (1995) has been previously immunoprobed in gymnosperms, especially in the secondary wall at the Norway spruce (Kukkola et al., 2003). In contrast, this structure only occurs in trace amounts in poplar lignin (Ammalahti et al., 1999) and can therefore be considered as a signature for conifer G-type lignin.

Flax is an annual angiosperm dicotyledon plant with *Linum usitatissimum* being the main cultivated specie (Millam et al., 2005). Fibre-flax cultivars are mainly used for their long fibres in textile application and potentially in agrocomposite materials (Akin et al., 2005). We have previously investigated the distribution and monomer composition of lignins in flax stem tissues. In contrast to xylem cell-walls, which contains ~ 25 % lignin, only ~3 % are detected in cellulose-rich bast fibres (Day et al., 2005). Flax lignin presents a relatively unusual composition since it is characterized by a G-unit-rich condensed type with S/G values of ~ 0.2 (xylem) and 0.3 (fibre) (Day et al., 2005). Immunoprobings of xylem lignin indicated that, as observed in other angiosperms, G condensed lignin is mostly distributed in the middle lamella, cell wall junctions, and S1 layer of the secondary cell walls while GS lignins occurred in secondary cell walls. Flax bast fibre lignins also give similar, but less intense reactions with lignin immunoprobes (Day et al., 2005). Interestingly, flax also appears to be somewhat atypical (for an angiosperm) with regards to the anatomy of its xylem. Flax xylem

is very homogeneous and parenchyma rays, for example, are hardly distinguishable in xylem cross-sections, and vessel and fibre diameters are very similar (Day et al., 2009). To some extent, the anatomy of flax wood resembles that of gymnosperm xylem (homogenous architecture : tracheids, ray, parenchyma) in comparison with that of angiosperms (vessels, fibres, fibre tracheids, ray , parenchyma) (Schwarze, 2007).

The present study aimed at providing further detailed information on flax lignin structure using both chemical and cytochemical approaches. In addition, given the apparent similarities between flax and gymnosperm lignin, we also decided to see whether we could detect coniferin which is the most likely precursor of G-lignin structures in gymnosperms. To this end, coniferin antibody was produced, used for immunolabelling and observed in TEM.

Materials and methods

Plant material

Flax cv. Diane was grown under field conditions (LINEA, Granvilliers, France). Whole stems were harvested at the green capsule developmental stage for lignin isolation. For microscopic observations, bottom and snap point regions of the stems were sampled at both flowering and green capsule stages.

Isolation of flax lignins and characterization

Lignin isolation : The bark was peeled off and the inner part of the stem was freeze-dried. After grinding to 1mm, stem powder was extracted with toluene-ethanol (2:1, v/v) for 5h and ethanol 95% for 5h in a Soxhlet apparatus before freeze-drying. The resulting extractive-free material was called cell wall residue (CWR).

Two successive fractionation steps were then applied in order to isolate lignin. (1) Intensive ultra-milling of CWR and dioxane-extraction allowed the recovery of milled-wood lignin fraction (ML). CWR (13g) were submitted to ultra-milling for 72 hours in a VIBRATOM grinder in ceramic jars and grinding balls (10 mm diameter). The fine powder was extracted with 90% dioxane-water (10 mL/g) and stirred for 24 hours. The dioxane extracts were removed by centrifugation and extraction repeated until no significant release of UV absorbing compound could be observed.

The dioxane extracts were combined, and their volume reduced to 7.5 mL under reduced pressure prior to precipitation into 120 mL of 5% sodium sulfate aqueous solution. The

completeness of lignin precipitation was ensured at 4°C for 48 hours. The precipitate was recovered by centrifugation, washed twice with water and finally dissolved in 6 mL acetic acid. The acetic acid solution was injected into 60 mL of diethyl-oxide. The precipitation was completed overnight and at room temperature. The precipitate was recovered by centrifugation, washed twice with water and finally freeze-dried to recover the so called ML fractions. (2) The residual powder recovered after the extraction of the ML sample was washed with water to remove dioxane and then treated with a commercial cellulase preparation (cellulase Onozuka, Serva). The enzymatic hydrolysis of the ML-free final residue was carried out in 0.5M acetate buffer pH 4.6 at 37°C (10 g of LM-free residue and 4 g of enzyme preparation in 800 mL) and for 72 hours. The insoluble sample was recovered by centrifugation, washed with water to remove the cellulolysis reagent and then freeze-dried before the extraction of lignin with aqueous dioxane as described above. The recovered purified lignin fraction was called enzyme lignin (EL)

Chemical evaluation :

Thioacidolysis. 10 mg of sample (ML and EL) were submitted to a mixture of BF₃/ethanethiol/dioxane for 4 hours at 100°C as detailed previously (Vallet et al, 1996) Thioethylated derivatives of monolignols were analyzed as trimethyl silyl derivatives using gas chromatography, with a fused silica capillary DB1 column (30m, 0.25μ) using helium as a carrier gas. The temperature gradient was 160-200°C at 3°C min⁻¹. Quantitative evaluation of the non-(hydroxyphenyl), mono (guaiacyl), or dimethoxyl (syringyl) moieties was carried out using tetracosane as internal standard and a flame ionization detector. Identification was carried out by GC-separation and mass spectrometry. Measurements were performed in triplicate.

Raney nickel desulphuration. The compounds derived from thioacidolysis were mixed with Raney nickel as described by Lapierre et al., 1991. Lignin-derived dimers were identified by GC-MS and quantified by GC, as their TMSi derivatives according to Lapierre et al., 1991b.

Total sugar composition was determined after 1M sulfuric acid hydrolysis (2 hours, 100°C) of the fractions (ML, EL) according to Blakeney and quantified as alditol acetates using *myo*-inositol as internal standard. Alditol acetates were purified by gas chromatography using an SP2380 column (SUPELCO) with a temperature gradient of 2°C min⁻¹ from 230°C to 250°C and a constant flow of helium.

Total protein: Nitrogen content of lignin fractions (ML, EL) was determined by sample combustion through oxidation at high temperature (900°C). The protein content was obtained by multiplying the nitrogen amount by 6.25.

SEC analysis: Before analysis, lignin fractions were submitted to acetylation in a mixture of acetic anhydride and pyridine (1:1, v/v) overnight at room temperature. The reaction products were then poured into ice water and extracted with CH₂Cl₂. Organic layers were washed with sodium carbonate and saturated sodium chloride solutions.

Experiments were performed on a multidetection system consisting of an online vacuum degasser (ERC 3215, ERC Inc.), HPLC pump (Waters 510), autosampler (Waters 717), columns oven (Waters), UV detector (Waters 486) and refractive index detector (Waters 410). Standards and sample solutions (150 µl) were injected at a concentration of 0.1%. Separation was performed on thermostatically-controlled Waters columns (50 °C; 2 columns PL gel mixed D 7.5 x 300 mm each; Polymer Laboratories) using a flow rate of 1 ml/min. The calibration curve (Log Molecular weight= f(retention time)) was plotted using nine low molecular weight monodisperse polystyrene standards (980 to 20700 g/mol), R²=0.997.

Sample preparation for immunodetection of dibenzodioxocin and coniferin

High pressure freezing: Small fragments (5 mm height) from the snap point and bottom regions of stems harvested at the flowering and green capsule stages were immersed under vacuum in a 0.1M phosphate buffer pH 7.2 containing 0.1M sucrose. Fragments were then rinsed 3 times in water before sectioning into 140 µm thick sections using a vibrating microtome (Microm Microtech, HM 650 V). The sections were then placed in a drop of Hexadecen before positioning in a 200 µm deep hat filled with hexadecen. The sample was then transferred to the EM-Pact (Leica) that allowed high pressure cryofixation (2,000 bars). The hats are then kept in liquid nitrogen until their transfer to the AFS (Automatic Freeze Substitution, Leica). They were then placed in Eppendorfs containing the cryosubstitution medium (2 % OsO₄ in acetone) previously cooled to -90 °C. The temperature was then gradually increased reach 0 °C and the cryosubstitution solvent was replaced by acetone. Samples were then impregnated with increasing amounts of EPON (Fluka) prior to resin polymerisation (24 hours to 60 °C)..

Preparation of coniferin hapten, production of the antiserum and determination of antiserum specificity

Coniferin synthesis has been described in Marjamaa et al. (2003). Dibenzodioxocin and biphenyl were synthesized as described in Kukkola et al. (2003). Conjugation of coniferin to the carrier protein, in this case cationized BSA (cBSA) was performed using the Inject Pharmalink Immunogen Kit (Pierce, Rockford, Ill., USA) according to manufacturer's instructions.

Two New Zealand rabbits were immunized with coniferin-cBSA conjugate with an equal volume of Freund's complete adjuvant. The rabbits were boosted 3 times after 2, 4 and 6 weeks with coniferin-cBSA conjugate mixed with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant and bled a week later. Pre-immunization samples were also drawn before the first injections. After bleeding, the sera were incubated at room temperature for 2.5 h and centrifuged for 15 min at 3000 g. IgG fractions of coniferin antiserum and the preimmune serum were purified by 45% ammonium sulfate precipitation, followed by ion-exchange chromatography on a DEAE-cellulose column (Sigma). Specificity of the antiserum was tested by dot blot technique, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect competitive ELISA.

Dot blot

In addition to coniferin, coniferyl alcohol (Fluka), biphenyl and dibenzodioxocin were also used in the dot blot test. Nitrocellulose membrane, pore size 0.45 μm , was used. Coniferin, coniferyl alcohol, biphenyl and dibenzodioxocin were pipetted in different amounts varying from 0.015 to 15 μg onto the membrane. Coniferin and coniferyl alcohol were diluted in 0.06 M sodium phosphate buffer pH 7.2 with 0.15 M sodium chloride while biphenyl and dibenzodioxocin were diluted in DMSO. The membrane was pretreated in water for 10 sec and in the blotting buffer, TBST (25 mM Tris, 200 mM NaCl, 0.05% Tween20, pH 7.4) for 5 min. After that membrane was incubated in a blocking solution (5% non-fat milk) for 1 h and rinsed with TBST. The membrane was incubated for 1 h in coniferin antibody diluted 1:20 in 5% non-fat milk. After that the membrane was rinsed with TBST three times for 5 min and incubated for 1h in Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Promega) diluted 1:7500 in 5% non-fat milk. The membrane was washed with TBST three times for 5 min. Alkaline phosphatase detection was performed using anti-DIG conjugated alkaline phosphatase (AP) and BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium according to manufacturer's (Roche) instructions.

ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the determination of antiserum specificity. Titration experiment was performed as described in Kukkola et al. (2003) except that the Nunc-Immuno MaxiSorp 96-well plates (Nunc) were coated with coniferin–cBSA conjugate using 2-fold serial dilution from 10 µg/ml. The coniferin antiserum was diluted 1:10 in TBS (180 µl/ml coniferin) and diluted in a 2-fold series across the plate. Absorbance was measured at 405 nm using a Multiscan MCC/340 plate reader (Labsystems, Finland).

The specificity of the antiserum was determined by indirect competitive ELISA as described in Kukkola et al. (2003) except that the microtiter plates were coated with coniferin–cBSA (5 µg/ml). Coniferin and coniferyl alcohol were diluted as 10-fold serial dilutions in TBS from 2 µM in the first step and coniferin antibody diluted 1:320 in TBS buffer.

Dibenzodioxocin and coniferin *in situ* immunohistochemistry

Dibenzodioxocin immunodetection was performed on semi-thin sections (0.5µm) cut with a microtome ((HM 360, Microm). The antibody raised against dibenzodioxocine was obtained as previously described by Kukkola et al., 2003. Immunolabelling was performed as described by Kukkola et al. (2004) except that 1% goat serum was added in all reagents. Control sections were incubated with the blocking solution without antibody, or with preimmune serum IgG fraction used at the same dilution as the antibodies.

The dibenzodioxocine antibody labelling of the sections was viewed after silver enhancement by epifluorescence microscopy using AxiomCam MRc digital camera and corresponding image analysis software.

Coniferin immunodetection: Ultrathin (80-100 nm) sections were cut with an ultramicrotome (LKB UM IV Ultratome) and collected on nickel grids. Sections were treated in the same conditions as those used for epifluorescence. After reaction with primary antibody and washing, sections were floated on a 50 µL droplet of gold conjugated protein A (10 nm gold bound to protein A, (Utrecht University, The Netherlands) for 1.5 h. The dilution of the protein A gold is determined by the manufacturer. The grids were then washed 3 times for 1 min in Tris-HCl, pH 8.2 containing 0.5M, 20% NaN₃, 1% milk and 1% goat serum (v/v) and then washed 2 times for 5 min in distilled water. Control sections were incubated with the blocking solution without antibody, or with preimmune serum IgG fraction used at the same

dilution as the antibodies. Coniferin immunolabelling of ultrathin sections was observed with a Jeol JEM 1200EX transmission electron microscope at 60 kV acceleration voltage.

Results and discussion:

1- Structural features of flax lignin

Chemical investigation of milled flax lignin Milled wood lignins (ML) and enzyme lignins (EL) were isolated from the cell walls of flax xylem. Recovery yields of ML and EL were 1.7 ± 0.1 % and 3.5 ± 0.1 % of total CWR, which represented almost 6 and 14% of total lignin content. These values are in agreement with the yields of milled wood lignins obtained in similar conditions from softwood. These yields represent generally less than 16% of initial lignin, while lignin extraction from angiosperm woody species give rise to higher yields (Guerra et al., 2006a; Tollier et al, 1986). Generally speaking the longer the milling period, the higher the ML yields, however prolonged milling may alter the lignin structure (Lai and Sarkanen, 1971). Further enzymatic treatment enabled the recovery of an additional lignin fraction (EL) which represented twice the amount of ML. Chemical characteristics of the lignin fractions ML and EML are summarized in Table 1.

Table 1 : Chemical features of flax lignin fractions

		ML	EL
Total sugar	(% dry matter)	10.6 +/- 0.4	4.5 +/- 0.1
Protein	(% dry matter)	1.5 +/- 0.2	1.2 +/- 0.1
Lignin composition ($\mu\text{mol/g}$ lignin fraction)			
Thioacidolysis	<i>p</i> -Hydroxyphenyl	10 +/- 1	9 +/- 1
	Guaiacyl	926 +/- 49	1008 +/- 19
	Syringyl	94 +/- 7	189 +/- 4
	S+G	1020	1197
	S/G	0.10 +/- 0.0	0.19 +/- 0.0
SEC analysis	Mw	12458 +/- 329	38743 +/- 5815
	Mn	3840 +/- 28	5561 +/- 53
	Polydispersity	3.2 +/- 0.1	7.0 +/- 1.1

Both lignin fractions contained low percentages of sugar that account for 10% and 4.5% of ML and EL dry matter respectively. Xylose represented 50% (EL) to 80% (ML) of the total sugars, indicating that some xylans are still present in the lignin fractions. Protein values in both ML and EL fractions were less than 2% indicating that these polymers represented only minor contaminants of the flax lignin fractions. When the quantification of both residual polysaccharides and protein are taken into account, ML and EML fractions contained 88% and 94 % lignin respectively

SEC analysis of both lignin fractions was done using THF as eluant after acetylation of lignins. Molecular weight determination of acetylated lignins by HPSEC (using THF) may vary greatly, depending on the different columns used (Ringena et al., 2006). Nevertheless, the average molecular weight (MW, weight average molar mass) obtained for the flax ML fraction (12,500) is in agreement with those determined by other authors in different coniferous species such as spruce (Mw ~ 21,000; Cathala et al., 2003) or Southern pine (Mw ~ 14,900; Guerra et al., 2006b). In contrast, calculated flax ML lignin molecular weights appeared much higher than those determined for other angiosperms such as eucalyptus (Mw ranged 6700 - 8300 ; Guerra et al., 2006b) and even higher when compared to different monocotyledons (wheat : 1150-1600; rice : 3709; Sun et al., 1997). Determination of the number average molar mass (Mn) allowed us to calculate the coefficient of polydispersity (Mw/Mn) of lignins isolated from flax. The value of the ML polydispersity was close to those of gymnosperms (3.5) while this coefficient was about 2.5 for angiosperms lignins (Faix et al., 1980, 1981). The average molecular weight and polydispersity of EL fractions gave higher values than ML fraction indicating that this lignin fraction is more heterogeneous.

These results suggest that the overall structure of flax lignin is more similar to that of conifers than to that commonly observed in other angiosperms. Further detailed analyses of flax lignin confirmed this initial conclusion.

Data on the monomer composition of the flax non condensed lignin was obtained by thioacidolysis that specifically cleaves arylglycerol- β -aryl ether linkages (Rolando et al., 1992). In agreement with our previous studies and other reports (Day et al., 2005) the ether labile fractions of isolated flax lignins consist mainly of G units, as indicated by the low S/G values (0.10 for ML and 0.19 for EL). Only traces of the H unit (approx. 1 %) were detected and the G fraction represents 90% (ML) and 83 % (EL) of the non condensed lignin. As previously observed (Day et al., 2005), flax has had the lowest S/G between 0.1 and 0.19 depending on the type of lignin extracted as compared to other bast fibre species : 0.8 for

hemp (Lora, 2002), 2.1 for jute (Islam and Sarkanen, 1993) and 3.5 for kenaf (Nishimura et al., 2002). In other angiosperm (woody) species such as poplar the S/G ratio varies between 1.8 and 2.3 (Lapierre et al., 1986; Davidson et al., 2006). From a perspective of plant evolution, the G-rich plants are reported as more primitive than plants with S-G lignins (Faix, 1991).

The condensed inter-monomer linkages were fingerprinted through the characterization of lignin dimers released by thioacidolysis. The structures of the main dimers detected in flax lignins are shown in Fig. 1, and their relative abundances are given in Table 2. The main dimers were GG type while GS-dimers were hardly detected. The SS dimers represented only 2% and 3% of the total dimer fraction of ML and EML respectively. Main dimer structures corresponded to 5-5, 4-O-5, β -1 and β -5 linkages. The two lignin fractions (ML or EL) shared

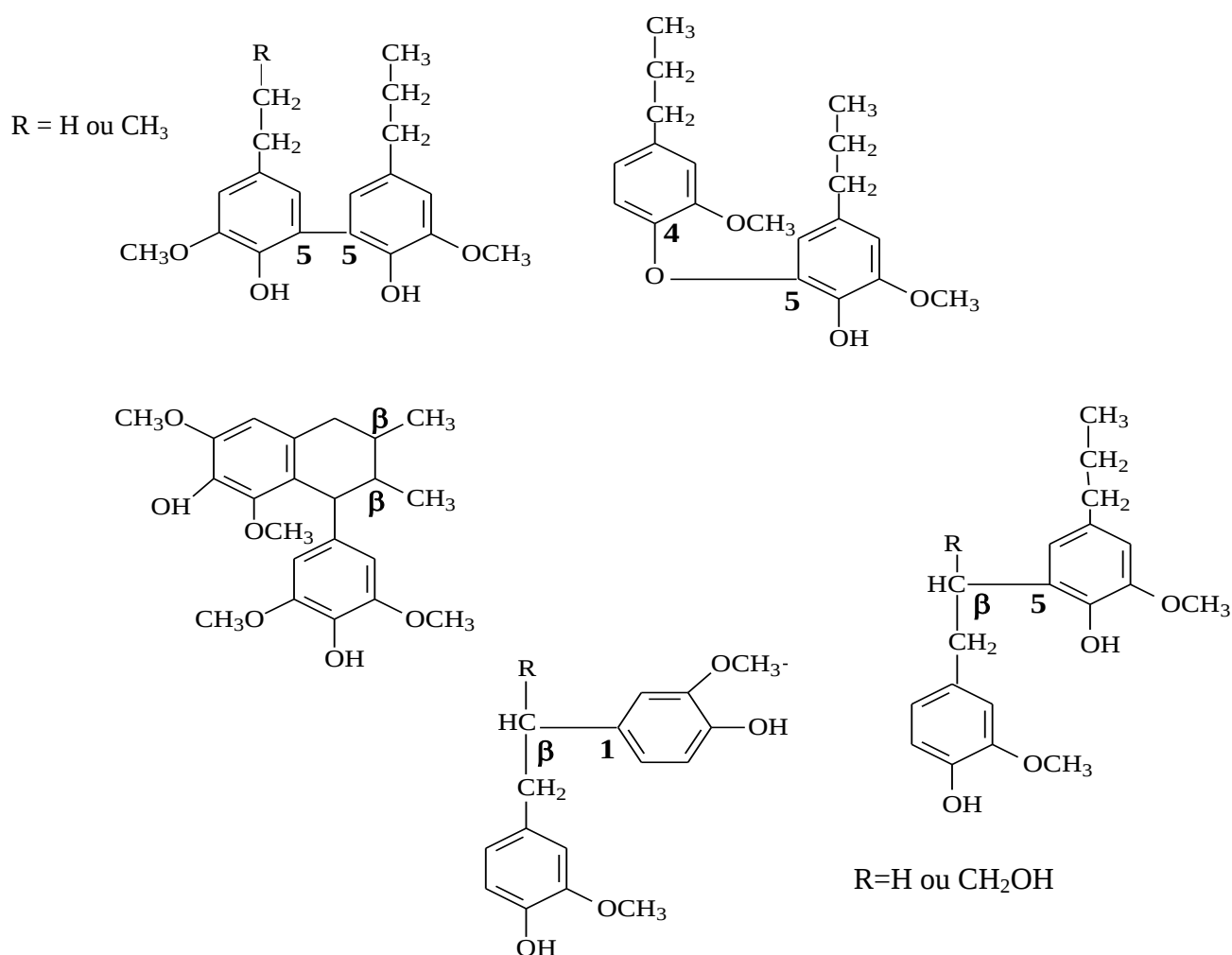


Figure 1 : Main dimers obtained after thioacidolysis and desulphuration over Raney nickel .

Table 2 : Relative importance (molar percentage) of the various dimer degradation products recovered from thioacidolysis of flax lignin (ML, EL)

Lignin	5-5 GG	4-O-5 GG	β -1 GG	β -5 GG	β - β SS
ML	28.2 (0.5)	4.7 (0.0)	27.0 (0.1)	38.8 (0.4)	1.3 (0.0)
EL	28.0 (1.5)	4.2 (0.2)	24.2 (0.2)	41.6 (1.3)	2.0 (0.2)

common features as the 5-5 and β -5 linkages were predominant in both cases; β -5 linked dimer accounting for the most prominent form. The dimer signature in flax lignin thus appeared unusual with regards to angiosperm lignin. Indeed, not only S-G dimers were hardly detectable but also the molar proportion of 4-O-5 dimers was less than 5% of total dimers. In contrast to typical features of angiosperm lignins, the 5-5 linkages represent the main dimer structure amongst thioacidolysis products. Such dimer signature makes flax lignin very close to conifer lignin where 5-5 linkage represents nearly 32% of interunit linkage (Lapierre et al., 1994; Saito and Fukushima, 2005). In softwood the main dimer structure are β -5 (with a molar frequency about 30 in pine and spruce) and 5-5 (molar frequency =32.7 in pine and 30.9 in spruce). In contrast lignin in hardwoods such as beech (Nimz et al., 1974) or poplar (Lapierre et al., 1995) would mainly contain the β -1 structure (29 at 48 % in poplar and beech) and β - β one (29% in poplar and 19% in beech) (Table 3). The similarity of these patterns between ML and EML tend to show that this signature could be considered as representative of flax lignin.

Linkage	spruce (Lapierre et al., 1994)	pine (Saito and Fukushima, 2005)	poplar (Lapierre et al., 1995)	beech (Nimz, 1974)
β -5	31	30	24	19
5-5	32	32.7	9	7
4-O-5	6	8.3	9	7
β -1	26	27.1	29	48
β - β	traces	traces	29	19

Table 3 : Relative importance (molar percentage) of the various dimer degradation products recovered from thioacidolysis of softwood and hardwood lignin

Given the lignin proportion in each fractions and assuming that average weight of lignin unit is 200, one could determine the proportion of non condensed structure in the lignins isolated from flax. The ML and EML contained 23% and 25 % ether labile structures and appeared almost similar in this respect. The yield of dimers were less than 5% of the polymer. Therefore chemical depolymerisation of the lignin fractions did not enable the characterization of the whole polymer, only 25% non condensed fraction available by thioacidolysis.

Given the richness in G type lignin and the dimer fingerprint we decided to complement these investigations by *in situ* detection of condensed structures that have been immunoprobed in gymnosperms.

In situ detection of dibenzodioxocin. Dibenzodioxocin is a 5-5-O-4 structure, which was obtained by *in vitro* oxidation of a 5-5 biphenyl with the coniferyl alcohol (Karkhunen et al., 1995). This structure is considered to be a condensed lignin substructure which mainly occurs in conifer wood (Karkhunen et al., 2005) A polyclonal antibody raised against dibenzodioxocine has been previously shown to label conifer xylem (Kukkola et al., 2003).

Given the predominance of 5-5 inter-unit bonds in flax lignin (thioacidolysis results), we decided to see whether dibenzodioxocine structures could be detected in flax lignins. To do this we used the dibenzodioxocine antibody previously described (Kukkola et al., 2003). The results (Fig. 2) showed an abundant labelling in the xylem cell walls at the snap point region of the stem (Fig. 2 A); this labelling appeared almost similar to the reaction displayed by older xylem situated in the bottom of the stem (Fig. 2 D). Gold particles were also observed through the entire thickness of the bast fibre (Figs. 2 B and C). The intensity of the labelling at the snap point region of the stem was higher than that observed in the bottom region (Fig. 2 E). Controls performed with preimmune serum or with secondary antibody did not show any positive reaction (Fig.2 F, G, H and I).

To date, dibenzodioxocine has been only immunolocalized in the xylem of conifers (spruce (*Picea abies*) and in the vessels of a woody angiosperm (silver birch (*Betula pendula* Roth) (Kukkola et al., 2003 and 2004). In the present study, dibenzodioxocin is immunodetected for the first time in an angiosperm herbaceous plant. In flax, this structure is apparently detected in the whole wall layers of xylem. However, previous studies have shown that the middle lamella was less stained by dibenzodioxocine antibody during secondary wall thickening (Kukkola et al., 2003).

Very few studies have addressed the subcellular distribution of lignin in bast fibres. G-condensed epitopes were shown in the cell corner and middle lamella as well as GS epitopes in the entire secondary cell wall (Day et al., 2005). The dibenzodioxocine antibodies gave rise to a dense labelling in all cell wall layers of the bast fibres indicating homogeneous distribution of this lignin substructure. The higher labelling observed in fibres at the onset of cell wall thickening (snap point region) as compared to the thick fibres (bottom region) appeared similar to the distribution of dibenzodioxocin in spruce that show homogeneous labelling of the tracheid cell walls in juvenile wood in contrast to the S3 layer in mature xylem (Kukkola et al., 2008).

The immunolocalization of dibenzodioxocin is thus clear and quite significant in flax stem tissues and would require further examination at sub-cellular levels or even other angiosperm species. Interestingly, our preliminary immunocytochemical experiments failed to detect dibenzodioxocin in poplar or hemp xylem. Altogether, the signature of interunit condensed linkage and the dibenzodioxocin immunodetection in xylem cell walls underline the occurrence of a “conifer-like” lignin structure in flax which is unusual with regards to angiosperm lignins. This large similarity between G type lignin encountered in flax and conifer lignin prompted us to address the distribution of the potential lignin precursor in coniferous species, coniferin, in flax stem tissues.

2- Coniferin immunolabelling.

Characterization of coniferin antibody. The dot blot test revealed that at 1.5 µg amount of the various epitopes per dot the coniferin antibody recognized clearly only coniferin. Larger amounts of the epitopes (over 15 µg per dot) resulted in a signal in coniferyl alcohol and 5-5 biphenyl but again with coniferin the signal was stronger.

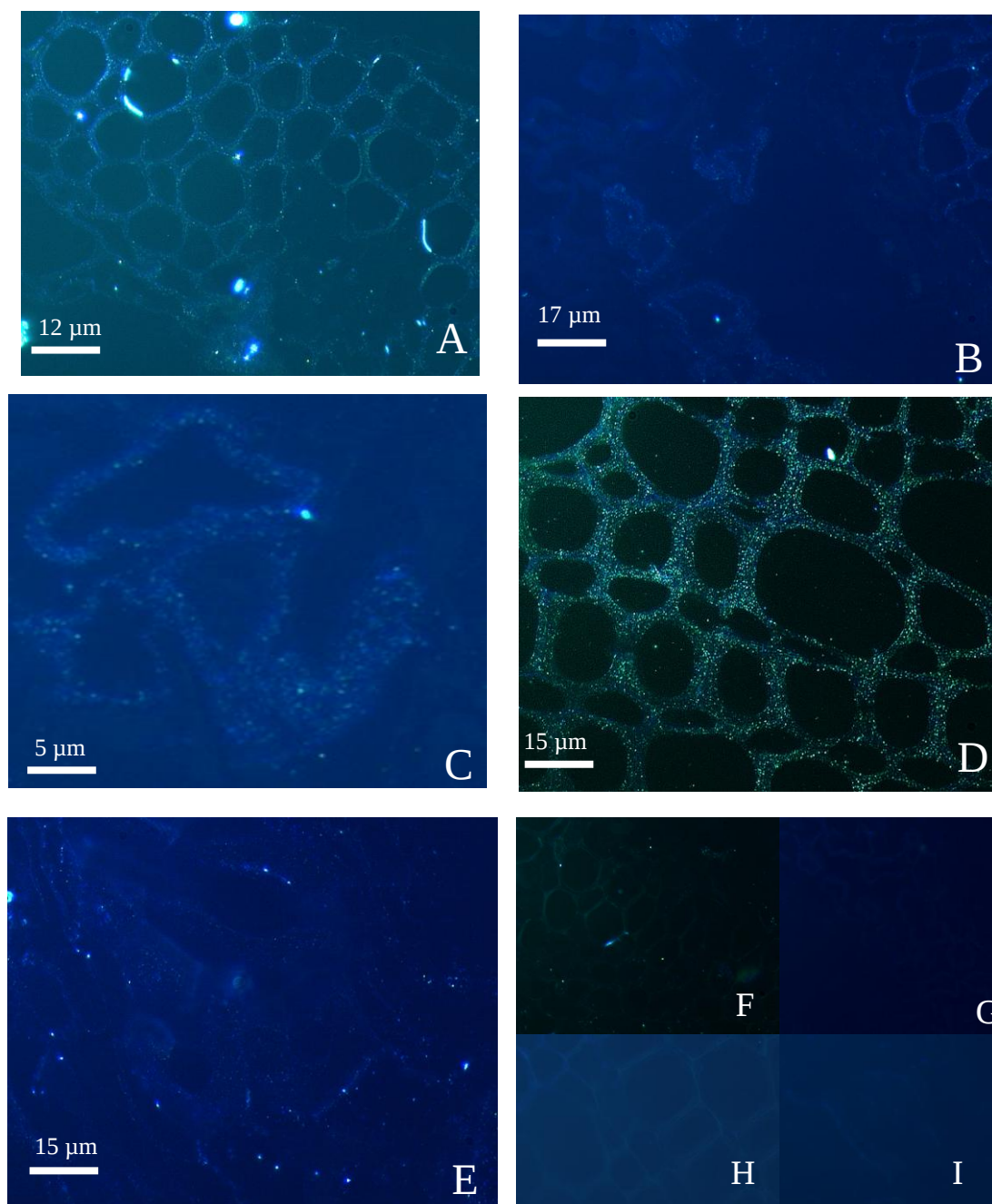


Figure 2 : Dibenzydioxocine immunolabelling of flax stem tissues by epi fluorescent microscope

A : xylem cells located at the snap point , B: extraxylary fibres located at the snap point; C : Higher magnification of fig B, D: xylem cells located at bottom part; E : bast fibres located at the bottom part ; F : Preimmune control of xylem cells located at the snap point; G Preimmune control of bast fibres located at the snap point; H : Preimmune control of xylem cell located at the bottom part ; I : Preimmune control of bast fibres at bottom part

Coniferin and coniferyl alcohol were used to determine antiserum specificity in the indirect competitive ELISA test. The microtiter plate wells were coated with cBSA-conjugated coniferin. Coniferin and coniferyl alcohol were added to compete with the coated antigen for the coniferin antiserum recognition. Antibodies bound to coated antigen were detected with a secondary antibody labeled with alkaline phosphatase using 4-nitrophenyl phosphate as substrate. The coniferin antibody recognized both coniferin and coniferyl alcohol but was clearly more sensitive in the case of coniferin than coniferyl alcohol (Fig. 3).

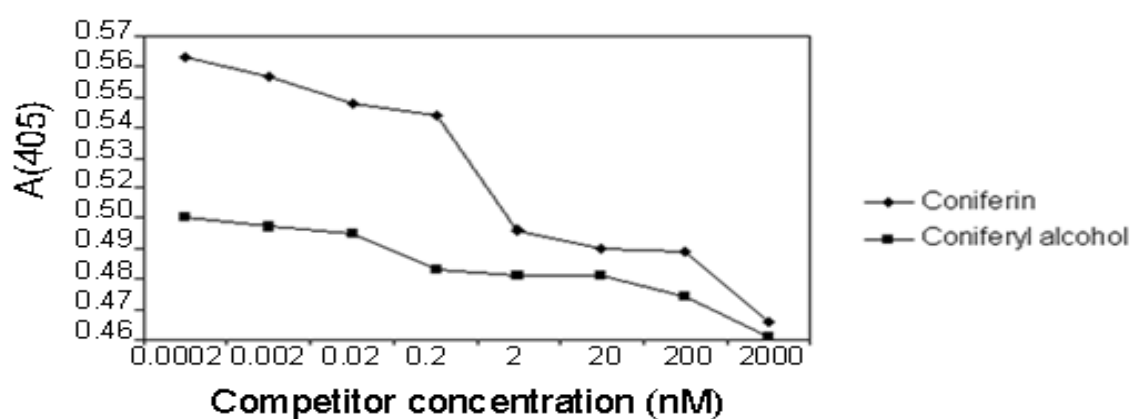


Figure 3 : Competitive ELISA tests of coniferin antibody

Immunodetection of coniferin in flax stem tissues Coniferin detection in stem tissues of flax harvested at the flowering stage was investigated at the ultrastructural level. Preliminary experiments performed on specimens prepared by chemical fixation (in absence of osmium post-fixation) did not give any positive reactions. In contrast, chemical fixations followed by osmium post-fixation allowed the detection of some labelling in cell corners (data not shown). These tests showed that OsO_4 post-fixation was a necessary step. In order to ensure the most appropriate conditions for immunodetection of this soluble component (coniferin), we used cryofixation under pressure associated with osmium post-fixation prior to EPON embedding. TEM observations of cryo-fixed, osmium post-fixed samples after immunoreaction with coniferin antibody are shown in figure 4. At the snap point region of the stem, light labelling

was detected in the xylem cell walls throughout the secondary cell wall with a few spots in the middle lamella (Fig. 4 A). The cambium also showed some spots (Fig. 4 B) and extraxylary fibers were not labelled (Fig. 4 C). At the bottom part of the stem coniferin antibodies gave rise to a very weak labelling in the cell wall of xylem cells (Fig. 4 D), labelling was weaker as compare to the snap point region. Cambium cells displayed positive reaction (Fig. 4 E) while no labelling was again observed in the extraxylary fibers (Fig. 4 F). Treatment of the stem sections with preimmunoserum did not give any reaction (Fig. 4 G, H and I).

Coniferin has been mainly reported in gymnosperms and is considered as precursor of lignin in this group. In contrast, endogenous coniferin has only been detected in a limited number of angiosperm species (magnolia and eucalyptus) (Tsuji and Fukushima, 2004). Recently, Kaneda et al., 2008 failed to trace radio-labelled coniferin in cryofixed tissue of *Pinus concorta* in contrast to chemical analysis. Preliminary investigations of oligolignol profiles suggest that coniferin does occur in flax stem tissues (W. Boerjan, personal communication). Polyclonal antibodies raised against coniferin were recently obtained and applied to flax tissues. Although very weak, the detection of coniferin in flax stem was in agreement with the G type lignin which deposit in flax stem. Variations in the density of labelling were hardly detectable. In contrast to xylem, no staining could be observed in the extraxylary fibers whatever was the extent of differentiation. This observation appeared consistent with the low level of lignin deposited in these cells. However, given the high content of crystalline cellulose in flax fibers, it might be possible that coniferin epitope would not be entirely accessible to antibody. This result may also suggest a limited availability of G monolignol for lignin polymerization in the bast fibres. Indeed, the rapid deposition of crystalline cellulose during secondary wall formation may quickly hinder penetration of precursors in the fibre cell wall. However, one cannot exclude that other precursor such as syringin or coniferadehyde glucoside could be involved in lignin biosynthesis. Mechanisms of monolignol transportation to the cell wall are still lacking knowledge. Although different enzymes (glucosidases, glycosyltransferases, ...) have been proposed for this transport, no clear picture are yet available with respect to lignin polymerisation (Tsuji et al., 2005)

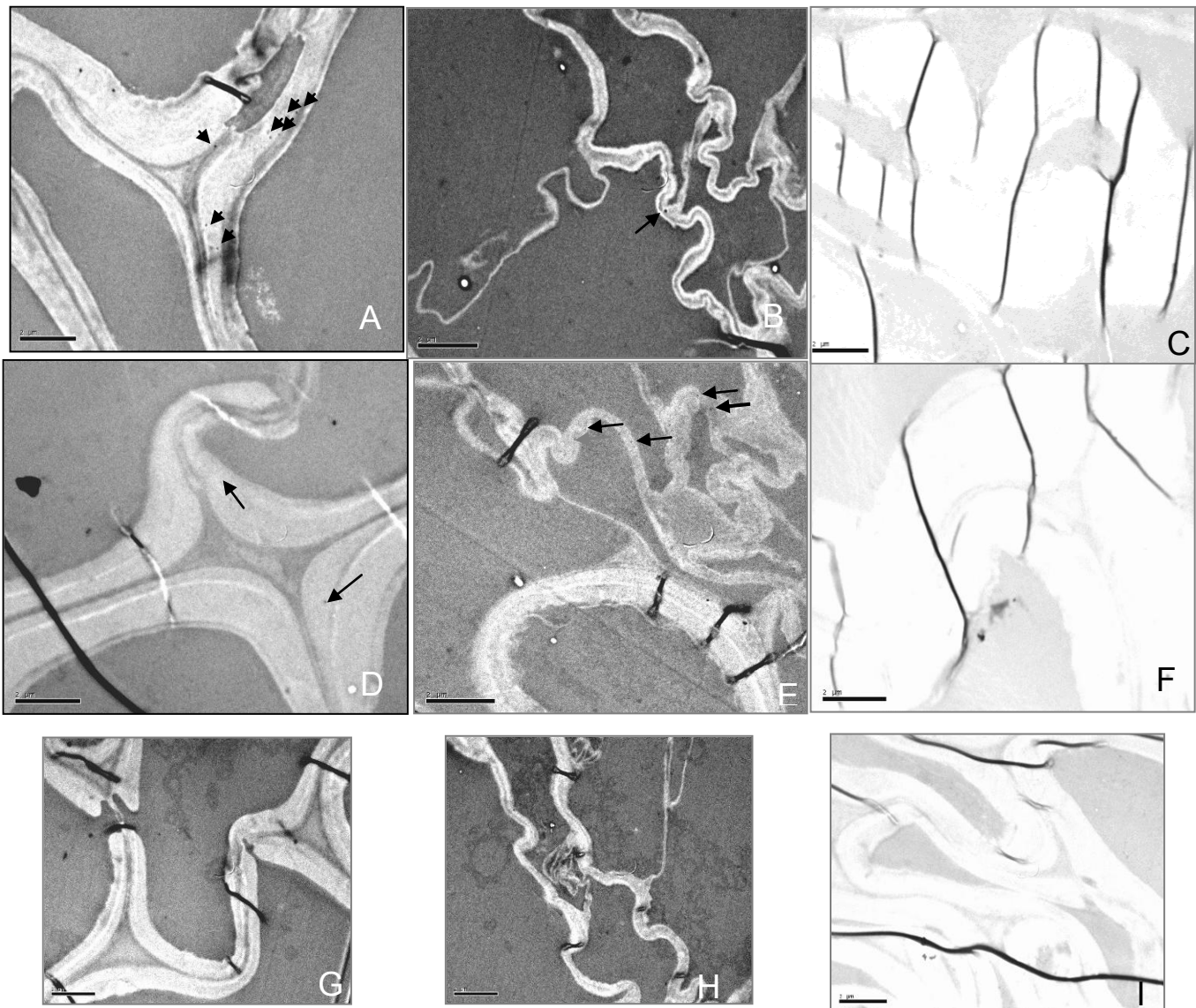


Figure 4 : Coniferin immunolabelling of stem tissues of flax at flowering stage observed by transmission electron microscopy

A : xylem cell located at the snap point; B : cambium cell located at the snap point; C : bast fibre located at the snap point ; D : xylem cell located at bottom part; E : cambium cell located at the bottom part; F : extraxylary fibres located at bottom part; G : Preimmune control of xylem cell ; H : Preimmune control of cambium cell and I : preimmune control of bast fibres. All scale bars measure 2 μm.

Conclusion

Chemical analysis of isolated lignin fractions not only confirmed our previous observations on G condensed lignin in flax but also revealed common features between flax and conifer lignins. The detection of dibenzodioxocine substructure in flax tissues (xylem and bast fibers) further strengthened this hypothesis. A new antibody raised against coniferin was obtained and used on cryofixed, embedded samples of flax stems at the flowering stage. The absence of coniferin in extraxylary fiber cells is consistent with the weak lignin deposition in the bast fibres. Although weak, coniferin labelling of xylem cells especially in the snap point region suggested additional similarities between flax and conifer lignin.

References

- Akin D. E., Dodd R. B., Foulk J. A. (2005) Pilot plant for processing flax fibre. **Ind. Crops and Products** , 21 (3) : 369-378.
- Ämmälahti E., Brunow G., Bardet M., Robert D., Kilpeläinen I. (1998) Identification of side-chain structures in a poplar lignin using three dimensional HMQC-HOHAHA NMR Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.**, 46 : 5113-5117.
- Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J., Stone B. A. (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, 113 (2) : 291-299.
- Baucher M., Monties B., Vanmontagu M., Boerjan W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 17 (2) : 125-197.
- Boudet A. M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds, **Phytochem.** 68 (22/24) : 2722-2735.
- Cathala B., Saake B., Faix O., Monties B. (2003) Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1020 (2) : 229-239
- Davidson B. H., Drescher S. R., Tuskan G.A., Davis M. F., Nghiem N. P. (2006) Variation of S/G ratio and lignin content in a populous family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochem. and Biotech.**, 130 (1-3) : 427-435.
- Day A., Ruel K., Neutelings G., Cronier D., David H., Hawkins S., Chabbert B. (2005) Lignification in flax stem : evidence for an unusual lignin in bast fibers. **Planta**, 222 : 234-245.
- Day A., Neutelings G., Nolin F., Grec S., Habrant A., Cronier D., Maher B., Rolando C., David H., Chabbert B., Hawkins S. (2009) Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase down regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem. **Plant Physiol. and Biochem.**, 1-11.
- Faix O., Lange W., Beinhoff O. (1980) Molecular weights and molecular distributions of milled wood lignins of some wood and bambusoidae species **Holzforschung**, 34 : 174-176.
- Faix O., Lange W., Salud E. C. (1981) The use of HPLC for the determination of average molecular weights and molecular weight distributions of milled wood lignins from *Shorea polysperma* (Blco.). **Holzforschung**, 35 : 3-9.
- Faix O. (1991) Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, 45 (SUPPL) : 21-27.

- a) Guerra A., Filpponen I., Lucia L., Saquing C., Baumberger S., Argyropoulos D. S. (2006) Toward a better understanding of the lignin isolation process from wood. **J. Agric. Food Chem.**, 54 : 5939-5947.
- b) Guerra A., Filpponen I., Lucia L., Argyropoulos D. S. (2006) Comparative evaluation of three lignin isolation protocols for various wood species. **J. Agric. Food Chem.**, 54 (26) : 9696-9705.
- Ikedo T., Holtman K., Kadla J., Chan H., Jammel H. (2002) Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. **J. Agric. Food Chem.**, 50 (1) : 129-135.
- Islam A., Sarkanen K. V. (1993) The isolation and characterization of the lignins of jute (*Corchorus capsularis*). **Holzforschung**, 47 (2) : 123-132.
- Kaneda M., Rensing K. H., Wong J. C. T., Banno B., Mansfield S. D., Samuels A. L. (2008) Tracking monolignols during wood development in Lodgepole pine. **Plant physiology**, 147 : 1750-1760.
- Karkhunen P., Rummakko P., Sipilä J., Brunow G., Kilpeläinen I. (1995) Dibenzodioxocins ; A novel type of linkage in softwood lignins. **Tetrahedron letters**, 36 (1) : 169-170.
- Kukkola E. M., Koutaniemi S., Gustafsson M., Karkhunen P., Ruel K., Lundell T. K., Sarampää P., Brunow G., Teeri T. H., Fagerstedt K. V. (2003) Localization of dibenzodioxocin substructures in lignifying Norway spruce xylem by transmission electron microscopy-immunogold labeling. **Planta** 217 : 229-237.
- Kukkola E. M., Koutaniemi S., Pöllänen E., Gustafsson M., Karkhunen P., Lundell T. K., Sarampää P., Kilpeläinen I., Teeri T. H., Fagerstedt K. V. (2004) The dibenzodioxocin lignin substructure is abundant in the inner part of the secondary wall in Norway spruce and silver birch xylem. **Planta**, 218 : 497-500.
- Kukkola E. M., Sarampää P., Fagerstedt K. V. (2008) Juvenil and compression wood cell wall layers differ in lignin structure in Norway spruce and Scots pine. **IAWA J.**, 29 (1) : 47-54.
- Lapierre C., Monties B., Rolando C. (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. **Holzforschung**, 40 (2) : 113-118.
- Lapierre C., Pollet B., Monties B. (1991) Heterogeneous distribution of diarylpropane structures in spruce lignins. **Phytochem.**, 30 (2) : 659-662.
- b. Lapierre C., Pollet B., Monties B. (1991) Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after Raney nickel desulphuration. **Holzforschung** 45:61-68

- Lapierre C. (1993) Application of new methods for investigation of lignin structure. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield DR, Ralph J (eds) Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp 133–166.
- Lapierre C., Pollet B., Rolando C. (1994) Determination of the main bonding patterns in native and industrial softwood lignins. Third European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, pp 54-57
- Lapierre C., Pollet B., Rolando C. (1995) New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. **Res. Chem. Intermed.**, 21 : 397-412.
- Lai Y., Sarkanen K. (1971) Isolation and structural studies. In *Lignins*. Sarkanen, K. V., Ludwig, C., Eds; Wiley-Interscience: New York. pp 165-240.
- Lewis N. G., Davin L. B., Sarkanen S. (1999) The nature and function of lignins. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol 3. Eds : Barton Sir DHR, Nakanishi K, Meth-Cohn O. Oxford: Elsevier pp 617-745.
- Lora J. H. (2002) Characteristics, industrial sources, and utilization of lignins from non wood plants. In : *Chemical Modification, Properties and Usage of Lignin*. Eds : Hu T. Q., Kluwer Academic, New-York, pp 267-282.
- Marjamaa K., Lehtonen M., Lundell T., Saranpää P., Fagerstedt K. V. (2003) Lignification and seasonal variation in beta-glucosidase and peroxidase activities in Norway spruce, Scots pine and Silver birch xylem. **Tree Physiology**, 23 : 977-986.
- Millam S., Obert B., Pret'ova A. (2005) Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* - a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82 (1) : 93-103.
- Nimz H. H. (1974) Beech lignin_ proposal of a constitutional scheme, **Agnew Chem. Int. Ed.**, 13 : 313-321.
- Nishimura N., Izumi A., Kuroda K. -I. (2002) Structural characterization of kenaf lignin: Differences among kenaf varieties. **Industrial Crops and Products**, 15 (2) : 115-122
- Peter G. and Neale D. (2004) Molecular basis for the evolution of xylem lignifications. **Current Opinion in Plant Biology**, 7 : 737-742.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P. F., Marita J. M. Hatfield R. D., Ralph S. A., Christensen J. H., Boerjan W. (2004) Lignins : Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl propanoids. **Phytochem. Reviews** 3 : 29-60.
- Ringena O., Lebioda S., Lehn R., Saake B. (2006) Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. **Journal of Chromatography A**, 1102 (1-2) : 154-163

- Rolando C., Monties B., Lapierre C., (1992) Thioacidolysis : Methods in Lignin Chemistry edited by S.Y. Lin and C. W. Dence pp334-349.
- Sarkanen K. V., Ludwig C. H. (1971) in : Lignins occurrence, formation, structure and reactions Sarkanen K. V., Ludwig C. H. (eds) New York, 916 p.
- Saito K. and Fukushima K. (2005) Distribution of lignin interunit bonds in the differentiating xylem of compression and normal woods of *Pinus thunbergii*. **J. Wood Sci.**, 51 : 246-251.
- Schwarze F. W. M. R. (2007) Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews**, 21 : 133-170.
- Sun R., Lawther J. M., Banks W. B., Xiao B. (1997) Effect of extraction procedure on the molecular weight of wheat straw lignins. **Industrial Crops and Products**, 6 : 97-106.
- Tollier M. T., Monties B., Lapierre C. (1986) Inhomogeneity of angiosperm lignin: Comparison of the monomeric composition of lignin fractions isolated from different wood species. **Holzforschung**, 40 (SUPPL.) : 75-79
- Tsuji Y. and Fukushima K. (2004) Behaviour of monolignol glucosides in angiosperms. **J. Agric and Food Chem.**, 52 : 7651-7659.
- Tsuji Y., Chen F., Yasuda S., Fukushima K. (2005) Unexpected behaviour of coniferin in lignin biosynthesis of *Ginkgo biloba* L. **Planta**, 222 : 58-69.
- Vallet C., Chabbert B., Czaninski Y., Monties B. (1996) Histochemistry of lignin decomposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. **Ann. Bot.** 78 : 625-632.

Les données présentées dans le chapitre précédent sont en accord avec les travaux effectués précédemment par A. Day (2005, 2009). Combinant des observations microscopiques et des analyses biochimiques, il avait mis en évidence la présence majoritaire de structures condensées dont les lignines de type G dans les parois des tissus du lin : le xylème et les fibres périphloëmiennes.

L'immunomarquage d'un motif associé aux structures condensées des lignines : la dibenzodioxocine, dont la présence a été décelée chez les conifères révèle une distribution homogène dans les parois du xylème quelque soit le degré de maturité des tissus (partie basale et apicale de la tige). Ces observations associées à l'anatomie de type homoxylé chez le lin suggèrent fortement que cette espèce serait une Angiosperme primitive, proche des Gymnospermes. Dans les fibres périphloëmiennes le motif dibenzodioxocine est détecté dans tout l'épaississement de la fibre notamment dans les parties jeunes représentées par le snap point région apicale où les fibres commencent à s'épaissir.

La coniférine, dérivé glycosylé de l'alcool coniférylique, est un précurseur fortement présumé des lignines de type G. La coniférine présente majoritairement chez les conifères et chez seules quelques Angiospermes montre cependant une distribution sporadique dans les parois de lin, notamment au niveau du cambium et des cellules proches cambium donc relativement jeunes et ce quelque soit le niveau de tige. Ce précurseur n'a pu être mis en immunodétecté dans les fibres extraxylémiennes.

Le fait que le précurseur d'une lignine de type G ne soit présente que dans les cellules du xylème et non dans les fibres externes a orienté mes travaux vers les étapes de la polymérisation de la biosynthèse des lignines. Les monolignols étant acheminés vers la paroi via leurs précurseurs (coniférine et/ou syringine), formes de transport et/ou de stockage pour être polymérisés par le biais des oxydases : peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène et/ou laccases en présence d'oxygène.

Notre étude s'est donc focalisée dans un premier temps sur les oxydases pariétales chez le lin en vue de mieux appréhender et comprendre l'hétérogénéité tissulaire au regard de la lignification dans les tiges de lin.

Ch 2 : Monolignol Oxidases

Characterization of cell-wall peroxidases in flax stem tissues (article en preparation)

Characterization of cell-wall peroxidases in flax stem tissues

F. NOLIN^{1,2}, S. HAWKINS², B. CHABBERT¹

1. UMR 614 INRA-URCA, Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE), 51686 Reims, France
2. UMR 1281 USTL-INRA, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés (SADV), UFR Biologie. Bât SN2. 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France

Introduction

Lignins are cell wall polymers which result from the dehydrogenative coupling of monolignols (Sarkanen et al., 1991). This reaction is initiated by enzymatic oxidation of the monolignol into unstable phenoxy radicals which subsequently undergo non-enzymatic coupling reactions. The nature of the enzymes involved in this oxidation step is still debated, although peroxidases and/or laccases would be the main candidates (Whetten and Sederoff, 1995).

The role of laccases in the lignification process was initially suggested by Freudenberg in 1958. Numerous studies have subsequently attempted to support this hypothesis (Liu et al., 1994). Laccases isolated from different plants can achieve *in vitro* polymerization of monolignol (Bao et al., 1993) albeit the oxidation of the monolignol by laccases would not lead to molecules with high degree of polymerization (Dean and Eriksson, 1994). Genes encoding laccases are highly expressed in lignifying tissues from *Pinus taeda* (Sato et al., 2001), and antisense laccase gene expression has impact on xylem formation (Ranocha et al., 2002). However, the results obtained so far are not conclusive on the role of laccases in lignin formation.

Peroxidases (class III plant peroxidases, EC 1.11.1.7) are reported as the main enzymes involved in the process of radical formation from the three monolignols. Class III plant peroxidases are glycoproteins which contain a Ferric anion in the prosthetic group (Veitch, 2004). These PODs are mainly localized in the vacuole and the cell walls (Mäder, 1992;

Crevecoeur et al., 1997). Class III peroxidases catalyze the one-electron oxidation of diverse organic compounds and are involved in many physiological phenomena related to plant growth, defense mechanisms in addition to lignin biosynthesis (Harkin and Obst, 1973; Klotz et al. 1998; Dunand et al., 2003; Schopfer, 2001; Park et al., 2003). Given the large multigenic family of peroxidase encoding genes and their 40-60% sequence homology, assignment of POD isoenzymes to one specific function is difficult (Lagrimini et al., 1997; Tognolli et al., 2002; Welinder et al., 2002; Passardi et al., 2004; Sasaki et al., 2007).

Many data argued in favor of peroxidase-mediated oxidation of monolignols in lignin biosynthesis. Peroxidases activities are associated with tissues undergoing lignification (Catesson et al., 1978; Goldberg et al., 1983; Imberty et al., 1985). More recently, modulation of the expression of gene encoding peroxidases were shown to impact lignification in various species (Blee et al., 2003; El Mansouri et al., 1999; Christensen et al., 1998; Quiroga et al., 2000; Li et al., 2003; Kärkönen et al., 2002; Koutaniemi et al., 2005; Gabaldon et al., 2005).

Peroxidases are usually classified into acid (anionic) and basic (cationic) isoenzymes. Several studies have revealed that both types of peroxidases are involved in lignification. Christensen et al (1998) have shown the involvement of anionic and cationic peroxidases in lignification in poplar. Other studies have reported that anionic PODs are mainly involved in lignification (Li et al., 2003) while some authors proposed that cationic PODs would be mainly responsible for cell wall assembly and lignification (Koutaniemi et al., 2005). Moreover lignification of secondary xylem can be accomplished through the coordination of several isosymes of peroxidases (Sasaki et al., 2006). The precise role of the different cell wall peroxidases isoforms in lignification is still under investigation.

Until the 2000s, most of the characterized plant peroxidases (anionic or cationic) could oxidize p-coumaryl and coniferyl alcohols but were ineffective towards sinapyl alcohol. (Dean et al., 1994; Christensen et al., 1998, 2001). Tsutsumi et al. (1998) provided evidence for poplar peroxidases that were able to oxidize sinapyl alcohol. Thereafter, similar activities were demonstrated in various angiosperm and herbaceous species (Gabaldon et al., 2005, Sasaki et al., 2006) but also more surprisingly in gymnosperms which nevertheless do not have S-type lignin (Koutaniemi et al., 2005). Christensen et al. (1998) have shown that most of the anionic peroxidases are poor catalysts for sinapyl alcohol. X-ray crystallography showed that unfavourable hydrophobic interaction between the methoxyl groups of the alcohol S and residues I138 and P139 of the substrate binding site would induce steric

hindrance preventing POD to operate on sinapyl alcohol (Ostergaard et al., 2000). In contrast, the ability of cationic peroxidases to oxidize sinapyl alcohol has been reported by several authors (Quiroga et al. 2000; Ros Barceló and Pomar, 2001; Aoyama et al., 2002; Sasaki et al., 2004, 2006). Moreover, downregulation of cationic POD gene induced a decrease of both G and S lignin in transgenic plants (Blee et al., 2003) whereas downregulation of anionic peroxidases (Li et al., 2003) produced a decrease in the quantity of G (Gabaldón et al., 2005). The main feature of S active peroxidases is the absence of steric restriction at the binding site of the enzyme. So the reactions catalyzed by these S-peroxidases would be only conducted by redox thermodynamic forces (Gabaldon et al., 2006) which are very different depending on the type of alcohol ie $E^{\circ} (R./R-) = -257 \text{ mV}$ for sinapyl alcohol ; -15 mV for p-coumaryl alcohol and $+180 \text{ mV}$ for coniferyl alcohol (Ros-Barcelo et al., 2007).

In flax stem tissues, lignin represents ~25% of cell wall polymers in the xylem whereas only very low amounts are deposited in the bast fibers cell wall (less than 3%) (Day et al., 2005). In contrast to mature xylem where the whole cell walls are fully lignified, lignified area of the bast fibers mainly correspond to the middle lamellae at cell corners. Slightly higher S/G ratio were determined in the labile ether lignin fraction of fibre lignin (0.3) compare to xylem (0.2), suggesting that albeit weakly lignified extraxylary fibers would contain higher proportion of S units. Only few studies have focused on monolignols polymerization in flax. The activity of cell wall peroxidases were shown to correlate with the extent of lignification in bast fibers and to display the highest values at the flowering stage (Mc Dougall, 1992) which corresponds to a more intense lignin deposition in these fibres (Tiver, 1942; Crozier 1950; Mc Dougall 1992). Mc Dougall demonstrated the occurrence of several anionic and cationic cell wall peroxidases in flax fibres (1992). Studies on flax callus showed the presence of both cationic and anionic forms (Mc Dougall, 1991). In 1994 and 1996, Omann et al. isolated the cDNA of two stem anionic peroxidases. Recently, peroxidase transcript was evidenced in ESTs obtained from extraxylary fiber rich-tissues in flax (Day et al, 2005b). In addition molecular studies (Roach and Deyholos, 2007) based on microarrays analysis showed low transcript levels of cationic peroxidases in fibre rich tissues, that was not present in leaves. However none of these studies had addressed the activity of cell wall peroxidases towards monolignols and possible variation according to the stem tissue.

In order to get a better understanding of the mechanisms underlying lignin heterogeneity in flax stem tissues, we have investigated cell wall oxidative activities related to lignification in fibre-rich tissues and xylem. To this end, histochemical investigation of laccase and POD

were carried out in the stem tissues of flax harvested at flowering stage, which corresponds to intensive thickening of bast fibres and the onset of lignin deposition in these cells. Cell wall enzymes were then extracted and their efficiency tested against both coniferyl and synapyl alcohol.

Material and methods

Plant materials

Flax (*Linum usitatissimum*) cv. Diane was grown in a greenhouse at INRA Versailles (France) under photoperiod (12h/8h) at 22°C using sand. Flax was harvested at flowering stage (2 to 3 flowers.)

Histochemistry

Histochemical detection of laccase- and/or peroxidase-activities was undertaken on cross-sections of stems obtained from fresh material. Thick sections (35µm) were obtained using a cryotome (MICROM) in water and allowed to react with syringaldazin (1mg/ml EtOH) in the presence (peroxidase) or absence (laccase) of H₂O₂ (Harkin et Obst, 1973b) When oxidized, syringaldazin gives rise to a pink coloration. Control samples were incubated without H₂O₂ and or slides were heated (100 °C, 30 mins) to denature cell wall proteins.

Cell wall peroxidase extract

Fiber-rich tissues (epidermis + fibers) were peeled off from the inner xylem tissues. Both tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C until needed.

Xylem (140g) or tissues rich in fiber (93 g) of flax stems were cut into 1 cm fragments using a razor blade. Tissues were then homogenized in 0.05 M sodium acetate buffer (pH = 5.2) in a blender at 4 ° C for 17 seconds every 10 minutes during 3 hours. After centrifugation (18,000g, 4 ° C , 20 mins), the supernatant containing “soluble peroxidases” was discarded. The cell wall residue was suspended into 0.05 M sodium acetate buffer (pH = 5.2) containing 1M NaCl, homogenised quickly in a blender then centrifuged. This operation was repeated three times allowing the recovery of ionically-bound cell wall peroxidases (CW POD) in the supernatant. The CW POD extract was concentrated by ultracentrifugation with polysulfone membranes (Centricon) (MW> 10000) and then stored at 4 ° C. CW PODs were then further purified by chromatography in 2 steps as described previously (Fernandes et al., 2006).

i) Gel Filtration Chromatography

The extract was dialysed against ultra-pure water (milliQ), and applied to the column Sephadex G-100 (1 * 68cm) previously equilibrated with 0.05 M sodium acetate buffer (pH = 5.2) containing 1M NaCl. Elution was done using the equilibrium buffer at a flow rate of 0.22 mL/min at 4 ° C. Fractions (1.5 mL) were collected and checked for peroxidase activity using pyrogallol using 2.36 M of pyrogallol, 1 M H₂O₂ and 33 mM phosphate buffer pH : 5.2.

ii) Ion exchange Chromatography

The POD active fractions recovered from gel filtration were pooled and dialysed against a 0.05M buffer of sodium acetate (pH = 5.2). Samples were then purified on either a MonoQ HR 5/5-column. Elution was done using a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in 0.05 M acetate buffer at a flow rate of 0.5 mL / min. Fractions (1.2 mL) were collected and the absorbance measured at 280 nm in order to determine protein content. Peroxidase activity was measured using pyrogallol in presence or absence of hydrogen peroxide.

i)SDS-PAGE

Mono Q HR 5/5 fractions were desalted and concentrated 20 fold in cold acetone before loading onto acrylamide gel (10% for separating gel) in denaturing condition using 10% SDS. Electrophoresis was performed for 1h at 200V, then gels were stained for protein with 0.25% coomassie brilliant blue.

ii)NATIVE-PAGE

The separation gel was made of 10% acrylamide and did not contain SDS denaturant reactant. Electrophoresis was proceeded as above and were stained for POD using pyrogallol, guaiacol (13 mM) or syringaldazin (10 mM) substates with hydrogen peroxide (2.5 mM). The stained gels were then fixed in a mixture of methanol, acetic acid and bi-distilled water (3 : 1 : 6)

iii)IEF (Isoelectric focusing)

IEF was performed with a Multiphor II apparatus (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions using 4% polyacrylamide gel with an ampholine carrier of 3-10 pH range. The gel was kept under 1100 Vh voltage at 4°C. The pH gradient was estimated with a contact pH electrode. Peroxidase activity was then visualised by staining the gel with 400µM guaiacol and 500µM H₂O₂ in 50mM Na-citrate buffer pH : 5.0.

Cell Wall peroxidase activity

Peroxidase activity of the POD extract of flax was assayed using pyrogallol, coniferyl alcohol and sinapyl alcohol as substrates.

POD activities of the protein fraction recovered after chromatography were determined using pyrogallol as substrate. The method is based on the measurement of purpurogallin produced by the oxidation of pyrogallol at 420 nm and at 20°C. One unit of peroxidase is defined as the amount of enzyme required to catalyse the production of 1 mg of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at 20°C under the assay conditions ie : 2.36 M of pyrogallol, 1M H₂O₂ and 33mM phosphate buffer pH : 5.2

Peroxidase activities towards monolignols were measured in buffer solution (33 mM Phosphate buffer pH 5.2) containing either coniferyl alcohol (5.5 mM) or sinapyl alcohol (5.5 mM); the reaction was initiated by addition of H₂O₂ at 2 main concentrations (5.7 mM and 2.8 mM). The decrease in UV absorbance was measured at 280 and 275 nm for coniferyl alcohol and sinapyl alcohol respectively.

The same experimentation (alcohol consumption) was made with HRP VI (SIGMA) using exactly the same conditions (33 mM Phosphate buffer pH : 5.2, 5.5 mM monolignols and H₂O₂ at different concentrations: 5.7 mM , 2.8 mM and 1.4mM). Horseradish peroxidase type VI (mostly cationic isoforms according to SIGMA indications) is known to be inefficient on sinapyl alcohol and was used as a control POD activity

Results

Histochemistry

Peroxidase- and laccase-activities were detected by histochemical tests using syringaldazin in presence or absence of hydrogen peroxide. Preliminary histochemical tests were also carried out with other reagents such as TMB or PPD-PC (p-phenylenediamine-catechol), the latter one was largely unstable while tissue staining with TMB and syringaldazin gave rise to similar observations. At the snap point region of the flax stem, peroxidase activity was detected in all cells of the xylem and displayed a more intense reaction in the immature cell layers close to the cambium; the pith cells also gave a pink staining (Fig. 1 A). No staining was observed in the bast fibres (Fig 1 B). At the bottom part of flax stem the differentiating xylem cells close to cambium stained pink after addition of syringaldazin and hydrogen peroxide whereas no reaction was detected in the most mature xylem (Fig. 1 C). Also, more cell layers are colored as compare to snap-point xylem. Regarding the bast fibers, a homogeneous but weak staining was observed across the whole thick cell walls (Fig. 1 D). When performed in the absence of H_2O_2 , no staining was observed in either xylem or extraxylary fibers whatever the stem region (Fig 1 E, F, G, and H) suggesting the existence of little/no laccase activity in the flax tissues examined. The boiled controls show no staining (data not shown)

Peroxidase purification and characterization.

In order to study flax peroxidases, outer fiber-rich tissues were separated from inner xylem. Then cell wall peroxidases were extracted from these two tissue fractions and isolated by gel filtration and anion exchange chromatography. Fractions are tested at each stage of purification using pyrogallol in the presence of H_2O_2 : an orange brown coloration appears clearly and quickly when peroxidases were present. When hydrogen peroxide was omitted, none of the fractions gave a positive reaction regardless the tissue type or the purification step, suggesting little or no laccase activity. The elution profile after ion exchange chromatography showed that the fibre-rich tissues contained mainly cationic PODs, while anionic forms were only present in low amounts (data not shown). A similar elution profile was obtained in the case of xylem cell wall extract.

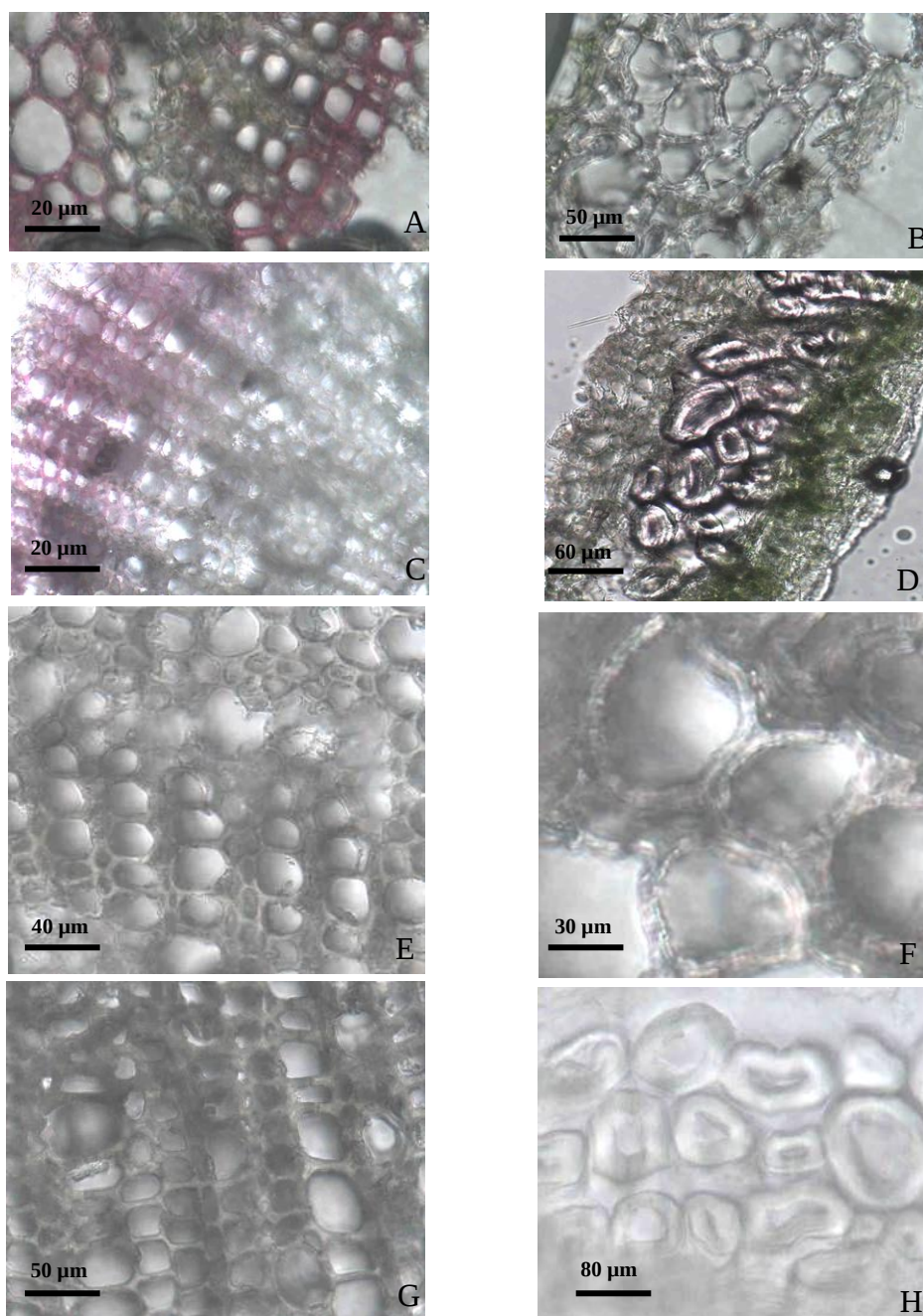


Fig 1 : Histochemical test of flax stem section stained with syringaldazin in presence or absence of H_2O_2 .

A: Xylem cells at the snap point with H_2O_2 . B: Bast fibers cells at the snap point with H_2O_2 . C: Xylem cell at the bottom part with H_2O_2 . D: Extraxylary fibers cell at the bottom part with H_2O_2 . E: Xylem cells at the snap point without H_2O_2 . F: Bast fibers cells at the snap point without H_2O_2 . G: Xylem cells at the bottom part without H_2O_2 . H: Extraxylary fibers at the bottom part without H_2O_2 .

Electrophoresis assay

SDS-PAGE of the fiber-rich tissue PODs (MonoQ HR 5/5 pooled fraction, desalted and concentrated with Amicon 10000) revealed the presence of three main bands at 28 kDa, and 30 kDa and 44 kDa were displayed (Fig. 3a). Five proteins corresponding to 27 kDa, 28 kDa, 45 kDa, 55 kDa and 60 kDa were displayed in the case of xylem extract (Fig. 3b). Further characterization of this protein extracts was performed by NATIVE-PAGE electrophoresis using non denaturing conditions. Activities were detected by incubating the gels in a solution containing hydrogen peroxide and one of the 2 following substrates: syringaldazin or guaiacol which can mimic S- and G-monolignol structures, respectively. Fibre fractions contained 2 protein bands that stained pink with syringaldazin and one positive band after reaction with guaiacol (Fig. 2a). In contrast NATIVE-PAGE of xylem fractions revealed 2 positive bands with syringaldazin, and 3 positives bands with guaiacol (fig. 2b). In each case the number of bands detected in NATIVE-PAGE with syringaldazin and guaiacol correspond to the number of peroxidases detected by SDS-PAGE electrophoresis with coomassie brilliant blue coloration.

Isoelectrofocusing (IEF) of the partially-purified fiber-rich tissue peroxidases indicated the presence of 2 cationic proteins (pI 8.15, 8.45) and one anionic form with a pI of 6.2 (Fig. 4a). Five bands were observed after IEF of xylem cell wall peroxidases (Fig. 4b), three of them were anionic (pI 4.2, 5.2 and 6.2) and the other 2 were cationic (pI 7.5 and 8.45).

Flax cell wall peroxidase activity

Peroxidase activities towards monolignols were measured in the partially-purified PODs obtained from ion exchange chromatography. In order to compare tissues extracts, we used the amount of extract that corresponded to a similar POD activity towards pyrogallol ie 0.85U/mL. This activity towards pyrogallol was taken as a reference to compare flax extracts PODs and was obtained using the same amount of protein (as estimated by UV). However the UV absorption of the partially-purified extracts were very low even in the concentrated extract. Based on this value, one could estimate that the amount of protein in the PODs extract were nearly 2.5µg/mL for both wood and fibre extracts.

To determine the activities of peroxidases towards coniferyl alcohol and sinapyl alcohol substrates, we used monolignols (5.5 mM) and hydrogen peroxide (5.8 mM) in concentrations that correspond to the range of the concentrations used by Tsutsumi et al. (1998) and

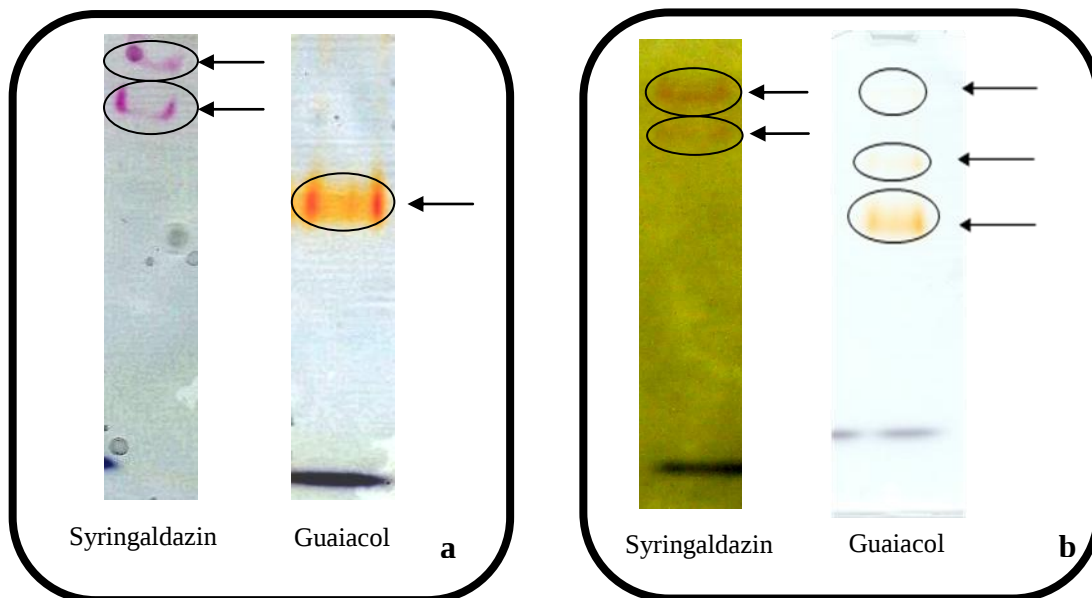


Fig. 2 : NATIVE-PAGE stained with syringaldazin and guaiacol of flax POD cell wall extract from a) fiber riche tissues (left) and for b) xylem tissues (right)

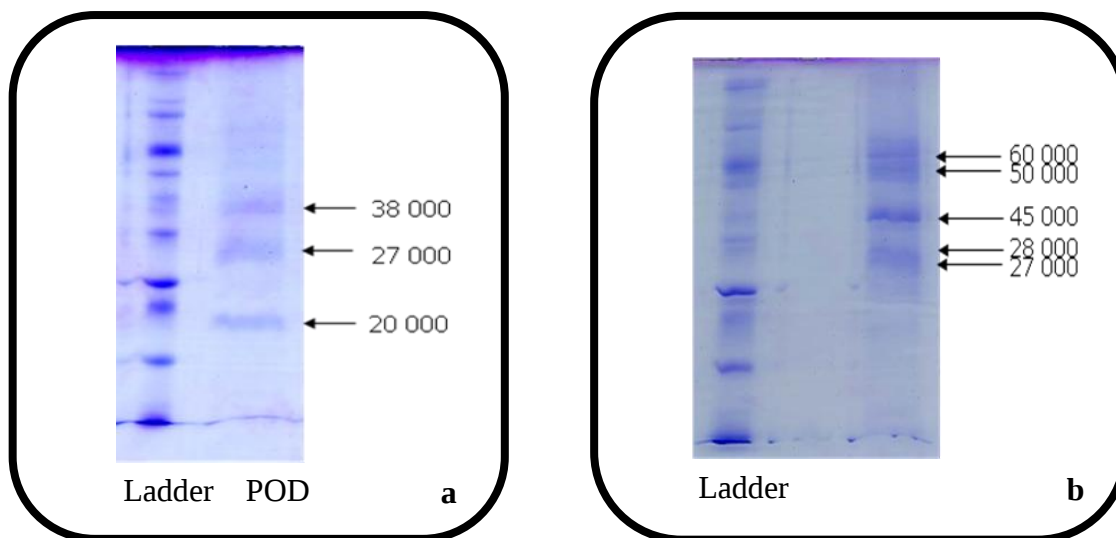


Fig 3 : SDS-PAGE of flax POD cell wall extract from a) fiber-riche tissues (left) and for b): xylem tissues (right)

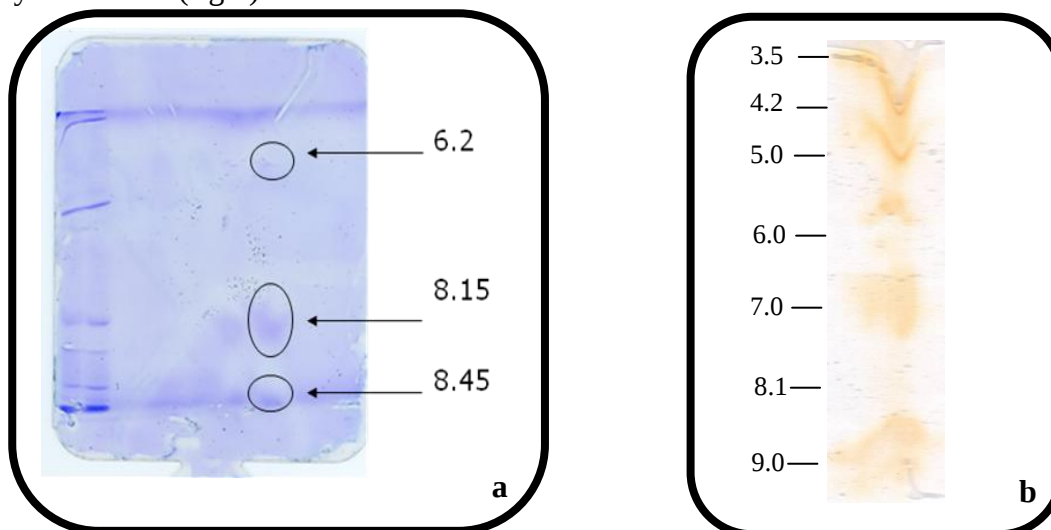


Fig 4 : IEF of cell wall POD extract from a) fiber riche tissues (left) and b) xylem tissues (right)

Marjamaa et al. (2006) to measure cell wall peroxidases in poplar callus and spruce xylem respectively. As sake of comparison; tests were also performed on the commercial horseradish peroxidase (SIGMA) type VI (HRP VI), which is predominantly composed of cationic isoforms. The flax fiber CW peroxidases could oxidize both coniferyl and sinapyl alcohol (Table 1); HRP VI exhibited similar activity towards coniferyl alcohol compared to fibre but was unable to oxidize sinapyl alcohol (Table 1). When the amount of H_2O_2 was reduced by 2 the consumption of both G and S by the fiber POD extract was significantly enhanced (factor 2.5) in contrast to HRP which did not show any change in the activity. When dividing the amount of H_2O_2 by 4 (1.45 mM) the effectiveness of the 2 alcohol consumption decreases slightly (Table 1).

Regarding xylem CW peroxidases, the activity towards coniferyl alcohol appeared almost similar to HRP using 5.8 mM peroxide hydrogen. The xylem POD extract also gave some activity towards syringyl that was almost three fold the value observed with HRP VI. However, when compare to fibre cell wall POD, the ability of xylem POD to oxidize syringyl appeared 2, 5 fold weaker. In contrast to fiber cell wall peroxidases there was no significant change compare to initial conditions on the activity either coniferyl alcohol either sinapyl alcohol when the amount of H_2O_2 is reduced by two. When we further reduced the amount of hydrogen peroxide (1.45 mM) the effectiveness of the consumption of monolignol particularly fall drastically to 46 coniferyl alcohol $\mu\text{mol} / \text{min}$)

Table 1 : Peroxidase activity of the partially purified POD extract of fiber rich and xylem cell walls ($\mu\text{mol monolignol/min}$)

		Fiber PODs	Xylem PODs	HRP POD VI SIGMA
5.5 mM monolignol 5.8 mM H_2O_2	Coniferyl Alcohol	150 $\mu\text{mol CA/min}$	145 $\mu\text{mol CA/min}$	125 $\mu\text{mol CA/min}$
	Sinapyl Alcohol	71 $\mu\text{mol SA/min}$	27 $\mu\text{mol SA/min}$	10 $\mu\text{mol SA/min}$
5.5 mM monolignol 2.9 mM H_2O_2	Coniferyl Alcohol	412 $\mu\text{mol CA/min}$	126 $\mu\text{mol CA/min}$	114 $\mu\text{mol CA/min}$
	Sinapyl Alcohol	159 $\mu\text{mol SA/min}$	22 $\mu\text{mol SA/min}$	10 $\mu\text{mol SA/min}$
5.5 mM monolignol 1.45 mM H_2O_2	Coniferyl Alcohol	397 $\mu\text{mol CA/min}$	46 $\mu\text{mol CA/min}$	61 $\mu\text{mol CA/min}$
	Sinapyl Alcohol	124 $\mu\text{mol SA/min}$	18 $\mu\text{mol SA/min}$	4 $\mu\text{mol SA/min}$

Discussion

Heterogeneity in flax stem lignification patterns could arise from several regulation mechanisms acting on both the biosynthesis and local availability of monolignols. In addition, these control mechanisms could operate on the final step of lignin polymerization ie oxidative enzymes of monolignol involving oxidative enzymes such as peroxidases and hydrogen peroxide and/or laccases and oxygen). Both enzymes could be involved in lignin polymerization. Given the occurrence of a peptide signal at the N terminal of laccases, these proteins would indeed be excreted and addressed to the cell wall where lignin polymerization takes place (Caparróz-Ruiz et al., 2006). Similarly the cell wall is the main site of localization of peroxidases (Crevecoeur et al., 1997). However, the specific involvement of laccase or peroxidase into the process of lignification is hardly achieved. Laccases isolated from different plants can give rise to *in vitro* polymerization of monolignol (Bao et al., 1993). It was also suggested that at a certain level of lignin deposition, the hydrophobicity of the middle lamella would not permit the passage of hydrogen peroxide whereas oxygen would diffuse easily and be available for laccase (Gavnholt and Larsen, 2002).

Our histochemical results using syringaldazin suggest very strongly that peroxidases are the main oxidative enzymes present in flax stem tissues and that little/no laccase activity is present. In addition, tests performed on the fractions from the gel permeation chromatography did not reveal laccase activities. Peroxidases would thus mainly account for the oxidative enzymes involved in the process of lignification in flax.

In flax it is clear that the oxidation of syringaldazin in the presence of H_2O_2 (ie peroxidasic activity) was visible in the xylem cells during lignification. Indeed, the pink color was displayed in the entire xylem in young stem tissue at the snap point and close to the cambium cells at the bottom of stem. This pattern of activity is consistent with data reporting highest peroxidase activity in poplar woody tissues in June, at the onset of cambial activity and xylem differentiation (Nishida et al., 1991). In the bast fibers, the activity of peroxidases was only detected in the older part of the stem, ie at the bottom part while at the snap point no staining was visible. One may suggest that the weak lignification in bast fibres could be the result of a lack of coordination between monolignol availability and peroxidase activity This hypothesis would have to be confirmed by more detailed (immunolocalisation) studies, as well as transcriptome studies (POD gene expression in outer stem tissues).

Partially-purified protein extracts from the fibre rich tissues of the flax stem showed similar peroxidase protein activities to comparable fractions recovered from xylem tissue. Overall, cell wall peroxidases would represent a very low amount of protein. Although Bradford detection failed to give reliable results on the POD amount in the flax cell wall extract, UV absorbance determination clearly indicated that weak amounts of cell wall peroxidase protein were recovered from both xylem and fibre-rich tissues. Albeit no absolute values can be obtained from UV absorption measurement, this approximation showed that almost similar amount of protein were obtained in the xylem and fibre extract and would represent almost 0.01- 0.02 µg protein extracted per gram of fresh xylem and fibres rich tissues.

Different cell wall POD isoenzymes were detected in flax tissues by SDS-PAGE. The sizes of isoenzymes ranged 27-60kDa which was consistent to the size of POD reported elsewhere. PODs below 40 Kda are generally cationic forms with for example 33.8 kDa in *Zinnia* (Gabaldon et al., 2005), 35-40 kDa in *Picea abies* (Koutaniemi et al., 2005) while anionic PODs have been reported as larger proteins : 53kDa in *Populus trichocarpa* (Christensen et al., 1998), 50 to 60 kDa in *Picea abies* (Koutaniemi et al., 2005). Consequently the cell walls from fiber rich tissues contained 2 cationics forms that may correlated to the 28 and 30 kDa protein bands detected by SDS-PAGE and an anionic form which would correspond to the 44 kDa band. Regarding xylem cell wall peroxidases, the five isoenzymes including 3 anionic and 2 cationic ones could be correlated to the three SDS bands related to protein >40 kDa and the two 27 and 28 kDa protein bands. Mc Dougall already showed the occurrence of various anionic and cationic isoforms in flax cell wall extract but did not provide indication on the isoforms molecular weight (Mc Dougall, 1991 ; 1992 ; 1993).

NATIVE-PAGE electrophoresis was also in a good agreement with IEF results on the partially purified PODs from the fibre-rich tissues Altogether NATIVE-PAGE results underlined the fact that the cell wall POD pool from flax stems contains isoenzymes active on either syringaldazin (S-unit type activity) or guaiacol (G-unit type activity). Two out of the three detected fibre POD isoenzymes reacted with syringaldazin. Although not conclusive these observations could suggest that flax fibre PODs are mainly cationic since studies on other species indicate that it is mainly the cationic forms that oxidize sinapyl alcohol (Tsutsumi et al., 1998; Quiroga et al. 2000; Ros Barceló and Pomar, 2001, Sasaki et al., 2004, 2006). In contrast, the partially-purified xylem POD pool contains three guaiacol-active and 2 syringaldazin active forms. Such an observation could suggest that the xylem POD pool is less capable of oxidizing sinapyl alcohol.

Partially-purified flax POD extracts were then analyzed for their ability to oxidize the monolignols coniferyl- and sinapyl-alcohols. Our results show that coniferyl alcohol is preferentially metabolized by both xylem and fibre POD extracts. This result is in agreement with the predominance of G type lignin in flax and appears quite similar to those obtained by Marjamaa et al., in 2006 with Norway spruce xylem peroxidase isoforms. The HRP type VI (sigma) was also more effective on coniferyl alcohol. Studies reporting on POD activities on mono and dimethoxylated lignin unit are rather seldom. However, Aoyama et al. (2002) obtained higher PODs activities from poplar callus than the values reported herein; notably horseradish peroxidase activity was 2.5 fold higher. This discrepancy might rely on the wavelength selected to follow oxidation of monolignols. While these authors quantified coniferyl alcohol and sinapyl alcohol at 263 nm for and 272 nm respectively we have selected wavelength that corresponded to the maximum absorption, ie, 280nm (coniferyl alcohol) and 275 nm (sinapyl alcohol). Therefore, the activity determined in the partially-purified PODs extract may reflect different specific activities corresponding to each isoenzymes. Nevertheless these data show that inner xylem and outer fibre-rich tissues display distinct ability towards monolignols. Fiber-rich tissues would contain 3 times more peroxidase activity towards sinapyl alcohol as compared to xylem cell wall PODs. Since we used similar amount of POD activity with respect to pyrogallol oxidation, the different behaviour of fibre rich tissues and xylem PODs regarding sinapyl alcohol oxidation would be relevant. Notably, this result is consistent with the fact that flax fibers in spite a very low lignification are somehow richer in S units (S/G=0.3) compare to xylem (S/G =0.2), at least in the non condensed lignin structure. These cell walls also have a positive reaction with antibodies against GS structures (Day et al., 2005). The preferential involvement of anionic peroxidase active on G units in the xylem cells of flax suggests that these anionic PODs are necessary for an intense lignification of the cell walls. The cationic peroxidases are not absolutely mandatory but would be preferentially associated with the lignification of the cells involved in the support functions.

Another important difference between fibre and xylem PODs concerns the effect of the H_2O_2 concentration on enzyme activity. Our data clearly showed that a reduction in H_2O_2 concentration was associated with a significant increase in metabolic capacity of the fibre POD pool. In contrast, the reduction had little/no effect on the activity of the xylem POD pool when the H_2O_2 amount is divided by 2, but when the quantity is decreased by 4, the amount of hydrogen peroxide became insufficient and there is a drastic drop in the consumption of

coniferyl alcohol. Interestingly, other work in our laboratory (paper in preparation) has suggested that the availability of H_2O_2 is lower in fibre cell walls as compared to xylem cell walls at the flowering stage. These data suggest that cells which are weakly lignified have down-regulated the production of the hydrogen peroxide. In contrast, xylem undergoing extensive lignification (apical stem regions) would require higher levels of H_2O_2 and peroxidase as compare to the xylem cells from the bottom region. A weak availability of hydrogen peroxide in flax fibers may control the extent of monolignol polymerization in the bast fibers (Mc Dougall, 1992).

Isoenzyme purification is under progress to check if the cationic forms are the only forms responsible for the oxidation of sinapyl alcohol. During the last decade, many studies on purification and characterization of peroxidases (anionic and cationic forms) were performed. However molecular studies of cell wall peroxidases are often limited by the very small amounts of peroxidases recovered from the different extraction steps. Nevertheless some cloning and molecular characterization of peroxidases has been reported (Koutaniemi et al., 2005; Gabaldon et al., 2005; Sasaki et al., 2006). However, these studies were often conducted on tissue cultures either as callus or cell suspensions that enable obtention of peroxidase in large quantities. Only EST and microarrays are available in the case of flax. Among flax EST only 6 were awarded to peroxidase (Day et al., 2005b) but these EST are made on all outer stem tissues and may correspond to both cell wall and intracellular fraction.

Conclusion

Peroxidases represent the major oxidizing activity in flax stem in both outer and inner tissues. Differences exist between outer/inner tissue CW POD pools regarding the number, size and isoelectric point. Moreover, differences exist between the peroxidase pools in terms of enzymatic activity towards coniferyl and sinapyl alcohol. Outer tissues peroxidases have a higher affinity for sinapyl alcohol than inner tissues peroxidases. Both peroxidases pools have the same affinity for coniferyl alcohol. Interestingly, outer tissue peroxidase pool activity is significantly modified by a reduction in hydrogen peroxide concentration. Further studies would be required to address the way by which these differences contribute /are associated with the different lignification patterns in inner/outer flax stem tissues

References :

- Aoyama W., Sasaki S., Matsumura S., Mitsunaga T., Hirai H., Tsustumi Y., Nishida T. (2002) Sinapyl alcohol specific peroxidase isoenzyme catalyzes the formation of the dehydrogenative polymer from sinapyl alcohol. **J. Wood Sci.**, 497-504.
- Bao W., O'Malley D. M., Whetten R., Sederoff R. R. (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. **Science** 260 : 672-674.
- Blee K. A., Choi J. W., O'Connell A. P., Schuch W., Lewis N. G., Bolwell G. P. (2003) A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. **Phytochem.**, 64 : 163-176.
- Capparós-Ruiz D., Fornalé S., Civardi L., Puigdomènech P., Rigau J. (2006) Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. **Plant Science**, 171 : 217-225.
- Catesson A. M., Czaninski Y., Monties B. (1978) Caractères histochimiques des peroxydases pariétales des cellules en cours de lignification. **C. R. Acad. Sci.** 286D, 1787-1790.
- Christensen J. H., Bauw G., Welinder K. G., Van Montagu M., Boerjan W. (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiol.**, 118 : 125-135.
- Christensen J. H., Overney S., Rohde A., Diaz W. A., Bauw G., Simon P., Van Montagu M., Boerjan W. (2001) The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem : cDNA isolation, characterization and expression. **Plant Mol. Biol.**, 47 : 581-593.
- Crevecoeur M., Pinedo M., Greppin H., Penel C. (1997) Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*, **Acta Histochemica** 99 (2) : 177-186.
- Crozier M. N. (1950) Microscopic examination of the sectioned stem of linen flax (*Linum usitatissimum*). **N. Z. J. Sci. Technol.**, 6 : 17-30.
- Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S., Chabbert B. (2005) Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers, **Planta**, 222 (2) : 234-245.
- Day A., Addi M., Kim W., David H., Bert F., Mesnages P., Rolando C., Chabbert C., Neutelings G., Hawkins S. (2005b) ESTs from the fibre-bearing stem tissues of flax (*Linum usitatissimum* L.): Expression analyses of sequences related to wall development. **Plant Biology**, 7 (1) : 23-32.
- Dean J. F. D., Eriksson K.-E. L. (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. **Holzforschung**, 48 : 21-33.

- Dean J. F. D., Sterjiades R., Eriksson K.-E. L. (1994) Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. **Physiol. Plantarum**, 92 : 233-240.
- Dunand C., De Meyer M., Crèvecoeur M., Penel C. (2003) Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth. **Plant Physiol. Biochem.**, 41 : 805-811.
- El Mansouri I., Mercado J. A., Santiago-Dómenech N., Pliego-Alfaro F., Valpuesta V., Quesada M. A. (1999) Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. **Physiol. Plantarum** 106 : 355-362.
- Fernandes, C.F., Moraes, V.C.P., Vasconcelos, I.M., Silveira, J.A.G., Oliveira, J.T.A. (2006) Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid, **Journal of Plant Physiology** 163 (10) : 1040-1048.
- Freudenberg, K., Harkin J. M., Rechert M., Fukuzumi T., Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des subaoinalkohols, **Chem. Ber.**, 1958, 91 : 581-590.
- Gabaldón C., López-Serrano M., Pedreño M. A., Ros Barceló A. (2005) Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. **Plant Physiol.**, 139 : 1138-1154.
- Gabaldón, C., López-Serrano M., Pomar F., Merino F., Cuello, J., Pedreño M. A., Ros Barceló A. (2006) Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. **FEBS Lett.**, 580, 4311–4316
- Gavnholt B., Larsen K. (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. **Physiologia Plantarum** 116 : 273-280.
- Goldberg R., Catesson A. M., Czaninski Y. (1983) Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in lignifications processes, **Z Pflanzenphysiol.**, 110 : 267-279.
- Harkin J. M., Obst J. R. (1973) Lignification in trees: Indication of exclusive peroxidase participation, **Science** 180 (4083) : 284-285
- Harkin J. M., Obst J. R. (1973b) Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi, *Cellular and Molecular Life Science*, 29 (4) : 381-387.
- Kärkönen, A., Koutaniemi, S., Mustonen, M., Syrjänen, K., Brunow, G., Kilpeläinen, I., Teeri, T.H., Simola, L. K. (2002) Lignification related enzymes in picea abies suspension cultures, **Physiologia Plantarum**, 144 (3) : 343-353.
- Klotz K. L., Liu T-T. Y., Liu L., Lagrimini L. M. (1998) Expression of the tobacco anionic peroxidase gene is tissue-specific and developmentally regulated. **Plant Mol. Biol.**, 36 : 509-520.

- Koutaniemi, S., Toikka, M.M., Kärkönen, A., Mustonen, M., Lundell, T., Simola, L.K., Kilpeläinen, I.A., Teeri, T.H. (2005) Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture, **Plant Mol. Biol.**, 58 (2) : 141-157.
- Lagrimini L. M., Gingas V., Fingers F., Rothstein S., Liu T-T. Y. (1997) Characterization of antisens transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. **Plant Physiol.**, 114 : 1187-1196
- Li Y., Kajita S., Kawai S., Katayama Y., Morohoshi N. (2003) Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. **J. Plant. Res.**, 116 : 175-182.
- Liu L., Dean J. F. D., Friedman W. E., Eriksson K-E. L. (1994) Laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissue, **Plant J.**, 6 : 213–224
- Mäder M. (1992) Compartmentation of peroxidases isoenzymes in plant cells. In **Plant Peroxidases 1980-1990** (eds Greppin, Penel), Geneve, pp 37-46.
- Mc Dougall G. J. (1991) Cell-wall associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres, **J. Plant Physiol.**, 139 : 182-186.
- Mc Dougall G. J. (1992) Changes in cell-wall associated peroxidases during the lignification of flax fibres. **Phytochem.**, 31 (10) : 3385-3389.
- Mc Dougall G. J. (1993) Solubilization of wall-bound peroxidases by limited proteolysis, **Phytochem.**, 4 : 765-767.
- Marjamaa K., Kukkola E., Lundell T., Karhunen P., Sranpää P., Fargestedt K. V. (2006) Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway Spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). **Tree Physiology**, 26 : 605-611.
- Nishida K., Katayama Y., Morohoshi N. (1991) Isolation of plant peroxidase involved in the lignification. **Bull. Exp. For.**, 28 : 57-64.
- Oman F., Beaulieu N, Tyson H. (1994) cDNA sequence and tissue specific expression of an anionic flax peroxidase. **Genome**, 37 : 137-147.
- Oman F. et Tyson H. (1996) An anionic, stem specific flax peroxidase cDNA with C-terminal motifs also found in a blue copper Pea protein correlated with lignin deposition. **Aus. J. Plant Physiol.**, 23 : 773-789.
- Østergaard L., Teilum K., Mirza O., Mattsson O., Petersen M., Welinder K. G., Mundy J., Gajhede M., Henriksen A. (2000) *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-

resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. **Plant Mol. Biol.**, 44 : 231-243.

Park S. Y., Ryu S. H., Kwon S. Y., Lee H. S., Kim J. G., Kwak S. S. (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweet potato in response to stress. **Mol. Genet. Gen.**, 269 : 542-552.

Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. **Phytochem.**, 65 : 1879-1893.

Quiroga M., Guerrero C., Botella M. A., Barceló A., Amaya I., Medina M. I., Alonso F. J., Milrad de Forchetti S., Tigier H., Valpuesta V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiol.**, 122 : 1119-1127.

Ranocha P., Chabannes M., Chamayou S., Danoun S., Jauneau A., Boudet A.-M., Goffner D. (2002) Laccase down-regulation cause alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiol.**, 129 : 145-155.

Roach M. J., Deyholos M. K. (2007) Micro-array analysis of flax (*Linum Usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues. **Molecular Genetics and Genomics** 278 (2) : 149-165.

Ros Barceló A., Pomar F. (2001) Oxidation of cinnamyl alcohol and aldehydes by basic peroxidase from lignifying *Z. elegans* hypocotyls. **Phytochem.**, 57 : 1105-1113.

Ros- Barceló A., Gómez-Ros L. V., Carrasco A. E. (2007) Looking for syringyl peroxidases. **TRENDS in Plant Science**, 12 (11) : 486-491.

Sarkanen S., Razal, R.A., Piccariello, T., Yamamoto, E., Lewis, N.G. (1991) Lignin peroxidase: Toward a clarification of its role in vivo, **Journal of Biological Chemistry** 266 (6) : 3636-3643

Sasaki S., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2004) Lignin dehydrogenative polymerization mechanism : a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in β -O-4 linkage. **FEBS Letters**, 562 : 197-201.

Sasaki S., Baba K., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2006) The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. **Plant Mol. Biol.**, 62 : 797-807.

Sasaki S., Shimizu M., Wariishi H., Tsutsumi Y., Kondo R. (2007) Transcriptional and translational analyses of poplar anionic peroxidase isozymes. **J. Wood Sci.**, 53 : 427-435.

Sato Y., Bao W. L., Sederoff R., Whetten R. (2001) Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). **J. of Plant Research**, 114 : 147-155.

Schopfer P. (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: Implications for the control of elongation growth. **Plant J.**, 28 (6) : 679-688.

Tiver N. S. (1942) Studies of the flax plant. 1. Physiology of growth, stem anatomy and fibre development in fibre flax. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, 19 : 149-160.

Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 288 : 129-138.

Tsutsumi Y., Matsui K., Sakai K. (1998) Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringyl and guaiacyl type lignins. **Holzforschung**, 52 : 275-281.

Veitch N. C. (2004) Structural determinants of plant peroxidase function. **Phytochem. Rev.**, 3 : 3-18.

Welinder K.G., Justesen A. F., Kjærsgård I. V., Jensen R. B., Rasmussen S. K., Jespersen H. M., Duroux L. (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **Eur. J. Biochem.**, 269 : 6063-6081.

Whetten R., Sederoff R. (1995) Lignin biosynthesis. **The Plant Cell**, 7 : 1001-1013.

Les données présentées dans le chapitre précédent sont en accord avec les travaux effectués précédemment par A. Day (2005, 2009). Combinant des observations microscopiques et des analyses biochimiques, il avait mis en évidence la présence majoritaire de structures condensées dont les lignines de type G dans les parois des tissus du lin : le xylème et les fibres périphloëmiennes.

L'immunomarquage d'un motif associé aux structures condensées des lignines : la dibenzodioxocine, dont la présence a été décelée chez les conifères révèle une distribution homogène dans les parois du xylème quelque soit le degré de maturité des tissus (partie basale et apicale de la tige). Ces observations associées à l'anatomie de type homoxylé chez le lin suggèrent fortement que cette espèce serait une Angiosperme primitive, proche des Gymnospermes. Dans les fibres périphloëmiennes le motif dibenzodioxocine est détecté dans tout l'épaississement de la fibre notamment dans les parties jeunes représentées par le snap point région apicale où les fibres commencent à s'épaissir.

La coniférine, dérivé glycosylé de l'alcool coniférylique, est un précurseur fortement présumé des lignines de type G. La coniférine présente majoritairement chez les conifères et chez seules quelques Angiospermes montre cependant une distribution sporadique dans les parois de lin, notamment au niveau du cambium et des cellules proches cambium donc relativement jeunes et ce quelque soit le niveau de tige. Ce précurseur n'a pu être mis en immunodétecté dans les fibres extraxylémiennes.

Le fait que le précurseur d'une lignine de type G ne soit présente que dans les cellules du xylème et non dans les fibres externes a orienté mes travaux vers les étapes de la polymérisation de la biosynthèse des lignines. Les monolignols étant acheminés vers la paroi via leurs précurseurs (coniférine et/ou syringine), formes de transport et/ou de stockage pour être polymérisés par le biais des oxydases : peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène et/ou laccases en présence d'oxygène.

Notre étude s'est donc focalisée dans un premier temps sur les oxydases pariétales chez le lin en vue de mieux appréhender et comprendre l'hétérogénéité tissulaire au regard de la lignification dans les tiges de lin.

Ch 3 : Distribution subcellulaire de H₂O₂

Distinct patterns of hydrogen peroxide distribution
in the xylem cells and hypolignified bast fibres of
flax stems (Article en preparation)

Distinct patterns of hydrogen peroxide distribution in the xylem cells and hypolignified bast fibres of flax stems

F. NOLIN^{1,2}, S. HAWKINS², B. CHABBERT¹

1. UMR 614 INRA-URCA, Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE), 51686 Reims, France
2. UMR 1281 USTL-INRA, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés (SADV), UFR Biologie. Bât SN2. 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France

Introduction

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an annual angiosperm dicotyledonous crop which is grown for grain or fibre production (Millam et al., 2005). Fibre flax cultivars have been improved for textile application of their cellulose-rich bast fibres. Owing to the high strength and low density provided by these fibres, further research on flax are receiving increasingly interest with regards to their potential uses in designing agrocomposite materials (Akin et al., 2005).

Flax fibres are stem extraxylary fibres which are distributed as bundles between bark and xylem. Fibre formation takes place throughout the growth of the plant at the outside part of conducting tissues. Apical elongation of the fibre cells is intrusive and starts at the outermost fibres of a bundle then proceeds centripetally to the other cells (Jacquemart and Fourcroy, 1961). Fibre elongation is maximal at the flowering stage and then decreases. From this stage up the plant maturity stage, the fibre cell walls undergo intense thickening which is mainly related to the deposition of cellulose in the secondary cell walls (Morvan et al., 2003). In contrast to xylem that contains approximately 25% lignin only very low amounts are

deposited in the bast fibres thus leading to a marked tissue heterogeneity regarding lignin distribution. Generally speaking flax lignin in both xylem and extraxylary fibres is characterised by the predominance of guaiacyl-condensed lignin type with syringyl/guaiacyl molar ratio close to 0.2 (xylem) and 0.3 (fibre) (Day et al., 2005).

The biosynthesis of lignin monomer has been repeatedly investigated, which has helped to refine the various established biosynthesis pathways and models. All these studies have provided evidence for two main pathways which result in a complex cascade of several enzyme-mediated reactions (Boudet, 2007). The phenylpropanoid pathway starts from phenylalanine to achieve the synthesis of the precursors of flavonoids, coumarines or lignin. Then the monolignol pathway leading to the three cinnamyl alcohols (*p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols) would be more specific to lignin synthesis. Numerous genomic studies and genetic engineering strategies (as transgenesis and mutant generation) have provided evidence for key genes whose expression levels significantly impact on the quantity and quality of lignin (Ralph et al., 2006; Millar et al., 2007; Coleman et al., 2008).

The last step of lignification corresponds to the dehydrogenative polymerization of monolignols. Monomers are enzymatically oxidized into phenoxy radicals which are then polymerized in the cell wall according to non-enzymatic reactions. The enzymatic oxidation of monolignols would be catalyzed by laccases (Liang et al., 2006) and / or peroxidases, the latter requiring the presence of H₂O₂ (Sasaki et al., 2004; 2006). Freudenberg et al. in 1958 was the first to mention a possible role of laccases in lignification. This was strengthened by immunolocalisation of laccases showing a close association of these proteins with the lignification process (Driouich et al., 1992). However, *in vitro* oxidation of monolignols by laccases does not lead to a high polymerisation degree. It was then suggested that they would be responsible for the initiation of the polymerisation of protolignins which would then be used by peroxidases to form highly condensed macromolecules ie lignin (Dean and Eriksson, 1994). In parallel many more studies were conducted on the modulation of gene-encoding peroxidases; different strategies of molecular biology have shown a significant impact on the quality and quantity of lignin (Blee et al., 2003; Gabaldon, 2005).

Different transcription factors can regulate the expression levels of phenylpropanoid genes or would act upon secondary wall formation in response to environmental conditions (Zhong and Ye, 2007). Xylogenesis and lignification have also been shown to be modulated in response to the change in the levels of plant growth regulators (Aloni, 1991; Ievinsh and Romanovskaya, 1991; Sanchez-Bravo et al., 1992). Increased levels of ethylene induce lignification-related enzymes like PAL, accumulation and oxidation of soluble phenolic compounds (Eklund and

Tiltu, 1999; Sitbon et al., 1999). Peroxidases, including wall bound peroxidases are also stimulated by ethylene (Ridge and Osborne, 1977; Faivre-Rampant et al., 1998). In response to stress, which may end in increased or abnormal lignification, the stimulation of the ethylene synthesis also results in the regeneration of ROS (Reactive Oxygen Species) like hydrogen peroxide (Wang et al., 2002).

Hydrogen peroxide being required for the peroxidasic activity, this component may play a role in the process of lignification among other factors. Likewise, the production of H_2O_2 has been detected in lignifying xylem cells (Czaninski et al., 1993; Ros-Barcelo, 1998). Depending on sub-cellular compartment, hydrogen peroxide would act as a catalyst for the oxidative polymerization of monolignols but also as a metabolite signal (Biernat et al., 2006). The differentiation/lignification of xylem could be regulated by H_2O_2 in different ways (Ros-Barcelo, 2005) including transcriptional regulation of genes encoding enzymes such as PAL (Desikan et al. 1998) and peroxidases (Wu et al., 1997), programmed cell death (Fukuda, 1996) or secondary wall formation.

Several interacting mechanisms could thus account for the heterogeneous extent of lignin deposition in secondary cell walls. With regards to the low lignin content in flax extraxylary fibres, low transcript levels of genes encoding monolignol biosynthesis have been previously underlined (De Pauw et al., 2007). Besides availability of the lignin monomer, other factors required for the polymerization step could dictate the extent of lignin deposition. The present study was aimed at investigating the local availability of hydrogen peroxide in flax stem tissues, namely xylem and extraxylary fibres. The distribution of hydrogen peroxide was examined at ultrastructural levels in tissues according to their maturation extent. Cerium chloride ($CeCl_3$) was used as a cytochemical stain for hydrogen peroxide. Indeed, Briggs et al. (1975) introduced that cerium can react with H_2O_2 to produce a water-insoluble cerium perhydroxide precipitate ($Ce[OH]_2OOH$). Cerium chloride thus acts as a capture agent and has allowed the *in situ* detection of H_2O_2 (Czaninski, 1993; Ellis and Grant, 2007). The distribution of hydrogen peroxide was investigated in flax grown under different environmental conditions. More specifically, the effect of Ethephon (commercial name of ethrel, 2 chloroethyl phosphonic acid) on the hydrogen peroxide distribution was examined, this synthetic compound is metabolized by plants to produce ethylene (Yamamoto and Kozlowski, 1987; Telewski, 1990; Öztürk et al., 2008).

Materials and Methods

Plant materials:

Flax (*Linum usitatissimum* L.) cv. Diane was grown either under field conditions (LINEA, Granvilliers, France) or in a greenhouse for 10 weeks (photoperiod 12h/8h, 22°C) using a sand/soil mixture (1/3 ; 2/3) and 22 cm-diameter pots. The sowing density was 1,800 seeds/m². Plants were harvested at the flowering stage (field plant height of 1 m; greenhouse plant height of 0.8 m).

Ethrel application was carried out on plants grown under greenhouse conditions. A 0.1% water-solution of Ethrel (ethephon, Sigma) was sprayed every 2-3 days on aerial parts over a 3-week period. Control plants were treated similarly with distilled water. Ethrel applications were initiated on 3-week-old plants (25 cm high; vegetative growth stage) and stopped at 6 weeks (0.6 m high plants; vegetative growth stage) when plants were harvested.

Histochemical observations

Fresh transverse sections were obtained from the bottom part (15 cm above ground level) and the snap point region of flax stems using a cryotome (MICROM). As described by Gorshkova (2003), the snap point corresponds to the region where bast fibres undergo a developmental transition from cell elongation to cell-wall thickening. Lignin staining was performed on 35 µm-thick sections, using the Weisner reagent (phloroglucinol-HCl staining; Weisner, 1878). Observations were made with an Axioskop microscope equipped with an Axiocam MRc digital camera (Carl Zeiss).

Cytochemical staining for hydrogen peroxide detection:

Small (0.5 cm) fragments were isolated from fresh material at 3 different regions of the flax stem: snap point, median and bottom. Stem fragments were incubated for 6 h at room temperature in 5 mM CeCl₃ (Sigma) in 0.1 M HEPES buffer pH 7.5 (Czaninski et al., 1993). Control samples were incubated in 0.1 M HEPES buffer (pH 7.5) without CeCl₃. The samples were rinsed several times in the buffer and then fixed in a mixture of glutaraldehyde (0.5% (v/v) and paraformaldehyde (Sigma; 2% (v/v)) in 0.1 M sodium cacodylate (Sigma) buffer pH 7, followed by a post-fixation (4 h) in 1% OsO₄ (Flucka). The fragments were then washed, dehydrated in a graded ethanol series and then embedded in epoxy resin (EPON 812, Flucka) before polymerisation (48-72h at 60°C).

Ultrathin sections and cerium detection:

Ultrathin sections (80 nm) were cut with an ultramicrotome (Reichert OMU₂) and collected on copper grids (200 mesh) coated by a type B carbon film (Pelco). Following uranyl acetate (2%) post staining, samples were examined with a Philips CM30 electron microscope operating at 60kV. Electron-dense deposits were characterized by X-ray spectroscopy (SUTW-Sapphire) thereby confirming that electron-dense areas corresponded to cerium perhydroxide precipitates. Further analyses of the recorded X-ray spectra enabled the determination of the relative proportion of each element. The relative percentage of cerium in each electron-dense deposit was determined by calculating the cerium peak area as a percentage of the total element peak area. Between 4 and 5 electron-dense spots were analyzed per cell, and the values combined for 4 different cells in order to give the average cerium percentage per sample examined. The average cell surface area occupied by electron-dense cerium deposits was calculated from the values obtained for 4-5 cells. Average cell wall thickness (bast fibres) per sample examined was calculated on the basis of cell wall measurements from 4-5 cells.

Results

H₂O₂ detection in xylem and bast fibres

Lignin deposition in stem tissues was examined in field-grown harvested at the flowering stage using Phloroglucinol-HCl which gives a red coloration with lignified cell walls. Stem sections at the snap-point region showed a complete circle of lignified xylem (Fig. 1A). In this part of the stem, thickening of the bast fibre cell wall has just started but no lignin staining was observed (Fig. 1C). Examination of sections made at the bottom region of the flax stem reveal major differences in the lignin deposition patterns of inner- and outer-stem tissues (Fig. 1D). In contrast to the inner xylem core which is highly lignified (Fig. 1E), only a light red coloration is observed at the cell corner-middle lamella regions of certain bast fibres (Fig. 1F). Greenhouse flax stems displayed a very similar lignin distribution (data not shown)

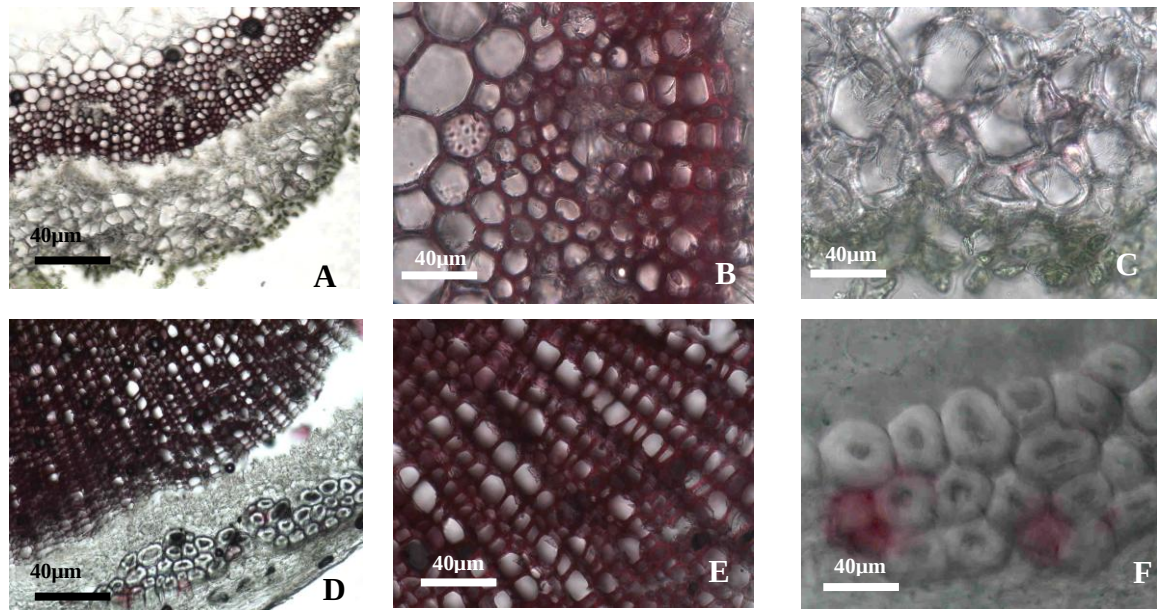


Fig. 1: Weisner reaction staining of stem transverse sections obtained from field-grown flax harvested at flowering stage

A : Overview of flax stem at the snap point region ; B : Higher magnification of xylem cell of fig. A; C: Higher magnification of extraxylary fibres of fig. A.; D : Overview of flax stem at the bottom region ; E: Higher magnification of xylem cell of fig. D ; F : Higher magnification of extraxylary fibres of fig. D .

In order to study the distribution of hydrogen peroxide in flax stem tissues, small stem samples (field-grown and greenhouse) were incubated with cerium chloride and embedded for examination by transmission electron microscopy combined with an X-ray probe. Analyses were made on i) differentiating xylem cells (close to cambium), ii) mature xylem cells (distant from cambium) and iii) bast fibres. Examination of control samples incubated in the absence of CeCl_3 did not reveal the presence of any electron-dense deposits regardless of the stem section/cell type examined (Fig. 2). In contrast, incubation of stem fragments in buffer containing CeCl_3 gave rise to the development of electron-dense deposits in different cells (Fig. 3). Analyses of these deposits by X ray spectroscopy confirmed the presence of cerium.

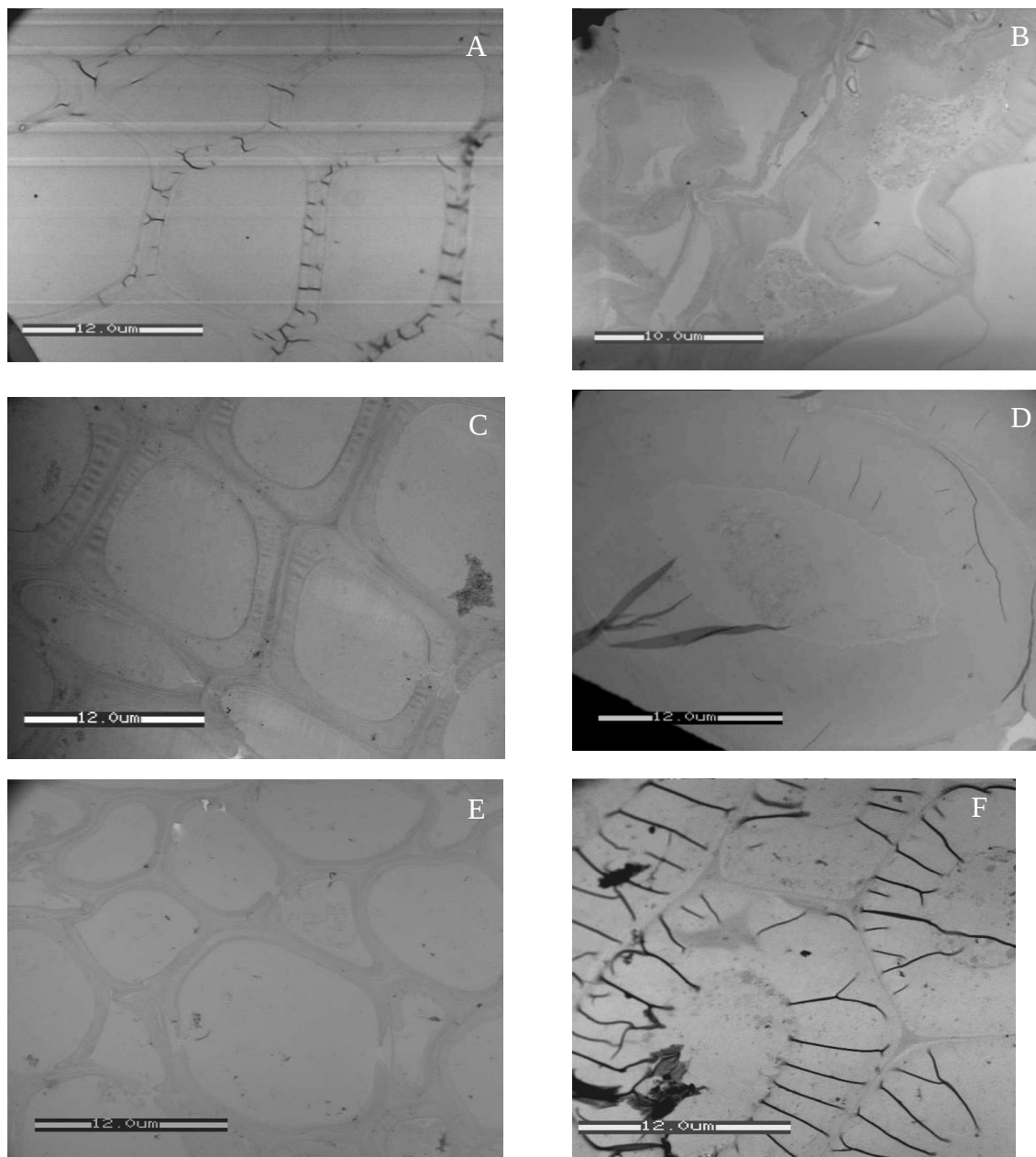


Fig. 2 : Control flax stem samples incubated with HEPES buffer in the absence of CeCl_3

A : Xylem cells at the snap point region; B : Bast fibres at the snap point; C : Xylem cells at the median stage ;
D : Bast fibres at the median stage ; E : Xylem cells at the bottom region; F : Bast fibres at the bottom part

Examination of immature xylem cells (close to cambium) from the snap point region indicated that electron-dense deposits occurred as diffuse globular areas on the inner surface of the secondary walls (Fig. 3A, B). The same pattern of labelling was observed in more mature xylem cells (Fig. 3C, D). In contrast, cerium precipitates in mature xylem cells (distant

from cambium) appeared as small black spots almost entirely covering the whole inner surface of the cell wall (Fig. 3E, F).

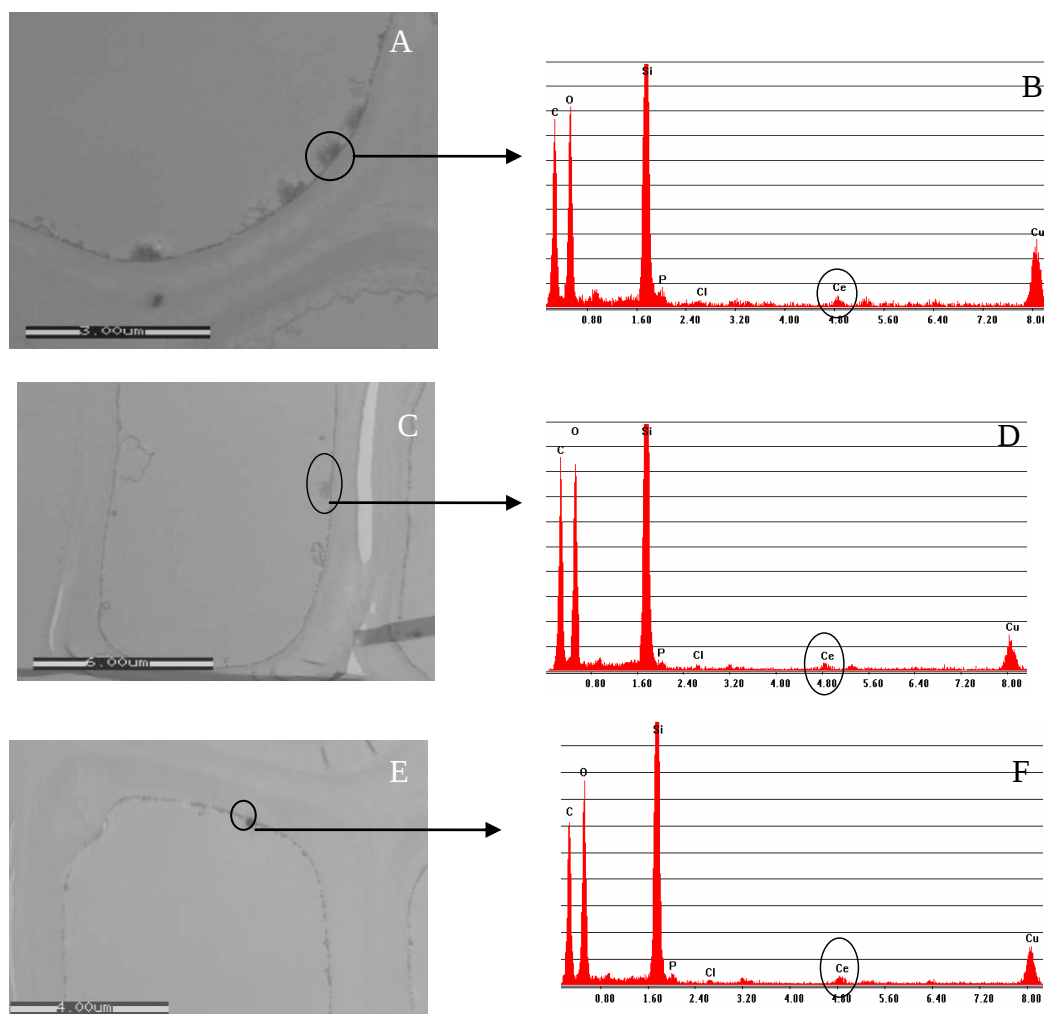


Fig. 3: Detection of hydrogen peroxide in xylem cells located at the snap point stem region of field-grown flax harvested at flowering stage

A: Xylem cells close to cambium; B: X-Ray spectra of the labelling displayed in the microphotographs A; C: Xylem cells between mature xylem and cambium ; D: X-Ray spectra of black area displayed in the microphotograph C ; E: Mature xylem cells; F : X-Ray spectra of small blacks spots displayed in the microphotograph E.

In the median stem region, globular staining was also observed in immature xylem cells (Fig. 4A, B). In addition electron-dense deposits were also detected at the punctuation between two xylem cells (Fig. 4C, D). Mature xylem cells showed a similar pattern of electron-dense deposits (occurring in small spots) to that observed in comparable snap-point samples (Fig. 4E, F).

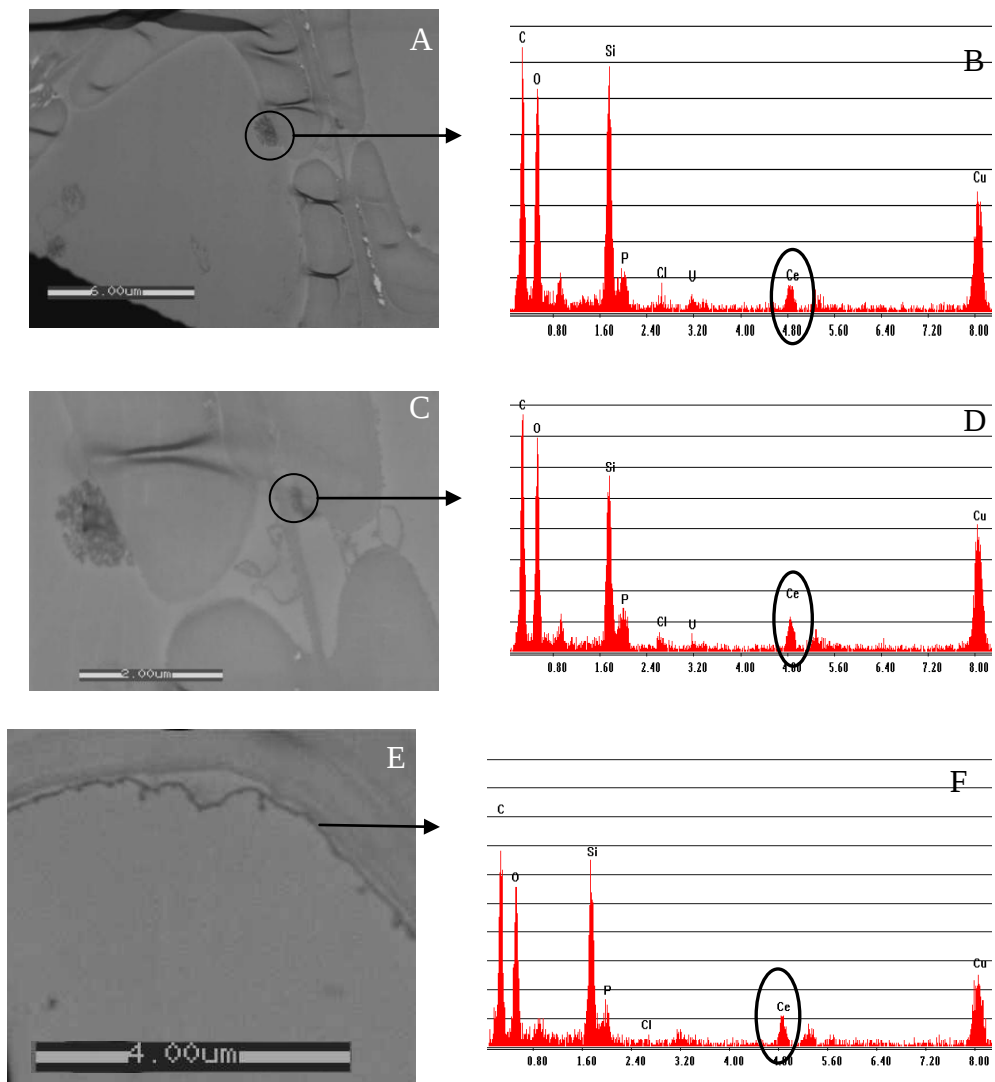


Fig. 4: Detection of hydrogen peroxide in xylem cells located at the median stem region of field-grown flax harvested at flowering stage.

A : xylem cells close to cambium ; B : X-Ray spectra of the labelling displayed in the microphotograph A (arrow) ; C : Higher magnification of the cell communication displayed in A ; D : X-Ray spectra of the labelling displayed in microphotograph C (arrow); E : Mature xylem cells ; F : X-Ray spectra of the labelling displayed in microphotograph E

Similar differences in the electron-dense labelling pattern were also observed between immature (Fig. 5A, B) and mature (Fig. 5C, D) xylem cells from the basal region of the stem. Interestingly, electron-dense deposits occurred as both diffuse globular areas and small spots in intermediate xylem cells from median and basal regions (data not shown).

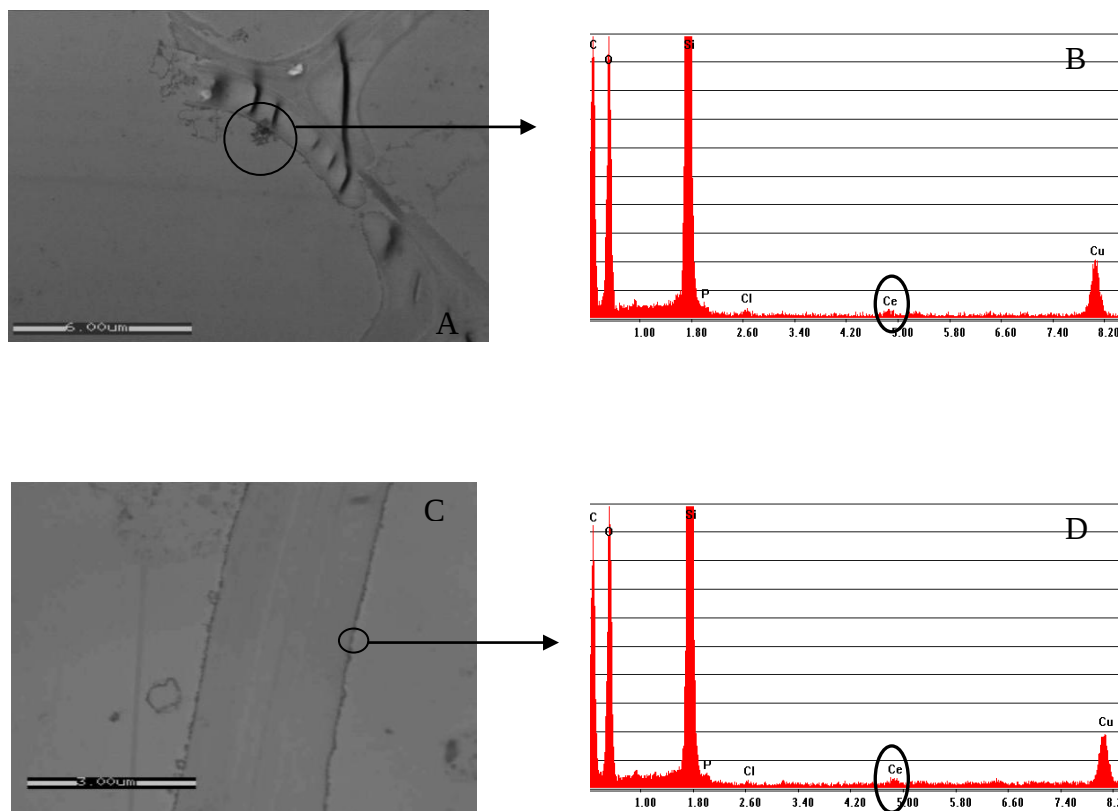


Fig. 5 : Detection of hydrogen peroxide in xylem cells located at the bottom stem region of field-grown flax harvested at flowering stage

A : xylem cells located close to cambium ; B : X-Ray spectra of the labelling observed in the microphotograph A (arrow) ; C : mature xylem cells; D : X-Ray spectra of labelling displayed in the microphotograph C (arrow).

Incubation of stem segments with CeCl_3 gave rise to a different pattern of electron-dense deposits in bast fibres (Fig. 6). No cerium deposits could be observed in bast fibres from the snap point (Fig. 6A) or basal regions (Fig. 6D) of the stem. In contrast, deposits were observed in bast fibres from the median region of the stem (Figs. 6B, E).

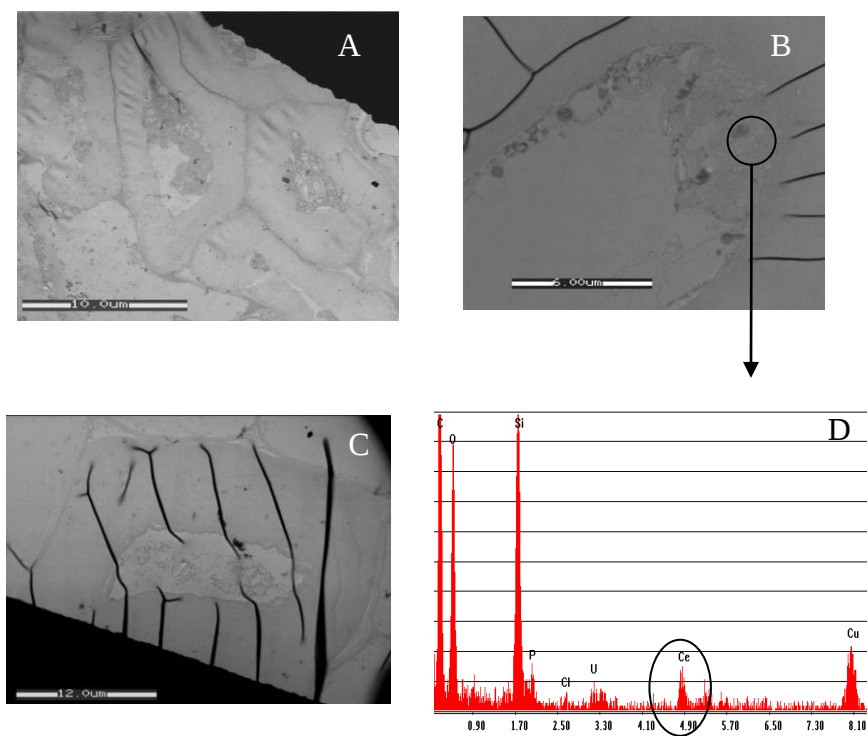


Fig. 6: Detection of hydrogen peroxide in the extraxylary fibres at the three stem regions of field-grown flax harvested at flowering stage

A : Fibres located at the snap point region ; B : Fibres located at the median region ; C : Fibres located at the bottom region; D : X-ray spectra of the labelling displayed in the microphotographs B.

As previously observed in xylem cells, electron-dense deposits occurred as more or less diffuse globular masses on the inner surface of the secondary walls. Measurements of bast fibre cell wall thickness indicated that average values varied from 2.0 μm (snap point) to 7.0 μm (median) and 8.7 μm (basal region) (Table 1). Assuming that the quantity of cerium in each electron-dense deposit is proportional to the amount of hydrogen peroxide, we evaluated variations in H_2O_2 content according to the different stem regions of field-grown flax (Table 1). The percentage cerium values are calculated as described in the material and methods and are independent of both individual xylem cell area and total xylem area. Table 1 also gives the average surface occupied by electron-dense deposits (globular and small spots) per cell. When both of these factors (percentage cerium values and electron-dense surface) are taken into account, our results would suggest that H_2O_2 production is highest in cells (xylem and bast fibres) from the median stem region.

	BOTTOM PART		MEDIAN PART		SNAP POINT	
	Xylem cell	Bast fibres	Xylem cell	Bast fibres	Xylem cell	Bast fibres
Cerium (%)	3.2 +/-0.5	0	17,0 +/-3.1	14.4 +/-0.1	5.0 +/-2.1	0
surface of globular deposit ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	0.5 +/- 0.1	0	2.4 +/-0.5	3.3 +/-0.4	1.9 +/-0.4	0
Surface of small spots ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)	1.5 +/-0.5	0	1.2+/-0.3	0	0.9 +/-0.5	0
Cell wall thickness (μm)	ND	8.7 +/- 1.0	ND	6.7 +/-0.2	ND	2.0 +/- 0.35

Table 1: Surface covered by electron-dense deposit and relative proportion of cerium in the precipitates arising from cerium chloride reaction with H_2O_2 (+/- standard deviation)

In order to confirm our results and to see whether growth conditions affected H_2O_2 distribution we decided to examine flax grown under greenhouse conditions. Our results show that globular electron-dense deposits could be detected in immature xylem cells (Fig. 7A, C) from the snap point and basal stem regions. In contrast, cerium deposits occurred as small spots in mature xylem cells from these 2 stem regions (Fig. 7B, D). Such results are similar to those observed for field-grown flax. Some deposits could also be detected in cell punctuations (Fig. 7E). In contrast, examination of electron-dense deposits in bast fibres revealed differences in the patterning between field-grown and greenhouse plants. In greenhouse plants, cerium deposits were detected in bast fibres from both the snap point (Fig. 7E) and median stem region (data not shown), as opposed to field-grown flax where deposits were only detected in median regions. As for field-grown flax, no deposits were observed in bast fibres from the bottom region (Fig. 7F). Further examination of the microphotographs (both field and green house conditions) suggested that occurrence of the cerium precipitates was related to cell wall thickness of the bast fibres. Measurements of bast fibre cell wall thickness indicated values of $3.2 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (snap point) and $7.3 \pm 0.19 \mu\text{m}$ (basal region).

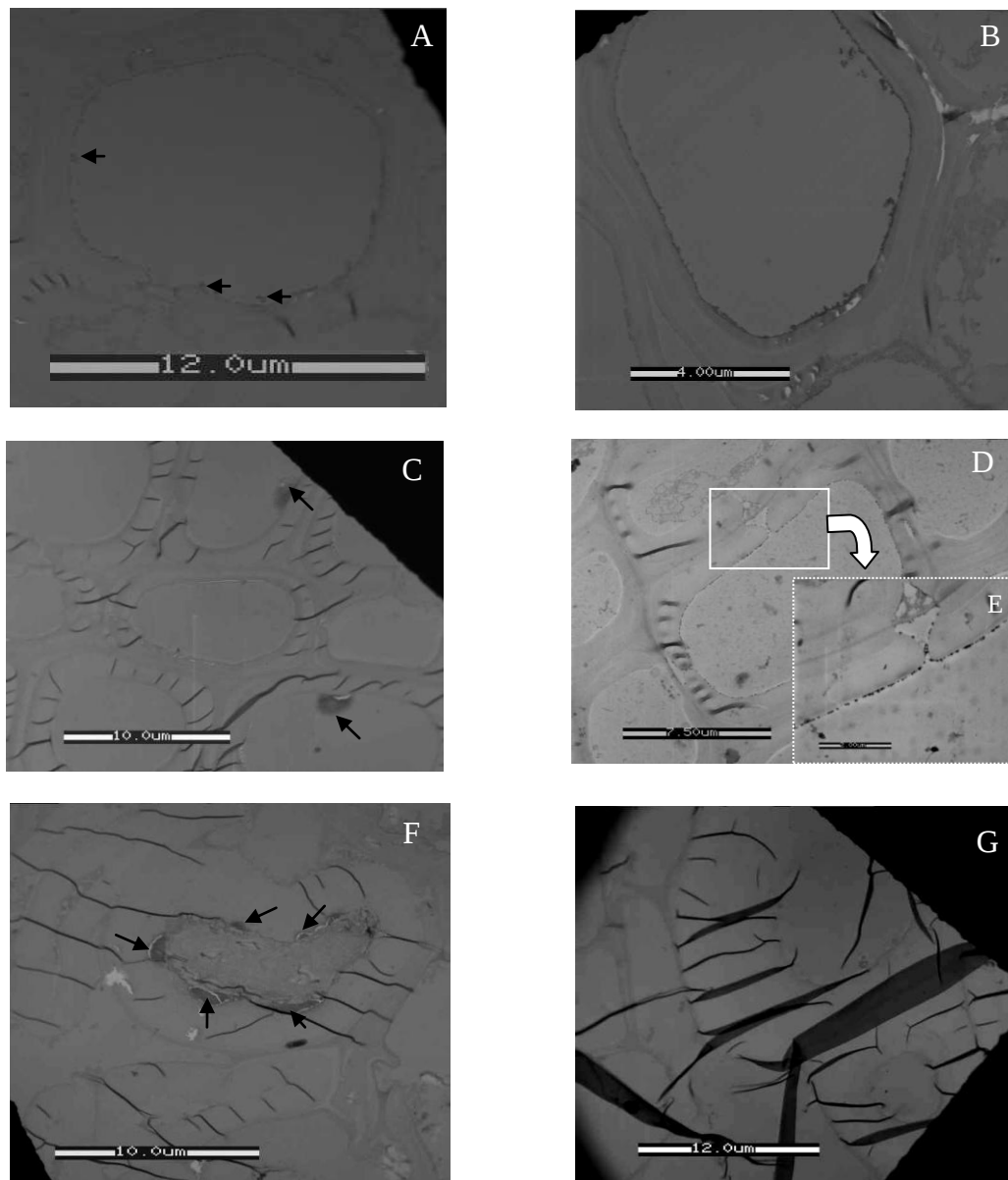


Fig. 7: Detection of hydrogen peroxide in xylem cells and in extraxylary fibres located at the the snap-point and bottom stem regions of greenhouse-grown flax harvested at flowering stage.

A : Xylem cells close to cambium located at the snap point stem region; B : Mature xylem at the snap point region ; C : Xylem cells close to cambium located at bottom stem region; D : Mature xylem at the bottom stem, E : Higher magnification of the area indicated in the photomicrograph D; F: Extraxylary fibres located at the snap-point stem region ; G : Fibres located at the bottom stem region

Impact of ethrel treatment on lignin and hydrogen peroxide distribution

Flax was treated by exogenous application of ethrel or distilled water (control). Our results indicated that ethrel-treatment reduced plant height by an average of 15 cm as compared to control plants at the end of the 3-week period, but did not have any apparent impact on

external stem morphology. Lignin distribution was analyzed by phloroglucinol-staining in stem tissues from 6-week-old flax (vegetative stage) flax harvested at the end of the treatment (Fig. 8).

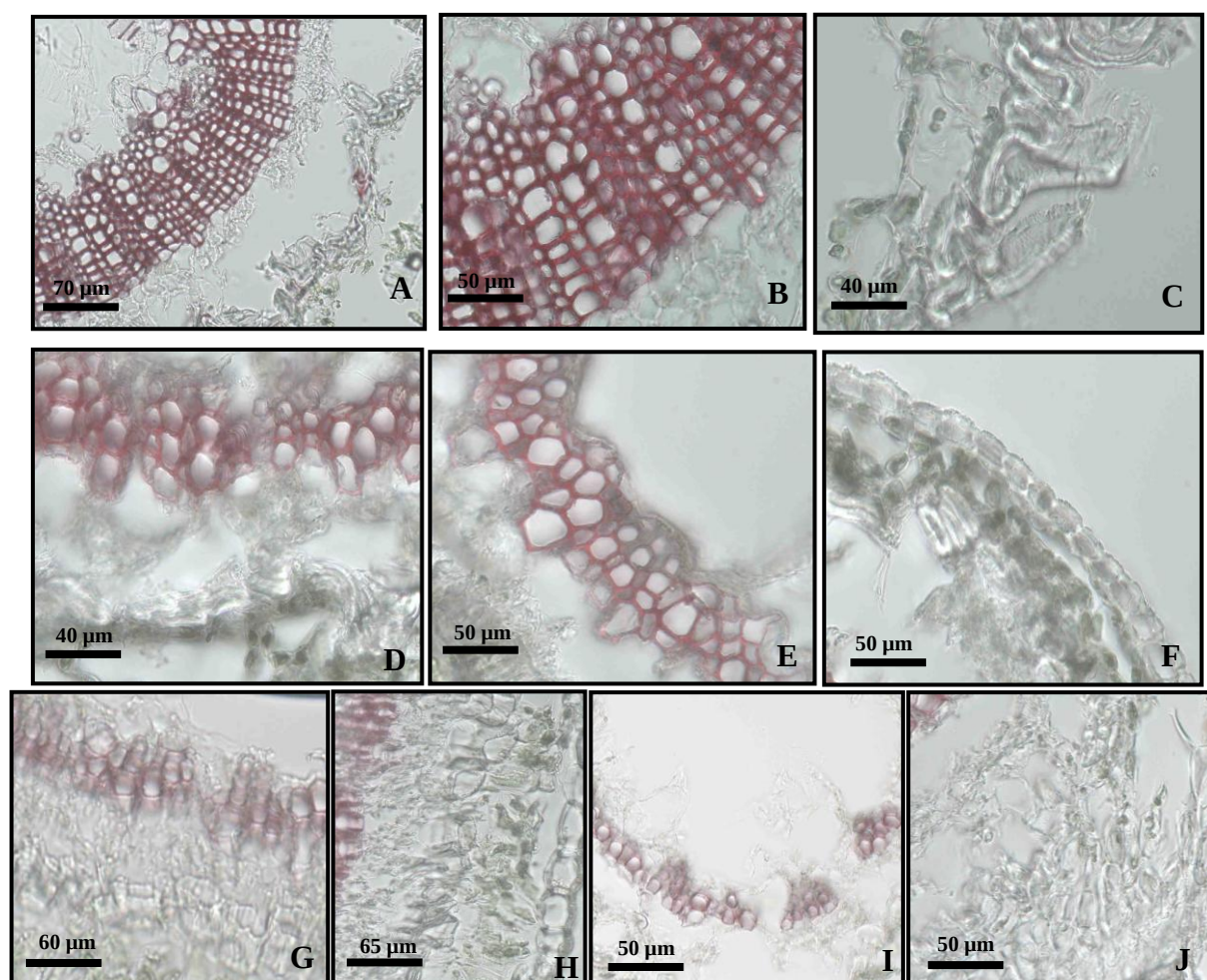


Fig. 8 : Weisner reaction of stem transverse sections obtained from flax sprayed with ethrel or water

A : Bottom stem region Ethrel treated flax ; B : Higher magnification of xylem cell shown in fig. A ; C: Higher magnification of extraxylary fibres shown in fig A; D : Bottom stem of water treated flax snap point region; E : Higher magnification of extraxylary fibres shown in fig D.; F: Higher magnification of extraxylary fibres shown in fig D.; G: Snap point region of ethrel treated flax; H: snap-point region of water-treated flax; I: Higher magnification of extraxylary fibres shown in fig G; J: Higher magnification of extraxylary fibres shown in fig H

Our results showed that while ethrel treatment did not modify lignin patterning, it did have a dramatic effect on xylem development. The surface of xylem tissue was almost doubled in ethrel-treated plants at both the basal region (Fig. 8A, B) and snap point (Fig. 8 G) as compared to water-sprayed flax (Fig. 8C, D, H). In contrast to xylem tissue, ethrel treatment had little/no impact on bast fibre bundle area/lignification (Fig. 8D, E, I, J).

Incubation of stem samples with CeCl_3 was used to investigate H_2O_2 distribution in both control and ethrel-treated plants. Since plants were harvested at 6 weeks and therefore relatively short, we only decided to analyze samples from the snap point and basal regions of stems. At the snap point, electron-dense deposits occurred mostly as small spots in the immature xylem cells of the ethrel-treated flax (Fig. 9A) in contrast to the water-treated control (Fig. 9B) where electron-dense deposits occurred as globular deposits as previously described in flax harvested at flowering stage (Fig. 3). At the bottom region, the number of globular deposits detected in immature xylem cells was higher in ethrel-treated samples (Fig. 9C, D) as compared to controls (Fig. 9E). With regards to bast fibres, ethrel-treatment had no apparent effect on H_2O_2 distribution. No electron-dense deposits were observed in snap point samples from either ethrel-treated samples (Fig. 9F) or controls (Fig. 9G). Electron-dense deposits could be rarely observed in ethrel-treated samples from the stem basal region (Fig. 9H, I) and were absent from control samples (data not shown).

Values for both percentage cerium and electron-dense surfaces (Table 2) would suggest that ethrel-treatment increases the quantity of H_2O_2 in stem basal regions. In contrast, our results indicating an apparent increase in percentage cerium, associated with a decrease in the total electron-dense surface in snap-point regions are more difficult to interpret.

	Flax stem sprayed with Ethrel				Flax stem sprayed with Water			
	BOTTOM PART		SNAP POINT		BOTTOM PART		SNAP POINT	
	Xylem cells	Bast fibre	Xylem cells	Bast fibre	Xylem cells	Bast fibre	Xylem cells	Bast fibre
Cerium (%)	10.9 $\pm$ 3.6	3.9 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 0.3	0	3.1 $\pm$ 0.4	ND	4.9 $\pm$ 0.3	0
Globular Area (μm^2)	3.6 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.1	0	0	0.6 $\pm$ 0.1	ND	2.1 $\pm$ 0.4	0
Black spot Area (μm^2)	0	0	0.79 $\pm$ 0.4	0	0.9 $\pm$ 0.1	ND	0.8 $\pm$ 0.3	0
Cell wall thickness (μm)	ND	6.1 $\pm$ 0.8	ND	2.4 $\pm$ 0.1	ND	ND	ND	1.9 $\pm$ 0.1

Table 2 : Surface covered by electron-dense deposit and relative proportion of cerium in electron-dense deposits corresponding to the cerium chloride reaction with H_2O_2 in water or ethrel sprayed stems ($\pm$ standard deviation)

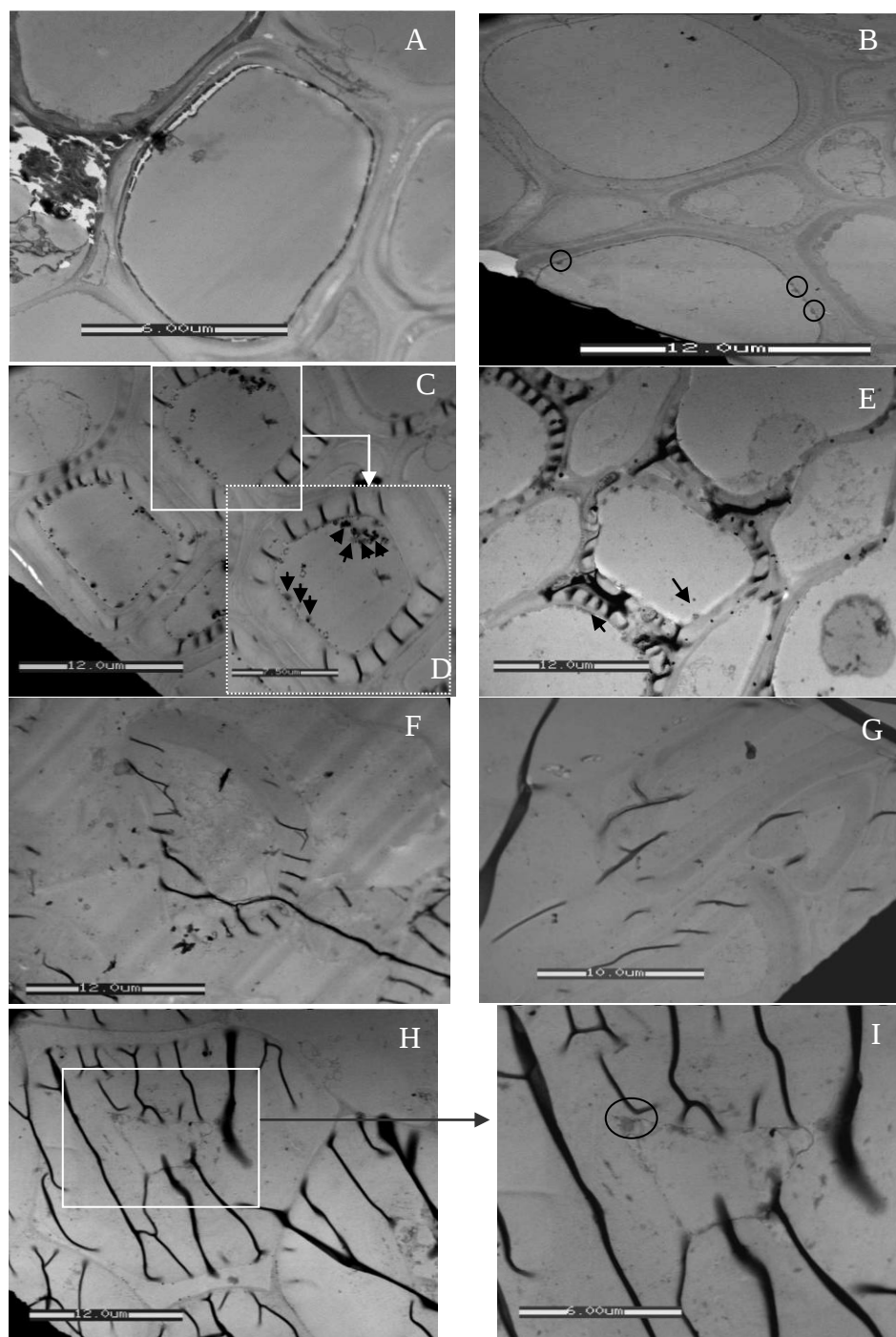


Fig. 9 : Detection of hydrogen peroxide in xylem and extraxylary cells of greenhouse-grown flax sprayed with ethrel or water .

A : Differentiating Xylem cells in the snap-point stem region of flax sprayed with ethrel; B : Differentiating Xylem cells at the snap-point stem region of flax sprayed with water; C : Differentiating Xylem cells at the bottom stem region of flax sprayed with ethrel; D : Higher magnification of the area indicated in the microphotograph A ; E : Xylem cell in differentiation at the bottom stem region of flax sprayed with water ; F : Fibres located at the snap-point stem region of flax sprayed with ethrel; G: Fibres located at the snap-point stem region of flax sprayed with water; H: Fibres located at the bottom stem region of flax sprayed with ethrel, I: Higher magnification of the area indicated in the microphotograph H.

Discussion

As for other reactive oxygen species, the occurrence and levels of hydrogen peroxide in plants is closely related to the developmental/physiological stages of the tissues. Plants cells have evolved several antioxidant mechanisms involved in the control of H_2O_2 levels (Foyer and Noctor, 2000). The presence of hydrogen peroxide has been often reported in plant tissues undergoing normal or stress-induced lignification (Ros-Barcelo, 2005). Since peroxidases are the oxidative enzymes most probably involved in monolignol oxidation, data on H_2O_2 distribution in different tissues/cells can provide information about the lignification process (Czaninski et al., 1993; Ros-Barcelo, 2005; Wu et al., 1997). In this paper we report the localisation of H_2O_2 in both xylem tissues and bast fibres of flax stems. We principally studied localisation in flax harvested at the flowering stage since this developmental stage corresponds to the onset of intense bast fibre thickening and lignification, and has previously been associated with the highest level of peroxidase activity (McDougall, 1992). In order to see whether growing conditions modified H_2O_2 distribution we compared field-grown and greenhouse flax. In addition we also studied the impact of exogenous applications of an ethylene precursor (ethe-rel) on both lignin and hydrogen peroxide distribution in flax stems.

Ultrastructural localization of H_2O_2

Our results using cerium chloride show that endogenous H_2O_2 is present in both xylem and bast fibres of flax stems at the flowering stage. As previously shown by Czaninski et al. (1993), cerium chloride gives a precipitate with hydrogen peroxide and therefore enables direct detection of H_2O_2 at the ultrastructural level. This technique is even more accurate than other reported staining reagents such as DAB: diaminobenzidine (Iwano et al., 2002) or the starch / KI reagent (Olson and Varner, 1993). Indeed DAB staining may display a low specificity due to possible interference with peroxidase. Starch / KI reacts with H_2O_2 produced in response to wounding and the staining is restricted to the cut surface. An additional advantage of cerium chloride depends on the fact that it readily penetrates cell layers (150-200 μm) in contrast to the starch / KI reagent. The use of osmium post-fixation is also essential for preserving membrane structure, thereby allowing retention of soluble compounds in different cell compartments and greatly improving the sensitivity of the experiment (Boka et al., 2007). X-ray spectra of electron-dense deposits allowed us to unambiguously identify cerium thereby preventing any confusion with uranyl acetate

deposits). In addition, X ray analysis allows calculation of the average cerium percentage in each sample analyzed. These values, together with calculations of the average surface area occupied by electron-dense deposits allowed indirect comparison of hydrogen peroxide levels in different stem tissues/cells.

Detection of H_2O_2 in xylem cells

Observations of electron-dense (cerium) deposits indicated that hydrogen peroxide was present in all xylem cells. Altogether our results showing variations in the shape of the cerium precipitates and the indirect quantification of hydrogen peroxide levels suggest that H_2O_2 distribution varies as a function of cell differentiation (cambium to mature xylem cells). To the best of our knowledge, only very few studies have specifically investigated the impact of cell differentiation on the distribution of hydrogen peroxide (Liu et al., 1999).

Our observations showed that diffuse globular precipitates mainly occurred in immature xylem cells (close to cambium). In contrast more concentrated spot-like deposits were observed in mature flax xylem cells as previously observed (Czaninski et al., 1993). Such differences were observed in all samples from different stem regions (snap point, median, basal). However, the lower average cerium percentage values and smaller electron-dense surface areas indicated that H_2O_2 was present in lower quantities in the basal region of the stem. Interestingly, flax xylem lignification is almost completed in this region at the flowering stage, and it is possible that this could be related to the lower levels of H_2O_2 . In contrast, our results indicated that the H_2O_2 level is higher in other stem regions, especially in the median region where extensive lignification of xylem cells is underway (Biernet et al., 2006). Our observations indicating that the H_2O_2 level varies as a function of the developmental stage in lignin would confirm previous observations indicating that this tissue is capable of regulating H_2O_2 levels (Ros-Barcelo, 1998).

Distinct pattern of H_2O_2 distribution in xylem and bast fibres

Bast fibres are primary tissues that differentiate from the apical meristem in contrast to stem xylem tissue which is composed of both primary and secondary tissues (derived from the vascular cambium). Previous studies (Gorshkova et al., 1996) have shown that the cell wall thickness of bast fibres is related to cell development. Our results indicated that H_2O_2 was present only in cells with a wall thickness between 3-7 μm corresponding to bast fibres situated in the median stem region. No H_2O_2 was observed in bast fibres from the snap point or basal regions with average cell wall thicknesses of < 3 μm or > 7 μm , respectively. So

H₂O₂ production in bast fibres is related to the development (and cell wall formation) of these fibres (“young” at the snap point, “maturing” in the median region and “mature” in the basal region. In contrast, H₂O₂ was observed in both immature and mature xylem cells from all 3 stem regions analyzed albeit as indicated above, the amount of H₂O₂ was lower in the basal region.

As compared to xylem, hydrogen peroxide would thus be more spatially and temporally restricted in flax sclerenchyma fibres. Based on the determination of cell surface covered by the electron deposit and of the percentage of cerium surface, H₂O₂ is clearly evidenced in somehow high levels when the fibre cell-wall is thickening ie in the median part of the stem of the field-growing flax. This pattern markedly differs from the xylem cells which produce H₂O₂ whatever the stem regions albeit this production seems to be related to the extent of xylem maturation. Hydrogen peroxide distribution in flax fibres is also quite distinct from previous observations on *Zinnia* stems showing the presence of hydrogen peroxide in phloem fibres, those cells being however lignified (Olson et Varner, 1993; Liu et al., 1999). Variation in hydrogen peroxide production by extraxylary fibres could be related to the extent of gene expression involved in lignification. The capacity for long-term monolignol production was shown to be related to the cell-specific developmental processes and biological roles of different cell types (Baghdady et al., 2006)

The weak availability of hydrogen peroxide in flax fibres could be linked to their very low lignin content in addition to other limiting factors. Not only the availability of monolignols (biosynthesis and compartmenting) but also peroxidase activities may control the extent of monolignol polymerization in the bast fibres (McDougall, 1992). Investigation of the spatial distribution of peroxidase is currently under progress, however preliminary *in situ* detection of oxidase activities failed to detect peroxidase or laccase in the bast fibres of flax in the median stem region where highest proportions of hydrogen peroxide were detected.

Effect of growing conditions

A number of studies have shown that environmental conditions can affect cell wall structure including lignification. Such modifications have been associated with changes in lignin gene expression (Mandre, 2002; Robertson et al., 2004; Mandre and Korsjukov, 2007). It is therefore possible that the environmental conditions could also influence the distribution of hydrogen peroxide. Our results show that both lignification patterns and hydrogen peroxide distribution are similar in stems from flax grown under both field and greenhouse conditions.

However, in both cases, plants were healthy, showed normal growth and it is therefore probable that the differences in growth conditions were not sufficient to provoke any major changes in lignification or H₂O₂ patterns. It would obviously be interesting to evaluate these two parameters in flax plants grown under stress conditions. Interestingly, flax plants grown under field conditions were higher than those grown in the greenhouse thereby resulting in the formation of a more mature stem at a given phonological stage (flowering stage). As a consequence the so-called snap point region would be more mature than the corresponding region in greenhouse flax. Such a situation could explain why we were able to detect H₂O₂ in bast fibres from the snap point region of field-grown, but not greenhouse plants. Further observations are necessary to confirm this point.

We continued our investigation into the potential effects of growth conditions on lignification and H₂O₂ distribution in flax by analyzing the impact of a growth regulator (ethrel) commonly-used against lodging. The use of ethrel presents an additional interest since this compound is a precursor of the plant hormone ethylene that has been shown to regulate wood formation in trees, and may also signal the metabolic shifts leading to the formation of compression wood (Barker 1979; Little and Eklund, 1999). A very recent study also suggest that endogenous ethylene produced in response to leaning stimulates cell division in cambial meristem (Love et al., 2009). Exogenous application of ethrel has also been shown to accelerate lignin deposition in rye (Ievinsh and Romanovskaya 1991) as well as activating cell wall formation in conifer (Ingemarsson, 1995). Similarly, ethrel application has also been reported to induce an increase in the radial growth of conifers and ethylene could play a role in the control of xylem differentiation (Eklund et Little, 1998; Eklund et Titlu, 1999). Although only very few studies have specifically investigated the impact of ethrel on bast fibre structure and formation (El-Shourbagy et al., 1995), the application of this compound has been shown to increase the relative proportion of phloem tissue in conifers (Yamamoto et al., 1987). We therefore decided to investigate the impact of ethrel application on flax stem anatomy, lignification patterns and hydrogen peroxide distribution in both xylem and bast fibres.

Our results showed that ethrel application reduced stem height as previously observed in flax (Gairi and Rashid, 2002). Since initial experiments indicated that ethrel treatment also significantly delayed flowering (only very rarely observed under greenhouse conditions) plants were harvested at the vegetative stage (6 weeks). Examination of flax stem cross-

sections revealed that ethrel application increased the quantity of xylem tissue by nearly two-fold as compared to water-treated controls. In contrast, of the overall quantity of bast fibres was not modified. It is possible that the lack of modifications in bast fibre quantity is due to the fact that such cells are derived from the primary meristem and therefore already formed prior to ethrel treatment, whereas xylem cells are continually derived from the cambium during the treatment.

Our results also showed that ethrel treatment had no apparent effect on lignification patterns in both xylem and bast fibres in flax stems. Interestingly, ultrastructural analyses indicated that while H₂O₂ levels were not modified in bast fibres, such treatment was associated with a clear increase in xylem tissues. Such an observation is in agreement with recent results showing that ethrel treatment enhances fruit maturation and induces higher levels of H₂O₂ in fruit (Singh and Dwivedi, 2008). However, in contrast to our results, previous studies have also reported that ethrel treatment modifies not only lignin deposition but also has an effect on H₂O₂, peroxidases or monolignols. The lack of major modifications in flax bast fibres in contrast to xylem is intriguing. Further studies would be required to compare expression levels of ethylene biosynthesis gene such as ACC synthases in xylem/extraxylary primary fibres. Also since many mechanisms related to transcriptional regulation are still unknown, it is probable that distinct developmental patterns exist according to cell type and ontogeny (primary/secondary tissue).

Hydrogen peroxide can be generated by several enzymatic mechanisms which have not yet been entirely characterized (Liu et al. 1999). Both H₂O₂ production, as well as peroxidase activity, are often stimulated by stress conditions (Apel and Hirt, 2004; Boka et al., 2007; Fernandez-Garcia et al., 2008). Plant response to environmental stress conditions have been associated with expression of genes regulated by plant growth regulators. Amongst these phytohormones, ethylene plays numerous roles in the growth and development of higher plants.

5- Mode of transport?

In addition to regulating mechanisms acting on the biosynthesis of hydrogen peroxide, it is possible that the absence of modifications in bast fibre lignin and H₂O₂ levels following ethrel treatment is due to the mode of transport and cell compartment.

Transport is always a difficult issue when considering thick cell walls. Currently, two mechanisms of hydrogen peroxide transport have been proposed - either by aquaporins or via free diffusion through membranes (Bienert et al., 2006). Based on our TEM observations of flax xylem incubated with cerium, it is also possible that H_2O_2 could be transported between two xylem cells via punctuations. However, such a system would be highly inefficient in bast fibres since such cells are extremely long and the cell wall has little punctuation. In this context, the transport of H_2O_2 (or of monolignols) in flax bast fibres may not be optimal thereby representing a considerable obstacle to the lignification process in these cells.

CONCLUSION

The use of cerium chloride enabled us to detect H_2O_2 in flax stem tissues. Hydrogen peroxide distribution varied according to the extent of cell differentiation and the type of cell. In particular H_2O_2 availability appeared to be highly restricted in the bast fibres as compared to xylem. Nevertheless, since hydrogen peroxide is detected in these fibres, H_2O_2 availability cannot be the sole factor explaining the weak lignification in flax fibres. In addition to transport mechanisms, the production of monolignols is also most likely a determinant factor in controlling lignin deposition in bast fibres, as recently underlined in phloem fibres of hemp and flax (Roach et Deyholos, 2007; De Pauw et al., 2007).

REFERENCES

- Akin D. E., Dodd R. B., Foulk J. A. (2005) Pilot plant for processing flax fibre, **Ind. Crops and Products**, 21 (3) : 369-378.
- Aloni R. (1991) Wood formation in deciduous hardwood trees, **Physiology of trees**, 175-197.
- Apel K. and Hirt H. (2004) Relative oxygen species : metabolism, oxidative stress, and signal transduction, **Annu. Rev. Plant Biol.**, 55 : 373-399.
- Barker J. E. (1979) Growth and wood properties of *Pinus radiata* in relation to applied ethylene. **N. Z. J. For. Sci.**, 9 :15-19.
- Baghdady A., Blervacq A. S., Jouanin L., Grima-Pettenati J., Sivadon P., Hawkins S. (2006) Eucalyptus gunnii CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in Arabidopsis thaliana. **Plant Physiol. and Biochem.**, 44 (11-12) : 674-683.
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide, **Biochimica et biophysica Acta**, , 1758 : 994-1003.
- Blee K. A., O'Connell A., Schuch W., Choi J., Lewis N. G., Bolwell G. P. (2003) A lignin specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification, **Phytochem.**, 163-176.
- Bóka K., Orbán N., Kristóf Z., (2007) Dynamics and localization of H₂O₂ production in elicited plant cells, **Protoplasma**, 230 : 89-97.
- Boudet A. M., (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds, **Phytochem.**, 68 (22/24) : 2722-2735.
- Briggs T., Drath D. B., Karnovsky M. L., Karnovsky M. J. (1975) Localization of NADH oxidase in the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. **Journal Of Cell Biology**, 67 : 566-586.
- Coleman H. D., Park J.-Y., Nair R., Chapple C., Mansfield S. D. (2008) RNAi-mediated suppression of a p-coumaroyl-CoA 3'-hydrolase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism, **P.N.A.S.**, 105 (11) : 4501-4506.
- Czaninski Y., Sachot R. M., Catesson A. M. (1993) Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls, **Annals of Botany**, , 72 : 547-550.
- Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S., Chabbert B. (2005) Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibres, **Planta**, 222 (2) : 234-245.

- Dean J. F. D. and Eriksson K. E. L. (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants, **Holzforschung**, 48 : 21-33.
- De Pauw M. A., Vidmar J. J., Collins J., Bennett R. A., Deyholos M. K. (2007) Microarray analysis of bast fibre producing tissues of *Cannabis sativa* identifies transcripts associated with conserved and specialised processes of secondary wall development. **Functional Plant Biology**, 34 (8) : 737-749.
- Desikan R., Reynolds A., Hancock J. T., Neill S. J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspensions cultures, **Biochem. J.**, 330 : 115-120.
- Driouich A., Laine A. C., Vian B., Faye L. (1992) Characterization and localisation of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore, **The Plant J.**, 2 : 13-24.
- Eklund L. and Little C. H. A. (1998) Ethylene evolution, radial growth and carbohydrate concentrations in *Abies balsamea* shoots ringed with Ethrel, **Tree Physiol.**, 18 : 383-391
- Eklund L. and Tiltu A. (1999) Cambial activity in 'normal' spruce *Picea abies* Karst (L.) and snake spruce *Picea abies* (L.) Karst f. *Virgata* (Jacq.) Rehd in response to ethylene, **J. Exp. Bot.**, 50 (338) : 1489-1493.
- El-shourbagy, M.; Abdel-ghaffar, B.; El-naggar, R. (1995) Effect of IAA and GA3 on the anatomical characteristics, straw and fibre yield and quality of flax. **J. of Agronomy and Crop Science**, 174, 21-26
- Ellis E. A. and Grant M. B. (2007) Cytochemical localization of H₂O₂ in biological tissues, **Methods in Molecular Biology**, Vol. 196 : Oxidants and antioxidants : Ultrastructure and Molecular Biology Protocols.
- Faivre-Rampant O., Kevers C., Bellini C., Gaspar T. (1998) Peroxidase activity, ethylene production, lignification and growth limitation in shoots of a non rooting mutant of tobacco, **Plant Physiol. and Biochem.**, 36 (12) : 873-877.
- Fernandez-García N., Piqueras A., Olmos E. (2008) Sub-cellular location of H₂O₂, peroxidases and pectin epitopes in control and hyperhydric shoots of carnation, **Env. Exp. Bot.**, 62 : 168-175.
- Foyer C. H. and Noctor G., (2000) Oxygen processing in photosynthesis : regulation and signalling, **New Phytol.**, 146 : 359-388.
- Freudenberg, K., Harkin J. M., Rechert M., Fukuzumi T. (1958) Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des subaoinalkohols, **Chem. Ber.**, 91 : 581-590.
- Fukuda H. (1996) Xylogenesis : initiation, progression and cell death, **Annuv. Rev. Plant Physiol.**, 299-325.

- Gabaldón C. (2005) Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isosyme from *Z. Elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis, **Plant Physiol.**, 139 : 1138-1154.
- Gairi A. and Rashid A., (2002) In vitro stimulation of shoot-buds on hypocotyls of *Linum* seedlings, by flooding and ethrel treatment of cultures. **Plant Science**, 163 (4) : 691-694.
- Gorshkova T. A., Wyatt S. E., Salnikov V. V., Gibeaut D. M., Ibragimov M. R., Lozovaya V. V., Carpita N. C. (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. **Plant Physiol.**, 110 (3) : 721-729.
- Gorshkova T. A., Sal'nikov V. V., Chemikosova S. B., Ageeva M. V., Pavlencheva N. V., Van Dam J. E. G. (2003) The snap point : a transition point in *Linum usitatissimum* bast fibre development, **Ind. Crops and Products**, 18 (3) : 213-221.
- Ievinsh G. and Romanovskaya O. I. (1991) Accelerated lignification as a possible mechanism of growth inhibition in winter rye seedlings caused by ethephon and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, **Plant Physiol. Biochem.**, 29 (4) : 327-331.
- Ingemarsson B. S. M. (1995) Ethylene effects of peroxidases and cell growth patterns in *Picea abies* hypocotyl cuttings, **Physiologia Plantarum**, 94 (2) : 211-218
- Iwano M., Che F.- S., Goto K., Tanaka S., Isogai A. (2002) Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells, **Mol. Plant. Pathol.**, 3 : 1-8.
- Jacquemart, J. and Froucroy M. (1961) Origine histologique des premières fibres de la tige de lin, **C. R. Acad. Sci. Paris**, 252 : 2753-2755.
- Liang M., Davis E., Gardner D., Cai X., Wu Y. (2006) Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of Arabidopsis. **Planta**, DOI 10.1007/s00425-006-0300-6.
- Little C. H. A. and Eklund L., (1999) Ethylene in relation to compression wood formation in *Abies balsamea* shoots. **Trees**, 13 (4) : 173-177.
- Liu L., Eriksson K.-E. L., Dean J. F. D. (1999) Localization of hydrogen peroxide production in *Zinnia elegans* L. Stems, **Phytochem.**, 52 : 545-554.
- Mac Dougall G. J., (1992) Changes in cell-wall associated peroxidases during the lignification of flax fibres, **Phytochem.**, 31 (10) : 3385-3389.
- Love J., Björklund S., Vahala J., Hertzberg M., Kangasjärvi J., Sundberg B. (2009) Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. **PNAS**, 106 (14) : 5984-5989.

- Mandre M. (2002) Relationships between lignin and nutrients in *Picea abies* L. under alkaline air pollution. **Water, Air and Soil Pollution**, 133 : 361–377.
- Mandre M. and Korsjukov R. (2007) The quality of stemwood of *Pinus Sylvestris* in an alkalised environment. **Water, Air and Soil Pollution**, 182 (1-4) : 163-172.
- Millam S., Obert B., Pret'ova A. (2005) Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* - a review, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82 (1) : 93-103.
- Millar D. J., Long M., Donovan G., Fraser P. D., Boudet A. M., Danoun S., Bramley P. M., Bolwell G. P., (2007) Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids, **Phytochem.**, 68 (11) : 1497-1509.
- Morvan C., Andème-Onzighi C., Girault R., Himmelsbach D. S., Driouich A., Akin D. E. (2003) Building flax fibres : more than one brick in the walls. **Plant Physiol. and Biochem.**, 41 : 935-944.
- Olson P. D. and Varner J. E. (1993) Hydrogen peroxide and lignification, **The Plant J.**, 4 (5) : 887-892.
- Öztürk L., Küfrevioglu Ö. I., Demir Y. (2008) In vivo and in vitro effects of ethephon on some oxidative enzymes in spinach leaves, **Acta Physiol. Plant**, 30 : 105-110.
- Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F. C., Schatz P. F., Marita J. M., Ralph S. A., Reddy M. S. S., Chen F., Dixon R. A. (2006) Effects of coumarate 3-hydroxylase down regulation on lignin structure, **J. of Bio. Chem.**, 281 (13) : 8843-8853.
- Ridge I. and Osborne D. J. (1977) Role of peroxidase when hydroxyproline-rich glycoprotein in plant cell walls is increased by ethylene, **Nature New Biol.**, 229 : 205-208.
- Roach M. and Deyholos M. (2007) Microarray analysis of flax (*Linum usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues, **Molecular Genetics and Genomics**, 278 : 149-165.
- Robertson I., Loader N. J., McCarroll D., Carter A. H. C., Cheng L., Leavitt S. W. (2004) $\delta^{13}\text{C}$ of tree-ring lignin as an indirect measure of climatic change. **Water, Air and Soil Pollution**, Focus, 4 : 531–544.
- Ros-Barcelo A. (1998) Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants, **Ann. Bot.**, 82 : 97-103.
- Ros-Barcelo A. (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H_2O_2 necessary for lignification in differentiating xylem vessels, **Planta**, 220 : 747-756.

- Sanchez-Bravo J., Ortuño A. M., Pérez-Gilabert M., Acosta M., and Sabater F. (1992) Modification by ethylene of the cell growth pattern in different tissues of etiolated lupine hypocotyls, **Plant Physiol.**, 98, 1121-1127.
- Sasaki S., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2004) Lignin dehydrogenative polymerisation mechanisms : a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produce in vitro DHP rich in β -O-4 linkage, **FEBS lett.**, 562 (1/3) : 197-201.
- Sasaki S., Baba K., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2006) The cationic cell wall peroxidases having oxidation ability for polymeric substrate participate in the late stage of lignification of *populus alba* L., **Plant Mol. Biol.**, 62 : 797-807.
- Singh R. and Dwivedi U. N. (2008) Effect of ethrel and 1 methylcyclopropene (1-MCP) on antioxidants in mango (*Mangifera indica* var. *Dashehari*) during fruit ripening, **Food Chem.**, 111 : 951-956.
- Sitbon F., Hennion S., Little C. H. A., Sundberg B. (1999) Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition, **Plant Sci.**, 141 (2) : 165-173.
- Telewski F. W. (1990) Growth, wood density, and ethylene production in response to mechanical perturbation in *Pinus taeda*, **Can. J. For. Res.**, 20 : 1277-1282.
- Wang K. L.-C., Li H., Ecker J. R. (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks, **The Plant Cell**, 14 : S131-S151.
- Weisner J. (1878) Das verhalten des phloroglucins und einiger verwandter körper zur verholzten zellmembran, **Sitzber Akad Wiss Wien Abt I**, 77 : 60-66.
- Wu G., Shortt B. J., Lawrence E. B., Léon J., Fitzsimmons K. C., Levine E. B., Raskin I., Shah D. M. (1997) Activation of host defence mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants, **Plant Physiol.**, 115 : 427-435.
- Yamamoto F., Angeles G., Kozlowski T. T. (1987) Effect of ethrel on stem anatomy of ulmus Americana seedlings, **IAWA bulletin**, 8 (1) : 3-8.
- Yamamoto F. and Kozlowski T. T. (1987) Effect of ethrel on growth and stem anatomy of *Pinus halepensis* seedlings. **IAWA bulletins**, 8 : 11-19.
- Zhong R., Ye Z. H. (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. **Curr. Op. in Plant Biol.**, 10 (6) : 564-572.

Les données présentées dans le chapitre précédent sont en accord avec les travaux effectués précédemment par A. Day (2005, 2009). Combinant des observations microscopiques et des analyses biochimiques, il avait mis en évidence la présence majoritaire de structures condensées dont les lignines de type G dans les parois des tissus du lin : le xylème et les fibres périphloëmiennes.

L'immunomarquage d'un motif associé aux structures condensées des lignines : la dibenzodioxocine, dont la présence a été décelée chez les conifères révèle une distribution homogène dans les parois du xylème quelque soit le degré de maturité des tissus (partie basale et apicale de la tige). Ces observations associées à l'anatomie de type homoxylé chez le lin suggèrent fortement que cette espèce serait une Angiosperme primitive, proche des Gymnospermes. Dans les fibres périphloëmiennes le motif dibenzodioxocine est détecté dans tout l'épaississement de la fibre notamment dans les parties jeunes représentées par le snap point région apicale où les fibres commencent à s'épaissir.

La coniférine, dérivé glycosylé de l'alcool coniférylique, est un précurseur fortement présumé des lignines de type G. La coniférine présente majoritairement chez les conifères et chez seules quelques Angiospermes montre cependant une distribution sporadique dans les parois de lin, notamment au niveau du cambium et des cellules proches cambium donc relativement jeunes et ce quelque soit le niveau de tige. Ce précurseur n'a pu être mis en immunodétecté dans les fibres extraxylémiennes.

Le fait que le précurseur d'une lignine de type G ne soit présente que dans les cellules du xylème et non dans les fibres externes a orienté mes travaux vers les étapes de la polymérisation de la biosynthèse des lignines. Les monolignols étant acheminés vers la paroi via leurs précurseurs (coniférine et/ou syringine), formes de transport et/ou de stockage pour être polymérisés par le biais des oxydases : peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène et/ou laccases en présence d'oxygène.

Notre étude s'est donc focalisée dans un premier temps sur les oxydases pariétales chez le lin en vue de mieux appréhender et comprendre l'hétérogénéité tissulaire au regard de la lignification dans les tiges de lin.

Ch 4 : Limitations architecturales à la lignification des fibres

How gelatinous are secondary cell walls of flax
fibres? (Article en preparation)

How gelatinous are secondary cell walls of flax fibres?

NOLIN F.^{1,2}, HABRANT A.¹, HAWKINS S.², CHABBERT C.¹

1. UMR 614 INRA-URCA, Fractionnement des AgroRessources et Environnement (FARE), 51686 Reims, France
2. UMR 1281 USTL-INRA, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés (SADV), UFR Biologie. Bât SN2. 59655 VILLENEUVE D'ASCQ, France

Introduction :

Cultivated flax (*Linum usitatissimum*) is a crop of economic interest that produces grain and fibres for food and non food uses. The crop reached 90 - 120 cm height (Kymäläinen et al., 2004) and is weakly ramified. The long fibers (up to 1m length and 25 µm in diameter, Bos and Donald, 1999) are distributed at the periphery of the stem and are used since antiquity for textiles. These fibres have remarkable mechanical properties that hold on morphological characteristics, combined with cellulose architecture and polymer organization in the fibre cell wall. These characteristics together with a weak density are also attractive for other applications such as composite materials (Akin et al., 2005)

Generally speaking, fibres cells are highly specialized cells that provide mechanical support to the plant tissues in Angiosperms whereas tracheids provide both support and conduction in gymnosperms. Fibres are long narrow cells with thick secondary walls and account for the main part of the woody biomass as trees although they are also abundant in lignocellulosic herbaceous species. According to their ontogeny, fibres are primary (originating from procambium) or secondary cells (originating from cambium) (Esau, 1943).

In flax stem, secondary xylem fibres are highly lignified in contrast to the hypolignified outer fibres that are called bast or extraxylary fibers (Day et al., 2005). These bast fibres are sclerenchyma cells that originate from the procambium cells in the protophloem, and are distributed as bundle of cells at the periphery of the stem. Bast fibres are long cells with thick cell walls (5 to 15 μm). (Morvan et al., 2003). The extraxylary fibers in flax consist exclusively of primary fibers (Gorshlova et al., 2005) whereas other fibre crops such as hemp generates both primary and secondary cells (Crônier et al., 2005).

Given the high cellulose content and cristallinity, hypolignified bast fibres in hemp or flax have been qualified as gelatinous fibres with regards to the architecture of fibre in tension wood. Indeed several woody species among angiosperms can overcome mechanical stress by differentiating fibre cells with an additional wall layer next to the secondary wall. In poplar, this extra wall layer is cellulosic-rich and is usually termed gelatinous (G) layer. The G-layer tends to shrink considerably after drying. Cellulose-rich bast fibres encountered in flax or hemp show chemical and organizational similarities with G-layer which is characterized by the deposition of highly orientated cellulose microfibrils, occurrence of galactans and weak amount of lignin (Pilate et al., 2004). In this respect, extraxylary fibres in flax or hemp were termed as gelatinous fibre by Gorshkova and coworkers (Gorshkova and Morvan, 2006; Mikshina et al., 2009).

Fibres in tension wood and flax sclerenchyma have supporting functions and exhibit apparent similarities in the differentiation events at molecular levels. Notably, arabinogalactan protein genes were expressed at high levels along secondary wall deposition in bast fibres as well as differentiation of tension wood (Pilate et al., 2004; Roach and Deyholos, 2007). Highly cellulosic fibres are thus characterized by several similar features. However the mechanisms underlying the cell wall network may hold on different organizational patterns. Indeed electron microscopy observations of the secondary walls in bast fibers and in G-layer give rise to different images (Gorshkova and Morvan, 2006; Clair and Thibault, 2001; Pilate et al., 2004). In contrast to flax fiber, G-layer appears to be less thick as compared to observations of samples sectioned from fresh wood. This pattern may be related to the way cell wall behave during the dehydration and resin embedding, which are required in sample preparation for transmission electron microscopy. Clair et al. in 2005 described a method that should avoid the swelling of the G-layer during sample preparation thereby allowing quantitative measurement of the shrinkage of the G-layer. Accordingly, recent studies have shown that G-layer in poplar may shrink due to drying (Fang et al., 2007).

Despite transmission electron microscopy allows examination of cell work at nanoscale levels, sample embedding procedure may induce some modifications in the cell wall network. In contrast ESEM, environmental scanning electron microscopy, allows observation of sample without any preparation and enables to determine on line morphological changes that may occur during drying thanks to the possible modulation of vacuum pressure. This technique is thus powerful to evidence drying effects on lignocellulosic fibres (Jähn et al., 2002; Mohr et al., 2006). ESEM was used in the present study to get a better insight at the cell wall network in flax fibres and morphological changes under drying conditions. In addition, we evaluated the penetration and progression of fluorescent probes with different molecular weight in fibre well walls using confocal laser microscopy.

Material and Methods

Environmental scanning electron microscopy

The fiber flax cv. Diane was grown under greenhouse conditions and harvested at flowering stage. Freehand stem sections (300 µm thickness approximately) were obtained with a razor blade and spinal elderberry at bottom part of stem to 15 cm from the collar. Sections were observed using ESEM, FEI Quanta 200 at different temperatures and pressure starting from (3.6 to 12°C, 4 to 0.432 Torr).

Confocal microscopy

Flax stem sections were immersed in fluorescent probes prior to confocal laser microscopic observation. Dextran (10 and 70 kDa) were labeled either with FITC (Fluoresceine IsoThioCyanate) or RITC (Rhodamine IsoThioCyanate) (Sigma). Cross-sections (35 µm thick) were obtained with a cryotome from the bottom part (15 cm from the collar). The slices were immersed overnight in 2.5% fluorescent dextran water solutions under agitation at room temperature. After rinsing with water milliQ sections were mounted between slide and coverslip in water and observed using a confocal microscope LEICA TSC SP2 and oil immersion objective x 63. According to the fluorochrome, observations were performed at 490nm excitation/ 520nm emission wavelength for FITC, or 570 nm excitation/595 nm emission wavelength for RITC (Gain : 1, generally 6 accumulations)

Results and discussion

To study the possible drying of the fiber cell walls we use environmental microscopy which allows observation of the sample without metallization. Fresh samples can be viewed under low vacuum. The ESEM (environmental scanning electron microscopes) is used with water vapor (the most common gas used in ESEM) due to its efficiency in signal amplification. The sample can be observed at different humidity levels, which are dependent on pressure and temperature (through the Peltier stage), both parameters can be adjusted to evaporate a small amount of water (Bogner et al., 2007).

In situ ESEM examination of flax fibres has already been performed especially with regards of the physicochemical properties of isolated fiber such as resistance to tension and compression (Bos and Donald, 1999) and on alkali treated fiber (Jähn et al., 2002) but never on “native” situation ie without any treatment or separation, on the whole stem.

Microphotographs were taken at a beam voltage maintained below 12 KeV to prevent any damage to the external fibers. Drying was then carried out by the steady decrease of the pressure from 4 to 0.42 Torr. Shrinkage of the bast fibre cell wall was hardly detected during the drying step (Fig. 1 A to D). Several studies have addressed the longitudinal shrinkage of G- layer with regards to the strong implication of tension in the final mechanical properties of the wood. Clair and Thibaut (2001) showed by atomic force microscopy that G-layer in chestnut was strongly involved in axial shrinkage of tension wood. In addition, Clair (2001) observed a large shrinkage of the G-layer without macroscopic deformation of the sample during drying experiment performed on poplar tension wood under ESEM. The G-layer got gradually detached from the S2 at the end of drying. In tension wood, G-layer is thus considered to play a major role in the shrinkage of longitudinal tension wood. Other studies on different species have then confirmed these observations (Washusen and Ilic, 2001; Yamamoto et al., 2005; Fang et al., 2007). Notably, Yamamoto et al. (2005) have shown that the longitudinal shrinkage of tension wood is effectively due to the shrinkage of G-layer but in axial direction. Although longitudinal shrinkage cannot be easily demonstrated in the case of long fibres such as bast fibres, transversal shrinkage at least did not seem to occur under drying or would be only minor. The hypothesis that secondary wall of flax bast fibre is gelatinous layer is based on the common features with G-layer in tension wood ie: high amount of cellulose (Roland et al., 1995) highly orientated microfibrils (Salmanikov et al., 2008), small amount of phenolic compounds as lignin, as well as high proportion of polymers

such as galactans and AGPs (Gurjanov et al., 2008). Albeit similar to G-layer in many respects, the bast fibre secondary cell walls that show almost no shrinkage may differ regarding other properties.

The stability of the fibres can be considered as beneficial regarding industrial uses, the lack of shrinkage may indicate that fibers would have weaker potential to trap water compared to G-layer.

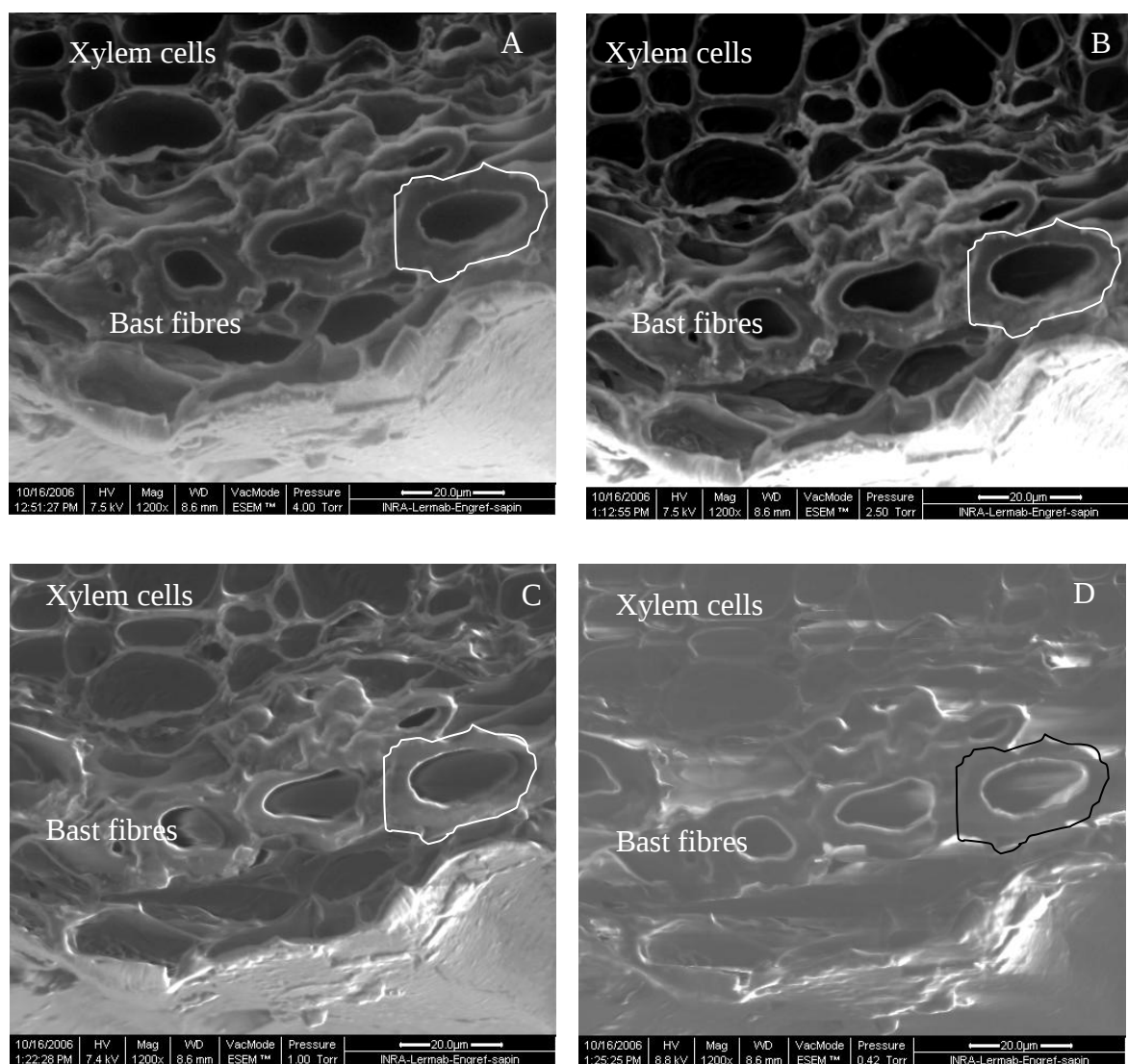


Fig. 1 : Bast Fiber in flax stem harvested at flowering stage during drying step observed with ESEM

A : Bottom part with a pression 4.00 Torr ; B : Bottom part with a pression 2.5 Torr ; C : High part with a pression 1 Torr ; D : High part with a pression 0.42 Torr

Since the secondary cell walls apparently display weak or even no shrinkage, the penetration and progression of metabolites into the fibre cell wall may be hampered by this dense

network. The high crystallinity of cellulose present in large quantities in flax extraxylary fibers (greater than 70%) could prevent or at least delay the progression of metabolites or proteins. To address this question, we examine the distribution of distinct molecular weight dextrans coupled with a fluorochrome: FITC-dextran 10 kDa and 70 kDa; and RITC-dextran 10 and 70 kDa. Following immersion of flax stem sections with dextrans solutions, these sections were observed using a confocal microscope. The distribution of FITC-dextran in flax bast fibres cell walls are reported in Figure 2 (A-B). For most of the bast fibres, the dextran 10 kDa is uniformly located across the thickness of cell wall and give rise to a strong labeling (Fig. 2 A). When sections are immersed with FITC-dextran 70 KDa, labeling was still observed in the cell walls of the bast fibres but labeling is much less intensive as compare to the dextran 10 kDa (Fig. 2B). Different areas within the cell wall could be distinguished with regards to the fluorescent labeling (Fig. 2B).The probe appeared to be more concentrated present in the layer S3 close to the lumen as compare to other secondary wall layers.

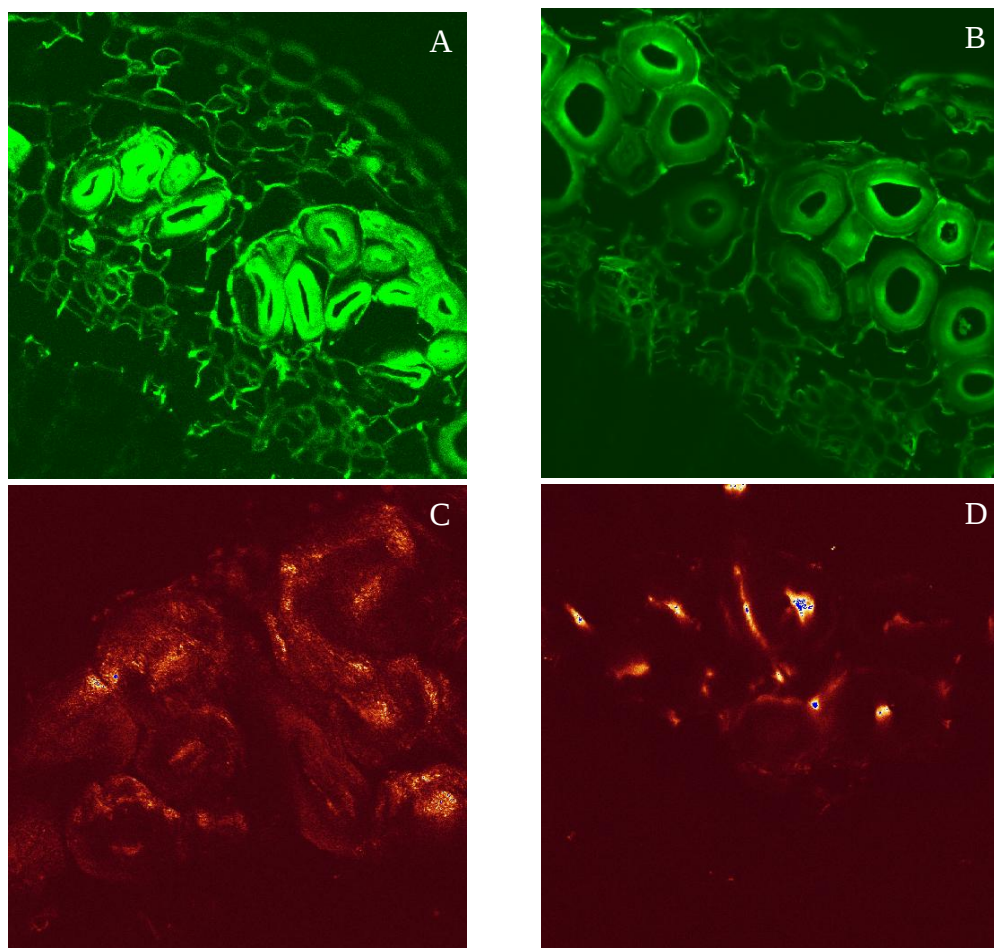


Fig. 2 : Probes distribution in bast fibers cell walls observed by confocal laser microscopy.

A : FITC-Dextran 10 kDa Da in flax bast fiber at bottom part ; B : FITC-Dextran 70 kDa in flax bast fiber at bottom part ; RITC-dextran 10 kDa in flax bast fiber at bottom part ; RITC-dextran 70 kDa in flax bast fiber at bottom part.

When the large dextran was used, the probe would have hardly penetrated into the bast fibre cell walls. It is possible that the wall network of the secondary cell wall had pores whose size is relatively small, thereby allowing only the passage of small molecules, but not hampering the penetration of larger molecules. In contrast to bast fibres, observations of xylem did not show variations in fluorescence according to the molecular weight of FITC-dextran (Fig. 3 A-D).

When using RITC-dextran as a probe to label the bast fibres, the same phenomenon was observed (Fig. 2 C-D). The RITC-dextran 70 kDa did not pass at all through the wall of the fibre and apparently remained in the lumen (Fig. 2 D). In addition, the fluorescence of RITC-dextran labeled cell walls was much lower than the fluorescence displayed by cell walls labeled with FITC-dextran (Fig. 2 C-D). The fluorescence of RITC-dextran 10 kDa was noted in the lumen (Fig. 2 C) while almost no fluorescence was detected in sections that have been treated with RITC-dextran 70 kDa (Fig. 2D). This distribution may reflect some restriction in the RITC-probe diffusion, this limitation would occur in addition to the steric hindrance due to the size of the dextran. It is then possible that dextrans differ in polarity depending on the fluorochrome. Indeed, RITC is more hydrophobic than FITC and may have a weaker affinity for cellulose-rich cell walls. In the case of xylem, cell walls were similarly labeled regardless of the dextran molecular weight. The RITC is evenly distributed in these lignified cell walls (Fig. 3 C-D) supporting the hypothesis that hydrophobic probes have a weaker affinity for cellulose-rich cell walls.

Our investigation addressing the penetration of probes into the cell walls still requires further insights on the impact of polarity upon macromolecule diffusion in cell walls. However, the preliminary experiments strongly suggest that the thick secondary cell wall of the bast fibres would not allow free diffusion of molecules depending on their size and/or polarity. Polarity, conformation and the charge of the molecules should impact on the diffusion. Indeed, the FITC molecule is considered neutral while the RITC reacts strongly with the anionic structures (Von Steyern et al., 1996). With respect to the low lignin deposition in bast fibres, such a restrictive barrier could also account for the non penetration of monolignol and/or peroxidases to accomplish the final step in the biosynthesis of lignin.

In the present study, we have selected stem samples from flax harvested at flowering stage. This stage corresponds to cell wall thickening of the bast fibres, lumen is thus still large. The cell wall undergoing thickening would not allow the penetration of component larger than 10 kDa indicating that secondary walls are getting into dense network as they differentiate. To

gain a better insight on the cell wall behaviour regarding probe penetration according to the stage of differentiation, further study would consider plant samples at different developmental stages (vegetative and green caps)

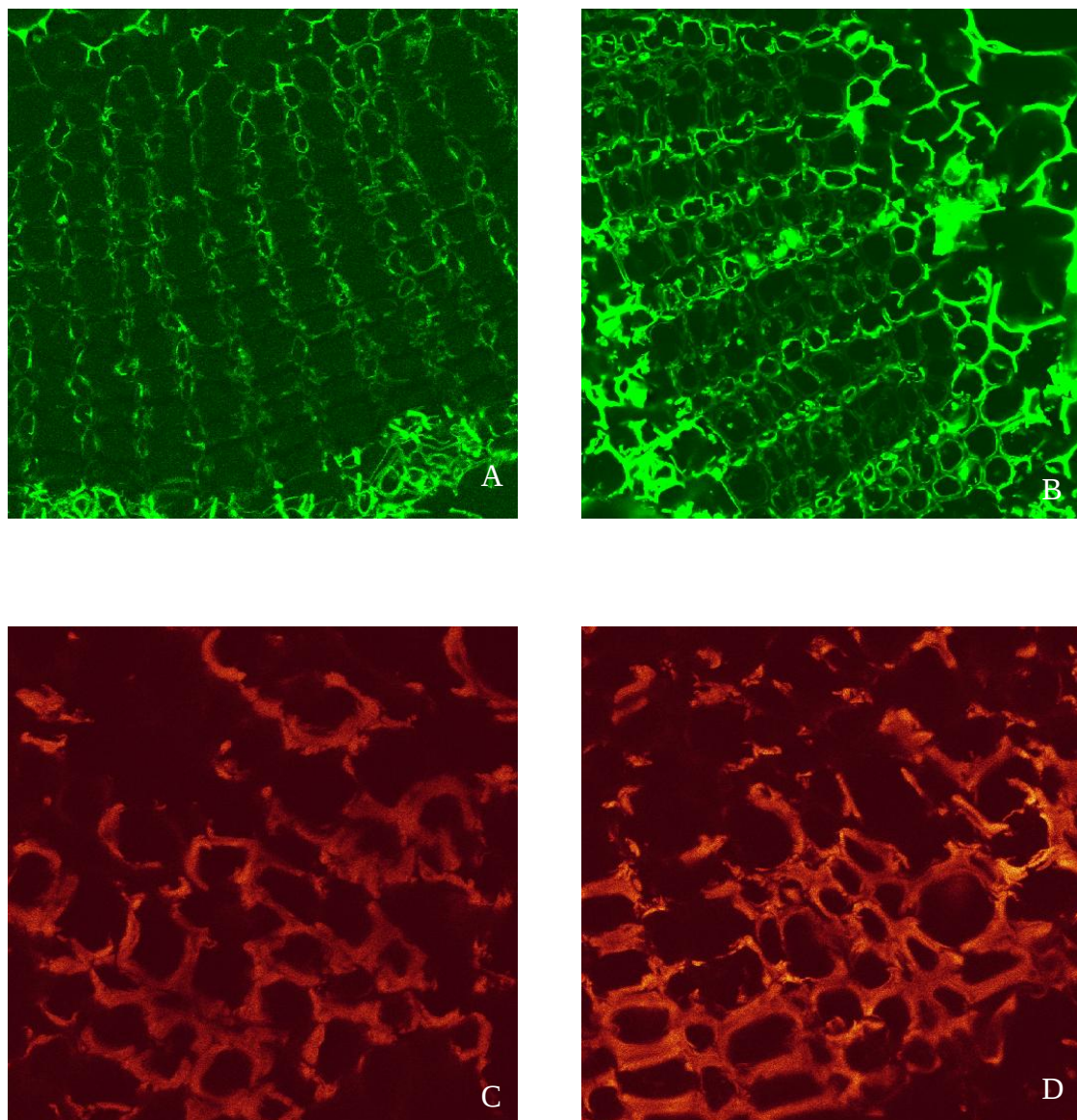


Fig. 3 : Probes distribution in xylem cell walls observed by confocal laser microscopy.

A : FITC-Dextran 10 kDa in flax xylem at bottom part ; B : FITC-Dextran 70 kDa in flax xylem at bottom part ; RITC-dextran 10 kDa in flax xylem at bottom part ; RITC-dextran 70 kDa in flax xylem at bottom part.

Reference :

- Akin D. E., Dodd R. B., Foulk J. A. (2005). Pilot plant for processing flax fiber. **Ind. Crops and Prod.** 21 : 369-378.
- Bogner A., Jouneau P. -H., Thollet G., Basset D., Gauthier C. (2007) A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging. **Micron**, 38 : 390-401.
- Bos H. L., Donald A. M. (1999) In situ ESEM study of the deformation of elementary flax fibres. **Journal of materials science**, 34 : 3029-3034.
- Clair B., Thibaut B. (2001) Shrinkage of the gelatinous layer of poplar and beech tension wood. **IAWA**, 22 (2) : 121-131.
- Clair B. (2001) Etude des propriétés mécaniques et du retrait au séchage du bois à l'échelle de la paroi cellulaire : essai de compréhension du comportement macroscopique paradoxal du bois de tension à couche gélatineuse. pp 93-98.
- Clair B., Gril J., Baba K., Thibaut B., Sugiyama J. (2005) Precautions for the structural analysis of the gelatinous layer in tension wood. **IAWA J.**, 26 : 189–195
- Crônier D., Monties B., Chabbert B. (2005) Structure and chemical composition of bast fibers isolated from developing hemp stem. **J. Agric.Food Chem.**, 53 (21) : 8279-8289.
- Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S., Chabbert B. (2005) Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers, **Planta**, 222 (2) : 234-245.
- Esau K. (1943) Vascular differentiation in the vegetative shoot of *Linum*. III. The origin of the bast fibers. **Amer. J. Bot.** 30 : 579-586.
- Fang C. H., Clair B., Gril J., Tancrede A. (2007) Transverse shrinkage in G fibers as a function of cell wall layering and growth strain. **Wood Science and Technology**, 41 (8) 659-671.
- Gorshkova T. A., Ageeva M. V., Chemikosova S. B., Salmanikov V. V. (2005) Tissues-specific processes during cell wall formation in flax fiber. **Plant Biosystems**, 139 : 88-92.
- Gorshkova T. A., Morvan C. (2006) Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres : role of galactans. **Planta** 223 : 149-158.
- Gurjanov O. P., Ibragimova N. N., Gnezdilov O. I., Gorshkova T. A. (2008) Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification. **Carbohydrates Polymers**, 72 : 719-729.

- Jähn A., Schröder M. W., Fütting M., Schenzel K., Diepenbrock W. (2002) Characterization of alkali treated flax fibres by means of FT Raman spectroscopy and environmental scanning electron microscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, 58 : 2271–2279
- Kymäläinen H. -R., Koivula M., Kuisma R., Sjöberg A. -M., Pehkonen A. (2004) Technologically indicative properties of straw fractions of flax, linseed (*Linum usitatissimum* L.) and fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). **Bioresource Technology**, 94 : 57–63.
- Mikshina P. V., Chemiksova S. B., Mokshina N. E., Ibragimova N. N., Gorshkova T. A. (2009) Free Galactose and Galactosidase Activity in the Course of Flax Fiber Development. **Russian Journal of Plant Physiology**, 56 (1) : 58–67.
- Mohr B. J., Biernacki J. J., Kurtis K. E. (2006) Microstructural and chemical effect of wet/dry cycling on pulp fiber-cement composites. **Cement and concrete research**, 36 : 1240-1251.
- Morvan C., Andème-Onzighi C., Girault R., Himmelsbach D. S., Driouich A., Akin D. E. (2003) Building flax fibres : more than one brick in the walls. **Plant Physiology and Biochemistry** 41 : 935-944.
- Pilate G., Chabbert B., Cathala B., Yoshinaga A., Leplé J. -C., Laurans F., Lapierre C., Ruel K. (2004) Lignification and tension wood. **C. R. Biologies**, 327 : 889–901.
- Roach M. J., Deyholos M. K. (2007) Micro-array analysis of flax (*Linum Usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues. **Molecular Genetics and Genomics** 278 (2) : 149-165.
- Roland J. -C., Mosiniak M., Roland D. (1995) Dynamique du positionnement de la cellulose dans les parois des fibres textiles du lin (*Linum usitatissimum*). **Acta Bot. Gallica**, 142 : 463-484.
- Salnikov V. V., Ageeva M. V., Gorshkova T. A. (2008) Homofusion of Golgi secretory vesicles in flax phloem fibers during formation of the gelatinous secondary cell wall. **Protoplasma**, 233 : 269-273.
- Von Steyern V. F., Josefsson J. -O., Tagerud S. (1996) Rhodamine B, a Fluorescent Probe for Acidic Organelles in Denervated Skeletal Muscle. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 44 (3) : 267-274.
- Washusen R, Ilic J (2001) Relationship between transverse shrinkage and tension wood from three provenances of *Eucalyptus globulus* Labill. **Holz Roh Werkst**, 59 : 85–93.
- 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*. **J. Wood Sci.**, 51 : 222–233.

Discussion générale

Conclusion/perspectives

Discussion générale

Le lin cultivé (*Linum usitatissimum* L.) regroupe deux types de variétés destinés à la production de graines ou de fibres (Millam et al., 2005). Les graines dont les huiles sont déjà utilisées dans des applications non alimentaires, sont actuellement considérées dans d'autres domaines en raison de leur richesse en vitamines et lipides de type omega (Coskuner et Karababa, 2007). Chez les variétés à fibres, les fibres périphloémiennes de la tige sont traditionnellement destinées au domaine textile. Ces fibres présentent des propriétés remarquables (finesse, résistance aux tensions et à l'usure, faible densité, isolation phonique) et suscitent un intérêt croissant pour les agrocomposites (Astley et Donald, 2003; Akin et al., 2005).

Les caractéristiques intrinsèques des fibres résultent de leur teneur élevée en cellulose (70 % de leur matière sèche) et de l'agencement des polymères non cellulosiques au sein de la matrice enrobant les microfibrilles (Girault et al., 1997). Parmi ces derniers, la lignine est déposée en très faible quantité dans les fibres extraxylémiennes (moins de 3%) par rapport au xylème (environ 25%) (Day et al., 2005). De plus, au regard d'autres espèces Angiospermes, la fraction non condensée des lignines de lin se caractérise par une proportion élevée en unités gâïacyle. Ces caractéristiques quantitatives et qualitatives sont le résultat d'un ensemble de voies biologiques coordonnées et régulées grâce à divers mécanismes agissant, entre autres, sur l'expression des gènes associés à la lignification. Ce contrôle porte ainsi sur les multiples étapes de biosynthèse des monolignols. Les facteurs de transcription, notamment MYB et LIM, forment un véritable réseau transcriptionnel, qui assure non seulement la régulation de la biosynthèse de la paroi secondaire des tissus conducteurs et de soutien, mais également celle des gènes de la voie de biosynthèse des lignines comme PtMYB4 chez le pin ou encore EgMYB2 chez l'eucalyptus (Patzlaff et al., 2003a; Goicoechea et al., 2005). Ces mécanismes pourraient effectivement intervenir dans le faible degré de lignification dans les fibres. Toutefois, le génome du lin n'est pas encore connu et cette espèce est relativement récalcitrante à la transformation, ce qui constitue un obstacle aux approches de génomique fonctionnelle à haut débit.

Au-delà de la biosynthèse des monolignols, la polymérisation des unités constitutives des lignines est potentiellement soumise à divers mécanismes de régulation pouvant contrôler/modifier la quantité et la structure du polymère. De manière générale cette dernière étape de la lignification est encore mal connue (Davin et al., 2008). Dans l'optique d'une meilleure compréhension des événements conduisant à l'hétérogénéité de lignification dans

les tissus caulinaires de lin, nous avons donc tenté de préciser différents aspects associés à la polymérisation des lignines chez cette espèce. Notre étude a porté sur trois volets principaux

- 1- Qualité de la lignine de lin et distribution des précurseurs candidats,
- 2- Nature et contribution des oxydases initiant la polymérisation oxydative de la lignine,
- 3- Distribution du peroxyde d'hydrogène, substrat des peroxydases

Dans une dernière partie de ce travail, nous avons tenté d'examiner les limitations de la lignification des fibres en lien avec l'architecture des parois secondaires de fibres.

I/ Qualité de la lignine de lin et distribution des précurseurs candidats

Nous avons poursuivi et élargi les travaux précédents soulignant la richesse des lignines de lin en unités gäiacyle et en structures condensées ainsi que leur répartition hétérogène dans les tissus caulinaires et les couches sub-pariétales (Day et al, 2005). En effet, contrairement au xylème, la lignification des fibres extraxylémiennes semble essentiellement limitée aux jonctions intercellulaires et la lamelle moyenne/paroi primaire. Toutefois, un faible dépôt de lignine a pu être mis en évidence dans l'épaisseur de la paroi secondaire. A l'instar des parois secondaires de xylème, ce dépôt correspond à des structures mixtes de type gäiacyle et syringyle (Day et al., 2005).

Par rapport à d'autres espèces dicotylédones annuelles, le xylème de la tige de lin, affiche une anatomie relativement homogène. En effet, l'observation en microscopie optique d'une coupe transversale de la tige ne permet pas de distinguer clairement les différentes cellules du xylème (rayons, fibres, vaisseaux) (Day et al., 2009). Dans une certaine mesure, l'anatomie du bois de lin rappelle l'organisation homogène du xylème chez les Gymnospermes où les éléments trachéides ont une double fonction à la fois de soutien et de conduction de la sève brute (Schwarze, 2007). Le xylème des Angiospermes présente en revanche une architecture cellulaire plus hétérogène associant aux cellules du parenchyme des cellules spécialisées, les vaisseaux et les fibres assurant conduction et soutien respectivement (Singh et Schmitt, 2000; Peter et Neale, 2004). Le bois de lin est relativement homogène, il présente une majorité de fibres trachéides et de vaisseaux vasicentriques, le lin serait alors une Angiosperme primitive ayant une majorité de caractéristiques provenant des Gymnospermes.

Chez les Gymnospermes, les lignines sont principalement composées d'unités G (éléments trachéides du xylème) associées à une faible proportion d'unités H. Les lignines d'Angiospermes sont constituées d'un mélange d'unités G (principalement dans les vaisseaux conducteurs) et S (fibres xylémiennes) en proportions variables (Ralph et al., 2004a). Chez les graminées, les lignines sont encore plus complexes, en raison de leur estérification par l'acide

p-coumarique (Ralph et al., 2004b). Les lignines montrent une complexité chimique croissante au cours de l'évolution des plantes, depuis les Ptéridophytes et Gymnospermes (épicéa, pin...) jusqu'aux Angiospermes (dicotylédones) et aux graminées (céréales) (Gomez-Ros et al., 2007). La relative abondance en unités G telle que rencontrée chez le lin est peu courante chez les dicotylédones ligneuses ou herbacées (Lapierre, 1993; Baucher et al., 1998). En effet, chez les feuillus tels le peuplier, le ratio S/G varie entre 1.8 et 2.3 (Davidson et al., 2006), chez les espèces herbacées, comme le chanvre le rapport S/G est proche de 0.8 (Lora, 2002; Crônier et al., 2005). De plus la teneur en lignine proche de 25% dans le bois de lin semble se positionner à un niveau intermédiaire entre les valeurs décrites chez les Gymnospermes (30% en poids de matière sèche) et les Angiospermes (20%) (Peter et Neale, 2004). Les similitudes entre les Gymnospermes et le lin en termes d'anatomie du bois et de quantité/qualité de la lignine ont motivé l'isolement de lignine de lin (xylème) en vue de sa caractérisation fine. La nature et la proportion des liaisons condensées, déterminées par thioacidolyse traduisent une signature relativement proche de celle obtenue pour une lignine de type conifère. En effet, la lignine de lin est très riche en unités G (90%), tout comme chez les conifères. Dans les bois d'Angiospermes la distribution en unités G varie de 14 à 66%. Les unités S représentent moins de 10% chez le lin alors que chez les Angiospermes « typiques/classiques » les valeurs varient entre 44 et 86%. De plus, la proportion de structures non condensées représente environ 25% de la lignine alors que pour les Angiospermes feuillus cette proportion atteint 50-60% du polymère (Lapierre et al., 1995). La mise en évidence par immunomarquage de motifs condensés typiques des Gymnospermes : la dibenzodioxocine renforce la similitude structurale apparente entre les lignines de lin et de conifères. La dibenzodioxocine est retrouvée dans les parois du xylème ainsi que dans tout l'épaississement des fibres périphloëmiennes. L'immunolocalisation montre une forte représentation de ces motifs dans les fibres extraxylémiennes, ce qui est en accord avec les résultats biochimiques et immunocytochimiques obtenus précédemment sur le dépôt de lignine dans ces cellules (Day et al., 2005). Ces travaux ont ainsi décrit un marquage de lignine de type gäiacyle dans la couche S1 des fibres ainsi que dans la lamelle moyenne, et en plus faible quantité dans la S2. La lignine de type GS est également détectée dans l'épaisseur de la paroi S2.

Les données chimiques et les observations immunocytochimiques tendent à renforcer le rapprochement entre les lignines de lin et des Gymnospermes.

Différents travaux ont suggéré que la coniférine serait le précurseur potentiel des unités gäiacyle chez les conifères. Les monolignols, composés toxiques pour la cellule, sont synthétisés dans le compartiment intracellulaire et doivent être conduits jusqu'à la paroi cellulaire (Boerjan et al., 2003; Marjamaa et al., 2007). Les dérivés glycosylés tels que la coniférine et la syringine seraient une alternative de transport des monolignols vers leur site de polymérisation sous une forme compatible avec le métabolisme cellulaire. Ainsi, l'incorporation de coniférine radiomarquée conduit à un marquage des lignines de xylème (Terashima et al., 1986). De plus, la coniférine principalement détectée chez les Gymnospermes, a été également signalée chez quelques Angiospermes primitives comme le magnolia (Tsuji et Fukushima, 2004).

Considérant la coniférine comme un précurseur candidat des lignines de lin, nous avons tenté d'examiner la distribution de ce composé à l'échelle ultrastructurale au moyen d'un anticorps dirigé contre la coniférine. En présence de cet anticorps, le xylème de lin n'a montré qu'un très faible marquage dans les parois de xylème jeune et le cambium. Aucune réaction n'a été décelée dans le compartiment intracellulaire. En revanche aucun marquage n'est observé dans les fibres périphloëmiennes. En dépit d'une lignification importante du xylème (25%) majoritairement de type G, un très faible marquage est retrouvé. Ceci peut être lié à la difficulté à maintenir les cellules dans leur intégrité originelle du fait de la préparation des échantillons en vue de l'observation en microscopie. Toutefois, nous avons essayé de nous affranchir des interférences inhérentes à la préparation des spécimens en retenant une méthode de fixation ultra rapide, la cryofixation sous haute pression et une post fixation à l'osmium. L'osmium, en assurant une meilleure préservation des membranes permettrait de restreindre la perte des composés cytosolubles. Au-delà des possibles limitations liées à la préparation des spécimens pour l'immunomarquage de la coniférine, d'autres événements peuvent expliquer la faible proportion de marquage observée dans les cellules du bois. En effet, la synthèse et la métabolisation de la coniférine par les β -glucosidases pariétales seraient fortement régulées selon les besoins de la cellule (Tsuji et al., 2006).

L'absence de détection de la coniférine dans les fibres de lin pourrait être associée à un transport réduit du précurseur jusqu'aux fibres. Ces dernières années, différents modes de transport ont été suggérés sans qu'aucun d'eux ne soit toutefois réellement validé. Les mécanismes proposés incluent l'exocytose, récemment contesté par Kaneda et al., 2008, la participation de transporteurs ABC supposant un transport actif (Ehlting et al., 2005), ou encore les phénomènes de diffusion passive à travers la membrane plasmique par interaction hydrophobe-hydrophile (Boija et Johansson, 2006). Les modes de transport par exocytose ou

diffusion passive paraissent compromis face à la structure hautement cristalline de la fibre de lin. La cellulose très majoritaire dans les fibres extraxylémiennes de lin pourrait être un frein aux différents phénomènes de transport quels qu'ils soient. Il est possible également que d'autres précurseurs, la syringine par exemple, puissent être impliqués préférentiellement dans les fibres.

L'hypolignification des fibres extraxylémiennes peut être également le résultat d'un défaut de polymérisation des monolignols au sein de la cellule. L'aptitude des cellules de tige de lin à oxyder les monolignols a été examinée par l'étude des activités oxydantes extraites de ces tissus et la distribution de l'eau oxygénée.

II/Oxydases de la polymérisation oxydative

Les dernières étapes de la biosynthèse de la lignine demeurent encore mal connues (Davin et al., 2008). Différentes enzymes sont susceptibles de catalyser l'oxydation des monolignols en radicaux phenoxyl. Nous avons appréhendé l'activité de ces enzymes, en particulier les peroxydases et les laccases, dans les tissus caulinaires de lin au stade floraison. Mc Dougall avait effectivement détecté la présence de plusieurs isoformes de peroxydases dans les tissus riches en fibres (Mc Dougall, 1991 ; 1992 ; 1993). Mc Dougall a montré une évolution des PODs en fonction du stade de croissance des fibres, l'activité maximale intervenant dans les fibres de lin entre la semaine 7 et 9 de culture (stade floraison) (Mc Dougall, 1992). Il a également précisé que l'activité des peroxydases dans les fibres de lin était corrélée avec la lignification. En accord avec ces travaux, les tests histologiques de coupes de tige de lin et les activités mesurées dans les fractions de protéines pariétales n'ont pas révélé une activité de type laccase dans les tissus externes et internes de la tige de lin au stade floraison. En revanche, une activité de type peroxydase a été détectée dans le xylème quelque soit le niveau de tige observé, soit dans l'intégralité des cellules au niveau du snap-point, soit dans les premières assises proche cambium en bas de tige. Par contre, l'activité peroxydase n'est détectée dans les fibres qu'en bas de tige et non au niveau du snap-point, région de la tige où l'épaississement des fibres est amorcé.

En plus de cette hétérogénéité spatiale, plusieurs différences ont été mises en évidence en ce qui concerne les isoformes des peroxydases pariétales en fonction de la nature du tissu (xylème et tissus extraxylémiens, riches en fibres). Premièrement, le nombre d'isoformes est plus important dans le bois que dans les fibres externes. Ce nombre apparaît cependant restreint au vu de la multigénicité des peroxydases dans les génomes séquencés d'*Arabidopsis*

thaliana, du riz ou bien encore du peuplier même si ces valeurs correspondent à l'ensemble des peroxydases (solubles et pariétales). La taille des peroxydases est également plus hétérogène dans le xylème par rapport aux fibres périphloëmiennes, suggérant que les peroxydases xylémiennes seraient diversement glycosylées. Les peroxydases anioniques sont généralement de haut poids moléculaires et glycolysées (Koutaniemi et al., 2005; Christensen et al., 1998). Nos résultats sur la taille des protéines sont en accord avec la valeur des points isoélectriques déterminés par électrophorèse. Dans le xylème, les peroxydases de haut poids moléculaire pourraient correspondre aux isoenzymes anioniques. Le fort potentiel des peroxydases des parois extraxylémiennes à oxyder l'alcool sinapylique est en accord avec la prédominance des formes cationiques, dont le rôle serait préférentiellement associé à l'oxydation des unités S (Ros-barcelo et Pomar, 2001; Sasaki et al., 2004). La détermination des activités pariétales du xylème suggère que le potentiel en peroxydases de ce tissu serait plutôt dédié à l'alcool coniférylique contrairement aux POD des tissus riches en fibres. Les très faibles rendements en peroxydases extraites à partir des tissus de lin se sont avérés trop limitant pour approfondir le rôle de ces enzymes dans la polymérisation via la synthèse *in vitro* de lignines modèles (DHP). Cependant, une étude préliminaire a permis de montrer que l'extrait peroxydasique des fibres extraxylémiennes conduit à un DHP dont le spectre infrarouge est très similaire à une lignine synthétique obtenu *in vitro* en présence de peroxydase de raifort commerciale. Ce résultat, en accord avec les travaux de Mc Dougall, suggèrent que les tissus riches en fibres faiblement lignifiées, dispose potentiellement des enzymes participant à la polymérisation des monolignols. Mc Dougall avait par ailleurs réalisé une distinction dans l'isolation des peroxydases pariétales, les ioniquement liées à la paroi et les peroxydases liées de manière covalente (Mc Dougall, 1992). Dans nos expérimentations, ces deux types de peroxydases ont été poolées afin d'avoir des quantités suffisantes pour mener à bien les tests d'activités. Par contre, contrairement aux travaux précédents, nous avons montré pour la première fois chez le lin que les PODs des tissus caulinaires externes sont non seulement capables d'oxyder l'alcool coniférylique mais seraient également particulièrement active sur l'alcool sinapylique. Ce résultat est à mettre en perspective avec des études menées sur le bois de tension. Chez de nombreux feuillus, le bois formé en réponse à un stress mécanique différencie des fibres gélatineuses comportant une couche pariétale supplémentaire dont l'architecture rappelle celle des fibres de lin. Les peroxydases pariétales de bois de tension catalysent préférentiellement l'oxydation des unités syringyle (Aoyama et al., 2001 ; Tsutsumi et al., 1998)

La proportion en unité S n'est que faiblement augmentée dans le bois de tension, néanmoins l'immunomarquage de lignines mixtes GS a été mise en évidence dans l'épaississement de la couche G (Pilate et al., 2004 ; Joseleau et al., 2004)

Cette situation est proche de celle rencontrée dans les fibres de lin dont le ratio S/G est légèrement supérieur à celui du bois (Day et al., 2005). Ces parois présentent également une réaction positive avec les anticorps dirigés contre les structures GS (Day et al., 2005). Aucune étude à ce jour ne permet cependant de dégager l'importance des isoenzymes et/ou leur possible coordination dans le degré de lignification des parois. L'intervention préférentielle de peroxydases anioniques, actives sur les unités G, dans le xylème de lin indiquerait que ces PODs anioniques sont nécessaires pour une lignification intense des parois. Les peroxydases cationiques ne seraient pas alors strictement obligatoires mais seraient préférentiellement associées à la lignification des cellules participant aux fonctions de soutien.

III/ Distribution du peroxyde d'hydrogène, substrat des peroxydases

Compte tenu de la mise en évidence d'activités peroxydases pariétales dans les tissus caulinaires de lin, nous avons orienté nos travaux sur la disponibilité *in situ* en eau oxygénée en privilégiant une approche ultrastructurale. La détection de l'eau oxygénée en microscopie électronique permet d'examiner la distribution locale de l'eau oxygénée via le chlorure de cérium dont les précipités sont clairement identifiés à l'aide d'une sonde à rayons X. La répartition de l'eau oxygénée, révélée par les précipités de cérium est différente à plusieurs niveaux. Tout d'abord une hétérogénéité tissulaire est clairement observée. L'eau oxygénée est toujours présente dans les cellules du xylème alors qu'elle semble plus limitée dans les fibres externes. Au sein du xylème, la distribution de l' H_2O_2 varie selon le stade de différenciation depuis la région du snap-point vers la partie basale. Les marquages les plus faibles sont détectés dans la portion basale de la tige par rapport au snap-point et la partie médiane. Au stade floraison, la lignification du xylème étant presque achevée en bas de tige, les cellules nécessiteraient moins de H_2O_2 et réguleraient la production d' H_2O_2 . Ceci peut également être mis en perspective avec le fait que les peroxydases sont essentiellement détectées dans les cellules à proximité du cambium à ce niveau de tige. En revanche, dans la partie médiane de la tige, le dépôt intense de H_2O_2 indique que la lignification se poursuit encore dans le xylème.

Au niveau des fibres périphloëmiennes, les peroxydases (mises en évidence avec la syringaldazine) ne sont détectées que dans la partie basale de la tige. Les observations au

niveau ultrastructural indiquent que l' H_2O_2 est présent dans les fibres extra xylémiennes dont l'épaisseur de la paroi cellulaire atteint 3 et 7 μm c'est-à-dire pendant leur épaissement. Le faible degré de lignification des fibres de lin pourrait résulter d'une disponibilité limitée en peroxyde d'hydrogène et en peroxydases. En particulier la distribution spatiale de ces deux acteurs de la polymérisation des monolignols suggère une absence de coordination : au niveau des fibres les peroxydases sont mises en évidence dans les tissus jeunes (localisés au niveau du snap-point) où le peroxyde d'hydrogène n'est pas décelé. Dans les tissus jeunes l'activité POD mise en évidence dans les fibres pourrait correspondre à une activité associée à la réticulation des parois permettant l'association covalente de protéines structurales présentes dans les fibres de lin (Burel et al., 1994)

Les études basées sur l'application d'un régulateur de croissance, l'éthrel, précurseur de l'éthylène, ont souligné des différences majeures entre les cellules xylème/ fibres dans leur adaptation aux modifications de l'environnement. Le nombre d'assises de cellules du bois a été considérablement augmenté ainsi que l'eau oxygénée. Par contre aucune modification n'a été observée chez les fibres, ni dans leur nombre, ni dans la présence de peroxyde d'hydrogène. Ce comportement distinct des fibres suggère que ces cellules présentent une plasticité fonctionnelle très réduite ou que l'éthylène ne soit pas un acteur majeur dans la mise en place des fibres externes de lin.

IV/Limitations architecturales à la lignification des fibres

Un dernier volet susceptible de contribuer aux limitations à la lignification des fibres externes a été abordé en prenant en considération une limitation physicochimique reposant sur la nature du réseau pariétal. En effet, la teneur en cellulose des fibres externes est environ deux fois supérieure à celle des parois du xylème. A la différence des fibres du xylème, les microfibrilles sont déposées de manière quasi parallèle à l'axe des cellules, et la cellulose a un indice de cristallinité élevé. Nous avons examiné le comportement de ces fibres au séchage en ESEM (microscopie électronique à effet environnemental). Contrairement aux couches gélatineuses du bois de tension chez des espèces comme le peuplier, la fibre ne présente pas de retrait transversal majeur même en fin de séchage. Le qualificatif « gélatineux » utilisé par d'autres auteurs à propos des fibres longues cellulosiques n'est peut être alors pas approprié aux fibres de lin. Ceci pourrait refléter le fait que les fibres de lin possèderaient une quantité d'eau initiale dans les cellules plus faibles que celles du bois de tension. Au vu de ces observations, une étude préliminaire sur la pénétration de sondes fluorescentes dans les parois de fibres externes a été menée. L'utilisation de sondes de taille variable suggère un effet

barrière lié à la porosité (encombrement stérique) et la polarité des parois secondaires. La richesse en cellulose et sa forte cristallinité dans les fibres pourraient expliquer cet effet barrière que l'on ne retrouve pas dans les cellules du bois. Il n'y aurait un impact quand à la taille des dextranes et la qualité du fluorochrome qui est associé.

Ces expérimentations ont été réalisées sur du lin au stade floraison quand l'épaississement est amorcé : les observations suggèrent un dépôt de parois secondaire dont le réseau est très vite « verrouillé » et n'autorise plus la diffusion de protéines ou de molécules apolaires.

Conclusion-Perspectives.

Dans ces travaux de thèse, nous avons axé notre étude sur la polymérisation de ces monolignols, étape ultime de la biosynthèse des lignines.

L'ensemble des données obtenues par des approches chimiques, immunocytochimiques et histologiques soulignent un parallèle entre le lin et les conifères au niveau de la structure des lignines ainsi que de l'anatomie du xylème. Un approfondissement de ces investigations, notamment par l'analyse en RMN des lignines isolées de lin permettrait de valider ces conclusions à l'ensemble du polymère, les dégradations chimiques retenues dans notre étude renseignent seulement 25% environ des lignines de lin. L'anticorps reconnaissant des structures de type conifères pourrait voir son application élargi à d'autres espèces herbacées et d'autres types parois secondaires peu lignifiées comme les fibres de chanvre ou les couches gélatineuses du bois de tension (peuplier) dont l'architecture cristalline rappelle les parois secondaires des fibres lin. Un prolongement de ces observations à l'échelle ultrastructurale permettrait de compléter nos connaissances en matière d'hétérogénéité spatiale de la lignification (lamelle moyenne/paroi primaire/sous-couches de la paroi secondaire)

Compte tenu de la prédominance des unités gaïacyle dans les lignines de lin, la coniférine peut être perçue comme un précurseur potentiel de ces unités. La coniférine est détectée en faibles proportions dans les cellules du xylème de lin, contrairement aux fibres extraxylémiennes. Ceci est cohérent avec la différence de lignification observée entre ces deux tissus. L'anticorps de coniférine présente toute fois une spécificité qui pourrait être améliorée. La coniférine étant un composé soluble, d'autres méthodes moins invasives peuvent être envisagées. La spectroscopie Raman permettrait d'observer l'échantillon brut, sans préparation.

Par ailleurs, des études de coniférine marquée permettraient de conforter les résultats d'immunomarquage et potentiellement de visualiser le mode de transport utilisé (exocytose, diffusion). Des membranes modèles pourraient également être testées pour suivre les modes de passages au travers de la bicouche lipidique. De même, des essais de lignification « artificielle » des fibres celluloseux couplées à des approches microscopiques et physicochimiques apporteraient des éléments de compréhension sur les phénomènes de diffusion/migration des précurseurs dans l'épaisseur de la paroi. Une telle stratégie, déjà mise en œuvre au laboratoire s'était heurtée à l'insolubilité de l'alcool coniférylique en milieu aqueux, le choix de la coniférine permettrait de s'affranchir de cette limitation. Le mode de stockage de la coniférine. Enfin, l'utilisation de la forme glucoside du coniféraldéhyde

radiomarké nous permettrait de vérifier si l'hypothèse d'une conversion rapide de la coniférine en glucoside pour un meilleur stockage est une option réaliste chez le lin. Afin de vérifier la participation d'autres précurseurs tels que la syringine d'autres approches pourraient être envisagées non seulement au niveau ultrastructural par la mise en œuvre de sondes reconnaissant ces précurseurs potentiels mais aussi au niveau chimique par une analyse approfondie des composés du métabolisme phénolique. Un élargissement des premières analyses du profil en oligolignols des tissus de lin à d'autres stades de maturation des tissus et/ou des conditions environnementales apporterait des éléments complémentaires sur le comportement distinct des fibres et du xylème, et sur l'origine des précurseurs dédiés à une lignification de type G. De plus la CCoAOMT de lin (3' et 5' méthylation) est atypique et présente des différences éventuelles au niveau des enzymes F5H, C-OMT (Day et al., 2009). Un lien entre ces activités enzymatiques et la composition/structure atypique de la lignine de lin pourrait être envisagé.

D'autres points de blocages sont possibles au cours de la polymérisation. Nous nous sommes alors intéressés aux peroxydases liées à la paroi et à leur catalyseur l'eau oxygénée. Du fait de la variation des peroxydases selon la nature des tissus (fibres/xylème) et leur degré de différenciation le long de la tige, nous avons choisi d'examiner la distribution de H_2O_2 en fonction du type cellulaire au cours de la maturation. L'eau oxygénée tout comme les peroxydases semblent être très limitée dans les fibres libériennes par rapport au xylème. Ces deux éléments essentiels et nécessaires de la polymérisation de la lignine ne semblent pas être disponibles simultanément. La disponibilité et la quantité en H_2O_2 apparaissent limitées aux fibres dont les parois sont en cours d'épaississement (stade médian de la tige) alors que les peroxydases ne sont détectées qu'en bas de tige. La localisation d'une activité peroxydase et de l'eau oxygénée montre une meilleure coordination dans le bois que dans les fibres périphloëmiennes. Ces deux acteurs de la polymérisation sont conjointement détectés dans les tissus jeunes en cours de lignification ie dans les premières assises proche cambium et au niveau médian de la tige. Afin de compléter et confirmer ces données, la localisation peroxydases par immunomarquage devra être envisagée, cette approche nécessitant de disposer des peroxydases associées à la lignification du lin.

Une première démarche consisterait à purifier les différentes isoenzymes mises en évidence dans cette étude afin de préciser plus finement leur rôle dans l'oxydation des deux alcools coniférylique et sinapylique. En effet, le pool des peroxydases pariétales issues des tissus riches en fibres montrent un fort potentiel à oxyder les deux alcools, alors que le potentiel peroxydasique des parois du xylème est moins élevé pour l'alcool sinapylique. Les

peroxydases pariétales des fibres externes possèdent donc un potentiel plus important à oxyder les S dans les tissus riches en fibres. De manière générale les lignines de la paroi secondaire des fibres comportent des structures enrichies en unités syringyle. Les peroxydases associées à la polymérisation des lignines contenant des unités S seraient moins déterminantes du taux final de lignine que les peroxydases dédiées aux unités G. Ainsi chez des espèces dont la lignine est très riche en unité G, comme le lin, les tissus comportant des peroxydases actives sur ces unités S ne parviendraient pas à être autant lignifiées, expliquant ainsi le faible taux de lignification dans les fibres périphloëmiennes de lin. L'isolement de lignines à partir de fibres montre néanmoins que le caractère G condensé reste très marqué dans des cellules (Day et al., 2005).

L'isolement des différentes isoformes couplé à une digestion par la trypsine et une approche de séquençage apporterait de plus amples informations sur la structure de ces protéines (séquence en acides aminés, degré de glycosylation). De telles études sont envisagées au laboratoire dans la continuité directe de cette étude afin d'analyser les séquences de ces protéines au regard des données disponibles dans la banque de PEROXIBASE (Passardi et al., 2007) et des séquences d'ADN identifiées au laboratoire par l'analyse d'ESTs des tissus externes de la tige de lin (Day et al, 2005). L'obtention de puces à ADN du lin devrait également contribuer à mieux comprendre les modes d'expression de gènes correspondants au cours du développement du lin (Roach et Deyholos, 2007 ; travaux du laboratoire en cours). Ces approches moléculaires contribueraient à clarifier le rôle des peroxydases pariétales identifiées avec la lignification en complément de leur caractérisation biochimiques. Des travaux sur la régulation transcriptionnelle des « gènes lignines » (= disponibilité de monolignols), ainsi que sur l'expression de gènes codant les enzymes responsables de la production de l'eau oxygénée (NADPH oxygénase, GLPs) peuvent être envisagés. Disposant de ces informations, la production de protéine recombinante pourra être envisagée, ce qui devrait permettre de disposer de quantités suffisantes en protéines enzymatiques pour conduire une approche modèle de polymérisation *in vitro* des monolignols. Ces synthèses pourraient être engagées avec de l'alcool coniférylique mais il serait intéressant de le faire avec de la dibenzodioxocine de synthèse mais également avec un mélange GS pour les isoformes anioniques des fibres et du bois et avec du S seul pour les isoformes des fibres montrant une bonne réactivité vis-à-vis de cet alcool.

Enfin, l'étude des modes de transport aussi bien des monolignols que de l'eau oxygénée est à entreprendre.

Les études réalisées en utilisant l'éthrel, un régulateur de croissance utilisé contre le phénomène de verse chez les céréales et plantes à fibres mais également pour accélérer le murissement des fruits a montré des différences entre les cellules xylème/ fibres dans leur adaptation aux modifications de l'environnement. L'éthrel est un agent de libération de l'éthylène, qui est un facteur de croissance généralement associés aux phénomènes de maturation des tissus végétaux (Sañudo-Barajas et al., 2009). D'autres hormones pourraient être testées sur les tissus du lin notamment l'acide abscissique (ABA) qui jouerait un rôle dans la régulation de la synthèse d'éthylène et l'activité de la PAL (Jiang et Joyce, 2003) point d'entrée de la voie de biosynthèse de la lignine.

L'utilisation d'un précurseur de l'éthylène n'a eu aucun impact sur le degré de lignification des fibres contrairement au xylème ce qui suggère un niveau de contrôle assez élevé. Des études pourraient être menées sur d'autres espèces à fibres extraxylémiennes peu lignifiées comme le chanvre. L'étude du rôle des facteurs de régulation sur le niveau d'expression des gènes de lignification chez le lin est donc une étape déterminante afin de préciser l'éventualité de mécanismes distincts de contrôle de la lignification dans les fibres phloémiennes. A cet égard, ces mécanismes pourraient être abordés en lien avec les types de différenciation associés aux tissus secondaires (xylème produit par le cambium) et primaires (fibres périphloémiennes issus du pro cambium)

Par ailleurs, des études en ESEM sur les fibres de chanvre pourraient nous permettre d'évaluer son comportement au séchage, et voir si la fibre du chanvre se rétracte de la même manière que la couche gélatineuse du bois de tension. De plus des essais à saturation d'eau dans les fibres de lin puis séchage complèteraient notre vision.

Contrairement à beaucoup d'études menées sur la dernière étape de la lignification, ce travail a tenté de prendre compte les trois acteurs majeures de la polymérisation. Certains aspects méritent des approfondissements envisageables à court terme compte tenu des méthodologies à notre disposition (ex localisation et caractéristiques des isoenzymes de peroxydases) Néanmoins d'autres questions supposent des études à plus long terme (nature et transport des précurseurs, niveaux de régulation) pour véritablement cerner les phénomènes régissant l'hétérogénéité de lignification entre les fibres et le bois chez le lin.

Annexe



Research article

Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem

Arnaud Day^{a,b}, Godfrey Neutelings^a, Frédérique Nolin^{a,b}, Sébastien Grec^a, Anouk Habrant^b, David Crônier^b, Bouchra Maher^c, Christian Rolando^c, Hélène David^a, Brigitte Chabbert^b, Simon Hawkins^{a,*}

^a UMR 1281 Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux, INRA, Université Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b INRA Parois Végétales et Matériaux Fibreux, UMR FARE, BP 224, 51686 Reims, France

^c Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire, UPRES SA CNRS 8009, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2008

Available online 9 October 2008

Keywords:

CCoAOMT

Cell wall

Flax

Irregular xylem

Lignin

Monolignol

ABSTRACT

Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) down-regulated-flax (*Linum usitatissimum*) plants were generated using an antisense strategy and functionally characterized. Chemical analyses (acetyl bromide and thioacidolysis) revealed that the lignin quantity was reduced and that the Syringyl/Guaiacyl (S/G) lignin monomer ratio was modified in the non-condensed lignin fraction of two independent down-regulated lines. These modifications were associated with altered xylem organization (both lines), reduced cell-wall thickness (one line) and the appearance of an irregular xylem (irx) phenotype (both lines). In addition UV microspectroscopy also indicated that CCoAOMT down-regulation induced changes in xylem cell-wall structure and the lignin fractions. Microscopic examination also suggested that CCoAOMT down-regulation could influence individual xylem cell size and identity. As a first step towards investigating the cellular mechanisms responsible for the unusual structure of flax lignin (G-rich, condensed), recombinant flax CCoAOMT protein was produced and its affinity for different potential substrates evaluated. Results indicated that the preferred substrate was caffeoyl coenzyme A, followed by 5-hydroxyconiferaldehyde suggesting that flax CCoAOMT possesses a small, but probably significant 5' methylating activity, in addition to a more usual 3' methylating activity.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Flax (*Linum usitatissimum*) plants are a source of high-quality fibers (bast fibers) that are used mainly in the textile industry, but also increasingly in the fabrication of bio-materials [1]. The interesting mechanical properties (high tensile strength, weak elasticity, wear-resistance) of these bast fibers, located in the stem outer tissues between the epidermis and the xylem, depend upon the structure and chemical composition of their cell walls. The fiber cell wall is rich in cellulose, but also contains pectins, hemicelluloses, proteins [2] and low amounts of lignin [3].

Lignins are formed by the oxidative polymerization of three different types of hydroxycinnamyl alcohols (monolignols) which

differ in the degree of aromatic ring methoxylation (i: *para*-coumaryl alcohol, no methoxyl group; ii: coniferyl alcohol, one methoxyl group in position 3 and iii: sinapyl alcohol, two methoxyl groups in positions 3 and 5). These three monolignols give rise to, respectively, H-units (hydroxyphenyl), G-units (guaiacyl) and S-units (syringyl) in the lignin polymer [4].

Although present in low amounts, lignin has a negative effect on flax elementary fiber separation and quality. Our previous results [3] showed that flax lignin (in both xylem and bast fibers) differs from that usually found in Angiosperms. For example, flax β -O-4 linked lignin is extremely rich in lignin G-units (S/G = approximately 0.2) as compared to *Arabidopsis* lignin (S/G = 0.5, [5]), tobacco lignin (S/G = 1, [6]) or poplar lignin (S/G = 1.7, [7]). In addition, our results indicated that flax bast fiber lignin contained a high proportion ($\leq 25\%$) of lignin H-units and was much more condensed (273 $\mu\text{mol/g}$ lignin degradation products) as compared with, for example, poplar lignin (2400 $\mu\text{mol/g}$ lignin degradation products [7]). Taken together, these results suggested that the structure of flax lignin (in both xylem and bast fibers) differed from that of other typically-studied Angiosperms, thereby suggesting that the lignification

Abbreviations: CCoAOMT, caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase; COMT, caffeic acid/5-hydroxy-ferulic 3-O-methyltransferase; CSA, cross-sectional area; CWR, cell-wall residue; F5H, ferulate 5-hydroxylase; G, guaiacyl; H, hydroxyphenyl; irx, irregular xylem; OMT, O-methyltransferase; S, syringyl.

* Corresponding author. Fax: +33 3 20 33 60 44.

E-mail address: simon.hawkins@univ-lille1.fr (S. Hawkins).

0981-9428/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.plaphy.2008.09.011

process in flax may also differ from that usually observed in other Angiosperms.

Since the chemical structure of lignin is influenced by the relative proportions of the different monolignols, the enzymatic reactions controlling monolignol methylation (and hence the formation of

different monolignols) play an important role in determining the structure of the lignin molecule. It now seems relatively well-established that monolignol methylation depends upon the activity of two different enzymes belonging to the O-methyltransferase superfamily (Fig. 1): caffeic acid/5-hydroxy-ferulic 3-,5-O-methyltransferase

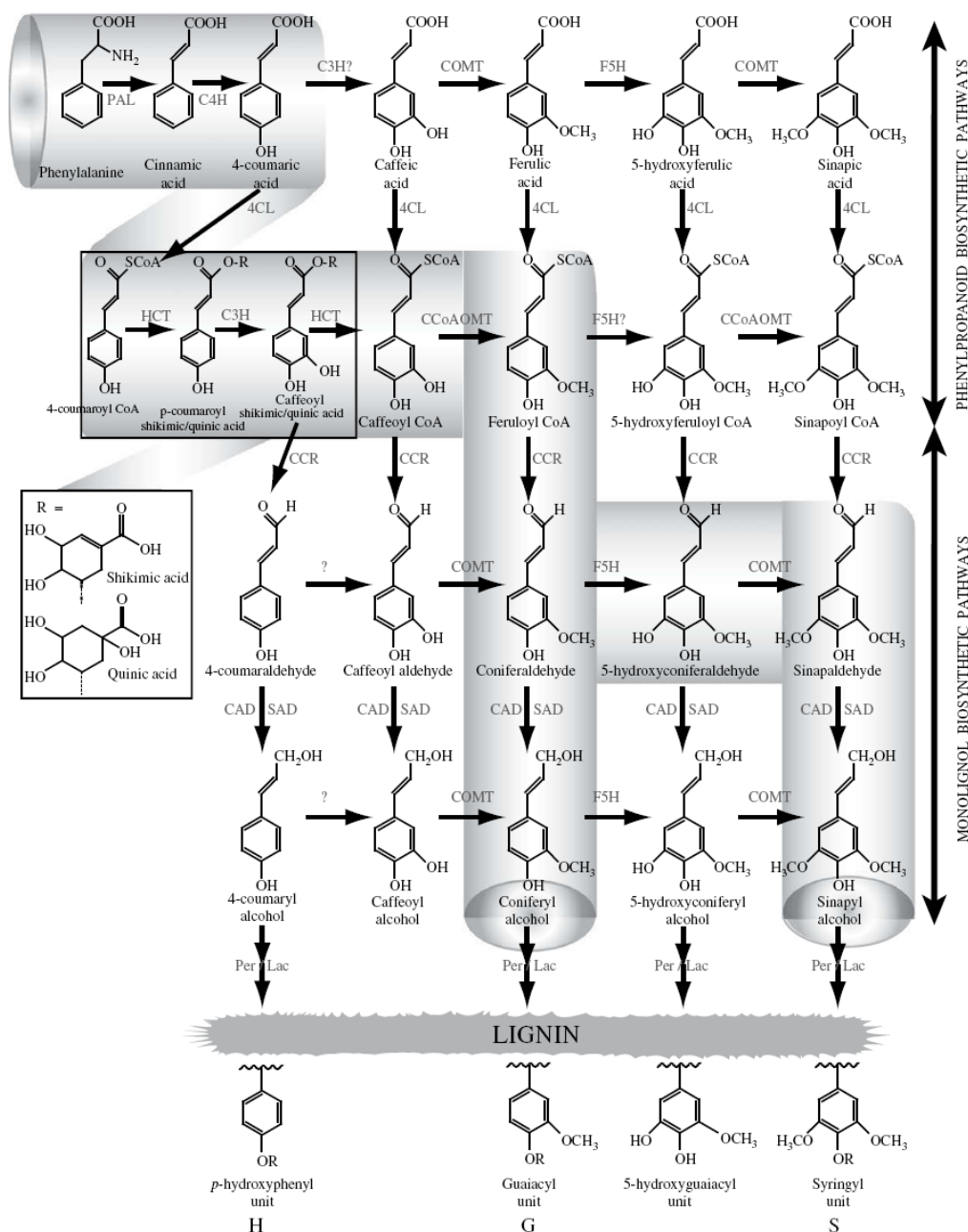


Fig. 1. Phenylpropanoid and monolignol biosynthetic pathways [15,29]. Shaded areas represent the most likely monolignol-production pathway in Angiosperms. C3H = p-coumarate 3-hydroxylase; C4H = cinnamate 4-hydroxylase; CAD = cinnamyl alcohol dehydrogenase; 4CL = 4-coumarate:CoA ligase; CCoAOMT = caffeoyl-CoA O-methyltransferase; CCR = cinnamoyl-CoA reductase; COMT = caffeic acid O-methyltransferase; HCT = p-hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid p-hydroxycinnamoyltransferase; F5H = ferulate 5-hydroxylase; Lac = laccase; PAL = phenylalanine ammonia-lyase; Per = peroxidase; SAD = sinapyl alcohol dehydrogenase; ? = conversion not convincingly demonstrated or substrate not tested.

(COMT) and ii: caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase (CCoAOMT) [8–10].

During the last decade, the use of a reverse genetics approach to under-express both the COMT and CCoAOMT gene(s) in a number of different plant species has been shown to modify both the lignin quantity and its chemical composition (S/G, proportion of condensed vs non-condensed bonds) [10–13]. These observations, together with the biochemical characterization of purified and recombinant proteins [9,14] suggest that the 3-O-methylation of caffeoyl CoA leading to the formation of feruloyl CoA is catalyzed by the enzyme CCoAOMT, while the 5-O-methylation of 5-hydroxyconiferaldehyde to sinapaldehyde is catalyzed by the enzyme COMT. According to the currently accepted model of lignin biosynthesis, feruloyl CoA is used for the formation of both G- and S-lignin units, while sinapaldehyde is used for the formation of S-units [15].

Given i: the negative effect of lignin on flax fiber quality, ii: the atypical structure of flax lignin [3] and iii: the central role of CCoAOMT in lignin precursor methoxylation, we decided to investigate the role of this enzyme in flax lignin biosynthesis. In this paper we report the isolation of a flax CCoAOMT cDNA and the effects of under-expressing this gene in flax, as well as the biochemical characterization of the flax CCoAOMT recombinant protein.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of a flax CCoAOMT cDNA

A CCoAOMT (EC 2.1.1.104) cDNA (DQ090002) was isolated from a flax outer tissue cDNA library [16] by PCR and sequenced to confirm its identity.

2.2. Flax transformation

The CCoAOMT sequence cloned into a pBlueScript vector (Stratagene) was digested with EcoRI and HindIII and subcloned between a 70S promoter and a 35S terminator in the pLBR19 plasmid. The new recombinant plasmid was digested with XbaI and KpnI and the promoter-inverted CCoAOMT sequence-terminator was cloned in the pCAMBIA1300 (CAMBIA, Australia) vector within a T-DNA containing a hygromycin resistance gene. This vector was introduced into *Agrobacterium* strain C58C1 by electroporation. Flax (*Linum usitatissimum* cv. Barbara) transgenic lines were obtained as described by Mlynarova et al. (1994) [17] with modifications of the antibiotics used for selection and *Agrobacterium* elimination. Four-day-old hypocotyls were sectioned and cocultivated with the *Agrobacterium* suspension for 2 days and placed on a medium containing 0.05 μ M ANA, 4.4 μ M BAP, 10 mg l^{-1} hygromycin and 500 mg l^{-1} timentin. Callus were isolated and cultivated on the same medium until shoot production. Shoots were then transferred to the same medium lacking growth regulators. In vitro plants were then repotted and grown in a greenhouse.

2.3. Enzyme extraction

Transgenic flax stem tissues were ground in liquid nitrogen with a pre-chilled mortar and pestle, then 0.5 g powder was homogenized and extracted (60 min, 4 °C) in 1.5 ml ice-cold extraction/activity buffer supplemented with (20% w/w) polyvinyl-pyrrolidone (PVPP) and quartz. Samples were then centrifuged (10 min, 10,000 g at 4 °C) and the supernatants filtered and used directly as a crude protein extract or stored at –80 °C. Total protein concentration was measured using the Bradford Reagent (Bio-Rad) [18].

2.4. Substrate synthesis and enzyme characterization

Caffeic acid was obtained directly from Sigma–Aldrich and the other 3 substrates tested (5-hydroxyconiferaldehyde, 5-hydroxyconiferyl alcohol and caffeoyl coenzyme A) were synthesized chemically as described below.

5-Hydroxyconiferaldehyde was synthesized from 3,4-diphenylmethylendioxy-5-methoxybenzaldehyde by sequential protection of the two vicinal phenol groups of trihydroxyethylbenzoate with dichlorodiphenylmethane followed by methylation of the third free phenol function as described previously [19]. Conversion of the aromatic ester into alcohol was achieved by using lithium aluminium hydride (LiAlH_4) and final oxidation with pyridinium dichromate terminated the synthesis of the required aldehyde in a satisfactory overall yield (75% over four steps). Then, a Wittig reaction with 1,3-dioxolan-2-yl-methyltriphenylphosphonium was performed using a biphasic liquid medium composed of a saturated aqueous solution of potassium carbonate and methylene chloride, in the presence of TDA (tris(methoxyethoxyethyl)amine). This reaction led to a Z/E mixture, with a slight excess of the Z isomer 60/40. Isomerisation into pure E isomer occurred in a second step with a catalytic amount of Br_2 in CCl_4 for 1 h at 0 °C. Acetyl group cleavage was achieved by mild acid hydrolysis (acetic acid/water 50/50), whereas deprotection of the catechol ring required more drastic conditions (acetic acid, reflux, 2 h) that provided a satisfactory yield (65%). The structure of 5-hydroxyconiferyl aldehyde was confirmed by ^1H - and ^{13}C -NMR and by high resolution mass spectrometry: NMR ^1H : (D_2O): δ = 3.76 (s, 3H, OCH_3), 6.53 (dd, 1H, J = 7.9 Hz, J = 15.5 Hz, CH), 6.80 (s, 1H, H_{arom}), 6.83 (s, 1H, H_{arom}), 7.48 (d, 1H, J = 15.6 Hz), 9.51 (d, 1H, J = 7.9 Hz, CHO). NMR ^{13}C (D_2O): δ = 22.9, 57.0, 106.3, 111.7, 126.1, 126.7, 138.4, 145.3, 149.2, 158.2, 199.4; MS (Chemical ionization, NH_3): m/z (rel. int %) = 195 (100); MS/HR (Electron ionization EI): m/z (observed. int %): 195.0653; calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$: 195.0657.

5-Hydroxyconiferyl alcohol was obtained by reduction of the protected aldehyde with NaBH_4 in methanol and THF (–10 °C, 3 h) followed by deprotection of the catechol group by mild acid hydrolysis (acetic acid/water 50/50).

Caffeoyl coenzyme A was produced by the coupling of the N-hydroxysuccinimide ester derivative of caffeic acid with coenzyme A as previously described [20]. Activated caffeic acid was added to a solution of coenzyme A in NaHCO_3 buffer and the reaction proceeded at 4 °C. The progress of the reaction was followed by mass spectrometry using ESI ionization, which confirms the formation of caffeoyl coenzyme A, characterized by a molecular peak $[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 930 amu. All chemicals used were obtained from Sigma–Aldrich (L'Isle d'Abeau, France).

CCoAOMT activities were determined essentially as previously described [21]. The reaction mix (50 μ l) contained 40 μ l activity/extraction buffer plus substrate (caffeic acid, caffeoyl coenzyme A, 5-hydroxyconiferaldehyde and 5-hydroxyconiferyl alcohol), 2.5 μ M S-adenosyl-L-(methyl- ^{14}C) methionine (2.18 GBq mmol^{-1}) (methyl- ^{14}C)-SAM and 10 μ l protein extract. Samples were incubated at 30 °C for 30 min and all reactions stopped by adding 60 μ l 1 M HCl except for the reaction leading to the formation of feruloyl CoA which was treated with 6 μ l 5 M NaOH (15 min, 40 °C), prior to acidification with 60 μ l 1 M HCl. The reaction products (ferulic acid, feruloyl coenzyme A, sinapaldehyde, sinapyl alcohol) were extracted with 1 ml acetate ethyl/hexane 1/1 (v/v) and centrifuged (5 min, 5,000 g) to separate the aqueous phase containing methyl- ^{14}C -SAM and the organic phase containing reaction product. Incorporated radioactivity was determined in a 800 μ l aliquot of the organic phase by liquid scintillation counting (Beckman LS 2800). Controls (protein extracts heated for 10 min at 100 °C) were also included for all assays. Enzyme activities were expressed in pkat mg^{-1} protein and each data point was the mean of three

separate assays. $V_{\max}$ and apparent K_m values were determined by Eadie–Hofstee plots of initial rate data [22,23].

2.5. Lignin characterization

Flax stems were ground to a fine powder in a mortar and pestle with liquid nitrogen and non-covalently-bound compounds were sequentially removed by successive extractions with 80% ethanol at room temperature. The obtained material was called Cell-Wall Residue (CWR).

CWR lignin content was estimated by a spectrophotometric procedure using the acetyl bromide method [24]. Lignin characterization was performed by thioacidolysis that disrupts the non-condensed intermonomer linkages (alkyl–aryl–ether). The reaction was performed in triplicate on 10 mg of CWR at 100 °C using tetracosane as an internal standard and ethanethiol/ $\text{BF}_3\text{etherate}$ /dioxane reagent as detailed previously [25]. After 4 h reaction, the mixture was adjusted to pH 3–4 using 0.4 M hydrogenophosphate sodium carbonate and extracted with dichloromethane. Guaiacyl (G) and syringyl (S) thioethylated monomers were analyzed as their trimethylsilyl derivatives using a gas chromatograph equipped with a fused silica capillary DB1 column (30 m $\times$ 0.3 mm) and flame ionization detector. The temperature gradient was 160–280 °C at 2 °C min⁻¹ [25]. Measurements were performed in triplicate.

2.6. Histochemical analyses

Fresh transverse sections were cut from the middle region of flax stems using a cryomicrotome (MICROM). Cytochemical staining of lignin was performed on 30 μm and 60 μm sections, respectively using the Wiesner reagent (phloroglucinol–HCl) or the Mäule reagent. Observations were made using an Axioskop microscope and AxioCam MRC digital camera (Carl Zeiss).

2.7. Microscopic analyses of flax xylem

Small transverse slices (1 mm thick) from the middle region of transgenic flax stems were fixed in a freshly prepared mixture of 0.2% glutaraldehyde (v/v), 2% para-formaldehyde (w/v) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7–7.2). After rinsing in phosphate buffer, samples were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in methyl- and butyl- (1/1, v/v) metacrylate resin (Sigma) and polymerized for 24 h at 60 °C. Both longitudinal tangential (2 μm) and transverse (1 μm) semi-thin sections were cut with a microtome (HM 360, Microm) prior to microscopic examination and measurements using AxioCam MRC digital camera and corresponding image analysis software.

2.8. UV microspectroscopy

Semi-thin transverse sections (1 μm) were obtained as previously described and placed on quartz slides, prior to resin removal with acetone for 1 h. Sections were then mounted with glycerin and covered with quartz cover-slips. UV-absorption spectra were recorded in the range of 250 to 400 nm in 2.5 nm steps for a spot diameter of 0.5 μm and a band-width of an illuminating monochromator (5 nm) using a microscopic spectrophotometer (Carl Zeiss MPM 800). UV-absorption spectra were measured at the center of the secondary walls of xylem cells. For each cell, four spectra corresponding to different areas of the periclinal secondary wall were measured and the results averaged. In addition, UV transmission microphotographs were obtained at 280 nm using transmission UV camera (Siemens).

2.9. Purification of recombinant CCoAOMT

The CCoAOMT open reading frame was excised from the pBluescript full-length cDNA clone and inserted between the BamHI and NdeI sites of the pET16b expression vector (Novagen) following introduction of the appropriate restriction sites in the CCoAOMT sequence. After sequencing to confirm the ORF, the CCoAOMT expression plasmid was transformed into *E. coli* BL21 Gold (DE3) competent cells (Stratagene) and expression was induced by the addition of IPTG according to the manufacturer's protocol.

Following bacterial lysis, recombinant enzyme was purified from the supernatant using His-bind magnetic beads (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. After a dialysis step at 4 °C against extraction/activity buffer (100 mM Tris–HCl pH 7.5, 0.2 mM MgCl_2 , 3 mM EDTA, 10% glycerol, 14 mM β -mercaptoethanol, 3 mM DTT), the poly His-tag was removed from recombinant enzyme with proteolytic Xa factor, and then removed with the proteolytic factor according to the manufacturer's protocol. Recombinant protein production and purification was controlled by SDS-PAGE and Western blot using antibodies raised against the recombinant poplar CCoAOMT protein [21]. Finally, the recombinant enzyme was stored in activity buffer at –80 °C until further use.

3. Results

3.1. Characterization of a flax CCoAOMT cDNA

The full-length CCoAOMT cDNA (DQ090002) isolated from a flax outer-stem tissue cDNA library [16] contained 741 nucleotides and encoded a protein of 246 amino acids (Fig. 2A). Analyses of the translated sequence indicated that the protein possessed a theoretical molecular mass of 27.9 kDa with a pI of 5.3. Dicotyledon CCoAOMTs can be divided into 2 groups (Fig. 2A, B) on the basis of their protein sequences. Comparison of the flax CCoAOMT sequence indicated that it was most strongly related to the first group (72.8% identity) containing *Zinnia elegans*, parsley, tobacco and alfalfa, poplar and the AtCCoAOMT protein from *Arabidopsis*. The flax CCoAOMT showed less similarity (43.5%) to the second group containing aspen and the AtCCoAOMT-3 protein from *Arabidopsis*.

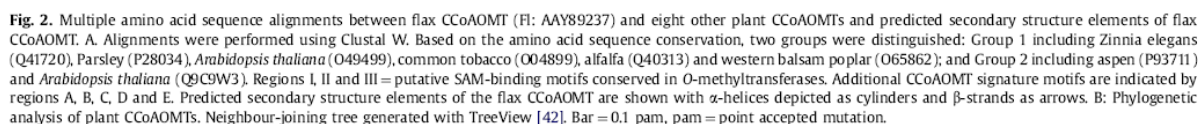
3.2. Selection of transgenic flax lines

Seven independently-transformed flax plants, containing an antisense flax CCoAOMT sequence under the control of a double 35S promoter, were identified by PCR (data not shown) and multiplied in vitro. Visual inspection of the transformed lines did not reveal any major phenotypic effects of the transformation.

In order to select transgenic lines showing a reduction in CCoAOMT activity for further analyses, residual activities were determined using caffeoyl coenzyme A, classically considered as the preferred substrate of CCoAOMT [26]. The results (Fig. 3) show that only 2 lines out of the 7 lines analyzed showed a relatively small, but significant, reduction in their activities (line A: 30.3%, L: 36.9%). In spite of the lack of visual phenotype and the modest reductions in CCoAOMT activities we decided to undertake further analyses of lignin structure and cell-wall architecture in the transgenic lines A and L.

3.3. Modifications in lignin quantity and composition

Lignin levels were determined in cell-wall residues obtained from whole stems (inner and outer tissues) by the acetyl bromide method. The results (Table 1) show that the lignin level for the control (21.7%) is similar to that observed in field-grown plants [3].



field-grown plants [3], flax lignin is rich in guaiacyl units with an average S/G value inferior to 0.2 in control plants. The S/G value is slightly reduced in the line L and increased in the line A. Calculation of the S + G value/lignin content gives an indication of the relative proportion of non-condensed intermonomer bonds present in the

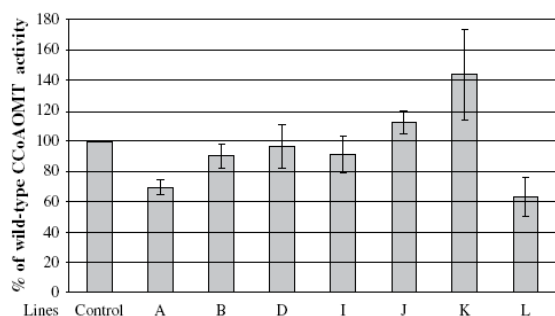


Fig. 3. CCoAOMT activities in control and transgenic flax plants. CCoAOMT activities with caffeoyl coenzyme A expressed as a percentage of control plant activity. Data are the means $\pm$ standard deviation of three assays.

lignin polymer. Although the results (Table 1) show that lines A and L appear to possess a lignin more condensed (816–879 μmol per gram of lignin) than that of the control (1005.0 μmol per gram of lignin) statistical analyses indicated that these variations were not significant.

3.4. Modifications in xylem tissue, cell structure and lignification

Microscopic examination of control- and CCoAOMT down-regulated-flax stem transversal sections stained with phloroglucinol-HCl showed a red coloration of the lignified xylem (Fig. 4A, C, E) and a discrete coloration of the compound middle lamella in some bast fibers (data not shown) indicating the presence of lignified cell walls in these tissues as previously described [3]. The examination of comparable stem transversal sections stained with the Mäule reagent revealed a pale purple-red coloration in the xylem (Fig. 4B, D, F) and no reaction in bast fibers (data not shown) of both control and down-regulated plants indicating that flax lignin contains low amounts of S-units. No differences in the intensity of the stains could be observed between the control and the lines A and L.

Structurally, the secondary xylem from line L is disorganized in comparison with that of the control, and cells with irregular outlines can be easily observed. In contrast, the xylem from line A is closer to that of the control, although irregular cells can also be detected. Irregular xylem phenotypes (Fig. 4) have been previously observed in other cell-wall mutants and are generally considered to be the result of reduced cell-wall mechanical resistance, probably due to modifications in cell-wall structure and/or formation. In order to explore whether the irregular xylem phenotype in CCoAOMT down-regulated flax was also due to modifications in cell-wall structure, we decided to measure the wall thickness of xylem cells in the control and down-regulated lines. Our results (Table 2) show that the average wall thickness of xylem cells in the

line L was significantly ($P < 0.05$) smaller than in the control and line A plants. In contrast, no significant difference in wall thickness was observed between the control and the line A. Since the down-regulation of CCoAOMT activity in flax is associated with a reduced lignin content, especially in the line L (Table 1), it is possible that the significant reduction in cell-wall thickness observed in this line is related to changes in the lignin quantity/composition. We therefore decided to use UV microspectroscopy to investigate this point.

Our results (Fig. 5) show that cell walls from both control (Fig. 5A) and down-regulated line L (Fig. 5B) xylem are characterized by an absorption peak at 280 nm typical of G-rich lignin. In contrast to the control, line L xylem cell walls are also characterized by a strong absorption in the 250–270 nm range. Interestingly, a similar augmentation was also observed in CCoAOMT down-regulated poplar plants [12]. In general, the range of peak absorption values (approximately 0.45–0.75) observed for the down-regulated line L was higher than that (approximately 0.28–0.58) observed for the control line. Examination of the cells (Fig. 5C, D) used to generate the spectra indicated that no relationship could be established between the UV-absorption values and the nature (irregular/normal) of the cells (Table 3).

Although it did not prove possible to correlate UV-absorption values with the nature of individual cells in the CCoAOMT down-regulated line L, examination of UV (280 nm) transmission micrographs (Fig. 6) suggested that the spatial distribution of lignin deposition was altered. In wild-type cell walls (Fig. 6A), the black coloration indicating high UV absorption and hence high lignin concentration is mainly limited to the cell corners and middle lamella/primary cell wall. The grey coloration observed in the secondary cell wall indicates the lower UV absorption and lignin content in this part of the wall. In contrast, this typical pattern of UV absorption is not observed (Fig. 6B) in the thinner walls of irregular cells in the down-regulated line L. Such an observation could suggest that CCoAOMT down-regulation modifies the normal lignification pattern.

Measurements of cell surface area (CSA) indicated that, in general, the cells from the down-regulated line L were larger (364 μm^2) than those of wild-type plants (208 μm^2). However, as with the nature (normal/irregular) of cells, no correlation ($R^2 = 0.095$) could be made between cell size and the UV-absorption values of the corresponding cell walls.

In order to further characterize the nature of the observed modifications in the down-regulated lines A and L, longitudinal tangential sections of xylem tissue were made. The results (Fig. 7) show that the xylem of wild-type plants (Fig. 7A) is composed mainly of richly-ornamented fiber tracheids of small diameter, together with a few larger cells. In contrast, observation of xylem from the line L (Fig. 7C) suggests that the general organization of this tissue is modified. The xylem in this line contains numerous cells with relatively large diameters showing lignified cell-wall thickenings organized in spiral and annular patterns. Examination of the line A (Fig. 7B) reveals an organization intermediate between control plants and the line L, with the presence of both fiber tracheids and cells with annular/spiral cell-wall thickenings. Taken together, these results confirm that the organization of xylem is modified in CCoAOMT down-regulated plants, as suggested by the examination of transversal stem sections (Fig. 4).

3.5. Characterization of the flax CCoAOMT recombinant protein

After purification of the recombinant protein and removal of the His-tag, the affinity of flax CCoAOMT for 4 different potential substrates of the phenylpropanoid pathway (caffeic acid, caffeoyl coenzyme A, 5-hydroxyconiferaldehyde, 5-hydroxyconiferyl alcohol) was determined. The results (Table 4) show that the enzyme exhibited a marked preference for caffeoyl coenzyme A

Table 1

Lignin content and composition in control and transformed flax plants. Lignin content was expressed in percentage of dry CWR. G, S = yields of the thioethylated products of guaiacyl (G) and syringyl (S) lignin units expressed as μmoles per gram of CWR; S/G = ratio of G to S lignin units; S + G/lignin = yields of total (S + G) expressed as μmoles per gram of lignin. Each value is the mean $\pm$ SD (in brackets) of three separate assays.

	Control	Line A	Line L
Lignin content	21.7 (1.1)	20.0 (0.9)	17.8 (0.6)
G	894.6 (137.4)	755.4 (71.9)	738.2 (46.4)
S	110.4 (20.0)	123.6 (21.3)	78.6 (4.8)
S/G	0.12 (0.00)	0.16 (0.01)	0.11 (0.00)
S + G/lignin	1005.0 (157.5)	879 (92.9)	816 (51.2)

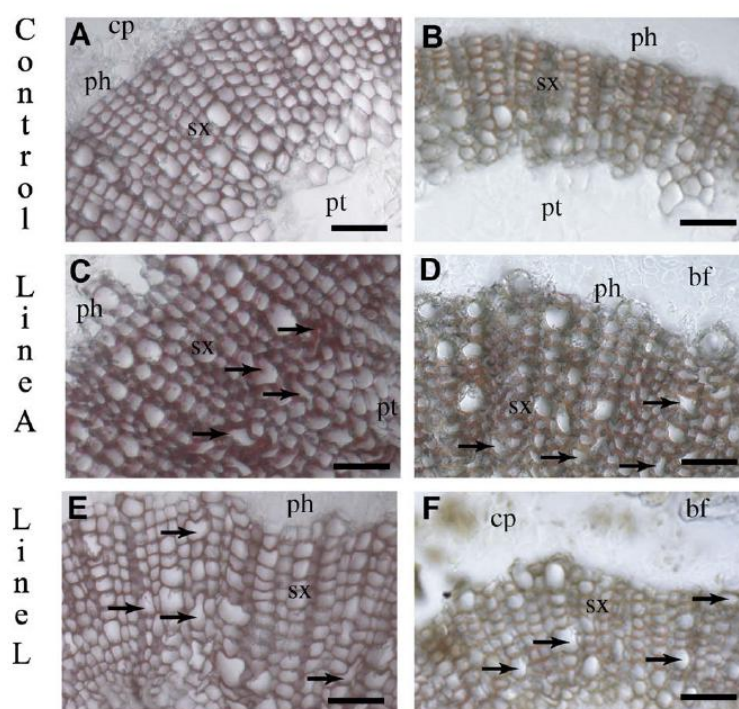


Fig. 4. Histochemical analyses of xylem in wild-type and in down-regulated-flax lines A and L. Staining by phloroglucinol-HCl (A, C, E) or by Mäule reaction (B, D, F) of fresh stem transverse cross sections. Arrows show abnormal and/or collapsed cells. bf: bast fibers, cp: cortical parenchyma, pt: central pith, ph: phloem, sx: secondary xylem. Bar = 100 μm .

($V_{\text{max}} = 38 \text{ pkat mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_m = 1.5 \text{ }\mu\text{M}$; $V_{\text{max}}/K_m = 25.3$) followed by 5-hydroxyconiferaldehyde ($V_{\text{max}} = 1.45 \text{ pkat mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_m = 0.25 \text{ }\mu\text{M}$; $V_{\text{max}}/K_m = 5.8$). Calculation of V_{max} , K_m and V_{max}/K_m values for the other potential substrates tested strongly suggested that flax CCoAOMT shows little affinity for caffeic acid or 5-hydroxyconiferyl alcohol.

4. Discussion

4.1. Structure of the flax CCoAOMT

As part of our ongoing studies on the formation of cell walls in flax, we decided to investigate the role of the key lignin biosynthetic enzyme caffeoyl coenzyme A-O-methyltransferase (CCoAOMT). Isolation of a CCoAOMT clone from a flax outer-stem tissue cDNA library [16] and examination of the translated sequence indicated that the flax protein showed a high degree of similarity to other Angiosperm CCoAOMTs including the AtCCoAOMT protein from *Arabidopsis*. The predicted molecular mass of the flax CCoAOMT is lower than that (32–33 kDa) determined experimentally [21] suggesting that the protein could be modified post-translationally. Examination of the protein sequence revealed a number of putative post-translational modification sites that could contribute to differences between the observed and predicted mass. Interestingly, CCoAOMTs from other plant species also show a high degree of variability in molecular mass (27–35 kDa), despite the similarity of their protein sequences [8,14,26,27].

4.2. Down-regulation of CCoAOMT in flax

In order to evaluate the function of CCoAOMT in flax, we used an antisense approach with the cDNA isolated previously. Although

transformation efficiency in flax is low [28], we were able to generate 7 independent lines. Of these 7 transformed flax lines, two lines (A and L) showed significantly-reduced activities towards the substrate caffeoyl coenzyme A. Visual inspection of the 2 transformed flax lines selected for further studies did not reveal any marked modifications in the size or growth of plants. These results are similar to those of previous studies showing that, in general, CCoAOMT down-regulation in poplar [28], alfalfa [29] and tobacco [10] does not lead to modifications in plant growth. Nevertheless, the situation is presumably more complex since other studies [30] have shown that CCoAOMT down-regulation can affect growth in tobacco and, depending upon growth conditions, in *Arabidopsis*. To have a better view of the effect of down-regulation on flax growth, it will be necessary to improve plant transformation. In addition, the use of RNAi gene repression that generally has a stronger effect on mRNA accumulation could also facilitate our understanding of CCoAOMT's role in lignin biosynthesis in flax [31].

4.3. Chemical characterization of transformed flax lignin

Determination of lignin levels by acetyl bromide revealed that both lines (A and L) with reduced activity showed significant reductions in total lignin levels (line A: 7.8%; line L: 18%). These reductions are relatively weak as compared to other studies in herbaceous or woody dicotyledons where CCoAOMT down-regulation is associated with

Table 2
Average wall thickness (μm) of xylem cells in control and transformed flax lines. Values labelled with different superscripts (a and b) are significantly different at $p < 0.05$.

	Control	Line A	Line L
Cell-wall thickness (μm)	1.28 ^b	1.23 ^b	0.92 ^a

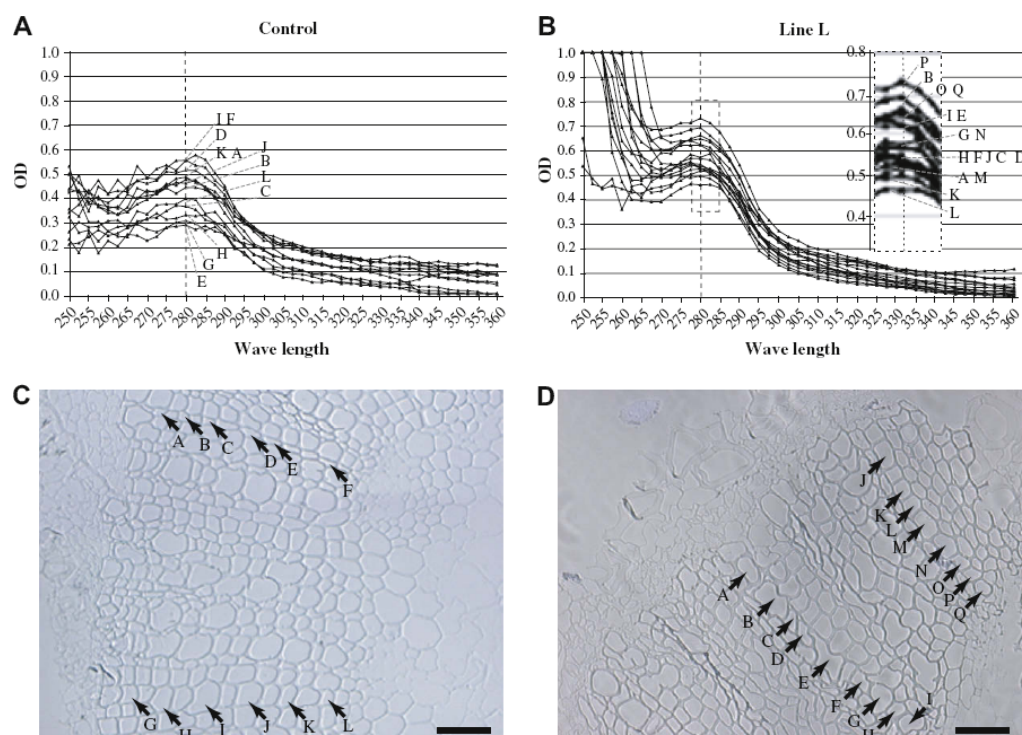


Fig. 5. UV microspectra (A, B) and micrographs (C, D) showing individual cells used to generate spectra in wild-type and CCoAOMT down-regulated line L. (A) UV microspectra for wild-type xylem, letters indicate the spectra of the individual cells shown in the corresponding micrograph (C). (B) UV microspectra for CCoAOMT down-regulated line L, letters indicate the spectra of the individual cells shown in the corresponding micrograph (D). Bar = 125 μm .

a reduction in Klason lignin levels of between 12 and 47% depending upon the study [10,29,30]. Nevertheless, it is interesting to note that down-regulation of CCoAOMT in alfalfa had no effect on acetyl bromide extractable lignin [29]. In contrast, down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) activity in transgenic flax was shown to lead to much greater reductions (16–40%) in lignin content of *in vitro* plants [32].

Thioacidolysis showed that CCoAOMT down-regulation gave rise to an increase in the S/G ratio (line A), and to a slight decrease in the line L. The results for the line L are in contrast with that generally observed in other CCoAOMT down-regulated angiosperms that show either no modification in the S/G ratio, or else an increase in this ratio. The significance of these results is more fully discussed later. Taken together, these results confirm the important role of the CCoAOMT enzyme in lignin biosynthesis in flax where its activity is presumably necessary to produce the feruloyl CoA precursors of G- and S-lignin units.

While not significant, the decrease in the degree of lignin condensation could suggest a trend towards the formation of a more condensed lignin in the transformed lines. Interestingly, similar analyses in other species [12,28,30] indicate that the down-regulation of CCoAOMT expression leads to an increase in the proportion of condensed structures.

4.4. Modifications in xylem cell structure, organization and lignification

Given the modest reduction in CCoAOMT activities and lignin levels in the flax transformants, the modifications in the structure

of certain xylem cells, as well as in the overall organization of flax xylem tissue in the lines L and A were surprising. In both cases the modified flax xylem cells were characterized by their irregular shape. A number of mutants presenting a collapsed xylem cell phenotype have now been identified and are collectively described as *irx* (irregular xylem) mutants [33,34]. *irx* mutants typically show problems in cell-wall polymer biosynthesis and/or assembly.

Table 3
UV peak absorption values (OD 280 nm), tentative cell phenotype (normal/irregular) and cell surface areas (CSA) of individual xylem cells (letters A–Q) in CCoAOMT down-regulated line L. Letters (A–Q) correspond to those cells illustrated in Fig. 5D. No correlations could be established between (i) cell phenotype and UV absorption, and (ii) cell size and UV absorption.

Cell	OD 280 nm	CSA (μm^2)	Cell phenotype
A	0.52	392	Normal
B	0.69	685	Irregular/Normal
C	0.55	184	Irregular
D	0.55	207	Irregular
E	0.63	690	Irregular
F	0.55	239	Irregular/Normal
G	0.58	465	Normal
H	0.55	188	Normal
I	0.63	352	Normal
J	0.55	385	Normal
K	0.49	229	Normal
L	0.40	235	Normal
M	0.52	411	Normal
N	0.58	365	Normal
O	0.65	185	Normal
P	0.73	148	Normal
Q	0.65	171	Normal

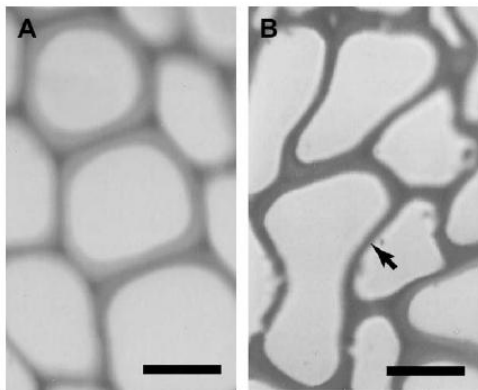


Fig. 6. UV (280 nm) absorption micrographs of xylem from wild-type plants (A) and CCoAOMT down-regulated line L (B). Arrows indicate the altered lignin deposition pattern in the thinner walls of irregular xylem cells (B). Bar = 55 µm.

Interestingly, deformed xylem vessels have also been observed in CCoAOMT down-regulated poplar, tobacco and *Arabidopsis* [10] plants. Since a collapsed cell phenotype is most likely due to a decreased mechanical resistance of the cell wall associated with a reduction in the amount of cell-wall material and/or modifications in the cell-wall structure, we decided to measure the thickness of xylem cell walls in control and transformed flax lines A and L. Our results indicated that xylem cell walls in the line L were significantly thinner than those in control- and line A-plants. Such an observation is interesting since it is the line L that appears to have the highest proportion of collapsed cells, as well as showing the greatest reduction in lignin content. Interestingly, modifications in cell-wall thickness have also been observed in other *irx* mutants as well as in tobacco plants over-expressing a Myb transcription factor [35].

In the light of these observations, we initially concluded that the irregular xylem phenotype in flax was probably due to reduced lignin content associated with a reduction in cell-wall thickness. However, our further investigations suggested that the situation is more complex. Our acetyl bromide analyses indicated that the line L contained approximately 18% less lignin than wild-type plants. The thioacidolysis results indicated that the G- and S-unit content was decreased by 18% and 28%, respectively, giving rise to a slight reduction in the S/G value. These results are in contradiction with studies of other angiosperm species [10–12,29] showing that CCoAOMT down-regulation has either no effect on the S/G ratio, or else is associated with an increase in this ratio due to a relative decrease in G-units and an increase in S-units.

However, chemical analyses of flax lignin is complex since the lignin polymer is particularly condensed [3] and, on average, only 20–25% of the polymer is chemically degraded and available for analyses. It is therefore difficult to evaluate the effects of CCoAOMT down-regulation on the major condensed part of the polymer. While it is theoretically possible that CCoAOMT down-regulation might be associated with an increase in S-units (as observed in other species) in the condensed part of the flax lignin polymer, such S-units are generally involved in non-condensed bonds [36]. It is clear that further analyses of flax lignin using alternative analytical tools are necessary to fully characterize the effects of CCoAOMT down-regulation in flax.

In an initial attempt to obtain further information about the effects of CCoAOMT down-regulation in flax we analyzed lignin by UV microspectroscopy in wild-type and line L plants. In contrast to the chemical analyses, our UV microspectroscopy results suggested

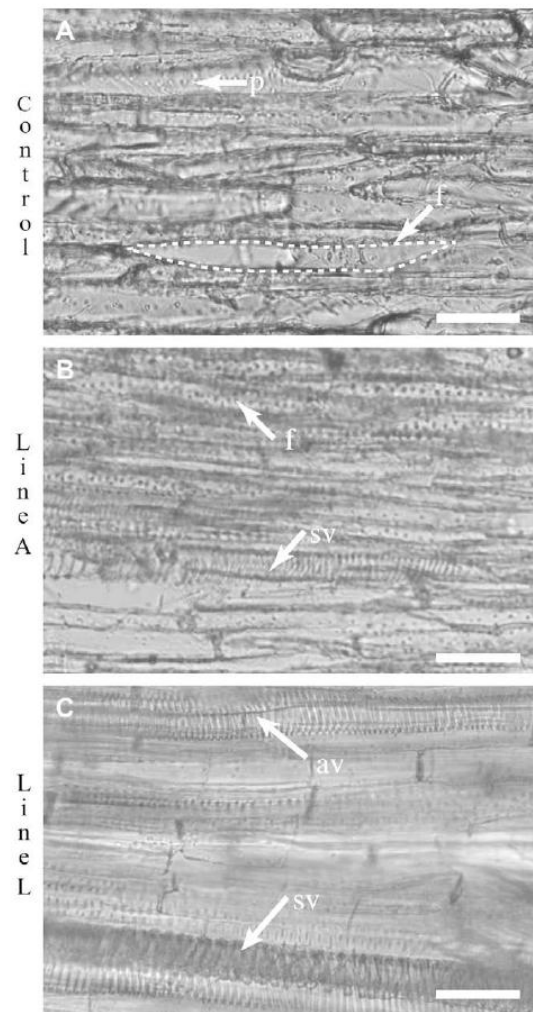


Fig. 7. Micrographs of longitudinal tangential sections of secondary xylem of wild-type (A), and CCoAOMT down-regulated lines A (B) and L (C). av: annular vessel, f: fiber tracheid, p: pit structure, sv: spiral vessel. Bar = 200 µm.

that lignin levels in the walls of individual cells from the line L increased. At first sight, these two sets of results are contradictory. However, a number of factors can influence the UV peak levels. Firstly, lignin G-units show a greater absorption at 280 nm than do S-units [37]. If, as suggested by the thioacidolysis results, CCoAOMT down-regulation leads to a greater decrease in S-units, the relative proportion of G-units in the lignin polymer would be increased,

Table 4

Kinetic properties of purified recombinant flax CCoAOMT for 4 different potential substrates of the phenylpropanoid pathway (Fig. 1). V_m is expressed as pkat/mg of protein. K_m is expressed as µM.

Substrat	V_m	K_m (µM)	V_m/K_m
Caffeic acid	0.18	39.0	0.004
Caffeoyl CoA	38.0	1.5	25.300
5-Hydroxyconiferaldehyde	1.45	0.25	5.800
5-Hydroxyconiferyl alcohol	0.19	27.0	0.007

thereby contributing to a higher UV-absorption value. Secondly, the significant reduction in cell-wall thickness in the line L might contribute to an overall increase in the lignin 'concentration' (within the cell wall), thereby leading to higher UV absorption. In this context, it is interesting to note that UV-absorption microphotographs suggest that the typical pattern of cell-wall lignification (high lignin levels in cell corners, middle lamella, primary cell wall and S1 layer of the secondary cell wall: [3]) is disturbed in the line L. Although further work is clearly necessary, our results suggest that CCoAOMT down-regulation in flax induces modification in lignin quantity, structure and distribution. In addition, the strong UV absorption in the 250–270 nm range (line L) also suggests that modifications in xylem cell-wall composition have occurred. A similar augmentation in this range was previously observed in poplar plants under-expressing CCoAOMT and the authors suggested that this was due to the accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in the xylem cell walls [12].

In conclusion, these results suggest that CCoAOMT down-regulation in flax modifies the lignification process and that this is associated with the *irx* phenotype.

The xylem from the modified flax line L (and to a lesser extent, the line A) is characterized by the presence of irregular cells. One important question concerns why only certain cells show this phenotype. Our UV microspectroscopy results indicated that no correlation could be made between UV peak values and the nature (irregular/normal) of individual cells. One possibility is that the down-regulation of CCoAOMT in flax affects the lignin in all cells, but that the appearance of an irregular cell phenotype depends upon the level of mechanical pressure exerted on individual cells during growth. The observation that changes to plant growth conditions are able to induce phenotypic differences in plant size in CCoAOMT down-regulated *Arabidopsis* [38] and other 'cell-wall mutants' [39] would tend to support this hypothesis.

As well as provoking an *irx* phenotype, the down-regulation of CCoAOMT in flax also appeared to exert an effect on xylem cell identity. For example, the xylem of wild-type plants is composed mainly of small diameter fiber tracheids, as previously observed [40], whereas the xylem from modified flax line L contains a higher proportion of relatively large-diameter cells with spiral and annular secondary cell-wall thickenings. Such an observation could suggest that 'normal' lignification (at least in flax) is not only necessary for cell-wall resistance, but also contributes to xylem cell identity. In this context, it is interesting to note that the average cross-sectional area of xylem cells in the modified line L was greater than in wild-type plants, thereby raising questions about the possible contribution of lignification to controlling cell expansion during differentiation. However, further studies of this point are necessary.

Altogether, these results underline (i) the important contribution of the lignin polymer to cell-wall mechanical resistance in flax and (ii) the central role of CCoAOMT in this process.

4.5. Enzymatic characterization of flax recombinant CCoAOMT

In contrast to many other angiosperms, flax lignin is unusually rich in G-units [3] thereby suggesting that the cellular mechanisms controlling monolignol methoxylation might present differences with those previously studied in other species. The observation that CCoAOMT down-regulation in flax can apparently give rise to a greater reduction in S-units is in contrast with that observed in other angiosperm species, and would tend to support this idea. As a first step towards investigating this question we produced recombinant CCoAOMT protein and tested its affinity towards 4 different potential substrates (caffeic acid, caffeoyl coenzyme A, 5-hydroxyconiferaldehyde and 5-hydroxyconiferyl alcohol).

Our results indicated that flax CCoAOMT showed low affinity for caffeic acid and 5-hydroxyconiferyl alcohol as has been observed in

other studies [26] on dicotyledon CCoAOMTs. The preferred substrate of flax CCoAOMT was caffeoyl coenzyme A suggesting that, as previously observed in other dicotyledon species, the enzyme is involved in 3'-methylating reactions leading to the formation of G-unit lignin monomers, as well as S-unit formation via subsequent COMT activity. In addition, our results indicated that the flax CCoAOMT showed a non-negligible affinity for 5-hydroxyconiferaldehyde. As a result of different studies [6,10,13,28] on the under-expression of CCoAOMT and COMT genes, it is generally accepted that CCoAOMT is responsible for 3' methylation reactions, and that COMT is responsible for 5' methylation reactions leading to the formation of lignin S-units. Such a viewpoint is also reinforced by enzyme studies [9,26] showing that only COMT (and not CCoAOMT) is capable of methylating the hydroxycinnamic acids. Altogether, these results have led to the conclusion that CCoAOMT is most probably not involved in 5' methylation reactions [15,41].

Our results showing that flax CCoAOMT has a non-negligible affinity for 5-hydroxyconiferaldehyde could suggest that, at least in flax, CCoAOMT is also involved in 5'-methylation reactions leading to lignin S-unit formation. While the observed reduction of S-units in the flax line L would support this idea, the 11% increase (but not significant) observed in the line A indicates that further investigation is necessary. Furthermore, a proper understanding of 3'- and 5'-methylating reactions in flax also requires the isolation and study of the flax COMT and F5H proteins, as well as a functional genomics approach on the corresponding genes. We have identified potential COMTs and F5H sequences in our collection of flax ESTs [16] and studies are currently underway to isolate the corresponding cDNAs. An approach similar to that described in this paper should help us to learn more about the 3'- and 5'-methylation reactions in flax and their potential roles in determining the atypical structure of lignin in this species. In addition, further studies on the cell-wall composition in modified cells should enable us to more clearly understand the role of these different enzymes in controlling lignin composition, cell-wall integrity and, possibly, cell identity.

Acknowledgements

A. Day and F. Nolin gratefully acknowledge the Nord-Pas de Calais and Champagne-Ardenne Regions (France) for financial support. This work was performed in the context of the project "Métabolisme Pariétal et Cohésion Intercellulaire" (CPER Nord-Pas de Calais, 2000–2006). The authors gratefully thank Dr. Lise Jouanin for the gift of the vector pLBR19.

References

- [1] C. Bailey, Analysis of the flax fibres tensile behaviour and analysis of the tensile stiffness increase, *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* 33 (2002) 939–948.
- [2] C. Morvan, C. Andème-Onzighi, R. Girault, C.D. Himmelsbach, Building flax fibers: more than one brick in the wall, *Plant Physiol. Biochem.* 41 (2003) 935–944.
- [3] A. Day, K. Ruel, G. Neutelings, D. Crônier, H. David, S. Hawkins, B. Chabbert, Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers, *Planta* 222 (2005) 234–245.
- [4] K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig, Definition and nomenclature, in: K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig (Eds.), *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley Interscience, New York, 1971, pp. 1–18.
- [5] T. Goujon, V. Ferret, I. Mila, B. Pollet, K. Ruel, V. Burlat, J.P. Joseleau, Y. Barrière, C. Lapiere, L. Jouanin, Down-regulation of the *AtCCR1* gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability, *Planta* 217 (2003) 218–228.
- [6] R. Atanassova, N. Favet, F. Martz, B. Chabbert, M.T. Tollier, B. Monties, B. Fritig, M. Legrand, Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation, *Plant J.* 8 (1995) 465–477.
- [7] C. Lapiere, Application of new methods for the investigation of lignin structure, in: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, J. Ralph (Eds.), *Forage cell wall structure and Digestibility*, ASA, CSSA, SSSA, Madison, 1993, pp. 133–166.

- [8] Z.H. Ye, Association of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants, *Plant Physiol.* 115 (1997) 1341–1350.
- [9] K. Inoue, V.J. Sewalt, G.B. Murray, W. Ni, C. Sturzer, R.A. Dixon, Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification, *Plant Physiol.* 117 (1998) 761–770.
- [10] R. Zhong, W.H. Morrison, J. Negrel, Z.H. Ye, Dual methylation pathways in lignin biosynthesis, *Plant Cell* 10 (1998) 2033–2045.
- [11] J.M. Marita, J. Ralph, R.D. Hatfield, D.J. Guo, F. Chen, R.A. Dixon, Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase, *Phytochemistry* 62 (2003) 53–65.
- [12] H. Meyermans, K. Morreel, C. Lapierre, B. Pollet, A. DeBruyn, R. Busson, P. Herdewijn, B. Devreese, J. VanBeeumen, J.M. Marita, J. Ralph, C.Y. Chen, B. Burggraef, M. VanMontagu, E. Messens, W. Boerjan, Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 36899–36909.
- [13] D.G. Guo, F. Chen, J. Wheeler, J. Winder, S. Selman, M. Peterson, R.A. Dixon, Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases, *Transgenic Res* 10 (2001) 457–464.
- [14] S. Maury, P. Geoffroy, M. Legrand, Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism. The different caffeoyl-coenzyme A/5-hydroxyferuloyl-coenzyme A 3/5-O-methyltransferase and caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase classes have distinct substrate specificities and expression patterns, *Plant Physiol* 121 (1999) 215–223.
- [15] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 519–546.
- [16] A. Day, M. Addi, W. Kim, H. David, F. Bert, P. Mesnage, C. Rolando, B. Chabbert, G. Neutelings, S. Hawkins, ESTs from the fibre-bearing stem tissues of flax (*Linum usitatissimum* L.): expression analyses of sequences related to cell wall development, *Plant Biol.* 7 (2005) 23–32.
- [17] L. Mlynarova, M. Bauer, J.P. Nap, A. Pretova, High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax, *Plant Cell Rep.* 13 (1994) 282–285.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [19] M. Bouktaib, S. Lebrun, A. Atmani, C. Rolando, Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions, *Tetrahedron* 58 (2002) 10001–10009.
- [20] J. Stockigt, M.H. Zenk, Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives, *Z. Naturforsch., C* 30 (1975) 352–358.
- [21] A. Day, B. Dehorter, G. Neutelings, X. Czeszak, B. Chabbert, L. Belingheri, H. David, Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development, *Physiol. Plant.* 113 (2001) 275–284.
- [22] G.S. Eadie, The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine, *J. Biol. Chem.* 146 (1942) 85–93.
- [23] B.H. Hofstee, On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions, *Science* 116 (1952) 329–331.
- [24] K. Iiyama, A.F.A. Wallis, Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure, *J. Sci. Food Agric.* 51 (1990) 145–161.
- [25] C. Vallet, B. Chabbert, Y. Czaniński, B. Monties, Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems, *Ann. Bot.* 78 (1996) 625–632.
- [26] K. Parvathi, F. Chen, D.J. Guo, J.W. Blount, R.A. Dixon, Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols, *Plant J.* 25 (2001) 193–202.
- [27] K. Vander-Mijnsbrugge, H. Meyermans, M. VanMontagu, G. Bauw, W. Boerjan, Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins, *Planta* 210 (2000) 589–598.
- [28] R. Zhong, W.H. Morrison, D.S. Himmelsbach, F.L. Poole, Z.H. Ye, Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants, *Plant Physiol.* 124 (2000) 563–577.
- [29] D.J. Guo, F. Chen, K. Inoue, J.W. Blount, R.A. Dixon, Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin, *Plant Cell* 13 (2001) 73–88.
- [30] G. Pinçon, S. Maury, L. Hoffmann, P. Geoffroy, C. Lapierre, B. Pollet, M. Legrand, Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth, *Phytochemistry* 57 (2001) 1167–1176.
- [31] S.V. Wesley, C.A. Helliwell, N.A. Smith, M.B. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green, P.M. Waterhouse, Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants, *Plant J.* 27 (2001) 581–590.
- [32] M. Wrobel-Kwiatkowska, M. Starzycki, J. Zebrowski, J. Oszmianski, J. Szopa, Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 919–934.
- [33] S.R. Turner, C.R. Somerville, Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall, *Plant Cell* 9 (1997) 689–701.
- [34] J.C. Leple, R. Dauwe, K. Morreel, V. Storme, C. Lapierre, B. Pollet, A. Naumann, K.Y. Kang, H. Kim, K. Ruel, A. Lefebvre, J.P. Joseleau, J. Grima-Pettenati, R. De Rycke, S. Andersson-Gunnar, A. Erban, I. Fehrlie, M. Petit-Conil, J. Kopka, A. Polle, E. Messens, B. Sundberg, S.D. Mansfield, J. Ralph, G. Pilate, W. Boerjan, Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure, *Plant Cell* 19 (2007) 3669–3691.
- [35] M. Goicoechea, E. Lacombe, S. Legay, S. Mihaljevic, P. Rech, A. Jauneau, C. Lapierre, B. Pollet, D. Verhaegen, N. Chaubet-Gigot, J. Grima-Pettenati, EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus xylem*, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis, *Plant J.* 43 (2005) 553–567.
- [36] B. Monties, Lignins, in: P.M. Dey, J.B. Harborne (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Plant Phenolic, vol. 1, Academic Press, New York, 1989, pp. 113–157.
- [37] B.J. Fergus, D.A.I. Goring, The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy, *Holzforshung* 24 (1970) 118–124.
- [38] C.T. Do, B. Pollet, J. Thevenin, R. Sibout, D. Denoue, Y. Barriere, C. Lapierre, L. Jouanin, Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*, *Planta* 226 (2007) 1117–1129.
- [39] T. Goujon, R. Sibout, B. Pollet, B. Maba, L. Nussaume, N. Bechtold, F.C. Lu, J. Ralph, I. Mila, Y. Barriere, C. Lapierre, L. Jouanin, A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters, *Plant Mol. Biol.* 51 (2003) 973–989.
- [40] S. Carlquist, Comparative Wood Anatomy: Systematic, Ecological and Evolutionary Aspects of Dicotyledon Wood, Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- [41] A.M. Anterola, N.G. Lewis, Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity, *Phytochemistry* 61 (2002) 221–294.
- [42] R.D. Page, TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Appl. Biosci.* 12 (1996) 357–358.

Bibliographie

A

- Abbadì A., Domergue F., Bauer J., Napier J. A., Welte R., Zähringer U., Cirpus P., Heinz E. (2004). Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds : constraints on their accumulation. **Plant Cell**. 16 : 2734-2748.
- Abdulrazzak N., Pollet B., Ehlting J., Larsen K., Asnaghi C., Ronseau S., Proux C., Erhardt M., Seltzer V., Renou J. -P. (2006) A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. **Plant Physiol**. 141 : 1708
- Aimi H., Matsumoto Y., Meshitsuka G. (2005) Structure of small lignin fragments retained in water soluble polysaccharides extracted from birch MWL isolation residue. **J. Wood Sci.**, 51 : 303-308.
- Akin D. E., Gamble G. R., Morrison III W. H., Rigsby L. L., Dodd R. B. (1996) Chemical and Structural Analysis of Fibre and Core Tissues from Flax?, **J. Sci. Food Agric**. 72 : 155-165.
- Akin D. E., Dodd R. B., Foulk J. A. (2005). Pilot plant for processing flax fiber. **Ind. Crops and Prod**. 21 : 369-378.
- Åkerholm M., Salmén L. (2003) The oriented structure of lignin and its viscoelastic properties studied by static and dynamic FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, 57 (5) : 459-465.
- Alconada-Magliano T. M., Casal J. J. (1998) In vitro cross-linking of extensin precursors by mustard extracellular isoforms of peroxidase that respond either to phytochrome or to wounding. **J. Exp. Bot**. 49 (326) : 1491-1499.
- Aoyama W., Matsumura A., Tsutsumi Y., Nishida T. (2001) Lignification and peroxidase in tension wood of *Eucalyptus viminalis* seedlings, **J. Wood Sci.**, 47 : 419-424.
- Astley O. M., Donald A. M. (2003) The tensile deformation of flax fibres as studied by X-ray scattering. **Journal of Materials Science**, 38 (1) : 165-171.
- Attala R. H. (1984) Polymorphism native in cellulose : recent developments. In : Function and biosynthesis of plant cell wall. Dugger V. M., Bartnicki-Garcia S. (eds) Rockville, pp : 381-387.

B

- Baker C. J., Deahl K., Domek J., Orlandi E. W. (2000) Scavenging of H₂O₂ and production of oxygen by horseradish peroxidase. **Archives of Biochem and biophys.**, 383(2) : 232-237.
- Baley C., Grohens Y., Levesque G., Busnel F., Pomel C., Sire O. (2002) Influence des traitements chimiques sur les propriétés interfaciales et l'adhérence du système fibre de lin-résine polyester. **MATERIAUX**, pp 1-4.
- Bao W., O'Malley D. M., Whetten R., Sederoff R. R. (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. **Science** 260 : 672-674.
- Barakat A. Thèse de doctorat (2007) : Etude de la lignification de parois végétales de graminées par des assemblages modèles : Réactivité, organisation et structure supramoléculaire. Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Baucher M., Monties B., VanMontagu M., Boerjan W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 17 (2) : 125-197.
- Baucher M., Petit-Conil M, Boerjan W (2003) Lignin: genetic engineering and impact on pulping. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 38 : 305-350.
- Besseau S., Hoffmann L., Geoffroy P., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. (2007) Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. **Plant Cell** 19 : 148-162.
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochem and Biophys. Acta**, 1758 : 994-1003.
- Blee K. A., Choi J. W., O'Connell A. P., Schuch W., Lewis N. G., Bolwell G. P. (2003) A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. **Phytochem.**, 64 : 163-176.
- Boerjan W., Ralph J., Baucher M. (2003) Lignin biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54 : 519-546.
- Boija E., Johansson G. (2006) Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1758 : 620-626.

Bonatti P. M., Ferrari C., Focher B., Grippo C., Torri G., Consentino C. (2004) Histochemical and supramolecular studies in determining quality of hemp fibres for textile application, **Euphytica**, 140 (1-2) : 55-64.

Boudet A. M. (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds, **Phytochem.**, 68 (22/24) : 2722-2735.

Bouton S., Leboeuf E., Mouille G., Leydecker M. -T., Talbotec J., Granier F., Lahaye M., Höfte H., Truong H. -N. (2002) *QUASIMODO1* Encodes a Putative Membrane-Bound Glycosyltransferase Required for Normal Pectin Synthesis and Cell Adhesion in Arabidopsis. **Plant cell.**, 14 : 2577-2590.

Brett C., Waldron K. (1996) Physiology and biochemistry of plant cell walls. London, Champman, Halle, 225 pages.

Brown R. M. (1996) The biosynthesis of cellulose, **J. Macromol. Sci.**, , 33 : 1345-1373.

Brownleader M.D., Ahmed N., Trevan M., Chaplin M. F., Dey P. M. (1995) Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. **Plant Physiol.**, 109 (3) : 1115-1123

Buchanan B. B., Gruissem W. & Jones R. L (2001) Biochemistry & molecular biology of plants. Eds (Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L.) **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, Maryland.

Buranov A. U. et Mazza G. (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. **Ind. Crops and Products.**, 28 : 237-259.

Burel C., Berthe T., Mery J. -C., Morvan C., Balangé A. P. (1994) Isoelectric-focusing analysis of peroxidases in Flax seedling hypocotyls grown in different light conditions. **Plant Physiol. Biochem.**, 32 : 853-860

C

Cai X., Davis E. J., Liang X., Bushman E., Haroldsen V., Torabinejad J., Wu Y. (2006) Mutant identification and characterization of the laccase gene family in Arabidopsis. **J. Exp. Bot.** 57(11) : 2563-2569.

Caliskan M., Cuming A. C. (1998) Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. **The Plant J.**, 15(2) : 165-171.

Capparós-Ruiz D., Fornalé S., Civardi L., Puigdomènech P., Rigau J. (2006) Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. **Plant Science**, 171 : 217-225.

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 growing plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J.** 3 : 1-30.

Carpita N. C., McCann M. (2000) Ch2 : The cell wall. In : Biochemistry and molecular biology of Plants. Eds : Buchanan B., Gruissem W., Jones R. pp : 52-108.

Casa R., Russell G., Lo Cascio B., Rossini F. (1999) Environmental effects on linseed (*Linum usitatissimum* L.) yield and growth of flax at different stand densities. **Eur. J. Agron.** 1 (3-4) : 267-278

Catesson A. M., Czaninski Y., Monties B. (1978) Caractères histochimiques des peroxydases pariétales des cellules en cours de lignification. **C. R. Acad. Sci.** 286D, 1787-1790.

Chatterjee S., Mayor S. (2001) The GPI-anchor and protein sorting. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58 (14) : 1969-1987.

Chapple C. C. S., Vogt T., Ellis B. E., Somerville C. R. (1992) An Arabidopsis mutant defective in the general propanoid pathway. **Plant Cell**, 4 : 1413-1424

Cheeseman J.M. (2006) Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **J. Exp. Bot.**, 57 : 2435-2444.

Chen F., Yasuda S., Fukushima K. (1999) Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. **Planta** 207 (4) : 597-603.

Chen F., Reddy M. S. S., Temple S., Jackson L., Shadle G., Dixon R. A. (2006) Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wallbound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant J.** 48:113-124.

Chen J., Varner J. E. (1985) An extracellular matrix protein in plants : characterization of a genomic clone for carrot extensin. **The EMBO journal** 4 (9) : 2145-2151

Christensen J. H., Bauw G., Welinder K. G., Van Montagu M., Boerjan W. (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. **Plant Physiol.**, 118 : 125-135.

Christensen J. H., Overney S., Rohde A., Diaz W. A., Bauw G., Simon P., Van Montagu M., Boerjan W. (2001) The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem : cDNA isolation, characterization and expression. **Plant Mol. Biol.**, 47 : 581-593.

Cona A., Rea G., Angelini R., Federico R., Tavladoraki P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. **TRENDS in Plant Science**, 11 (2) : 80-88.

Cosgrove D. J. (2000) New genes and new biological roles for expansions. **Curr. Op. in Plant Biol.**, 3 (1) : 73-78.

Coskuner Y., Karababa E. (2007). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) **J. of Food Engineering**, 78 : 1067-1073.

Crônier D., Monties B., Chabbert B. (2005) Structure and chemical composition of bast fibers isolated from developing hemp stem. **J. Agric.Food Chem.**, 53 (21) : 8279-8289.

Crevecoeur M., Pinedo M., Greppin H., Penel C. (1997) Peroxidase activity in shoot apical meristem from Spinacia, **Acta Histochemica** 99 (2) : 177-186.

Czaninski Y., Sachot R. M., Catesson A. M. (1993) Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. **Annals of Botany**, 72 : 547-550.

D

Datta K., Schmidt A., Marcus A. (1989) Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes. **Plant Cell** 1 (9) : 945-952

Daroit D. J., Silveira S. T., Hertz P. F., Brandelli A. (2007) Production of extracellular β -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochem.**, 42 : 904-908.

Davidson B. H., Drescher S. R., Tuskan G.A., Davis M. F., Nghiem N. P. (2006) Variation of S/G ratio and lignin content in a populous family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotech.**, 130 (1-3) : 427-435.

Darvill A., McNeil M., Albersheim P. (1978) Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. **Plant Physiol.** 62 : 418-422.

Davin L. B., Jourdes M., Patten A. M., Kim K.-W., Vassão D. G., Lewis N. G. (2008) Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly : Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignan biosynthesis. **Natural Product Reports**, 25 : 1015-1090.

Day A. : Thèse (2004) La lignifications des fibres periphloemiennes du lin (*Linum usitatissimum* L.): Approches cytochimique, chimique et moleculaire. Université des Sciences et Technologies de Lille1.

Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S., Chabbert B. (2005) Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers, **Planta**, 222 (2) : 234-245.

Day A., Addi M., Kim W., David H., Bert F., Mesnages P., Rolando C., Chabbert C., Neutelings G., Hawkins S. (2005b) ESTs from the fibre-bearing stem tissues of flax (*Linum usitatissimum* L.): Expression analyses of sequences related to wall development. **Plant Biology**, 7 (1) : 23-32.

Day A., Neutelings G., Nolin F., Grec S., Habrant A., Crônier D., Maher B., Rolando C., David H., Chabbert B. (2009) Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase down-regulation is associated with modifications in lignin and cell-wall architecture in flax secondary xylem. **Plant Physiol.Biochem.**, 47 (1) : 9-19.

Dean J. F. D., Eriksson K.-E. L. (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. **Holzforschung**, 48 : 21-33.

Dean J. F. D., Sterjiades R., Eriksson K.-E. L. (1994) Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. **Physiol. Plantarum**, 92 : 233-240.

Deepak S., Shailasree S., Kini R. K., Hause B., Shetty S. H., Mithöfer A. (2007) Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Planta** 226 : 323-333

DelRio L.A., Sandalio L. M., Palma J.M., Bueno P., Corpas F. J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Radical Bio. and Med.**, 13(5) : 557-580.

DelRio L.A., Corpas F. J., Sandalio L. M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J. B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **J. Exp. Bot.**, 53 : 1255-1272.

DelRio L.A., Sandalio L. M., Corpas F. J., Palma J.M., Barroso J. B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signalling. **Plant Physiol.**, 141 : 330-335.

Deluc L., Barrieu F., Marchive C., Lauvergeat V., Decendit A., Richard T., Carde J. -P., Mérillon J. -M., Hamdi S. (2006) Characterization of a grapevine R3R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway, **Plant Physiol.** 140 : 499–511.

Desikan R., Reynolds A., Hancock J. T., Neill S. J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have a differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspensions cultures. **Biochem. J.**, 330 : 115-120.

Dharmawardhana D. P., Ellis B. E., Carlson J. E. (1995) A β -glucosidase from Logepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. **Plant Physiol.**, 107 : 331-339.

Dharmawardhana D. P., Ellis B. E., Carlson J. E. (1999) cDNA cloning and heterologous expression of coniferin β -glucosidase. **Plant Molecular Biology** 40 (2) : 365-372.

Diederichsen A. (2007). Ex situ collections of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L.) and other species of the genus *Linum* L. **Genet. Ressour. Crop Evol.**, 54 : 661-678.

Do C. -T., Pollet B., Thevenin J., Sibout R., Denoue D., Barriere Y., Lapierre C., Jouanin L. (2007) Both caffeoyl Coenzyme A 3-Omethyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in Arabidopsis. **Planta** 226 : 1117-1129.

Dodin S., Lemay A., Jacques H., Legaré F., Forest J. C., Mâsse B., (2005) The effects of flaxseed dietary supplement on lipid profile, bone mineral density, and symptoms in menopausal women : a randomized, double blind, wheat germ placebo-controlled clinical trial, **J. Clin. Endocrinal Metab.**, , 90 (3) : 1390-1397.

Driouich A., Lainé A.-C., Vian B., Faye L. (1992) Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. **Plant J.**, 2(1) : 13-24.

Dunand C., De Meyer M., Crèvecoeur M., Penel C. (2003) Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth. **Plant Physiol. Biochem.**, 41 : 805-811.

E

El Mansouri I., Mercado J. A., Santiago-Dómenech N., Pliego-Alfaro F., Valpuesta V., Quesada M. A. (1999) Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. **Physiol. Plantarum** 106 : 355-362.

Ehlting J., Mattheus N., Aeschliman D. S., Li E., Hamberger B., Cullis I. F., Zhuang J., Kaneda M., Mansfield S. D., Samuels L. (2005) Global transcript profiling of primary stems

from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation, **Plant J.** 42 : 618–640.

Engelhardt J. (1995) Sources, industrial derivatives, and commercial applications of cellulose. **Carbohydrate Eur.**, 12 : 5-14.

Esau K. (1943) Vascular differentiation in the vegetative shoot of *Linum*. III. The origin of the bast fibers. **Amer. J. Bot.** 30 : 579-586.

Escamilla-Treviño, L.L., Chen, W., Card, M.L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., Poulton, J.E. (2006) *Arabidopsis thaliana* β -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. **Phytochem.** 67 (15) : 1651-1660.

F

Fengel D., Wegener G. (1984) *Wood : Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin, New-york, Walter de Gruyter, 613 pages.

Foyer C. H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiol. Plantarum**, 119 : 355-364.

Foyer C. H., Noctor G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis : regulation and signalling. **New Phytol.**, 146 : 359-388.

Franke R., Hemm M. R., Denault J. W., Ruegger M. O., Humphreys J. M., Chapple C. (2002 a) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. **Plant J.**, 30 (1) : 47-59.

Franke R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., Chapple, C. (2002b) The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. **Plant J.** 30 (1) : 33-45.

Freudenberg, K., Harkin J. M., Rechert M., Fukuzumi T. (1958) Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des subaoinalkohols, **Chem. Ber.**, 91 : 581-590.

Freudenberg, K. (1959) Biosynthesis and constitution of lignin. **Nature** 183 : 1152-1155.

Fukuda H. (1996) Xylogenesis : intiation, progression, and cell death. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Bio. Mol.**, 47 : 299-325.

Fukushima K., Terashima N. (1990) Heterogeneity in formation of lignin. XIII. Formation of p-hydroxyphenyl lignin in various hardwoods visualized by microautoradiography. **J. Wood Chem. Technol.** 10 (4) : 413-433.

Fukushima K., Matsui N., Taguchi S., Yasuda S. (1997) On the roles of monolignol glucosides and monolignol pathway (coniferyl alcohol-5-hydroxyconiferyl alcohol-sinapyl alcohol) in lignin biosynthesis of *Magnolia kobus*. In : 9th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, 9-12 June 1997, Montreal, Quebec, Canada 28 : 21-24.

G

Gabaldón C., López-Serrano M., Pedreño M. A., Ros Barceló A. (2005) Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis. **Plant Physiol.**, 139 : 1138-1154.

Gajhede M., Schuller D. J., Henriksen A., Smith A. T., Poulos T. L. (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. **Nature Struct. Biol.**, 4(12) : 1032-1038.

Gavnholt B., Larsen K. (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. **Physiol. Plantarum**, 116 : 273-280.

Gazaryan I. G., Lagrimini L. M. (1996) Tobacco anionic peroxidase over-expressed in transgenic plants. II. Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. **Phytochem.**, 42 : 1271-1278.

Girault R., Bert F., Rihouey C., Jauneau A., Morvan C., Jarvis, M. (1997) Galactans and cellulose in flax fibres: Putative contributions to the tensile strength. **Int. J. Biol. Macromol.**, 21 (1-2) : 179-188.

Girault R., His I., Andeme-Onzighi C., Driouich A., Morvan C. (2000) Identification and partial characterization of proteins and proteoglycans encrusting the secondary cell walls of flax fibres. **Planta**, 211 (2) : 256-264

Goicoechea M., Lacombe E., Legay S., Mihaljevic S., Rech P., Jauneau A., Lapierre C., Pollet B., Verhaegen D., Chaubet-Gigot N., Grima-Pettenati J. (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis, **Plant J.**, 43 : 553–567.

Goldberg R., Catesson A. M., Czaninski Y. (1983) Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in lignifications processes, **Z Pflanzenphysiol.**, 110 : 267-279.

Gomez Ros L. V., Aznar-Asensio G. J., Hernandez J. A., Bernal M. A., Nuñez-Flores M. J. L., Cuello J., Ros Barcelo A., Structural motifs of syringyl peroxidase are conserved during angiosperm evolution. **J. Agric. Food Chem.**, 2007, 55 : 4131-4138.

Gorshkova T. A., Wyatt S. E., Salnikov V. V., Gibeaut D. M., Ibragimov M. R., Lozovaya V. V., Carpita N. C. (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. **Plant Physiol.**, 110 (3) : 721-729.

Gorshkova T. A., Salnikov V. V., Pogodina N. M., Chemikosova S. B., Yablokova E. V., Ulanov A. V., Ageeva M. V., van Dam J. E. G., Lozovaya V. V. (2000) Composition and Distribution of Cell Wall Phenolic Compounds in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Stem Tissues. **Annals of Botany**, 85 (4) : 477-486.

Gorshkova T. A., Morvan C. (2006) Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres : role of galactans. **Planta**, 223 : 149-158.

Grabber J. H., Lu F. (2007) Formation of syringyl-rich lignins in maize as influenced by feruloylated xylans and p-coumaroylated monolignols. **Planta**, 226 : 741-751.

Granbmbow H. J., Langenbeck-Schiwch B. (1983) The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxidase and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. **Planta**, 157 : 131-137.

Gur'janov O. P.; Gorshkova T. A., Kabel M. A., Schols H. A., Van Dam J. E. G. (2007) MALDI-TOF MS evidence for the linking of flax bast fibre galactan to rhamnogalacturonan backbone. **Carbohydrate Polymers**, 67 (1) : 86-96.

H

Hahlbrock K., Scheel D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 17 : 425-429.

Harkin J. M., Obst J. R. (1973) Lignification in trees: Indication of exclusive peroxidase participation, **Science**, 180 (4083) : 284-285

Hawkins S., Samaj J., Lauvergeat V., Boudet A. M., Grima-Pettenati J. (1997) Cinnamyl alcohol dehydrogenase : identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar. **Plant Physiol.**, 113 : 321-325.

Hayashi T., Marsden M. P. F., Delmer D. P. (1987) Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiol.**, 83 : 384-389.

Higara S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiol.**, 42(5) : 462-468.

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

Higuchi T. (2006) Look back over the studies of lignin biochemistry. **J. Wood Sci.**, 52 : 2-8.

His I., Andème-Onzighi C., Morvan C., Driouich A. (2001) Microscopic studies on mature flax fibers embedded in LR White : Immunogold localization of cell wall matrix polysaccharides. **J. Histochem. Cytochem.**, 49 (12) : 1525-1535.

Hoffman Laurent : Thèse (2003) Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Université Louis Pasteur, Strasbourg I.

Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. (2004) Silencing of hydroxycinnamoylcoenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Cell**, 16:1446-1465.

Hoopes J. T., et Dean J. F. (2004) Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*, **Plant Physiol. Biochem.**, 42 : 27-33.

Hotte N. S. C., Deyholos M. K. (2008) A flax fibre proteome: identification of proteins enriched in bast fibres. **BMC Plant Biology**, 8 : 52

Howes B. D., Schiødt C. B., Wlinder K. G., Marzocchi M. P., Ma J-G., Zhang J., Schelnutt J. A., Smulevich G. (1999) The quantum mixed-spin heme state of barley peroxidase : A paradigm for class III peroxidases. **Biophys. J.**, 77 : 478-492.

Hu X., Jiang M., Zhang A., Lu J. (2005) Absciscic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, 223 : 57-68.

I

Imberty A., Goldberg R., Catesson A. M. (1985) Isolation and characterization of Populus isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. **Planta**, 164 (2) : 221-226.

J

- Jackson P. A. P., Galinha C. I. R., Pereira C. S. Fortunato A., Soares N. C., Amâncio S. B. Q., Pinto Ricardo C. P. (2001) Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. **Plant Physiol.**, 127 (3) : 1065-1076
- Jacquemart J., Foucroy M. (1961) Origine histologiques des premieres fibres de la tige de lin. **C. R. Acad. Sci. Paris**, 252 : 2753-2755.
- Jarvis M. C. (1984) Structure and properties of pectin gels in plant cell wall. **Plant Cell Envir.**, 7 : 153-164.
- Jespersen H. M., Kjærsgård I. V., Østergaard L., Wlinder K. G. (1997) From the sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. **Biochem. J.**, 326 : 305-310.
- Jiang Y., Joyce D.C. (2003) ABA effect on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. **Plant Growth Regul.**, 39 : 171–174.
- Joseleau J.-P., Imai K., Kuroda K., Ruel K. (2004) Detection and insitu characterization of lignin in the G-layer of tension woodfibres of *Populus deltoids*. **Planta**, 219 : 338–345.

K

- Kamisaka S., Takeda S., Takahashi K., Shibata K. (1990) Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena coleoptiles* - Their relationships to mechanical properties of the cell wall. **Physiol. Plant.**, 78 : 1-7.
- Kaneda M., Rensing K. H., Wong J .C. T., Banno B., Mansfield S. D., Samuels A. L. (2008) Tracking monolignols during wood development in Lodgepole pine. **Plant Physiol.**, 147 : 1750-1760.
- Kawaoka A., Kaothien P., Yoshida K., Endo S., Yamada K., Ebinuma H. (2000) Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis, **Plant J.**, 22 : 289–301.
- Kennedy C. J., Cameron G. J., Sturcova A., Apperley D. C., Altaner C., Wess T. J., Jarvis M. C. (2007) Microfibril diameter in celery collenchymas cellulose : X-ray scattering and NMR evidence. **Cellulose**, 14 : 235-246.

Klotz K. L., Liu T-T. Y., Liu L., Lagrimini L. M. (1998) Expression of the tobacco anionic peroxidase gene is tissue-specific and developmentally regulated. **Plant Mol. Biol.**, 36 : 509-520.

Knox J. P. (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **Int. Rev. Cytol.**, 171 : 79-120

Koutaniemi S., Toikka M. M., Kärkönen A., Mustonen M., Lundell T., Simola L. K., Kilpeläinen I. A., Teeri T. H. (2005) Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. **Plant Mol. Biol.**, 58 (2) : 141-157.

Koutaniemi S., Warinowski T., Kärkönen A., Alatalo E., Fossdal C.G., Saranpää P., Laakso T., Fagerstedt K. V., Simola L. K., Paulin L., Rudd S., Teeri, T.H. (2007) Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR, **Plant Mol. Biol.**, 65 (3) : 311-328.

Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H., Demura T. (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation, **Genes Dev.**, 19 : 1855–1860.

Kuga S., Brown R. M. (1991) Physical structure of celluloses microfibrils : Implications for biogenesis. In : Biosynthesis and biodegradation of cellulose. Haigler C. H., Wimer P. J. (eds) New York, pp : 125-142.

L

Lacombe E., Van Doorsselaere J., Boerjan W., Boudet A. M., Grima-Pettenati J. (2000) Characterization of cis-elements required for vascular expression of the Cinnamoyl CoA Reductase gene for protein-DNA complex formation. **Plant J.**, 23 (5) : 663-676.

Lacoux J. Thèse (2002) Etude de la regulation et du role du gene *Lupme3* codant pour une pectine methylesterase de lin (*Linum usitatissimum*) par transgenese. Université Picardie Jules Verne.

Lagrimini L. M., Joly R. J., Dunlap J. R., Liu T-T Y. (1997a) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Mol. Biol.**, 33 : 887-895.

- Lagrimini L. M., Gingas V., Fingers F., Rothstein S., Liu T-T. Y. (1997b) Characterization of antisens transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. **Plant Physiol.**, 114 : 1187-1196
- Lapierre C. (1993) Application of new methods for investigation of lignin structure. *In*: Jung HG, Buxton DR, Hatfield DR, Ralph J (eds) Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp 133–166.
- Lapierre C., Pollet, B.; Rolando, C. (1995) New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. **Res. Chem. Intermed.**, 21 : 397-412.
- Lau J. M., McNeil M., Darvill A. G., Albersheim P. (1985) Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydr. Res.**, 137 : 111-125.
- Lee D. J., Kim S. S., Kim S. S. (2002) The regulation of Korean radish cationic peroxidase promoter by a low ration of cytokinin to auxin. **Plant Sci.**, 162 : 345-353.
- Leplé J. -C., Dauwe R., Morreel K., Storme V., Lapierre C., Pollet B., Naumann A., Kang K.-Y., Kim H., Ruel K. (2007) Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar : multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. **Plant Cell**, 19 : 3669-3691.
- Lewis N. G., Yamamoto E. (1990) Lignin : occurrence, biogenesis and biodegradation. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 41 : 455-
- Lewis N. G. (1999) A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. **Curr. Op. in Plant Biol.**, 2 : 153-162.
- Lewis N. G., Davin L. B., Sarkanen S. (1999) The nature and function of lignins. *In* Comprehensive Natural Products Chemistry, vol 3. Eds : Barton Sir DHR, Nakanishi K, Meth-Cohn O. Oxford: Elsevier pp 617-745.
- Li L., Popko J.L., Umezawa T., Chiang V.L. (2000) 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. **J. Biol. Chem.**, 275 (9) : 6537-6545
- Li L., Xiao Fei Cheng, Leshkevich J., Umezawa, T., Harding S.A., Chiang V.L. (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. **Plant Cell**, 13 (7) : 1567-1585

Li Y., Kajita S., Kawai S., Katayama Y., Morohoshi N. (2003) Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. **J. Plant. Res.**, 116 : 175-182.

Liang M., Haroldsen V., Cai X., Wu Y. (2006a) Expression of a putative lacacase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. **Plant Cell and Envir.**, 29 : 746-753.

Liang M., Davis E., Gardner D., Cai X., Wu Y. (2006b) Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of Arabidopsis. **Planta**, DOI 10.1007/s00425-006-0300-6.

Lindeboom J., Mulder B. M., Vos J. W., Ketelaar T., Emons A. M. C. (2008) Cellulose microfibril deposition : coordinated activity at the plant plasma membrane, **J. Microscopy**, 231(2) : 192-200.

Linnaeus C. (1753) Species Plantarum. Holmiae (Stockholm)

Liu L., Eriksson K.-E. L., Dean J. F. D. (1999) Localization of hydrogen peroxide production in *Zinnia elegans* L. stems. **Phytochem.**, 52 : 545-554.

Lourd J. (1964) Le lin et l'industrie linière, Paris Presses universitaires de France 85 pages.

M

Mäder M. (1992) Compartmentation of peroxidases isoenzymes in plant cells. In **Plant Peroxidases 1980-1990** (eds Greppin, Penel), Geneve, pp 37-46.

Marjamaa K., Kukkola E. M., Fagerstedt K. V. (2007) Lignification in development. *Int. J. Plant Dev. Biol.*, 1 (1) : 160-169.

Matsui N., Chen F., Yasuda S., Fukushima K. (2000) Conversion of guaiacyl to syringyl moieties on the cinnamyl alcohol pathway during the biosynthesis of lignin in angiosperms. **Planta**, 210 (5) : 831-835.

Mayer A. M., Staples R. C. (2002) Laccase : new functions for an old enzyme. **Phytochem.**, 60 : 551-565.

Mc Cann M. C., Roberts K. (1991) Ch.9 Architecture of the primary cell wall. In : The cytoskeletal basis of plant growth and form. Ed : Llyod C. W. Academic press, London, pp109-129.

Mc Cann M. C., Roberts K. (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. **J. Exp. Bot.**, 45 : 1683-1691.

- Mc Dougall G. J. (1991) Cell-wall associated peroxidases and lignification during growth of flax fibres, **J. Plant Physiol.**, 139 : 182-186.
- Mc Dougall G. J. (1992) Changes in cell-wall associated peroxidases during the lignification of flax fibres, **Phytochem.**, 31 (10) : 3385-3389.
- Mc Dougall G. J. (1993) Solubilization of wall-bound peroxidases by limited proteolysis, **Phytochem.**, 4 : 765-767.
- Mc Dougall G. J., Morrison I. M., Stewart D., Weyers J. D. B. and Hillman J. R. (1993) Plant fibres : botany, chemistry and processing for industrial use. **J. Sci. Food Agric.**, 62 : 1-20.
- McIntyre C. L., Bettenay H. M., Manners J. M. (1996) Strategies for the suppression of peroxidase gene expression in tobacco. II. In vivo suppression of peroxidase activity in transgenic tobacco using ribozyme and antisense constructs. **Transgenic Res.**, 5 : 263-270.
- Mellerowicz E. J., Baucher M., Sundberg B., Boerjan W. (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot. stem. **Plant Mol. Biol.**, 47 (1-2) : 239-274.
- Meyer K., Cusumano J. C., Somerville C., Chapple, C. C. S. (1996) Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. **P. N. A. S of the USA**, 93 (14) : 6869-6874.
- Millam S., Obert B., Pret'ova A. (2005). Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. **Plant Cell, Tiss. and Org. Cul.**, 82 : 93-103.
- Mir Derikvand M., Sierra J. B., Ruel K., Pollet B., Do C. -T., Thevenin J., Buffard D., Jouanin L., Lapierre C. (2008) Redirection of the phenylpropanoid pathway to feruloyl malate in *Arabidopsis* mutants deficient for cinnamoyl-CoA reductase 1. **Planta**, 227 : 943-956.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**, 9(10) : 490-498.
- Mitsuda N., Seki M., Shinozaki K., Ohme-Takagi M. (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulates secondary wall thickening and are required for anther dehiscence, **Plant Cell**, 17 : 2993–3006.
- Mitsuda N., Iwase A., Yamamoto H., Yoshida M., Seki M., Shinozaki K., Ohme-Takagi 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

Møller I. M., Jensen P. E., Hansson A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 58 : 459-481.

Morreel K., Ralph J., Kim H., Lu F., Goeminne G., Ralph S., Messens E., Boerjan W. (2004) Prolifing of oligolignols reveals monolignol coupling condition in lignifying poplar xylem. **Plant Physiol.**, 136 : 3537-3549.

Morvan C., Abdul-Hafez A., Morvan O., Jauneau A., Demarty M. (1989) Physicochemical and biochemical studies of polysaccharides solubilized from under-retted flax. **Plant Physiol. Biochem.**, 27 (3) : 451-459

Morvan C., Andème-Onzighi C., Girault R., Himmelsbach D. S., Driouich A., Akin D. E. (2003) Building flax fibres : more than one brick in the walls. **Plant Physiol. Biochem.**, 41 : 935-944.

Müller M., Czihak C., Vogl G., Fratzl P., Schober H., Riekkel C. (1998) Direct observation of microfibril arrangement in a single native cellulose fiber by microbeam small angle X-ray scattering. **Macromolecules**, 31 : 3953-3957.

Müller M., Czihak C., Burghammer M., Riekkel C. (2000) Combined X-ray microbeam small angle scattering and fibre diffraction experiments on single native cellulose fibres. **J. Appl. Cryst.**, 33 817-819.

N

Nagano S., Tanaka M., Ishimori K., Watanabe Y., Morishima I. (1996) Catalytic roles of the distal site Asparagine-Histidine couple in peroxidases. **Biochem.**, 35 : 14251-14258.

Nishida K., Katayama Y., Morohoshi N. (1991) Isolation of plant peroxidase involved in the lignification. **Bull. Exp. For.**, 28 : 57-64.

Nishiyama Y., Langan P., Chanzy H. (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **J. Am. Chem. Soc.**, 124 (31) : 9074-9082.

Nishiyama Y., Sugiyama J., Chanzy H., Langan P. (2003) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **J. Am. Chem. Soc.**, 125 (47) : 14300-14306.

Normanly J., Bartel B. (1999) Redundancy as a way of life - IAA metabolism. **Curr. Op. Plant Biol.**, 2 : 207-213.

O

Olson P. D., Varner J. E. (1993) Hydrogen peroxide and lignification. **Plant J.**, 4(5) : 887-892.

O'Malley D., Whetten R., Bao W., Chen C.-L., Sederoff R. R. (1993) The role of laccase in lignification. **Plant J.**, 4 (5) : 751-757.

Oplinger E. S., Oelke E. A., Doll J. D., Bundy L. G., Schuler R. T. (1989). Flax. *In* **Alternative Field Crops Manual**.

Disponible à l'adresse <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/flax.html>

Østergaard L., Teilum K., Mirza O., Mattsson O., Petersen M., Welinder K. G., Mundy J., Gajhede M., Henriksen A. (2000) *Arabidopsis* ATP A2 peroxidase. Expression and high-resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. **Plant Mol. Biol.**, 44 : 231-243.

Otte O., Barz W. (2000) Characterization and oxidative in vitro cross linking of an extensin like protein and a proline-rich protein purified from chick pea cell walls. **Phytochem.**, 53:1-5.

P

Paredez A. R., Somerville C. R., Ehrhardt D.W. (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules, **Science**, 312 : 1491-1495.

Park S. Y., Ryu S. H., Kwon S. Y., Lee H. S., Kim J. G., Kwak S. S. (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweet potato in response to stress. **Mol. Genet. Gen.**, 269 : 542-552.

Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. **Phytochem.**, 65 : 1879-1893.

Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Rep.**, 24 : 255-265.

Passardi F., Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Margis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand C. (2007) PeroxiBase : the peroxidase data base. **Phytochem.**, 68 : 1605-1611.

Pastori G. M., Foyer C. H. (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiol.**, 129 : 460-468.

Patzlaff A., McInnis S., Courtenay A., Surman C., Newman L. J., Smith C., Bevan M. W., Mansfield S., Whetten R. W., Sederoff R. R., Campbell M.M. (2003a) Characterization of a pine MYB that regulates lignification, **Plant J.**, 36 : 743–754.

Patzlaff A., Newman L. J., Dubos C., Whetten R. W., Smith C., McInnis S., Bevan M. W., Sederoff R. R., Campbell M.M. (2003b) Characterization of PtMYB1, an R2R3-MYB from pine xylem, **Plant Mol. Biol.**, 53 : 597–608.

Pelmont J. (1995) Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. pp1033.

Peter G., Neale D. (2004) Molecular basis for the evolution of xylem lignifications. **Curr. Op. in Plant Biol.**, 7 : 737-742.

Pilate G., Chabbert B., Cathala B., Yoshinaga A., Leplé J. -C., Laurans F., Lapierre C., Ruel K. (2004) Lignification and tension wood. **C. R. Biologies**, 327 : 889–901.

Pomar F., Caballero N., Pedreño M.A., Ros Barceló A. (2002) H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. **FEBS Lett.**, 529 : 198-202.

Pourcel L., Routaboul J.-M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., Debeaujon I. (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxydative polymerisation of flavonoids in Arabidopsis seed coat. **Plant Cell**, 17 : 2966-2980.

Pickett-Heaps J. D. (1968) Xylem wall deposition. Radioautographic investigations using lignin precursors. **Protoplasma**, 65 : 181-205.

Preston R. D. (1986) Natural cellulose. *In* : Cellulose : structure, modification and hydrolysis, Young R. A., Rowell R. M. (eds), pp 3-27.

Price N.J., Pinheiro C., Soares C.M., Ashford D.A., Ricardo C.P., Jackson P.A. (2003) A Biochemical and Molecular Characterization of LEP1, an Extensin Peroxidase from Lupin. **J. Biol. Chem.**, 278 (42) : 41389-41399.

Q

Quiroga M., Guerrero C., Botella M. A., Barceló A., Amaya I., Medina M. I., Alonso F. J., Milrad de Forchetti S., Tigier H., Valpuesta V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiol.**, 122 : 1119-1127.

R

- Ralph J., Quideau S., Grabber J. H., Hatfield R. D. (1994) Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1** (23) : 3485-3498
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P. F., Marita J. M., Hatfield R. D., Christensen J. H., Boerjan W. (2004a) Lignins : natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochem. Rev.**, 3 : 29-60.
- Ralph J., Bunzel M., Marita J. M., Hatfield R. D., Lu F., Kim H., Schatz P. F., Grabber J. H., Steinhart H. (2004b) Peroxidase dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. **Phytochem. Rev.**, 3, 79-96.
- Ranocha P., Chabannes M., Chamayou S., Danoun S., Jauneau A., Boudet A.-M., Goffner D. (2002) Laccase down-regulation cause alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. **Plant Physiol.**, 129 : 145-155.
- Rasmussen S., Dixon R. A. (1999) Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. **Plant Cell**, 11 (8) : 1537-1551
- Rebolé A., Rodriguez M. L., Ortiz L. T., Alzueta C., Centeno C., Treviño C. (2002) Mucilage in linseed : effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in broiler chicks. **J. Food Sci. Agric.**, 82(10) : 1171-1176.
- Ridge I., Osborne D. J. (1971) Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cell wall is increased by ethylene. **Nature : New Biology**, 229 (7) : 205-208.
- Ridley B. L., O'Neill M. A., Mohnen D. (2001) Pectins : structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. **Phytochem.**, 57 : 929-967.
- Roach M. J., Deyholos M. K. (2007) Micro-array analysis of flax (*Linum Usitatissimum* L.) stems identifies transcripts enriched in fibre-bearing phloem tissues. **Molecular Genetics and Genomics** 278 (2) : 149-165.
- Rodriguez-Lopez J. N., Smith A. T., Thorneley R. N. F. (1996) Role of Arginine 38 in horseradish peroxidase. A critical residue for substrate binding and catalysis. **J. Biol. Chem.**, 271(8) : 4023-4030.
- Rolando C., Daubresse N., Pollet B., Jouanin L., Lapierre C. (2004) Lignification in poplar plantlets fed with deuterium-labelled lignin precursors. **C.R. Acad. Biol.**, 327 (9-10) : 799-807.

Romano C. P., Hein M. B., Klee H. J. (1991) Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. **Genes Devel.**, 5 : 438-446.

Ros Barceló A., Pomar F. (2001) Oxidation of cinnamyl alcohol and aldehydes by basic peroxidase from lignifying *Z. elegans* hypocotyls. **Phytochem.**, 57 : 1105-1113.

Ros Barceló A. (2005) Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. **Planta**, 220 : 747-756.

Ros- Barceló A., Gómez-Ros L. V., Carrasco A. E. (2007) Looking for syringyl peroxidases. **TRENDS in Plant Science**, 12 (11) : 486-491.

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 (12) : 1421-1435.

Rose, J.K.C., Catala R., Gonzalez-Carranza R. H., Roberts J. A. (2002) Ch9. Cell wall disassembly. In : The plant cell wall. **Ann. Plant Rev.**, Vol 8. Eds : Rose J. K. C. pp 264-325.

S

Sablowski R. W. M., Moyano E., Culianez-Macia F. A., Schuch W., Martin C., Bevan M. (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes, **EMBO J.**, 13 : 128–137.

Samuels A. L., Rensing K. H., Douglas C. J., Mansfield S. D., Darmawardhana D. P., Ellis B. E. (2002) Cellular machinery of wood production : differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. **Planta**, 216 : 72-82.

Sañudo-Barajas J. A., Labavitch J., Greve C., Osuna-Enciso T., Muy-Rangel D., Siller-Cepeda J. (2009) Cell wall disassembly during papaya softening: Role of ethylene in changes in composition, pectin-derived oligomers (PDOs) production and wall hydrolases. **Postharvest Biology and Technology**, 51 (2) : 158-167.

Sarkanen S., Razal, R.A., Piccariello, T., Yamamoto, E., Lewis, N.G. (1991) Lignin peroxidase: Toward a clarification of its role in vivo, **J. Biol. Chem.**, 266 (6) : 3636-3643

Sarkanen K. V., Ludwig C. H. (1971) In : Lignins occurrence, formation, structure and reactions Sarkanen K. V., Ludwig C. H. (eds) New York, 916 p.

- Sasaki S., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2004) Lignin dehydrogenative polymerization mechanism : a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in β -O-4 linkage. **FEBS Lett.**, 562 : 197-201.
- Sasaki S., Baba K., Nishida T., Tsutsumi Y., Kondo R. (2006) The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. **Plant Mol. Biol.**, 62 : 797-807.
- Sasaki S., Shimizu M., Wariishi H., Tsutsumi Y., Kondo R. (2007) Transcriptional and translational analyses of poplar anionic peroxidase isozymes. **J. Wood Sci.**, 53 : 427-435.
- Sato Y., Bao W. L., Sederoff R., Whetten R. (2001) Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). **J. Plant Res.**, 114 : 147-155.
- Savidge R. A. (1989) Coniferin, a biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in conifers. **Can. J. Bot.**, 67 : 2663-2668.
- Savidge R. A., Förster H. (1998) Seasonal activity of uridine 5'-diphosphoglucose : coniferyl alcohol glucosyltransferase in relation to cambial growth and dormancy in conifers. **Can. J. Bot.**, 76 : 486-493.
- Schnabelrauch L.S., Kieliszewski M., Upham B.L., Alizedeh H., Lamport D.T.A. (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site, **Plant J.**, 9 (4) : 477-489.
- Schmid G., Hammer D. K., Ritterbusch A., Grisebach H. (1982) Appearance and immunohistochemical localization of UDP-glucose : coniferyl alcohol glucosyltransferase in spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings. **Planta**, 156 : 207-212.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P., Werck-Reichhart D. (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. **J.Biol. Chem.**, 276 (39) : 36566-36574.
- Schopfer P. (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: Implications for the control of elongation growth. **Plant J.**, 28 (6) : 679-688.
- Schuller D. J., Ban N., Van Huystee R. B., McPherson A., Poulos T. L. (1996) The crystal structure of peanut peroxidase. **Structure**, 4(3) : 311-321.

Schultz C. J., Rumsewicz M. P., Johnson K. L., Jones B. J., Gaspar Y. M., Bacic A. (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. **Plant Physiol.**, 129 (4) : 1448-1463.

Schwarze F. W. M. R. (2007) Wood decay under the microscope. **Fungal Biology Reviews**, 21 : 133-170.

Sibout R., Eudes A., Mouille G., Pollet B., Lapierre C., Jouanin L., Séguin A. (2005) CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. **Plant Cell**, 17 : 2059-2076.

Singh A. P., Schmitt U., (2000). High variability in the distribution of lignin in the middle lamella of rubber-wood (*Hevea brasiliensis*) cells. *In*: Kim YS (ed), New horizons in wood anatomy. Chonnam National Univ. Press, Kwangju/Korea, pp. 203–207.

Sitbon F., Hennion S., Little C. H. A., Sundberg B. (1999) Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition. **Plant Science**, 141 (2) 165-173.

Smith A. T., Veitch N. C. (1998) Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Curr. Op. Chem. Biol.**, 2 : 269-278.

Sturcova A., His I., Apperley D. C., Sugiyama J., Jarvis M. C. (2004) Structural Details of crystalline cellulose from higher plants. **Biomacromolecules**, 5 : 1333-1339.

T

Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackay S., Culianez-Macia F. A., Roberts K., Martin C. (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco, **Plant Cell**, 10 : 135–154.

Taylor J. G., Page Owen Jr. T., Koonce L. T., Haigler C. H. (1992) Dispersed lignin in tracheary elements treated with cellulose synthesis inhibitors provides evidence that molecules of the secondary cell wall mediate wall patterning. **Plant J.**, 2 (6) : 959-970

Terashima N., Fukushima K., Takabe K. (1986) Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia Kobus* DC. **Holzforschung**, 40 suppl. 101-105.

Terashima N., Fukushima K., He L. -F., Takabe K. (1993) Comprehensive model of the lignified plant cell wall. *In* : Forage Cell Wall Structure and Digestibility pp 247-270. H. G. Jung, Buxton D. R., Hartfield R. D., Ralph J. (Eds) ASA-CSSA-SSSA, Madison WI.

Thompson L. U., Chen J. M., Li T., Strasser-Weippl K., Goss P. E. (2005) Dietary flaxseed alters tumor biological markers in post menopausal breast cancer, **Clin. Cancer Res.**, 11 (10) 3828-3835.

Tijen T.-O., Kemal K., Nermin G. (2001) Decreased peroxidase activity in transgenic tobacco and its effect on lignification. **Biotechnol. Lett.**, 23 : 267-273.

Tognolli M., Penel C., Greppin H., Simon P. (2002) Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 288 : 129-138.

Tsuji Y., Chen F., Yasuda S., Fukushima K. (2004) The Behaviour of Deuterium-labelled monolignol and monolignol glucosides in lignin biosynthesis in angiosperms. **J. Agric Food Chem.**, 52 : 131-134

Tsuji Y. et Fukushima K. (2004) Behaviour of monolignol glucosides in angiosperms. **J. Agric Food Chem.**, 52 : 7651-7659.

Tsuji Y., Chen F., Yasuda S., Fukushima K. (2005) Unexpected behaviour of coniferin in lignin biosynthesis of *Ginkgo biloba* L. **Planta**, 222 : 58-69.

Tsutsumi Y., Matsui K., Sakai K. (1998) Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringyl and guaiacyl type lignins. **Holzforschung**, 52 : 275-281.

V

Van Doorselaere J., Baucher M., Chognot E., Chabbert B., Tollier M. T. (1995) A novel lignin in poplar trees with reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. **Plant J.**, 8 : 885-864.

Vanholme R., Moreel K., Ralph J., Boerjan W. (2008) Lignin engineering. **Curr. Opin. in Plant Biol.**, 11 (3) : 278-285

Veitch N. C. (2004) Structural determinants of plant peroxidase function. **Phytochem. Rev.**, 3 : 3-18.

Vidal S., Doco T., Williams P., Pellerin P., York W. S., O'Neill M. A. (2000) Structural characterization rhamnogalacturonan II : evidence for back-bone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydr. Res.**, 326 : 277-294.

Vieira Dos Santos C., Delavault P., Letousey P., Thalouarn P. (2003) Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobancha ramosa* infection. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 62 : 297-303.

W

Wallace G., Fry S. C. (1995) In vitro peroxidase-catalysed oxidation of ferulic acid esters. **Phytochem.** 39 (6) : 1293-1299.

Wakabayashi K., Hoson T., Huber D. J. (2003) Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: A comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. **J. Plant Physiol.**, 160 (6) : 667-673.

Welinder K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Curr. Op. Struct. Biol.**, 2 : 388-393.

Welinder K.G., Justesen A. F., Kjærsgård I. V., Jensen R. B., Rasmussen S. K., Jespersen H. M., Duroux L. (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. **Eur. J. Biochem.**, 269 : 6063-6081.

Whetten R. W. (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 49 : 585-609.

Whetten R., Sederoff R. (1995) Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, 7 : 1001-1013.

Williamson R. E., Burn J. E., Hocart C. H. (2001) Cellulose synthesis : mutational analysis and genomic perspectives using *Arabidopsis thaliana*. **Cell Mol. Life Sci.**, 58 (10) : 1475-1490.

Wu G., Shortt B. J., Lawrence E. B., León J., Fitzsimmons K. C., Levine E. B., Raskin I., Shah D. M. (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. **Plant Physiol.**, 115 : 427-435.

Y

Yamamoto E., Inciong M. E. J., Davin L. B., Lewis N. G. (1990) Formation of cis-Coniferin in cell-free extracts of *Fagus grandifolia* Ehrh bark. **Plant Physiol.**, 94 : 209-213.

Yang C., Xu Z., Song J., Conner K., Barrena G.V., Wilson Z.A. (2007) *Arabidopsis* MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence, **Plant Cell**, 19 : 534–548.

Ye Z. -H., Varner J. E. (1995) Differential expression of two O-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. **Plant Physiol.**, 108 : 459-467.

Z

Zabackis E., Huang J., Muller B., Darvill A. G., Albersheim P. (1995) Structure of plant cell walls. 34. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Physiol.**, 107 : 1129-1138.

Zhang J. (2003) Evolution by gene duplication : an update. **TRENDS in Ecology and evolution.**, 18(6) : 292-298.

Zeliha, Tijan O., Ahu A., Kasim B., Kemal K., Nermin G., Melih B., Turan T., Tahsin A., Öznur Ö, Mehmet Ç., Korhan T., Müntaz T., Hülya B., Hulki T (1999) Reduced leaf peroxidase activity is associated with reduced lignin content in transgenic poplar. **Plant Biotechnol.**, 16 : 381-387.

Zhong R., Demura T., Ye Z. -H. (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*, **Plant Cell**, 18 : 3158–3170.

Zhong R., Ye Z. H. (2007) Regulation of cell wall biosynthesis. **Curr. Op. in Plant Biol.**, 10 (6) : 564-572.

Zhong R, Richardson E. A, Ye Z. -H. (2007) The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 19 (9) : 2776-2792

Zhong R., Richardson E. A., Ye Z. -H. (2007) 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., 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 (10) : 2763-2782.

RESUME

Le lin est une angiosperme annuelle dicotylédone connue pour ses fibres cellulosiques longues aux propriétés remarquables. Ces fibres se distinguent des cellules du bois par leur faible teneur en lignine et la distribution de ce polymère au sein des couches pariétales formant la fibre.

Afin de mieux comprendre les facteurs contrôlant le taux de lignine dans les différents tissus de lin, nous avons entrepris une étude détaillée de la lignification au moyen d'approches microscopiques et biochimiques. Dans un premier temps, nos travaux ont souligné des similarités (lignine gäiacycle, liaisons condensées, détection du motif dibenzodioxocine et de la coniférine) entre la lignine de lin et celle des conifères.

Une approche biochimique a montré que l'activité oxydasique majeure dépendrait des peroxydases. La partielle purification et des caractérisations initiales (électrophorèses natives, IEF, affinité de substrat) des peroxydases pariétales ont mis en évidence des différences importantes entre les isoformes du xylème, et celles des tissus externes (riches en fibres) de la tige.

L'utilisation du chlorure de cérium a permis de préciser la distribution subcellulaire de l' H_2O_2 (catalyseur de polymérisation) dans la tige du lin au stade floraison. Dans les fibres longues, l' H_2O_2 n'a pu être détecté que dans la région médiane de la tige. En revanche l' H_2O_2 était présente dans toutes les cellules du xylème examinées.

Des observations en ESEM et en microscopie confocale suggèrent que les fibres longues de lin forment un réseau dense qui limite la pénétration de protéines. L'ensemble de ces résultats souligne les différences entre le xylème et fibres longues pouvant expliquer en partie la faible lignification des fibres externes.

ABSTRACT

The angiosperm flax is an annual dicotyledon grown for its cellulose-rich bast fibres that show interesting properties. These fibres are characterized by a low lignin level in the different layers of the fibre cell wall that distinguishes them from xylem cells.

In order to obtain a better understanding of the factors controlling lignin levels in different flax stem tissues we have undertaken a detailed study of lignification using microscopic and biochemical approaches. Initial results underlined similarities (guaiacyl lignin, condensed bonds, presence of dibenzodioxocine and coniferin) between flax lignin and that of conifers.

A biochemical approach showed that the major oxidase activity was provided by peroxidases. Partial purification and initial characterization (native electrophoresis, IEF, substrate affinities) of cell wall peroxidases indicated important differences between the isoforms present in xylem and outer (fibre-rich) stem tissues.

The use of cesium chloride allowed us to determine the cellular locations of H_2O_2 (polymerisation catalyst) in flax stems at the flowering stage. In bast fibres, H_2O_2 was only detected in the median region of the stem. In contrast H_2O_2 was observed in all xylem cells examined.

Observation by ESEM and confocal microscopy suggested that the cell walls of flax bast fibres form a dense network that limits protein penetration. Altogether, these results highlight a number of differences between flax xylem and bast fibres that could partially explain the low lignification of the external bast fibres.