ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Alimentation
Biologie
Environnement
Santé

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Sciences du vivant

présentée et soutenue publiquement par

Yu ZHANG

le 19 Décembre 2012

Mise en place de la réticulation des parois de maïs au cours du développement et impact sur la variabilité de la dégradabilité des polysaccharides pariétaux

Directrice de la thèse : **Valérie MECHIN**
Co-encadrante de la thèse : **Stéphanie BAUMBERGER**

Jury

Mme Lise JOUANIN, Directrice de Recherche CNRS, Versailles	Rapporteuse
M. Gilles PILATE, Directeur de Recherche INRA, Orléans	Rapporteur
Mme Brigitte CHABBERT, Chargée de Recherche INRA, Reims	Examinatrice
M. Yves BARRIERE, Directeur de Recherche INRA, Lusignan	Examinateur
M. Jean-Pierre MARTINANT, M, Limagrain Europe, Chappes	Examinateur

INRA-AgroParisTech - Centre de Versailles-Grignon
78026 Versailles Cedex, France.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont adressés aux membres de mon jury : à Lise Jouanin et à Gilles Pilate qui ont très gentiment accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi à Brigitte Chabbert, Yves Barrière et Jean-Pierre Martinant qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie aussi tous les membres de mon comité de thèse : Elisabeth JAMET, Fabienne Guillon, Herman Höfte, Lise Jouanin et Yves Barriere pour le temps qu'ils m'ont consacré, pour leur soutien et pour tous les conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés.

Evidemment, ce travail n'aurait jamais pu être mené à bien sans l'implication de Valérie Méchin, ma directrice de thèse, pour m'avoir accepté sur ce projet et encadré en partie ce travail. Je voudrais d'abord la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée au cours de ces trois années. Merci pour ses nombreux conseils, toujours pertinents, et pour son soutien. Nulles paroles ne peuvent exprimer ma reconnaissance, mon profond respect et ma fidèle gratitude. Je tiens également à remercier Stéphanie Baumberger, ma co-dirigée de thèse, ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité m'ont toujours été précieux. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe qui a travaillé avec moi au quotidien, Tout d'abord, Catherine Lapierre pour son aide constante et le temps qu'elle m'a consacré. Je voudrais également remercier Brigitte Pollet, Frédérique Legée, Laurent Cézard et Sylvain legay pour leur amitié, leur encouragement et leur soutien au cours de ces années. Je n'oublie pas non plus l'aide précieuse de Bernard Cintrat, sans qui la vie pendant ma thèse serait bien plus compliquée.

Je remercie très sincèrement David Legland qui m'a initié à l'analyse d'image et a apporté toutes ses connaissances dans ce domaine pour l'interprétation des différents résultats obtenus au cours de ma thèse. Mes remerciements s'adressent également à Fabienne Guillon et Marie-Françoise Devaux pour sa disponibilité et son investissement dans l'analyse anatomique par granulométrique.

Je n'oublie pas de remercier Christiane Minault, Corine Melin, Dominique Denoue et Pascal Vernoux, les collègues de l'INRA de Lusignan, pour le temps qu'ils ont consacré à la réalisation de certains prélèvements et analyses, mais aussi pour l'ambiance de travail et les relations humaines. Je tiens également à remercier tout particulièrement Yves Barrière

d’accepter de m’accueillir dans son laboratoire pour faire certaines analyses de ses conseils et sa sympathie.

Je tiens également à remercier Domenica Manicacci pour m’avoir initié à l’analyse statistique, ses conseils, sa sympathie, et sa disponibilité tout au long de ma thèse. Merci également à Santa Heiss-Blanquet pour l’intérêt qu’elle a porté au travail, de nous fournir la cellulase, d’accepter de m’accueillir dans son laboratoire pour faire certaines analyses et de ses conseils.

Je pense également aux autres thésards Mika, Wenjia et Ying. Je vous souhaite une bonne route sur ce long chemin qui est la thèse.

Bien sûr, je pense à ma famille. Sans le soutien de ma femme et mes parents, il m’aurait été difficile de réaliser ce travail. Je leur dédicace ce travail.

Je finis par remercier toute personne ayant contribué à la réalisation de cette thèse que je n’ai pas citée.

A tous un grand merci…

LISTE DES ABREVIATIONS

4CL : hydroxycinnamate CoA ligase

ADF : acid detergent fiber

ADL : acid detergent lignin

ADS : acid detergent solution

ASE : Accelerated Solvent Extraction ®

AX : arabinoxylanes

bm : brown midrib

BAHD : benzylalcohol O-acetyltransferase, anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase, anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyl transferase, and deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase

BSTFA : N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

C3H : *p*-coumarate 3-hydroxylase

CAD : cinnamyl alcohol dehydrogenase

CCoAOMT : caffeoyl CoA O-methyl transferase

CCR : cinnamoyl CoA reductase

CLHP : chromatographie liquide haute performance

cOMT : catechol-O-methyltransferase

CPG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CTAB : cetyl trimethylammonium bromide

diFA : diférulate

D tige : diamètre de la tige juste en dessous de l'épi principal

F5H : férulate-5-hydroxylase

FA : acide férulique

FAest / eth : acide férulique estérifié / éthérifié

G : sous unités guaïacyles

GAX : glucuronoarabinoxylanes

GC-MS : gas chromatography–mass spectrometry

H : sous unités *p*-hydroxyphényles

H épi : hauteur d'insertion de l'épi principal

H plant : hauteur des plantes

HPSEC : chromatographie d'exclusion stérique

IVCWRD : *in vitro* cell wall residues digestibility

IVNDFD : in vitro NDF digestibility

IVDMD : *in vitro* dry matter digestibility

KL : lignine Klason

Liaisons C-C : liaisons carbone-carbone

LR : lignées recombinantes

MDA : monodehydroascorbate

MS : matière sèche

NDF : neutral detergent fiber

NIRS : near-infrared spectroscopy

PC : acide *p*-coumarique

PCest : acide *p*-coumarique estérifié

QTL : quantitative trait locus

Rdt dégradable : rendement de la matière sèche dégradable

Rendement β-O-4 : quantité totale de monolignols liés uniquement par des liaisons β-O-4

RILs : recombinant inbred lines

RMN : résonance magnétique nucléaire

RP : résidu pariétal

S : sous unités siryngyles

sfe : seedling ferulate ester

S-PC : acide *p*-coumarique conjugué avec l'alcool sinapylique

UV : ultra-violet

%S-PC : pourcentage d'unité S acylée par *p*-coumarate

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 7

1. Le maïs, une ressource essentielle pour l'alimentation animale et pour la production de biocarburant 8

1.1. Les avantages de la culture du maïs 8

1.2. La production du maïs et ses débouchés 9

1.3. La production du biocarburant issu du maïs 11

2. Maïs, valeur alimentaire et dégradabilité de paroi 12

2.1. La valeur alimentaire du maïs 12

2.2. Dégradabilité de parois et composition pariétale 13

2.3. Etude des lignocelluloses chez le maïs 14

3. Objectifs et travail de thèse 15

Recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de parois, dans un contexte de teneur en lignine fixée, et impacts sur les performances agronomiques chez le maïs 15

Etude de la mise en place de la lignification et de la réticulation de la paroi au cours du développement 16

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 19

1. Polymères et assemblages moléculaires de la paroi végétale 20

1.1. La cellulose 21

1.2. Les hémicelluloses 23

1.3. Les lignines 25

1.4. Les acides *p*-hydroxycinnamiques 35

2. Mise en place de la lignification au cours du développement 41

2.1 - Mise en place des parois au cours du développement cellulaire 41

2.2 - Mise en place des tissus lignifiés au cours du développement d'un entre nœud de maïs 44

3. Les facteurs clés explicatifs des variations de dégradabilité des parois 48

3.1. Impact de la composition monomérique et de la structure des lignines sur la dégradabilité des parois 50

3.2. Impact sur la dégradabilité des parois d'une spécificité forte des parois de graminées : la présence d'acides *p*-hydroxycinnamiques 54

3.3. Impact des différents tissus d'une tige sur la dégradabilité des parois 60

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES 64

1. Le matériel végétal 65

1.1. Les 8 lignées recombinantes (LR) choisies dans la population issue du croisement entre F286 et F7012 65

1.2. Les 7 lignées naturelles de maïs choisies 65

2. Les expérimentations au champ 66

2.1. Culture et récolte en plantes entières sans épis pour les 8 LR 66

2.2. Culture et prélèvements au cours du développement des entrenœuds pour les 7 lignées 67

3. Les méthodes d'analyses biochimiques mises en œuvre 68

3.1. Détermination de la teneur en paroi et obtention du résidu pariétal (RP) 68

3.2. Détermination de la teneur en lignines 69

3.3. Détermination de la composition monomérique des lignines par thioacidolyse ... 70

3.4. Détermination des teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques 71

3.5. Estimation des dégradabilités 74

4. Les méthodes utilisées pour l'étude histologique 74

4.1. Coupe des tiges de maïs 74

4.2. Coloration des coupes de tiges de maïs 74

4.3. Acquisition des images 75

4.4. Analyses des images 77

5. Les méthodes d'analyses statistiques des résultats 78

5.1. Analyse de variance au sein des 8 LR ainsi que les deux lignée parents 78

5.2. Analyse de variance au sein des trois lignées prélevé en cinétique 79

5.3. Corrélations et régressions multiples 79

CHAPITRE III : RECHERCHE DES FACTEURS BIOCHIMIQUES EXPLICATIFS DES VARIATIONS DE DEGRADABILITE DE PAROI DANS UN CONTEXTE DE TENEUR EN LIGNINES FIXE ET IMPACTS SUR LES PERFORMANCES AGRONOMIQUES CHEZ LE MAÏS 80

INTRODUCTION 81

1. Recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations pour la dégradabilité des parois de maïs dans un contexte de teneur comparable en lignine (Article I). 84

2. Variabilité génétique pour les caractéristiques agronomiques et études des relations avec les facteurs biochimiques pariétaux et la dégradabilité des parois. 93

2.1. Variabilité génétique pour les facteurs morphologiques au sein des 10 génotypes 93

2.2. Etude des relations entre les facteurs morphologiques et les facteurs biochimiques 94

2.3. Relations entre les facteurs morphologiques et la dégradabilité de paroi 97

CONCLUSION 101

CHAPITRE IV : MISE EN PLACE DES PAROIS, DE LEUR LIGNIFICATION ET DE LEUR RETICULATION AU SEIN DE LA TIGE DE MAÏS PENDANT LE DEVELOPPEMENT 104

INTRODUCTION 105

1. Etude cinétique de la mise en place de la lignification des parois et les différents composants pariétaux au cours du développement des plantes (Article II). 107

2. Etude cinétique de la distribution spatiale des lignines au sein des entrenœuds de maïs par analyse automatique d'images de coupes colorées au Fasga. 135

2.1. Color quantification of Fasga stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem (Article III). 135

2.2. Analyse anatomique par granulométrique en niveau de gris 164

2.3. Analyse cinétique de la distribution spatiale des lignines au sein des entrenœuds des trois génotypes de maïs F324, F66 et F7037 166

2.4. Analyse des relations entre la dégradabilité de la paroi et les facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux 174

CONCLUSION 178

CHAPITRE V : SYNTHESE – TRAVAUX A POURSUIVRE – DISCUSSION GENERALE 180

1. Compréhension de la lignification 181

1.1. Développements méthodologiques autour de l'estimation de la lignification 181

1.2. Mise en place des parois et de leur lignification au cours du développement de l'entrenœud de maïs 183

2. Facteurs explicatifs des variations de dégradabilité des parois et mise en place de la lignification des parois au cours du développement 185

2.1. Facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de paroi des plantes au stade ensilage 185

2.2. Mise en place de la lignification des parois au cours du développement 187

2.3. Variabilité génétique de la distribution spatiale des lignines au sein de l'entrenœud 189

2.4. Mise en place de *p*-coumaroylation des parois 190

2.5. Comparaison schématique de F324, F66 et F7037 au cours du développement . 191

3. Travaux à poursuivre à plus ou moins long terme 192

3.1. Complément de l'analyse cinétique de la mise en place des parois 192

3.2. Démonstration de l'effet de la proportion de liaisons β-O-4 sur la dégradabilité 193

3.3. Mise en évidence de l'effet de l'acide *p*-coumarique sur la performance des parois secondaires 194

4. Comment moduler les différentes cibles mises à jour dans cette étude et aller vers une amélioration de la dégradabilité des parois 196

4.1. Modulation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère 197

4.2. Modulation de la *p*-coumaroylation 200

4.3. Distribution ciblée de la lignification au sein des différents tissus 202

CONCLUSION GENERALE 204

REFERENCES 208

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Du fait notamment de ses atouts économiques, nutritionnels et environnementaux le maïs est la plante la plus cultivée de la planète et l'une des principales ressources alimentaires mondiale. Aujourd'hui, le maïs contribue aussi à l'émergence de solution pour préserver l'environnement par son utilisation pour la production d'énergies renouvelables. Cependant le potentiel de valorisation, aussi bien en alimentation animale qu'en production bioénergétique, du maïs est limité par la lignification et la réticulation des parois. L'amélioration de la dégradabilité enzymatique des lignocelluloses est donc un objectif important pour ces deux types de valorisation. L'objectif de mon travail de thèse s'inscrit dans cette problématique et se focalise sur la recherche des facteurs biochimiques pariétaux qui permettent d'expliquer des variations de dégradabilité de paroi chez le maïs afin de comprendre comment optimiser la valorisation de la biomasse lignocellulosique chez le maïs.

1. Le maïs, une ressource essentielle pour l'alimentation animale et pour la production de biocarburant

1.1. Les avantages de la culture du maïs

Le maïs est l'une des trois céréales les plus cultivées au monde. La culture du maïs concerne près de 150 pays dans les cinq continents. La culture du maïs présent de nombreux avantages pour l'agriculteur (Peltier *et al.*, 2010) :

- une bonne valeur alimentaire : la plante entière de maïs est très riche en énergie exploitable par les ruminants. Elle peut être consommée verte ou conservée par fermentation grâce à l'ensilage. C'est l'unité fourragère qui a le meilleur rapport coût-qualité. En France, 70% du lait est produit à base de maïs ; 1 ha de maïs fourrage permet de produire 21 000 litres de lait soit la consommation annuelle de 350 personnes environ.

- des qualités d'adaptation : le maïs présente une qualité d'adaptation assez large grâce à une diversité génétique importante. Il est cultivé sous des climats très différents (tropical, méditerranéen et tempéré). Au cours des cinquante dernières années, le progrès génétique a permis la culture de maïs bien adaptés au changement climatique, et aux maladies. Presque

uniquement localisée dans le Sud-ouest de la France dans les années 50, la culture du maïs est désormais présente sur l'ensemble du territoire français.

- une bonne valorisation de l'eau apportée: le maïs est capable de produire plus de matière sèche avec la même quantité d'eau que les autres grandes cultures (Tableau I-1) grâce à son métabolisme de plante en C4 qui lui confère, comme au sorgho, une photosynthèse très efficace. En fait, seulement un quart des surfaces de maïs française sont irriguées.

- un fort potentiel de production allié à un bon respect environnemental des plantes en C4 à la photosynthèse particulièrement efficace. Le maïs produit par exemple deux fois plus d'oxygène à l'hectare que la forêt, là encore du fait de son métabolisme C4 qui lui permet d'absorber plus de CO_2 et de rejeter plus d'oxygène.

Tableau I-1. Quantité d'eau (litres) nécessaire pour produire 1 kg de matière sèche pour les grandes cultures (Peltier *et al.*, 2010).

Maïs fourrage	**238L**
Maïs grain	**454L**
Orge	524L
Pomme de terre	590L
Blé	590L
Soja	900L
Riz pluvial	1600L
coton	5263L

1.2. La production du maïs et ses débouchés

En 2010, la production mondiale de maïs a atteint un total de 813 millions de tonnes (Source : Gecodia.fr) (Figure I-1). Deux zones concentrent la majorité des récoltes : les USA (41 % de la production mondiale) et la Chine (19 %). La production de maïs au sein de l'Union Européenne a atteint 56,9 millions de tonnes, soit 7 % de la production mondiale. Elle a nettement progressé, son niveau n'atteignait que 15 millions de tonnes dans les années 1970. La France est l'un des pays qui dominent la production de maïs au sein de l'UE, soit 15 millions tonnes (26 % du total de l'UE).

En France, le maïs est la deuxième production végétale derrière le blé tendre. Les surfaces consacrées à sa culture se sont rapidement développées depuis années 1950, passant de

450 000 à 2 837 000 ha ! En 2010, elles représentent un peu plus de 10% de la surface agricole utile totale. Sur ces 3 millions d'ha de maïs cultivés en France, 85 à 87 % ont pour destination l'alimentation animale, sous plusieurs formes d'utilisation.

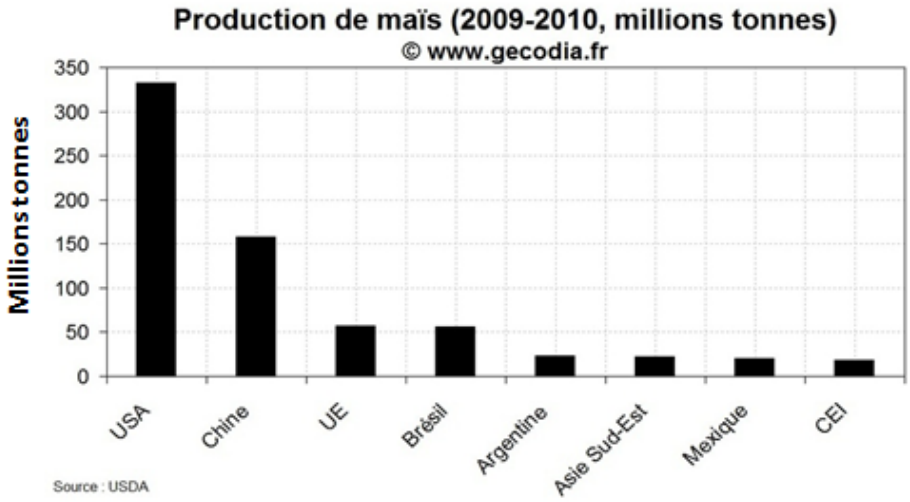


Figure I-1. Production mondiale de maïs en 2010. (Source : Gecodia.fr)

Le grain, récolté humide, ou employé sous sa forme sèche peut être utilisé directement dans la ration des animaux où il apporte à la fois l'énergie et le pouvoir colorant nécessaires aux productions de qualité (œufs, poulets, pintades, dindes, foie gras, etc.). Ensuite, les tiges, feuilles, rafles et grains de maïs peuvent être ensilés et utilisés comme ration de base pendant les périodes estivales et hivernales où l'herbe devient plus rare. Au stade ensilage, la plante entière de maïs est broyée puis tassée dans des silos. Conservé par la fermentation qui s'en suit, le maïs fourrage constitue la ration de base pour l'alimentation des bovins. Parmi ses atouts : une forte teneur en acides aminés ramifiés, minéraux et vitamines, qui favorise le fonctionnement du rumen ; un pouvoir tampon important, qui limite les risques d'acidose ; et une capacité d'amélioration de la fibrosité de la ration de base. La valeur alimentaire du maïs fourrage est cruciale à prendre en compte pour pouvoir sélectionner des maïs permettant de bonnes performances chez les ruminants et notamment une bonne production laitière.

1.3. La production du biocarburant issu du maïs

Aujourd'hui, le maïs est également une source potentielle de biomasse valorisable pour produire des biocarburants (Brésil, USA, France…), ou encore entrer dans des process de méthanisation (Allemagne). Comparée à la production d'essence à partir de pétrole, la production de bioéthanol mobilise deux fois moins d'énergie non renouvelable. La fabrication de bioéthanol soulève toutefois des questions environnementales et économiques.

La production mondiale de bioéthanol reste pour l'instant majoritairement une production de bioéthanol de première génération et se concentre à 70 % aux Etats-Unis et au Brésil, soit 26 milliards de litres par an (2010) (Peltier *et al.*, 2010). Le bioéthanol américain, à base de grains de maïs, représente 37 % de la production mondiale, soit 13.7 milliards de litres par an (2010). Le bioéthanol brésilien, 35 %, soit 13 milliards de litres par an (2010). Le gouvernement américain souhaite réduite de 20 % la consommation d'essence américaine dans les dix ans et veut y introduire au maximum de l'éthanol issu de la biomasse. L'union européenne figurait en 2010 au troisième rang mondial derrière les Etats-Unis et le Brésil en termes de production de biocarburants, avec une production nettement plus faible que celle des deux premiers (d'un facteur 10 environ).

Le bioéthanol issu de la biomasse est obtenu par la fermentation des sucres fermentescibles que contient cette biomasse. Il peut être élaboré à partir de biomasse riche en saccharose (canne à sucre, betterave sucrière, etc.), en amidon (maïs, orge, blé, pomme de terre, etc.) ou en cellulose (résidus agricoles tels que la paille ou les tiges de maïs, résidus forestiers, cultures énergétiques dédiées).

Les biocarburants de première génération produits à partir d'amidon (de maïs aux Etats Unis) ou de saccharose (de canne à sucre au Brésil) entrent en concurrence avec les besoins alimentaires et ont donc un effet négatif sur la sécurité alimentaire mondiale. Par ailleurs, leurs coûts de production sont élevés. Les biocarburants de seconde génération obtenus à partir de la biomasse lignocellulosique apparaissent comme une alternative très prometteuse aux biocarburants de première génération. Parce qu'ils utilisent de la biomasse non alimentaire, les biocarburants de seconde génération ne sont pas en concurrence directe avec les usages alimentaires et plus largement le développement de la biomasse en tant qu'énergie renouvelable aurait un potentiel plus large à des coûts de production plus faibles. De plus, les

bilans énergétiques et environnementaux des biocarburants de seconde génération sont considérés comme supérieurs à ceux de première génération.

2. Maïs, valeur alimentaire et dégradabilité de paroi

2.1. La valeur alimentaire du maïs

Pendant très longtemps, en termes de sélection du matériel végétal, aucune spécificité de l'utilisation sous forme d'ensilage n'a été envisagée (Argillier and Barriere, 1996) ; les hybrides de maïs sélectionnés pour l'utilisation en grain étaient aussi cultivés pour la production de fourrage. La sélection du maïs fourrage s'est donc uniquement faite sur des critères « grains » sans prise en compte de la valeur alimentaire. Cette sélection a entrainé une diminution de la dégradabilité du maïs fourrage des années 1950 à 1990 (Argillier and Barriere, 1996). Depuis 1998, le critère UFL (unité fourragère laitière) est maintenant pris en compte pour l'inscription des variétés au catalogue français de maïs ensilage.

La valeur alimentaire d'un fourrage réside dans 4 composantes : sa digestibilité, son appétibilité, sa valeur azotée et son ingestibilité. La valeur énergétique des fourrages est la teneur en énergie nette dans le système des unités fourragères. Dans un fourrage, le principal facteur de variation de la teneur en énergie nette des aliments est la dégradabilité de la paroi cellulaire. En effet, pour une cellule végétale, le contenu cellulaire est essentiellement dégradable (Tableau I-2) (Riboulet *et al.*, 2008) et ne constitue donc pas un facteur limitant de la valeur énergétique des fourrages. En revanche, la paroi cellulaire possède une variabilité importante pour la dégradabilité de ses différents constituants (Tableau I-3). Des variations génétiques très significatives ont ainsi été observées pour la dégradabilité *in vivo* des parois avec des valeurs allant de 35% à 60% (Barriere *et al.*, 2003). La dégradabilité des parois est donc un facteur essentiel pour des variations de la dégradabilité d'une plante entière (Barriere *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1993; Argillier *et al.*, 1995; Baumont *et al.*, 2009).

Tableau I-2. Proportion et dégradabilité moyenne des principaux constituants du contenu cellulaire du maïs (Riboulet *et al.*, 2008).

Composition du contenu cellulaire	Amidon	Glucides solubles	Protéines	Cendres	Lipides
% de la matière sèche	30%	10%	8%	4%	4%
Dégradabilité moyenne	100%	100%	90-99%	10-95%	90-99%

Tableau I-3. Proportion et dégradabilité moyenne des principaux constituants de la paroi cellulaire du maïs (Riboulet *et al.*, 2008).

Composition du contenu cellulaire	Hémicelluloses	Cellulose	Lignine
% de la matière sèche	20%	20%	4%
Dégradabilité moyenne	20-100%	20-100%	0%

2.2. Dégradabilité de parois et composition pariétale

La structure de la paroi végétale et la limitation de sa dégradabilité du fait de la lignification sera développée dans la synthèse bibliographique présentée dans la suite de ce manuscrit. De manière très synthétique, la paroi végétale du maïs est riche en polysaccharides qui sont en majorité de la cellulose et des hémicelluloses. La cellulose est un polymère de β1-4 glucane. Les hémicelluloses sont des assemblages complexes de sucres avec notamment des sucres en C5. On trouve aussi dans la paroi secondaire des composés phénoliques dont des lignines et des acides *p*-hydroxycinnamiques. Les lignines sont des copolymères de sous unités *p*-hydroxyphényle (H), guaïacyle (G) et syryingyle (S). Chez les graminées, les principaux acides *p*-hydroxycinnamiques trouvés dans la paroi sont l'acide férulique et l'acide *p*-coumarique. Au sein de la paroi, la cellulose est en interaction avec les hémicelluloses via des liaisons hydrogènes. Lesacide *p*-hydroxycinnamiques sont capables de former des liaisons entre les constituants pariétaux. Ainsi, la cellulose, les hémicelluloses et les composés phénoliques forment ensemble les lignocelluloses. Dans la paroi végétale, l'existence des

composés phénoliques limite l'accès enzymatique aux polysaccharides et altère ainsi la dégradabilité des fourrages. La cellulose et les hémicelluloses sont valorisées par les ruminants et sont donc des sources d'énergie dans les fourrages. Ces polymères sont à priori totalement dégradés à l'état pur (Grabber, 2005). Leur digestion n'est par contre que partielle dans l'environnement pariétal. En effet, les ruminants possèdent un complexe ruminal multi-compartiments qui offre un environnement optimal pour les micro-organismes qui digèrent les polysaccharides pariétaux (Van Soest, 1994) mais les lignines et les réticulations pariétales créent des barrières physiques qui empêchent les enzymes hydrolytiques d'atteindre les polysaccharides pariétaux, la valorisation du fourrage par l'animal est ainsi grandement limitée (Grabber, 2005; Jung *et al.*, 2012).

2.3. Etude des lignocelluloses chez le maïs

Le maïs est aujourd'hui une des plantes modèles pour l'étude de la lignocellulose. Sa croissance rapide, son haut rendement en biomasse ainsi que sa grande valeur énergétique sont des caractéristiques qui en font un bon candidat pour son utilisation comme plante énergétique ou comme fourrages. Chez les graminées, le maïs est probablement le plus étudié pour la réticulation des parois et leur dégradabilité enzymatique. La dégradabilité enzymatique sera aussi développée dans la synthèse bibliographique présentée plus loin.

Ces dernières années, de nombreux travaux ont permis d'améliorer notre compréhension de la synthèse de la lignine dans les plantes ainsi que des mécanismes par lesquels la lignification des parois cellulaires limite la dégradabilité. Ces études concernent la génétique, la génomique et la biochimie des lignines. Dans ces travaux relatifs à la biochimie des parois, la teneur en lignines est sans aucun doute le premier facteur limitant la dégradabilité des parois (Argillier *et al.*, 1996; Casler and Jung, 2006; Taboada *et al.*, 2010; Novo-Uzal *et al.*, 2011; Boon *et al.*, 2012). Cependant, il n'est pas possible de construire ou de sélectionner des plantes présentant une teneur drastiquement réduite en lignine. En effet, une lignification minimale est nécessaire pour assurer la tenue de la plante, protéger les plantes contre les attaques parasitaires ou encore assurer la conduction de la sève (Pedersen *et al.*, 2005). Il est donc nécessaire de rechercher les autres facteurs qui peuvent permettre d'améliorer la dégradabilité des parois tout en assurant une teneur minimale en lignine.

Mon travail de thèse tente de répondre à ces questions. Il s'insère dans le cadre de l'ANR MAGIC pilotée par V. Méchin et soutenue par l'Agence Nationale de la Recherche. Ce projet se focalise sur l'étude des parois de graminées avec le maïs comme modèle. Des approches de modélisation moléculaire et *in vitro* de la lignification viennent compléter les approches biochimiques développées sur des génotypes de maïs choisis. Trois types de matériel végétal ont été retenus dans ce projet. Des mutants naturels de maïs connus pour être affecté soit au niveau de leurs lignines (mutants brown midrib 1 à 4) ou de leurs polysaccharides ont été utilisés pour évaluer l'impact de ces modifications sur la paroi et sur sa dégradabilité. Des lignées recombinantes de maïs présentant des teneurs en lignines similaires et des dégradabilités de parois contrastées ont aussi été retenues pour analyser l'impact de la composition pariétale et de l'organisation des lignines sur la dégradabilité des parois. Enfin, 7 génotypes présentant eux aussi des teneurs comparables en lignine au stade ensilage et des dégradabilités de parois très contrastées ont été retenus au sein de la variabilité naturelle d'une collection de lignées de maïs. Ces 7 génotypes ont été prélevés à 6 stades de développement afin de pouvoir suivre la mise en place des parois et leur lignification au cours du développement des plantes. Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de cette ANR et plus particulièrement dans celui concernant l'étude des lignées recombinantes et des 7 lignées au cours de leur développement.

3. Objectifs et travail de thèse

L'objectif de mon travail de thèse est double.

Recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de parois, dans un contexte de teneur en lignine fixée, et impacts sur les performances agronomiques chez le maïs

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier l'impact des principaux facteurs biochimiques pariétaux sur la dégradabilité des parois en excluant le facteur « teneur en lignines ». Des lignées recombinantes de maïs sélectionnées en fonction de leur teneur en lignine proche mais avec des dégradabilités de paroi variables ont permis d'isoler et d'identifier certaines caractéristiques clés de la paroi des graminées qui permettent d'obtenir des dégradabilités de paroi améliorées. Nous avons pour mener à bien ce travail caractérisé biochimiquement ces lignées de façon approfondie. Ces analyses ont été suivies par des

analyses statistiques pour rendre compte de la variabilité génétique pour ces caractères d'une part et étudier les relations entre les différents caractères d'autre part pour réussir à rendre compte des variations de dégradabilité de paroi.

Dans un second temps, nous avons également étudié la variabilité génétique pour des caractéristiques morphologiques. Nous avons ensuite regardé les relations entre ces performances agronomiques, la composition biochimique des parois et la dégradabilité de ces parois. Une étude des relations entre facteurs biochimiques et facteurs morphologiques a ainsi été réalisée afin d'étudier les impacts des facteurs biochimiques explicatifs des variations de la dégradabilité des parois sur les performances agronomiques des plantes. L'objectif de cette partie de notre étude est de discuter de la possibilité d'améliorer la dégradabilité des parois tout en maintenant des performances agronomiques correctes pour les plantes.

Etude de la mise en place de la lignification et de la réticulation de la paroi au cours du développement

Dans la seconde partie de mon travail, j'ai choisi d'étudier si dans une base génétique plus large que celle visée dans le choix d'individus au sein d'une population de lignées recombinantes les facteurs identifiés dans la première partie étaient toujours de bons paramètres explicatifs des variations de dégradabilité de paroi. Pour ce faire, nous avons retenu 7 lignées de maïs présentant des teneurs en lignine comparables au stade ensilage et là encore une gamme de variation importante en termes de dégradabilité de paroi (pendant ma thèse, faute de temps nous avons choisi d'analyser seulement 3 des 7 génotypes au cours du développement). J'ai complété la caractérisation biochimique approfondie de ce matériel par une étude de la répartition des lignines au sein de coupes de tiges afin d'en mesurer l'impact sur la dégradabilité. J'ai également souhaité utiliser ces génotypes pour étudier si, pour des teneurs en lignine comparables au stade mature, la mise en place de la lignification des parois se faisait toujours suivant le même mode au cours du développement des plantes. Dans cette partie de mon étude nous avons décidé de développer une méthode d'analyse d'image permettant d'évaluer automatiquement la répartition des lignines au sein de la tige pour tenter d'expliquer au mieux les variations de la dégradabilité en combinant facteurs biochimiques et histologiques.

La paroi, sa composition biochimique, la répartition des tissus lignifiés au sein de la tige et les relations entre ces composantes et la dégradabilité des parois de maïs étant au cœur de mon travail de thèse, je vais, dans la partie qui suit, revenir en détail sur ces différents points en faisant le bilan de nos connaissances actuelles.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

La cellule végétale possède une paroi rigide entourant la membrane cytoplasmique. Cette paroi, ayant une structure très complexe, a plusieurs fonctions. Elle rend la cellule végétale peu flexible, au contraire de la cellule animale, et est l'un des facteurs essentiels qui contrôlent le développement des cellules végétales et donc de la plante dans son ensemble. La paroi assure dans la plante de nombreuses fonctions mécaniques, physiologiques et morphologiques tant au niveau cellulaire qu'à la plante entière (Brett and Waldron, 1996).

1. Polymères et assemblages moléculaires de la paroi végétale

La paroi cellulaire s'organise en trois couches (Figure I-2), **la lamelle moyenne** riche en pectine mature assurant la cohésion des cellules, **la paroi primaire** qui contient une quantité

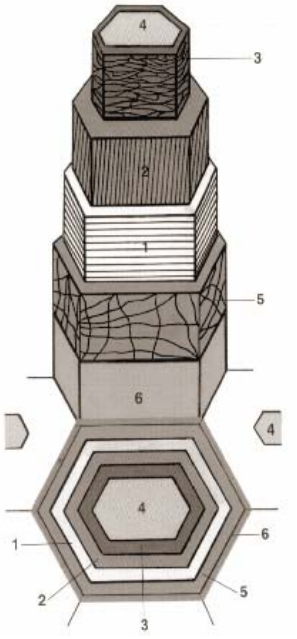


Figure I-2. Structure de la paroi cellulaire, en coupe transversale (en bas) et en vue tridimensionnelle (en haut) : paroi secondaire (1 à 3, couches S1 à S3); lumen (4); paroi primaire (5); lamelle moyenne (6) (Bowes and Thomas, 1966).

similaire de cellulose, hémicellulose et pectine, et la paroi primaire se retrouve seulement dans les cellules méristématiques car elle est élastique et permet l'élongation. **La paroi secondaire** est beaucoup plus épaisse que la primaire, elle peut être subdivisée en trois sous-couches : S1, S2 et S3 (Figure I-2), qui se différencient par l'orientation de leurs microfibrilles de cellulose (Taylor, 2008). La paroi secondaire se met en place suite à l'arrêt de la croissance de la paroi primaire qui se fait par des dépôts successifs de cellulose cristallisée et de lignines. Ces deux composantes sont responsables de la rigidité de la paroi cellulaire. Ces régions pariétales présentent des compositions chimiques distinctes. Les polymères constitutifs des parois végétales se regroupent en deux grandes catégories : les polysaccharides tels que la cellulose, les hémicelluloses, les pectines et les composés phénoliques comme la lignine et les acide *p*-hydroxycinnamiques.

1.1. La cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant sur Terre. Elle représente plus de la moitié de la biomasse. Chaque année la nature produit ainsi plus de 10^{10} tonnes de cellulose.

Dans la paroi primaire la cellulose constitue une part importante du réseau qui maintient la forme de la cellule tout en permettant son allongement essentiel durant la phase de croissance. La cellulose est également un constituant important de la paroi secondaire où elle joue un rôle clé dans la résistance de la paroi (Cosgrove, 2005). Alors que la majorité des polysaccharides pariétaux sont synthétisés dans le golgi puis exocytés à la paroi, il n'y a à l'heure actuelle aucune évidence pour ce type de synthèse pour la cellulose. La machinerie de synthèse de la cellulose se présente sous forme de complexes membranaires connus sous le nom de cellulose synthase complex (CSC). Trois différentes protéines CESA sont requises pour former des CSC fonctionnels (Taylor, 2008). Les protéines CESA recrutées pour former ces complexes sont différentes dans la paroi primaire et dans la paroi secondaire (Wightman and Turner, 2010). L'assemblage des protéines CESA en hexamères (Figure I-3) semble passer par la dimérisation préalable des protéines CESA. Les hexamères s'assemblent alors entre eux pour former des structures hexagonales aussi appelées « rosettes » (Mueller and Brown, 1980; Brown, 1996) (Figure I-3). Ces rosettes sont synthétisées dans le golgi puis transportées à la membrane (Haigler and Brown, 1986) où a lieu la biosynthèse de cellulose. Chaque protéine CESA synthétise une chaîne de (1,4)-β-D-glucane. La microfibrille de cellulose est ainsi formée comme un ruban cristallin rassemblant 36 chaines de β-D-glucane. Dans les parois

secondaires le degré de polymérisation (nombre d'unités glucose constituant une chaîne de cellulose) varie entre 14000-15000 (Brett, 2000), alors que dans les parois primaires le degré de polymérisation est plus faible et varie entre 2000-6000 (Brown, 2004).

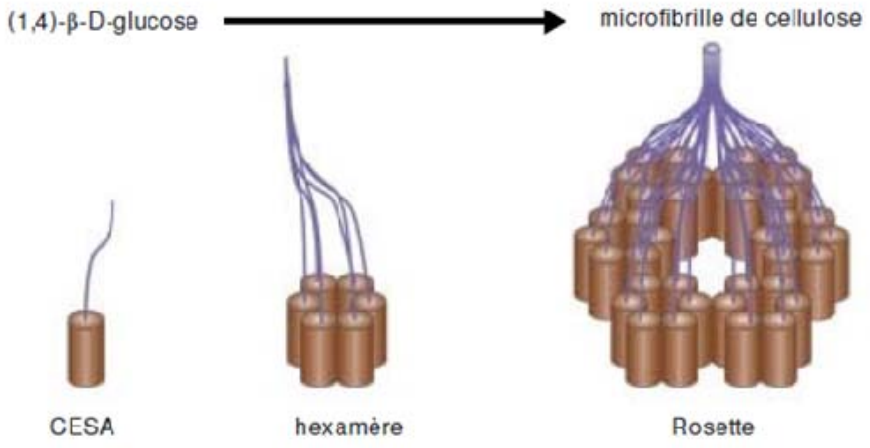


Figure I-3. Synthèse des microfibrilles de cellulose. Modèle d'une rosette hexamérique formée de 6 sous unités, chacune est formée par 6 protéines CESA. Chaque protéine CESA est capable de synthétiser une chaîne de (1,4)-β-D-glucane. Dans ce modèle, 36 chaînes de (1,4)-β-D-glucane sont formées par la rosette. (Cosgrove, 2005).

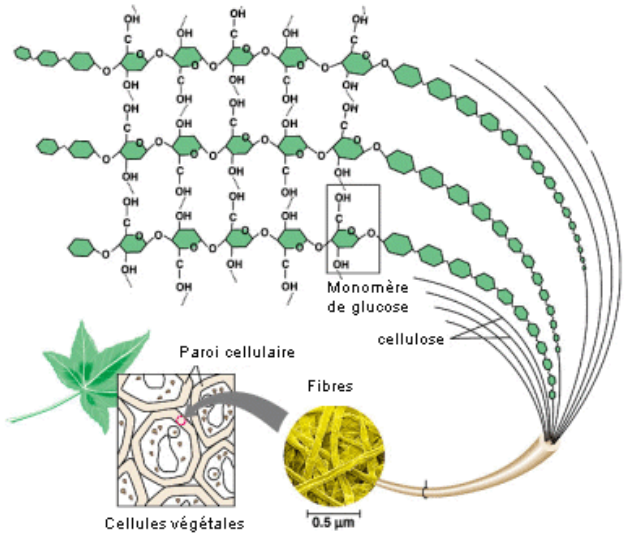


Figure I-4. Structure de la cellulose.

Les microfibrilles de cellulose se présentent ainsi comme un homopolymère linéaire formé d'unités D-glucose (Somerville, 2006; Guerriero *et al.*, 2010) qui font 3-5 nm de largeur et plusieurs µm de longueur (Figure I-4) (Cosgrove, 2005).

1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides hétérogènes possédant une structure plus complexe que celle de la cellulose. Contrairement aux microfibrilles de cellulose, les hémicelluloses sont ramifiées et cette caractéristique structurale, ainsi que leur capacité à se lier à la cellulose par des liaisons hydrogènes (non-covalentes), permet la constitution d'un réseau dense (Willats *et al.*, 2001; Cosgrove, 2005). Le squelette des hémicelluloses est composé de résidus β-(1,4)-D-pyranose, ou les pyranoses peuvent être le glucose, le mannose ou le xylose, et les hémicelluloses sont alors appelées glucanes, mannanes ou xylanes, respectivement (Figure I-5). Chez les graminées, des xylanes forment le squelette des principales hémicelluloses. Ce squelette y est décoré par des arabinoses et des acides glucuroniques. Ainsi les principales hémicelluloses rencontrées chez les graminées sont-elles des glucuronoarabinoxylanes (GAX) (Figure I-5) qui représentent environ 20-40% dans la paroi primaire et 40-50% dans la paroi secondaire (Tableau I-4) (Scheller and Ulvskov, 2010). Les glucuronoarabinoxylanes de graminées sont assez fortement ramifiés et sont capables de créer des liaisons hydrogènes avec la cellulose (Carpita and Gibeaut, 1993). Chez les graminées toujours, les glucuronoarabinoxylanes portent également des acides féruliques en position 5 de l'arabinose et forment alors des feruloylglucuronoarabinoxylanes (Lam *et al.*, 1992). La présence d'esters *p*-coumariques en quantité assez abondante est également avérée chez les graminées mais il est difficile par contre de connaître précisément la quantité d'acide *p*-coumarique estérifié sur les hémicelluloses. En effet, l'acide *p*-coumarique est principalement estérifié sur les lignines. La synthèse des hémicelluloses ainsi que l'accrochage des acides féruliques est connue pour se dérouler dans l'appareil de Golgi (Meyer *et al.*, 1991; Myton and Fry, 1994; Obel *et al.*, 2003). Des vésicules golgiennes sont ensuite exocytées à la membrane. Elles fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent les polysaccharides, qui sont directement intégrés à la paroi. Le feruloyl-CoA ou un feruloyl-glucoside peuvent être les substrats utilisés par les feruloyl transférases pour accrocher l'acide férulique aux arabinoses dans le golgi (Obel *et al.*, 2003). Les esters féruliques sont importants parce qu'ils peuvent être réticulés entre eux par oxydation pour former ainsi

différents dimères. Les dimères féruliques sont facilement détectés dans la paroi de graminées et reflètent les liens entre les hémicelluloses (Ralph *et al.*, 1994b). Les esters féruliques forment également un lien entre hémicelluloses et lignines (Grabber, 2005).

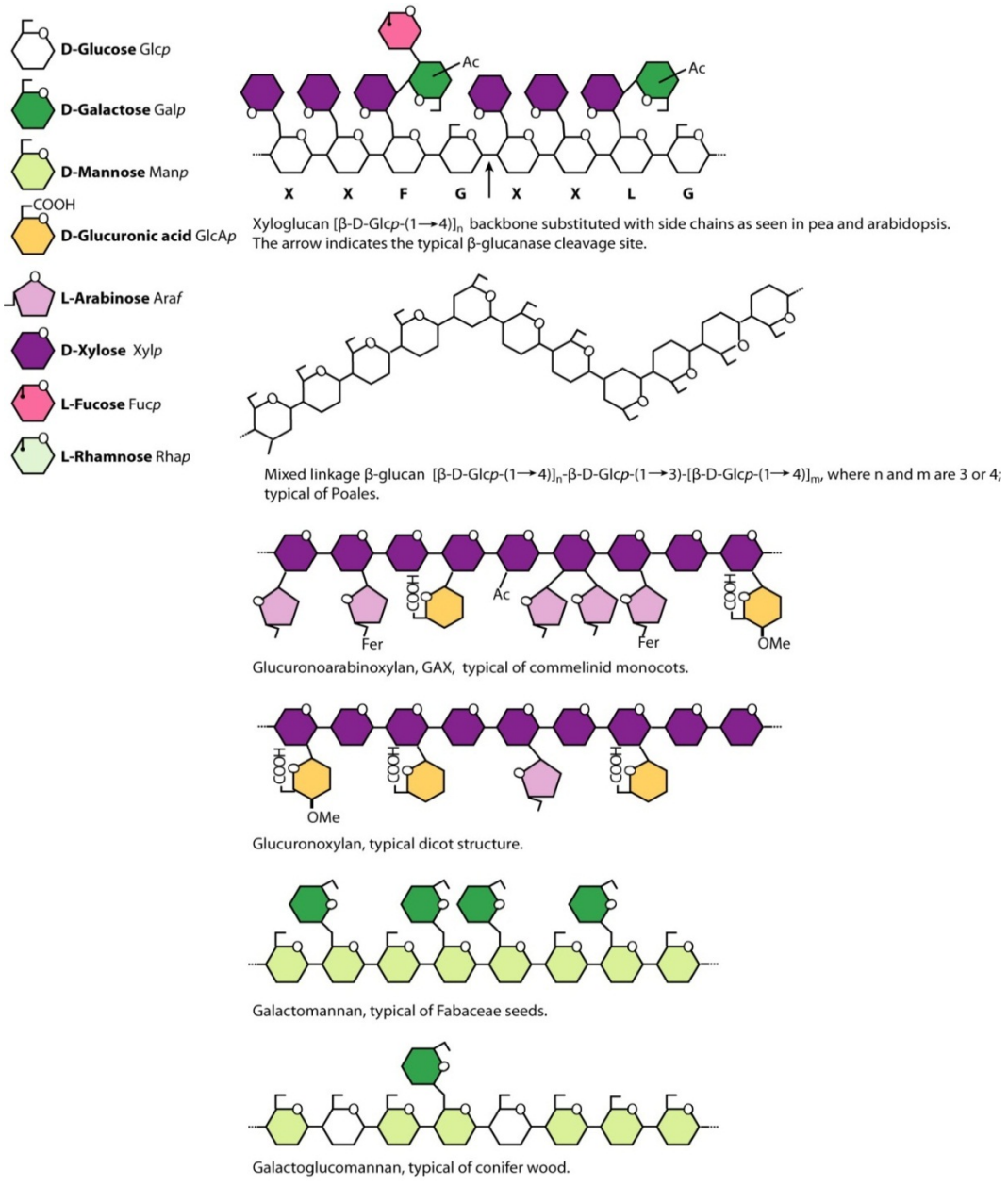


Figure I-5. Les structures des hémicelluloses selon les espèces. (Scheller and Ulvskov, 2010)

Tableau I-4. Présence des hémicelluloses dans les parois primaire et secondaire des plantes. (Scheller and Ulvskov, 2010)

Amount of polysaccharide in wall (% w/w)[a]						
	Dicot walls		Grass walls		Conifer walls	
Polysaccharide	Primary	Secondary	Primary	Secondary	Primary	Secondary
Xyloglucan	20–25	Minor	2–5	Minor	10	–[b]
Glucuronoxylan	–	20–30	–	–	–	–
Glucuronoarabinoxylan	5	–	20–40	40–50	2	5–15
(Gluco)mannan	3–5	2–5	2	0–5	–	–
Galactoglucomannan	–	0–3	–	–	+[b]	10–30
β-(1→3,1→4)-glucan	Absent	Absent	2–15	Minor	Absent	Absent

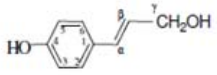
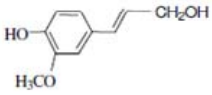
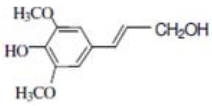
1.3. Les lignines

Les lignines sont les seconds biopolymères les plus abondants sur terre après la cellulose. La lignification est un processus qui débute au niveau de la lamelle moyenne au moment où la paroi secondaire s'épaissit, puis s'étend progressivement à l'ensemble des parois primaire et secondaire (Chesson *et al.*, 1997). La teneur en lignines est la plus élevée dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire dont l'épaisseur ne dépasse pas 1 µm (Wilson and Hatfield, 1997). Toutefois, la paroi secondaire, généralement très épaisse (1-5µm), constitue l'essentiel de la masse des parois lignocellulosiques et contient la plupart des lignines de la plante (Eriksson *et al.*, 1990).

Les lignines contribuent à la rigidité des parois cellulaires, et ainsi au port érigé des végétaux supérieurs terrestres (Morot-Gaudry, 2010). Ainsi par leurs propriétés, les lignines ont permis, au cours de l'évolution, le passage du port rampant (mousses) au port dressé (arbres) plus favorable à la capture de la lumière. De plus, leur implication dans la constitution du système vasculaire, vaisseaux et trachéides, a contribué à la constitution d'un système de circulation de la sève brute (eau et sels minéraux). Leur hydrophobicité contribue également à une meilleure conduction de la sève brute. La présence des lignines n'est pas toujours favorable. Elles sont extrêmement résistantes à la dégradation. En formant des liaisons à la fois avec la cellulose (liaison hydrogène) et les hémicelluloses (liaisons directe ou indirecte via les esters féruliques portés par les hémicelluloses), elles créent une barrière hydrophobe à toutes les solutions ou enzymes, et limitent ainsi la pénétration des enzymes lignocellulosiques au sein de la structure pariétale.

Les lignines sont des polymères aromatiques issus de la polymérisation de 3 sous unités principales que sont l'alcool *p*-coumarylique (H) (3-(4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol), l'alcool conifèrylique (G) (3-(3-méthoxy-4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol) et l'alcool sinapylique (S) (3-(3,5-diméthoxy-4-hydroxyphényl)-2-propèn-1-ol) (Tableau I-5). Ces monolignols diffèrent entre eux par la présence de groupements methoxy en ortho et para du groupement phénol.

Tableau I-5. Sous-unités constitutives des lignines.

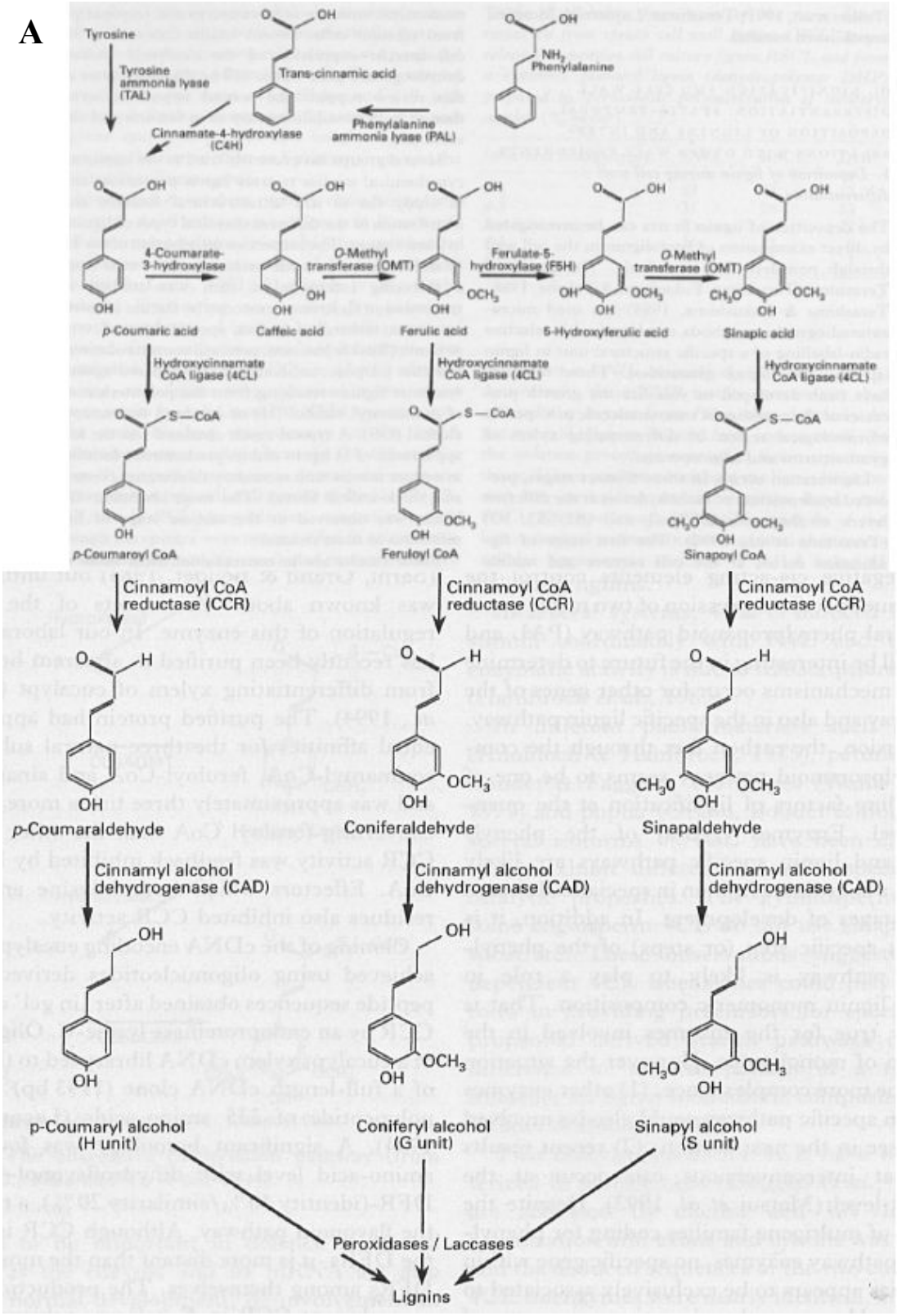
Alcool	Unité	Symbole	Structure
p-Coumarylique	*p*-Hydroxyphényle	H	
Conifèrylique	Gaïacyle	G	
Sinapylique	Syringyle	S	

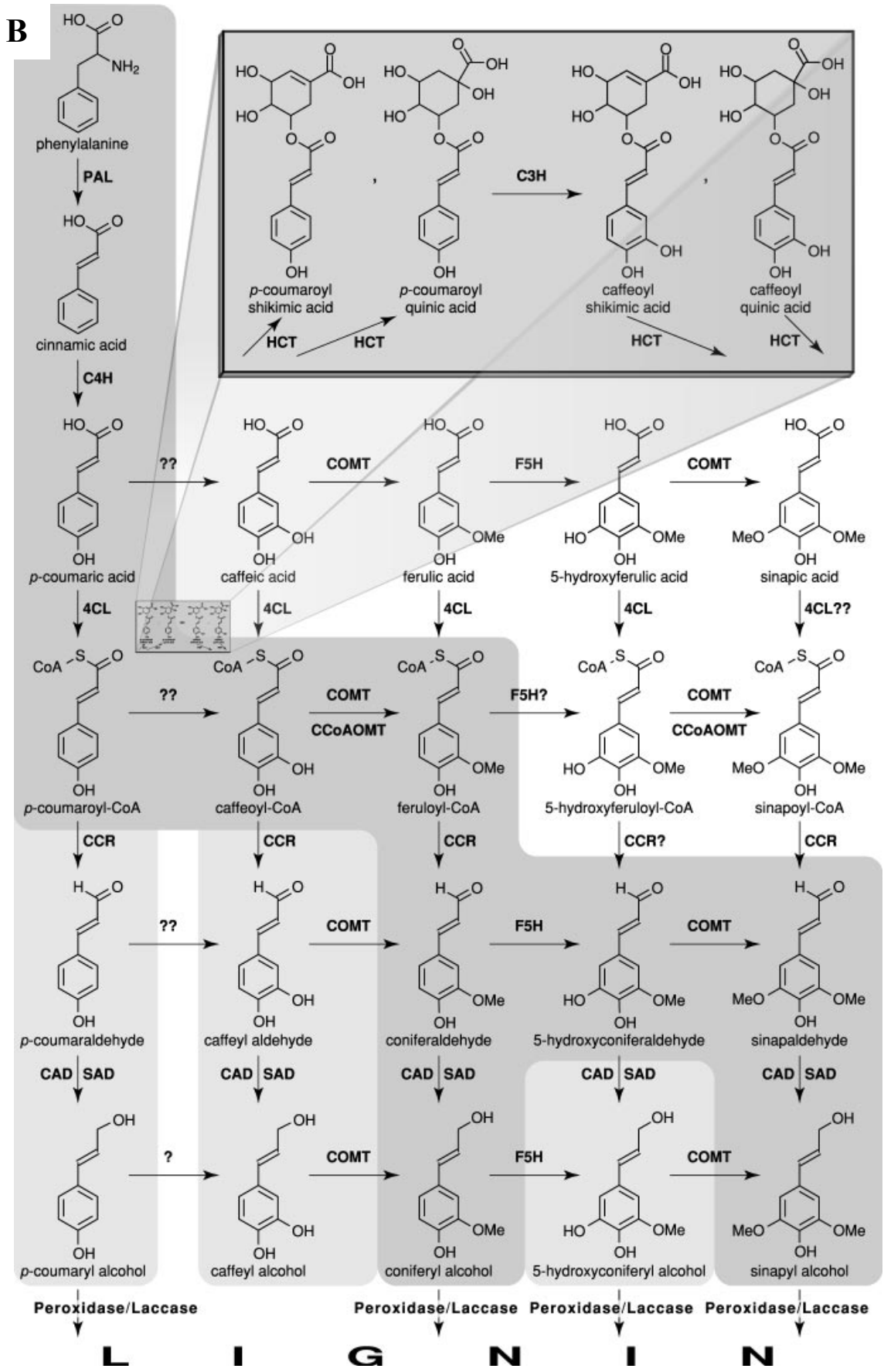
La biosynthèse de ces monolignols débute avec la phénylalanine et/ou la tyrosine (chez le maïs) et s'effectue via la voie commune de biosynthèse des phénylpropanoïdes suivi par des étapes spécifiques de la lignification (Vanholme *et al.*, 2010). Notre connaissance de cette voie de biosynthèse ne cesse de s'améliorer et les schémas de voie de biosynthèse évoluent donc avec le temps comme l'illustre la figure I-6 où nous avons repris les voies de biosynthèse des monolignols telles qu'elles étaient présentées dans les années 1990 (Boudet *et al.*, 1995) (Figure I-6A), 2000 (Boerjan *et al.*, 2003) (Figure I-6B), 2010 (Bonawitz and Chapple, 2010) (Figure I-6C) et en 2012 (Vanholme *et al.*, 2012) (Figure I-6D). Nous sommes ainsi passés d'une grille métabolique à multiples intermédiaires et voies parallèles à une voie de biosynthèse épurée s'intégrant dans une vaste grille métabolomique où la « lignomique » prend son essor.

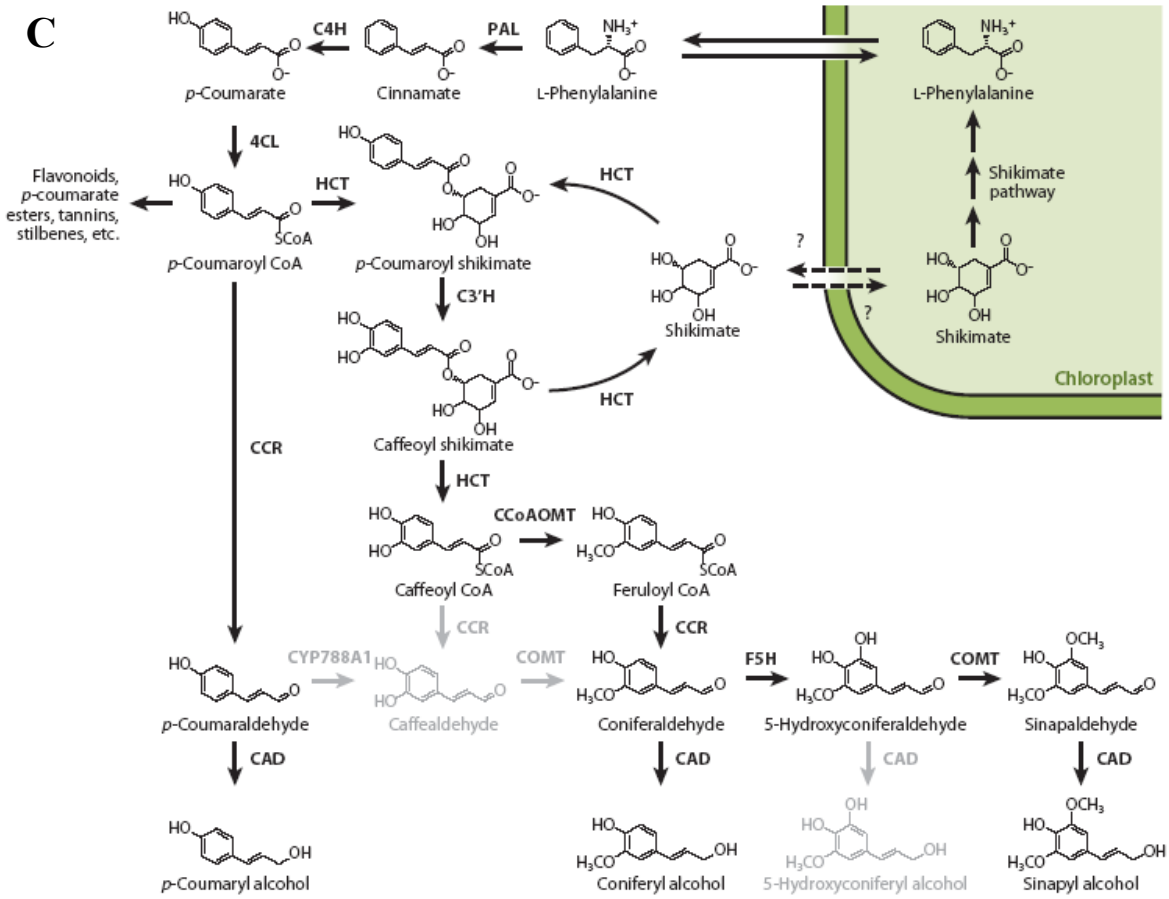
Si l'on revient à la biosynthèse des monolignols, après leur biosynthèse dans le cytosol, ils sont transportés à la paroi cellulaire par un mécanisme encore assez flou. Dans un modèle, les monolignols traverseraient la membrane plasmique sous une forme 4-O-glycosylée puis seraient déglucosylés ensuite par des glucosidases situées dans la paroi cellulaire (Vanholme

et al., 2010). Dans un autre modèle, les monolignols seraient transportés à la membrane plasmique par des vésicules du Golgi (Samuels *et al.*, 2002). Cependant, en l'absence de preuve solide aucun de ces modèles n'est pour l'instant définitivement retenu.

A


Tyrosine
Tyrosine ammonia lyase (TAL)
Trans-cinnamic acid
Phenylalanine
Phenylalanine ammonia lyase (PAL)
Cinnamate-4-hydroxylase (C4H)
4-Coumarate-3-hydroxylase
O-Methyl transferase (OMT)
Ferulate-5-hydroxylase (F5H)
O-Methyl transferase (OMT)
p-Coumaric acid
Caffeic acid
Ferulic acid
5-Hydroxyferulic acid
Sinapic acid
Hydroxycinnamate CoA ligase (4CL)
p-Coumaroyl CoA
Feruloyl CoA
Sinapoyl CoA
Cinnamoyl CoA reductase (CCR)
p-Coumaraldehyde
Coniferaldehyde
Sinapaldehyde
Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)
p-Coumaryl alcohol (H unit)
Coniferyl alcohol (G unit)
Sinapyl alcohol (S unit)
Peroxidases / Laccases
Lignins


B
phenylalanine
PAL
cinnamic acid
C4H
p-coumaric acid
??
caffeic acid
COMT
ferulic acid
F5H
5-hydroxyferulic acid
COMT
sinapic acid
4CL
4CL??
p-coumaroyl shikimic acid
p-coumaroyl quinic acid
C3H
caffeoyl shikimic acid
caffeoyl quinic acid
HCT
p-coumaroyl-CoA
caffeoyl-CoA
CCoAOMT
feruloyl-CoA
F5H?
5-hydroxyferuloyl-CoA
sinapoyl-CoA
CCR
CCR?
p-coumaraldehyde
caffeyl aldehyde
coniferaldehyde
5-hydroxyconiferaldehyde
sinapaldehyde
CAD
SAD
?
p-coumaryl alcohol
caffeyl alcohol
coniferyl alcohol
5-hydroxyconiferyl alcohol
sinapyl alcohol
Peroxidase/Laccase
L I G N I N


C
C4H
PAL
p-Coumarate
Cinnamate
L-Phenylalanine
L-Phenylalanine
Shikimate pathway
4CL
Flavonoids, p-coumarate esters, tannins, stilbenes, etc.
HCT
p-Coumaroyl CoA
p-Coumaroyl shikimate
HCT
Shikimate
?
?
Shikimate
Chloroplast
C3'H
Caffeoyl shikimate
HCT
CCR
HCT
CCoAOMT
Caffeoyl CoA
Feruloyl CoA
CCR
CCR
CYP788A1
COMT
F5H
COMT
p-Coumaraldehyde
Caffealdehyde
Coniferaldehyde
5-Hydroxyconiferaldehyde
Sinapaldehyde
CAD
CAD
CAD
CAD
p-Coumaryl alcohol
Coniferyl alcohol
5-Hydroxyconiferyl alcohol
Sinapyl alcohol

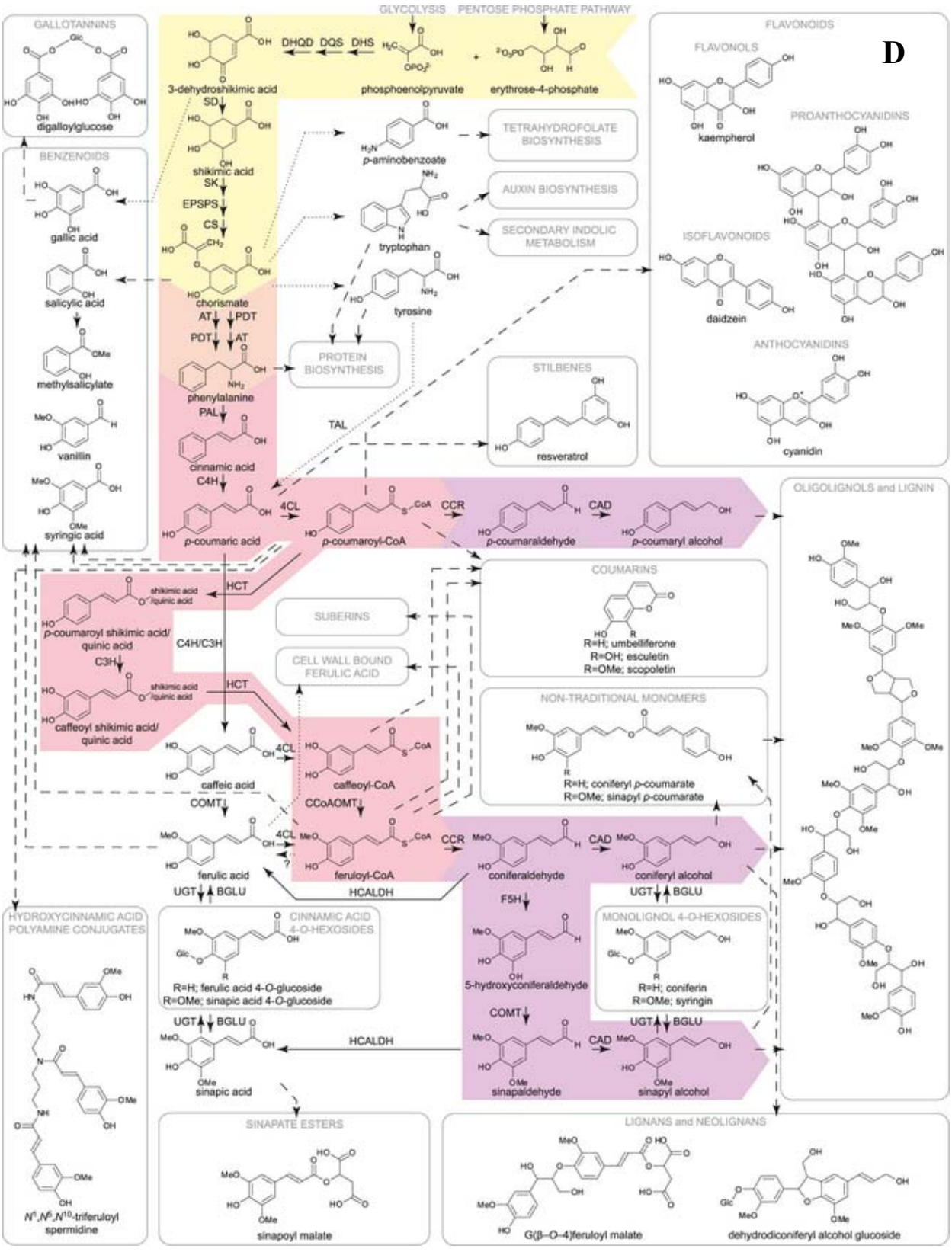


Figure I-6. L'évolution de notre connaissance de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des monolignols. A, (Boudet *et al* ., 1995b) ; B, (Boerjan *et al.*, 2003) ; C, (Bonawitz and Chapple, 2010) ; and D (Vanholme et *al.*, 2012).

La copolymérisation oxydative des monolignols est effectuée par oxydation enzymatique des monolignols, suivie d'un couplage radicalaire (Van Parijs *et al.*, 2010; Vanholme *et al.*, 2010). Dans une première étape, le monolignol est oxydé pour former le monomère radical, cette étape est elle aussi encore incertaine principalement quant aux enzymes réellement recrutées pour la réaliser. Des peroxydases et/ou des laccases pourraient réaliser cette oxydation (Onnerud *et al.*, 2002). L'électron du radical formé se trouve délocalisé dans le système conjugué entre les positions préférentielles 4, 5 et β (Figure I-7) (Achyuthan *et al.*, 2010).

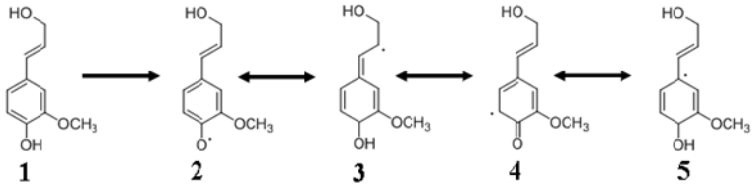


Figure I-7. Stabilisation du radical de l'alcool conifférylique. 1, alcool conifférylique; 2 à 5 les différentes formes radicalaires. (Achyuthan *et al.*, 2010)

Deux monomères radicaux peuvent alors se coupler ensemble pour former un déhydrodimère. Un radical monomère peut alors s'ajouter au polymère en croissance. Ce type de polymérisation est appelé « endwise ». Le couplage de dimères ou d'oligomères ensemble est quant à lui dénommer « bulk ». Par ces mécanismes les trois unités monomériques (H, G, S) se trouvent reliées entre elles par différents types de liaisons (Figure I-8).

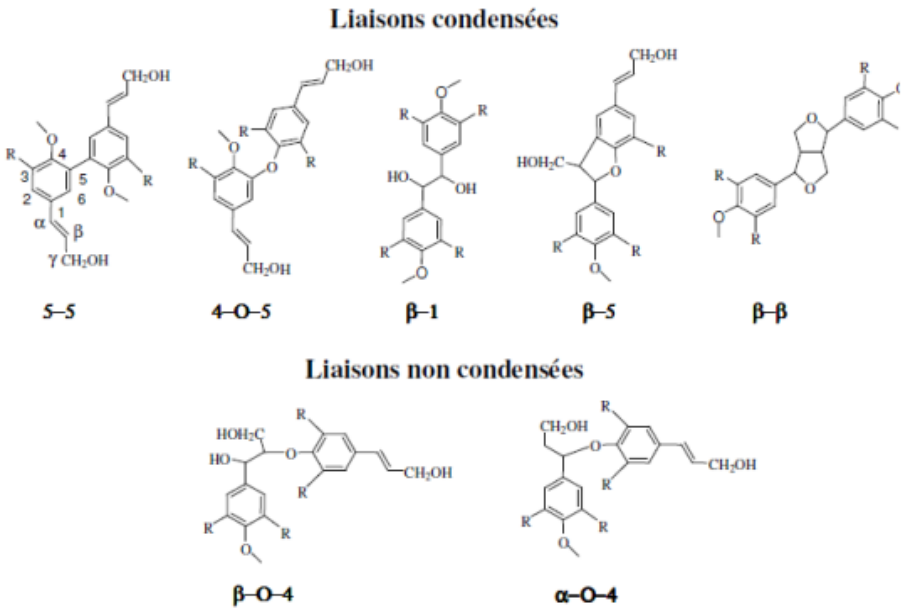


Figure I-8. Principales liaisons inter-monomères au sein des lignines (R = H ou OCH3).

Celles-ci sont classées en liaisons carbone-carbone (liaisons 5-5, β-1, β-5, β-β) ou diaryl éther (liaisons 4-O-5), ces types de liaisons sont dites « condensées ». Elles sont résistantes aux dégradations chimiques usuelles (Lapierre *et al.*, 1995). D'autres types de liaisons dites « non condensées » ou « labiles » sont les liaisons éther (liaisons α-O-4, β-O-4). La liaison β-O-4, est la plus fréquente dans les lignines naturelles, elle est la cible des méthodes de dégradation chimique (thioacidolyse, oxydation au nitrobenzène alcalin,…) (Lapierre *et al.*, 1995). Le taux de chacun des liaisons formées dépend de la vitesse d'approvisionnement en monolignols. Lorsque les monolignols sont mis à disposition rapidement, comme c'est le cas dans la lamelle moyenne et la paroi primaire, deux radicaux monomères peuvent se coupler spontanément, établissant ainsi une liaison covalente entre les deux sous unités (Vanholme *et al.*, 2010). Le dimère formé est ensuite déshydrogéné et s'ajoute au polymère en croissance. Ceci conduit à la formation d'un polymère « bulk » (Syrjanen and Brunow, 2000). Les liaisons C-C (β-β, β-5) entre les monomères sont favorisées dans ce type de polymérisation (Mechin *et al.*, 2007). Lorsqu'au contraire les monolignols sont apportés progressivement, comme c'est le cas dans la paroi secondaire, la concentration locale en monomères n'est pas élevée, ce qui favorise le couplage du radical monomère avec le polymère en croissance (polymérisation endwise) ainsi que l'apparition d'un grand nombre de liaisons β-O-4 (Jurasek, 1998; Mechin *et al.*, 2007). La structure du polymère ainsi formé est plutôt linéaire et non-condensée.

Les proportions des différentes unités H, G et S dans le polymère lignine sont très variables selon les espèces (Tableau I-6) (Pouzet, 2011). Avec quelques exceptions notables (Novo Uzal *et al.*, 2009), les lignines de gymnospermes sont composées d'unités G seulement (avec

Tableau I-6. Composition monomérique des lignines des plantes terrestres (Pouzet, 2011).

Taxonomie		**Plantes**	**H**	**G**	**S**
Gymnospermes		Conifères	5%	95%	Non
Angiospermes	**Dicotylédones**	Feuillus	Trace	14-66%	34-86%
	Monocotylédones	Maïs (tiges)	4%	35%	61%
		Blé (paille)	5%	49%	46%
		Riz (paille)	15%	45%	40%
		Canne à sucre	31%	28%	41%

de faibles quantités d'unités H), alors que les lignines d'angiospermes dicotylédones sont composées d'unités G et S (avec de faibles quantités d'unités H). Chez les graminées, les lignines contiennent les trois types de sous unités H, G et S (Boerjan *et al.*, 2003). En plus des différences de composition monomérique des lignines selon les espèces, la composition monomérique des lignines peut également varier selon le type de tissu (Chesson *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 2008; Barros-Rios *et al.*, 2012) et le stade de développement (Figure I-9) (Chen *et al.*, 2002).

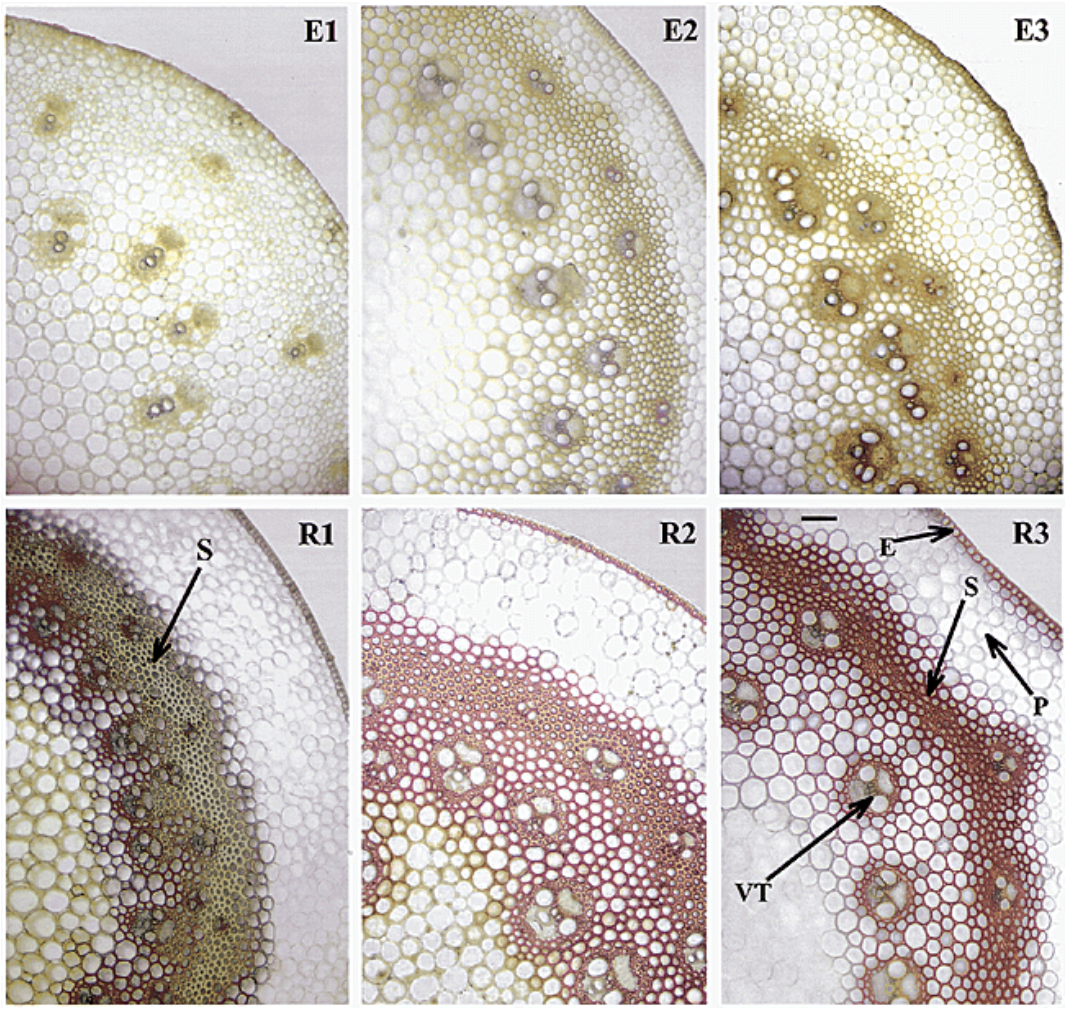
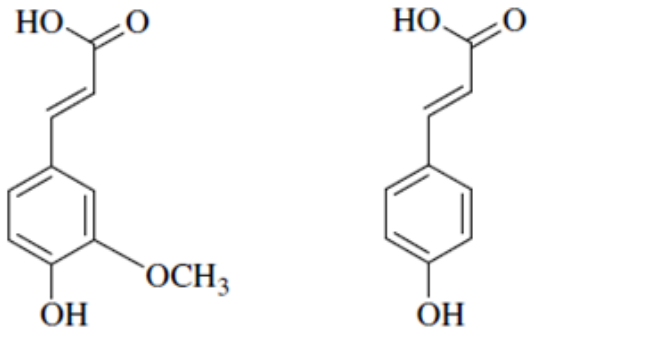


Figure I-9. Coupes de tiges de fétuque colorée au Mäule à différents stades de développement depuis le stade de jeune élongation (E1) au stade de reproduction (R3). E1 : premier nœud visible; E2 : deuxième nœud visible ; E3 : troisième nœud visible ; R1 : premier épillet visible; R2 ; épillets complètement sortis ; R3 : floraison femelle. Le changement de couleur du jaune au rouge indique l'augmentation d'unités S dans la lignine. VT : tissu vasculaire; P : parenchyme ; E : épiderme ; S : sclérenchyme. Longueur de la barre est de 50 µm. (Chen *et al.*, 2002)

Ces variations peuvent être visualisées par microdissection des tissus suivie de caractérisations biochimiques (Nakashima *et al.*, 2008), ou par la coloration histochimique de Mäule (Figure I-9) qui est indicative de la présence de sous unités S (Browning, 1967). De telles variations peuvent également être visualisées par microspectroscopie Raman, IR et UV, ou par immunomarquage de la paroi secondaire avec des anticorps dirigés contre des structures spécifiques des lignines (Shi *et al.*, 2006; Gierlinger and Schwanninger, 2007; Gou *et al.*, 2008; Ruel *et al.*, 2009b).

1.4. Les acides *p*-hydroxycinnamiques

Les parois de graminées se caractérisent par la présence abondante d'acides *p*-hydroxycinnamiques (acide *p*-coumarique et acide férulique en particulier) liés en ester et/ou en éther aux polymères pariétaux. Ces deux acides diffèrent par le nombre de groupements méthoxy (OCH_3) associés au cycle aromatique (Figure I-10).



Acide férulique (FA) Acide *p*-coumarique (PC)

Figure I-10. Structure chimique des acides férulique (FA) et *p*-coumarique (PC).

Au sein de la paroi des graminées, l'acide *p*-coumarique (PC) est acylé principalement aux sous-unités S des lignines et généralement par une liaison ester (Figure I-11) (Lu and Ralph, 1999). La teneur en *p*-coumarate peut atteindre 18% de la quantité de lignine chez le maïs (Ralph *et al.*, 1994a). Chez les graminées toujours, dans certains tissus, les dérivés de sous-unités lignine *p*-coumaroylées peuvent atteindre jusqu'à 40% des lignines (Withers *et al.*, 2012). Il est évident donc que ces sous unités inhabituelles *p*-coumaroylées peuvent représenter une part importante du pool de monomères constitutifs des lignines. Cette

acylation par PC se retrouve de façon prédominante sur les unités S. Chez le maïs, environ 10% de PC peuvent se retrouver sur les unités G (Grabber *et al.*, 1996a; Lu and Ralph, 1999). L'impact des sous unités S portant cet acide *p*-coumarique sur la structure des lignines est donc indéniablement à prendre en compte. Ces monolignols conjugués avec PC doivent ainsi conférer aux lignines de graminées des propriétés très particulières (Ralph, 2010).

Par l'analyse structurale des lignines de maïs, Ralph et al. (1994a) ont démontré que PC est exclusivement attachée à la position C-9 (ou γ) (Figure I-11) des monolignols et non à la position C-7 (ou α) des monolignols.

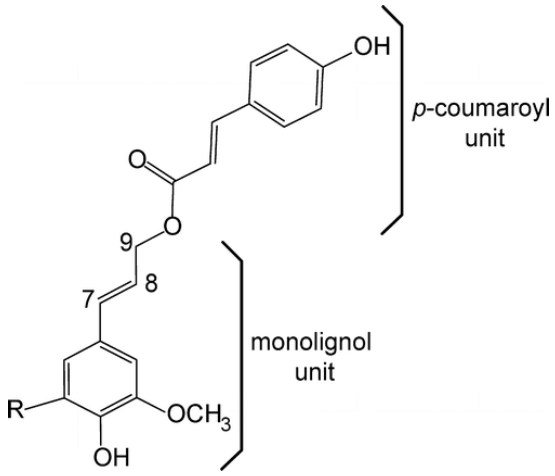


Figure I-11. Diagramme moléculaire de la *p*-coumaroylation des monolignols de graminées. R = H pour l'alcool coniférylique ; R = OCH_3 pour l'alcool sinapylique. (Lu and Ralph, 1999 ; Hatfield *et al.*, 2009)

L'attachement à la position C-7 exigerait simplement que l'acide soit présent pendant le processus de lignification et soit attaché spontanément sans préférence pour les alcools coniférylique ou sinapylique. Comme il n'y a pas de PC attaché au C-7 détectable, on peut éliminer la possibilité que du PC libre se trouve dans la paroi cellulaire au cours de lignification. De plus, la préférence de l'alcool sinapylique comme site de fixation pour le PC soutient l'idée que nous sommes confrontés à un processus métabolique contrôlé. PC est en fait transféré à la matrice pariétale sous forme de conjugué avec l'alcool sinapylique (S-PC) ou l'alcool coniférylique (G-PC) (Figure I-11). La fixation du PC au carbone C-9 de l'alcool coniférylique ou sinapylique implique donc une intervention enzymatique. Des travaux récents ont montré la présence d'une *p*-coumaroyl transférase dans les tiges de maïs réalisant

spécifiquement le transfert de PC sous sa forme activée (PC-CoA) vers les alcools sinapylique ou coniférylique (Hatfield *et al.*, 2008; Hatfield *et al.*, 2009). Withers et al. (2012) ont montré qu'une BAHD (pour benzylalcohol O-acetyltransferase, anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase, anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyl transferase, and deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase) acyltransférase de riz catalyse l'acylation des monolignols par l'acide *p*-coumarique sous sa forme *p*-coumaroyl-CoA. Le gène de riz codant cette enzyme se retrouve uniquement chez les graminées et est co-exprimé avec des gènes de la voie de biosynthèse des lignines (Mitchell *et al.*, 2007).

Il y a une nette préférence lors de ce transfert pour l'alcool sinapylique plutôt que pour l'alcool coniférylique en tant que molécule acceptrice. Chez les maïs, 90% des PC sont attachés à l'unité S (Grabber *et al.*, 1996a; Lu and Ralph, 1999). Cette *p*-coumaroylation des sous unités S chez les graminées pourrait être un moyen de mieux incorporer les unités S dans les lignines puisqu'en effet les unités S seules forment assez difficilement des radicaux via l'action des oxydases. Un transfert de radical du radical *p*-coumarate vers les unités S serait favorisé et permettrait ainsi leur incorporation dans le polymère (Figure I-12) (Ralph *et al.*, 2004; Hatfield *et al.*, 2009). Les unités S-PC peuvent aussi être incorporées mais dans ce cas elles restent souvent des unités terminales avec une chaine latérale insaturée et un groupement phénolique libre (Ralph *et al.*, 1994a). La fonction de cette acylation des sous unités des lignines reste quand même encore assez floue.

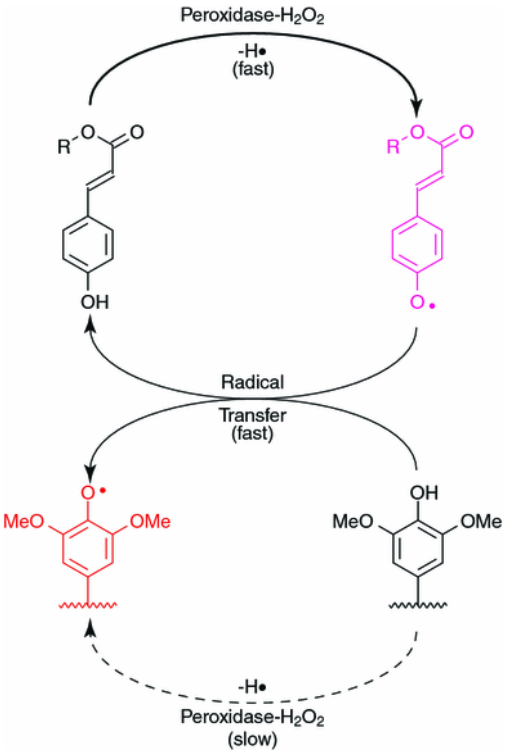


Figure I-12. Illustration d'un mécanisme possible de transfert de radical du *p*-coumarate aux sous unités S des lignines (Hatfield *et al.*, 2009).

Chez les monocotylédones, FA est capable de se lier par des liaisons esters via son groupe acide carboxylique avec le C5 du α-L-arabinose sur la chaîne latérale des xylanes (Figure I-13) (Ralph and Helm, 1993; Wende and Fry, 1997).

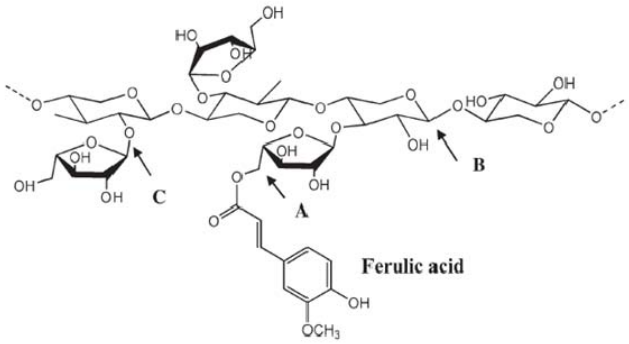


Figure I-13. Structure de l'acide férulique estérifié à un arabinoxylane. A : FA lié au C5 de l'arabinose ; B : β-1,4-xylan ; C : α-1,2-L-arabinose. (Marcie and Buanafina, 2009)

Chez les graminées, la teneur en férulate acylé aux arabinoxylanes des hémicelluloses est relativement élevé (Yamamoto *et al.*, 1989; Ishii, 1991; Lam *et al.*, 1992). Chez le maïs cette teneur est d'environ 1.5-2% dans la paroi non lignifiée (Grabber *et al.*, 1998b), et peut atteindre jusqu'à 3-4% dans les parois matures (Bunzel *et al.*, 2001). Si le FA s'estérifie aux hémicelluloses, il peut également être éthérifié à la lignine (de préférence aux unités G) par son groupe hydroxylique (Figure I-14) (Kondo *et al.*, 1990).

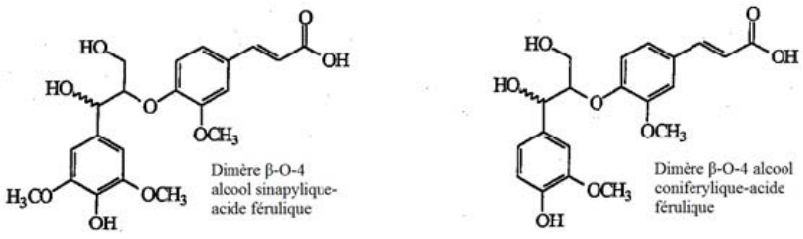


Figure I-14. Structure des hétérodimères d'acide férulique.

Jacquet et al. (1995) ont formellement identifié des hétérodimères d'acide férulique libérés par hydrolyse alcaline à partir de parois des pailles de blé et d'avoine. Ces auteurs ont décrit pour la première fois les hétérodimères associant l'acide férulique et les alcools *p*-

coumarylique, coniférylique et sinapylique. Ainsi, H, G et S se couplent à l'acide férulique pour former des hétérodimères. Le couplage avec l'alcool coniférylique prédomine largement (Jacquet, 1997). Proportionnellement aux sous unités présentes dans les lignines, les unités H se trouvent assez fortement liées à l'acide férulique. Ceci doit se produire dans les stades jeunes de lignification où chronologiquement, comme l'ont montré Terashima et al. (1993), les unités H et G sont déposées avant les unités S. Comme Jacquet (1997) en faisait l'hypothèse, à des stades précoces de lignification, alors que les unités G et H sont encore présentes qu'en faible quantité, les peroxydases auraient pour substrats préférentiels des esters féruliques, expliquant ainsi la formation décalée d'homo et d'hétérodimères féruliques. Une large gamme de déhydrodimères féruliques (Figure I-15) ont été caractérisés à partir de diverses sources (Bunzel *et al.*, 2005; Schatz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

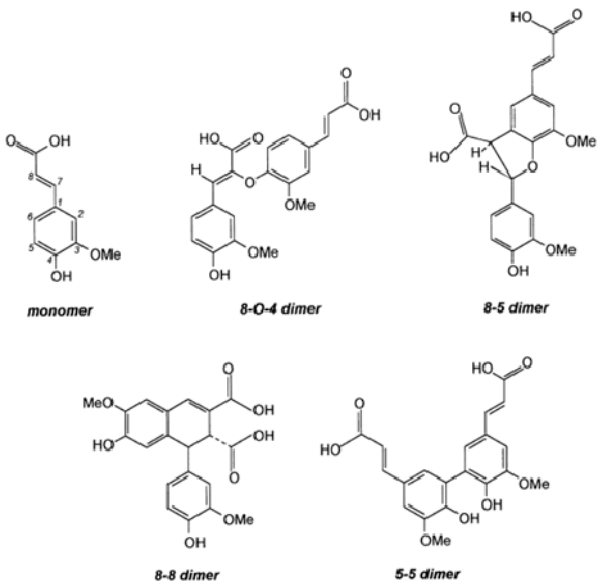


Figure I-15. Acide férulique et dehydrodimères féruliques.

FA joue un rôle important dans la structuration de la paroi. Dans un premier temps, comme nous l'avons dit FA est lié aux hémicelluloses qui sont déposées rapidement aux stades précoces de la lignification. FA pourrait ainsi servir d'amorce à la lignification et ainsi ponter les lignines et les hémicelluloses (Ralph *et al.*, 1995; Ishii, 1997). Dans un deuxième temps, deux FA estérifiés aux arabinoxylanes sont susceptibles de se lier entre eux pour former des ponts diféruliques entre deux chaînes d'hémicelluloses cette fois (Figure I-16) (Ralph *et al.*,

1994b). Ces ponts féruliques et diféruliques pourraient contribuer à compacter le réseau pariétal.

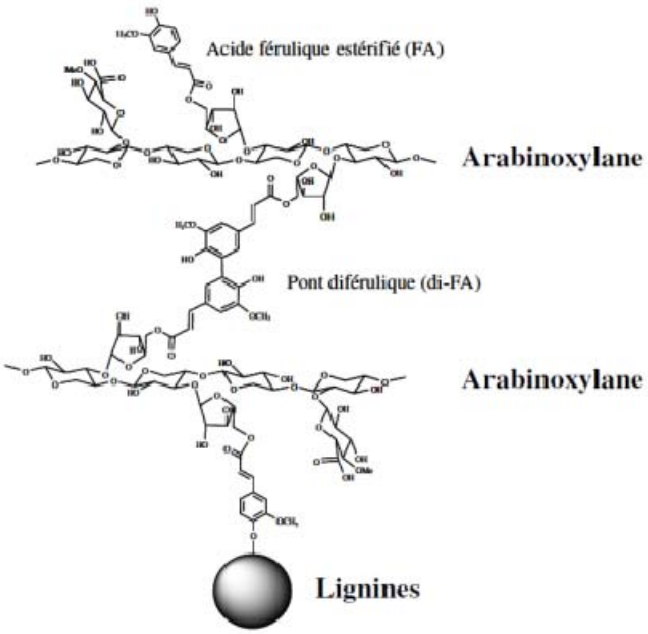


Figure I-16. Réticulation des arabinoxylanes entre eux et avec les lignines via des pontages féruliques ou diféruliques.

Tout comme pour l'acylation des monolignols par PC, l'accrochage de FA reste une vaste question qui a été moins investiguée à ce jour. Trois études ont essayé de mettre en évidence et de caractériser des féruloyl transférases impliquées dans l'acylation des arabinoxylanes (Meyer *et al.*, 1991; Myton and Fry, 1994; Yoshida-Shimokawa *et al.*, 2001). Yoshida-Shimokawa et al. (2001) ont prouvé l'existence d'une activité féruloyl transférase spécifique capable de transférer une forme activée de FA (FA-CoA) sur un trisaccharide (arabinoxylane). Cette réaction pourrait avoir lieu dans des vésicules golgiennes. Les travaux de Mitchell et al. (2007) suggèrent que les gènes de la famille pfam PF02458 pourraient coder des transférases impliquées dans la féruloylation des arabinoxylanes. A partir de ces informations, 4 gènes putatifs ont été identifiés chez le riz (Piston *et al.*, 2010). La sous-régulation de ces gènes entraine une diminution du niveau de ferulate dans les tiges de riz (Piston *et al.*, 2010).

Le mutant sfe de maïs récemment isolé par Jung et Phillips (2010) par une stratégie de transposon tagging présente une mutation qui impacte l'intégralité de la biosynthèse des arabinoxylanes féruloylés et pas seulement la synthèse d'esters féruliques. Le fait que ce

mutant ait été sélectionné dans une population de transposon tagging ouvre la possibilité de connaître bientôt le gène impacté. Ce gène pourrait intervenir dans ces étapes de féruloylation des arabinoxylanes et sa connaissance nous ouvrira certainement de nouvelles perspectives.

2. Mise en place de la lignification au cours du développement

Après l'échelle de la molécule, des polymères et des assemblages moléculaires évoqués dans les paragraphes précédents nous voici transportés dans un monde à deux échelles : celle de la plante et de sa tige et celle de la cellule.

2.1 - Mise en place des parois au cours du développement cellulaire

La constitution de la paroi cellulaire est variable avec l'âge de la cellule. Cette paroi évolue au cours du développement, passant ainsi d'une paroi primaire non lignifiée à une paroi qui s'épaissit et se secondarise en se lignifiant de plus en plus. Ainsi au cours du développement, la composition de la paroi se modifie, ainsi que la structure et les teneurs en ses différents constituants. La compréhension des mécanismes de formation de la paroi constitue des enjeux scientifiques et économiques majeurs surtout dans l'optique de l'utilisation de la biomasse végétale pour les fourrages et les biocarburants.

L'évolution au cours du développement de la composition des parois peut être abordée en étudiant des plantes prélevées à différents stades de développement (Boon *et al.*, 2005; Jung and Casler, 2006a; Boon *et al.*, 2008; Boon *et al.*, 2012) ou bien encore les entre nœuds d'une même plante (les entre nœuds du haut étant les moins matures) prélevés à différents niveaux (Chabbert *et al.*, 1994a, b).

Formation de la paroi primaire

Après la formation de la lamelle moyenne, la paroi primaire est la première à se former d'épaisseur très fine de 0,03 à 1 µm (Wilson and Hatfield, 1997). La paroi primaire est douée de plasticité et permet la croissance de la cellule. En effet, lors du processus d'élongation cellulaire, la paroi primaire se déforme pour permettre la croissance. La paroi primaire est essentiellement composée de polysaccharides, sous forme de microfibrilles de cellulose et d'une matrice complexe d'hémicelluloses et de pectines (Cosgrove, 2005). Les microfibrilles

de cellulose sont les principaux déterminants de l'orientation de l'expansion cellulaire : les cellules s'allongent difficilement dans la direction parallèle à la spirale de cellulose (Lloyd and Chan, 2004; Baskin, 2005; Cosgrove, 2005; Marga *et al.*, 2005; Kutschera and Nikas, 2007).

Aux stades précoces de développement, la teneur en monosaccharides d'origine non cellulosique (arabinose, galactose, mannose et xylose) est élevée (Morrison *et al.*, 1998), les hémicelluloses sont déposées principalement dans les lamelles moyennes et parois primaires pendant ces stades. Comme mentionné, chez les graminées, les xylanes des parois primaires présentent généralement des arabinoses en chaînes latérales et sont appelés arabinoxylanes (AX).

Les trois monolignols sont incorporé en proportion différentes selon le stade de lignification (Terashima *et al.*, 1993). En tout début de lignification, l'alcool coniférylique avec de faibles quantités d'alcool *p*-coumarylique sont copolymérisés dans la paroi primaire et la lamelle moyenne pour former des lignines mixtes formées d'unités G et H (avec les unités G prédominantes). Plus tard, pendant le développement de la paroi secondaire, l'alcool coniférylique est copolymérisé avec des quantités croissantes d'alcool sinapylique formant des lignines mixtes G et S (Terashima *et al.*, 1993; Donaldson, 2001a). Une telle régulation temporelle rendrait en partie compte du couplage préférentiel des FA avec des unités G des lignines. En effet, Morrison et al. (1998) ont montré que le dépôt des FA se fait très précocement par estérification sur les chaînes latérales des arabinoxylanes des parois primaires au cours d'élongation. Dans le même ordre d'idée, Ralph et al. (1995) ont réalisé une analyse par RMN de l'incorporation des FA chez le ray-grass. Cette étude a indiqué que les FA portés par les arabinoxylanes (FA estérifié) pourraient fonctionner comme site d'initiation de la lignification. Ainsi, le dépôt des FA dans la paroi pourrait réguler la répartition des lignines de façon non-aléatoire dans la paroi au stade précoce.

Formation de la paroi secondaire

La fin de croissance cellulaire est souvent associée à l'apparition de la paroi secondaire. Celle-ci est située du côté interne de la paroi primaire (Figure I-17). La paroi secondaire est en riche en cellulose sous forme cristalline. Elle est composée de trois couches S1, S2 et S3 qui

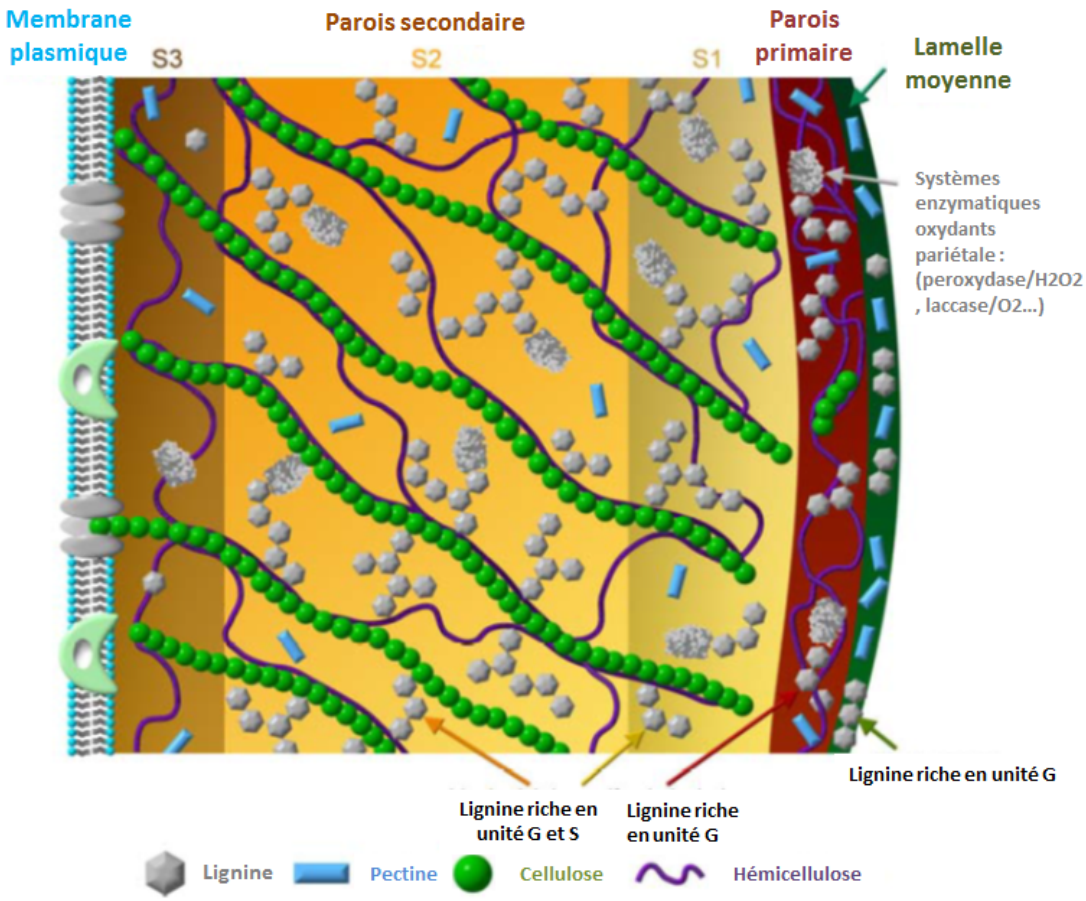


Figure I-17. Illustration d'une paroi cellulaire végétale. La localisation spécifique des différentes composantes de la paroi cellulaire végétale est présentée. Les contributions relatives des trois principaux monolignols des lignines dans les différentes couches sont également indiquées.

se distinguent par des orientations différentes des microfibrilles de cellulose (Figure I-2). A l'intérieur de ces plans les microfibrilles sont disposées parallèlement (Guerriero *et al.*, 2010). Au cours de développement de la paroi secondaire, la teneur en polysaccharides non-cellulosiques diminue. Ceci est dû à un dépôt important des cellulose et lignines (Chen *et al.*, 2002) qui diluent la teneur en hémicelluloses. Jung et Casler (2002; 2006a) ont montré que chez le maïs et la luzerne, la composition des hémicelluloses varie au cours de la maturation des parois secondaires avec une diminution du rapport arabinose/xylose. Comme les xylanes sont moins substitués par les arabinoses, le degré de substitution de l'arabinose par FA est fortement augmenté (Scobbie *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1998). En fait, au cours de la

maturation, une proportion plus importante d'arabinoses féruloylés est incorporée en regard de l'arabinose seul.

Après que la paroi secondaire enrichie en cellulose se soit mise en place, la lignification de la paroi s'intensifie. L'imprégnation des lignines se fait de manière centripète depuis la lamelle moyenne vers la paroi secondaire (Wilson, 1993).

Pendant le développement de la paroi secondaire, la composition des lignines évolue avec un enrichissement progressif en unités S dans la paroi secondaire alors que les lignines rencontrées dans la lamelle moyenne et la paroi primaire sont principalement de type G (Figure I-17) (Terashima *et al.*, 1993; Donaldson, 2001a). L'augmentation du rapport S/G est un phénomène général observé lors du développement des parois secondaire chez les graminées (Chen *et al.*, 2002; Jung and Casler, 2006a).

Jung et Deetz (1993) ont fait l'hypothèse que FA est déposé dans la paroi primaire et fournit des sites d'initialisation de la polymérisation des lignines. Si l'hypothèse était correcte, aucune nouvelle accumulation de férulates n'aurait dû être observée après la fin de croissance cellulaire. Mais en fait, Jung a observé que plus que 50% des FA sont déposés après la fin de croissance de l'entrenœud (Jung, 2003). Ces données indiquent qu'il y a une grande probabilité pour que les FA soient aussi déposés dans la paroi secondaire du maïs. Des analyses sur la croissance de feuilles de fétuque ont rapporté la même conclusion (MacAdam and Grabber, 2002). L'explication la plus plausible est donc que des férulates continuent à se déposer. Bernard-Vailhe et al. (2000) ont observé que le dépôt des FA est corrélé au dépôt des lignines. Il semble que le dépôt des FA se fasse donc à la fois dans les parois primaire et secondaire.

2.2 - Mise en place des tissus lignifiés au cours du développement d'un entre nœud de maïs

Au cours de la division cellulaire, les nouvelles cellules d'un entre nœud sont produites par le méristème situé à la base de l'entre nœud. Il se met ainsi en place un gradient d'âge cellulaire, avec les cellules les plus âgées en haut de l'entre nœud. Ce gradient spatio-temporel se retrouve également en termes de lignification au sein de l'entre nœud. Le méristème reste actif jusqu'à la fin de l'élongation de l'entre nœud. Le système vasculaire chez les

monocotylédones est généralement constitué de vaisseaux dispersés au sein de la tige et pas répartis sur une seule rangée comme chez les dicotylédones (Figure I-18).

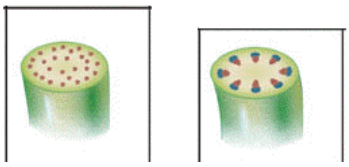


Figure I-18. Schématisation du système vasculaire chez les monocotylédones (à gauche) et chez les dicotylédones (à droite).

Un entre nœud jeune de maïs est constitué du bord vers le centre de la tige, d'une couche épidermale, d'une zone corticale constitué de 6 à 8 couches, d'une large zone avec de nombreux vaisseaux vasculaires et de la moelle avec des vaisseaux plus éparses (Figure I-19). Les vaisseaux situés dans le cortex présentent un sclérenchyme important contrairement à ceux situés dans la moelle (Figure I-19B).

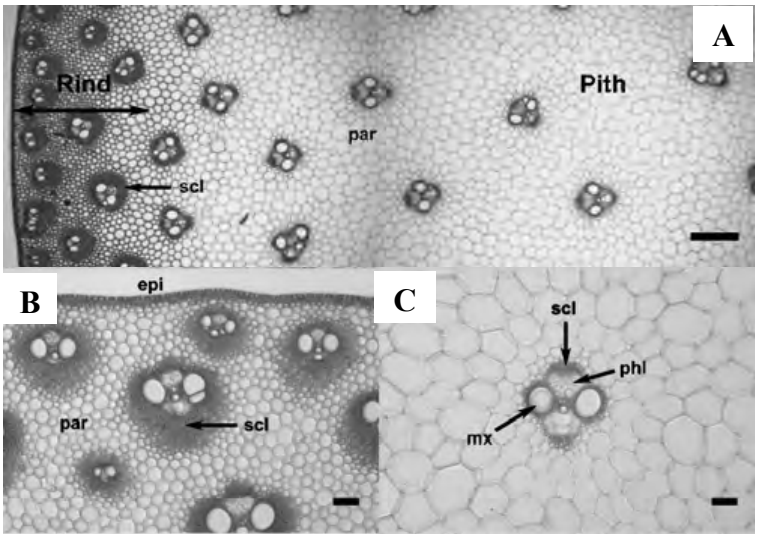


Figure I-19. Les différents tissus de la tige de maïs (Jung and Casler, 2006a). A, un aperçu partiel d'une coupe transversale d'entrenœud de maïs au stade maturité. La double flèche indique la largeur approximative du cortex (Rind). Bande = 500µm; B, Image zoomée du cortex. Bande = 100µm. C, Image zoomée d'un faisceau vasculaire dans la moelle. Bande = 100µm. Rind : cortex ; Pith : moelle ; scl : sclérenchyme ; par : parenchyme ; epi : épiderme ; phl : phloème ; mx : métaxylème.

Au stade jeune, comme le montrent Jung et Casler (2006a) chez le maïs en différenciant l'avancement de la lignification dans le cortex (Figure I-20, a à e) et dans la moelle (Figure I-20, f à j) seul le protoxylème des vaisseaux est lignifié (Figure I-20a).

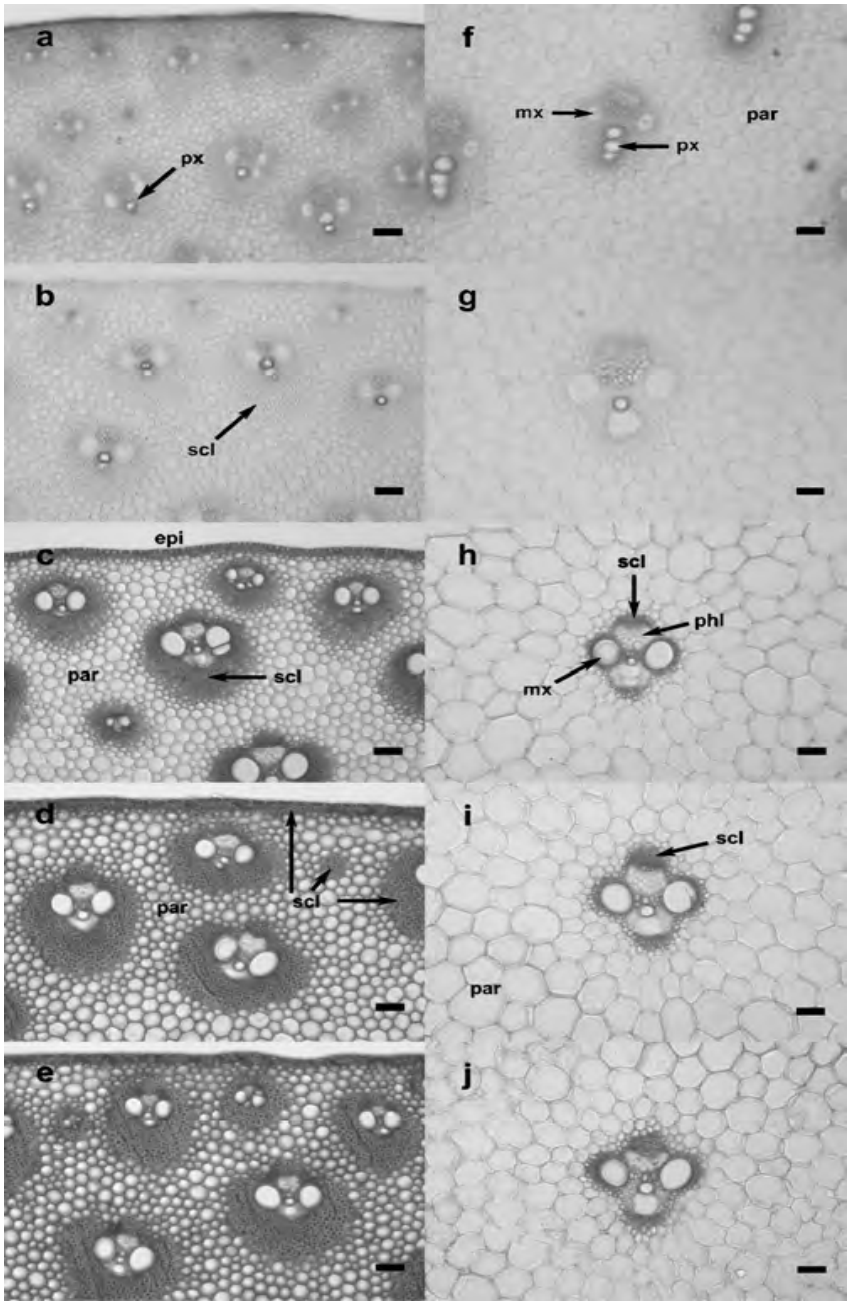


Figure I-20. Avancement de la lignification des tissus dans le cortex (a – e) et dans la moelle (f – j) au cours du développement d'un entrenœud (Jung and Casler, 2006a). Les tissus sont colorés pour la présence des lignines en utilisant le phloroglucinol. Les parois cellulaires apparaissent plus sombres. Bande = 100 µm, scl : sclérenchyme ; par : parenchyme ; epi : épiderme ; phl : phloème ; mx : metaxylème ; px, protoxylème.

Ensuite, le protoxylème reste le seul tissu lignifié mais les cellules du sclérenchyme qui entourent les vaisseaux du cortex commencent à s'épaissir (Figure I-20b). Avec la fin de l'élongation de l'entre nœud à la date 6 de prélèvement, Jung et Casler (2006a) montrent que le métaxylème et le sclérenchyme associé aux vaisseaux ont commencé à se lignifier (Figure I-20, c et h). A la date 8 de prélèvement, le parenchyme cortical a développé des parois épaisses et lignifiées et quelques spots de sclérenchyme non associés à des vaisseaux sont lignifiés (Figure I-20d). Dès le stade floraison, le pattern de lignification est donc déjà bien marqué (Wong Quai Lam Nöel, 2011). L'équipe de H.J. Jung a beaucoup étudié la mise en place de la lignification des entre nœuds au cours du développement en relation avec l'évolution de la dégradabilité chez différentes espèces dont le maïs. Ils montrent que les sucres pariétaux sont en place dès le 4ème stade de prélèvement alors que la teneur en paroi et en lignines augmentent jusqu'au 7ème stade de prélèvement auquel l'élongation de l'entre nœud se termine (Figure I-21).

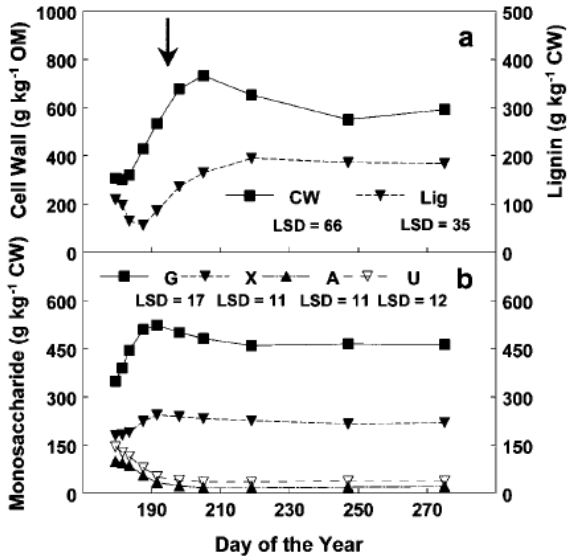


Figure I-21. Evolution des (a) teneurs en parois (CW), lignine Klason (Lig) et (b) teneurs en glucose (G), xylose (X), arabinose (A), et acide uronique (U) au sein d'un entrenœud au cours du développement. La flèche indique le temps approximatif d'arrêt de l'élongation de l'entrenœud Jung et Casler (2006a).

Dans le tableau I-7 issu de Jung et Casler (2006b) il apparaît très clairement qu'au sein de l'entre nœud, la mise en place des esters féruliques est achevée au 4ème stade en même temps que la mise en place des hémicelluloses (arabinose et xylose) alors que les pontages féruliques

n'atteignent leur maximum que beaucoup plus tard, vers le 7ème stade de prélèvement. L'acide *p*-coumarique par contre suit un gradient de mise en place continue au cours du développement de l'entre nœud. Contrairement à la teneur globale en lignines, la teneur en acide *p*-coumarique estérifié augmente jusqu'au dernier stade de prélèvement tout comme le rapport S/G (Tableau I-7). Ceci signe l'apport d'unités S acylées par PC jusqu'à la maturité grain au sein de l'entre nœud.

Tableau I-7. Comparaison des teneurs en parois et composantes pariétales d'entrenœuds prélevés à dix stades de développement (Jung and Casler, 2006b). Valeurs moyennes sur deux années de culture et trois lignées de maïs.

	Sampling date									
Trait†	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	g kg^{-1} organic matter									
Cell wall	307	302	320	429	534	677	733	653	551	593
	g kg^{-1} cell wall									
Glucose	349	391	445	510	523	501	482	460	465	463
Xylose	180	182	190	224	244	239	233	226	216	220
Arabinose	100	94	86	56	34	23	18	18	20	22
Galactose	70	62	55	33	17	10	8	8	10	11
Mannose	38	36	33	22	15	10	8	8	10	9
UA	145	127	115	80	52	40	35	35	38	38
KL	109	98	65	56	86	136	165	195	186	184
FA-esters	1.20	1.62	2.76	5.57	5.96	5.08	4.44	4.57	5.25	5.12
FA-ethers	0.41	0.57	0.43	1.99	3.50	4.81	5.52	4.81	5.17	4.77
PCA	0.84	0.84	1.12	7.59	14.64	23.46	29.65	32.65	34.90	35.04
					Normalized to guaiacol yield					
S/G ratio	0.08	0.03	0.02	0.55	0.84	1.37	1.74	1.87	2.15	2.24

UA, acide uronique ; KL, lignine Klason ; FA-esters, acide férulique esterifiée ; FA-ether, acide férulique etherifiée ; PCA, acide *p*-coumarique esterifiée ; S/G ratio, rapport S/G.

3. Les facteurs clés explicatifs des variations de dégradabilité des parois

Le maïs (*Zea mays L.*) est largement utilisé comme fourrage pour l'alimentation des ruminants, en particulier pendant l'hiver en raison de sa haute valeur nutritive (Struik and Dolstra, 1991). Tandis que la partie du grain de l'ensilage de maïs est hautement dégradable, la dégradabilité de la paroi cellulaire des tiges est très variable (Struik, 1985). Comprendre comment les composants pariétales affectent la dégradabilité de la paroi cellulaire est un objectif important de nombreux programmes de recherche visant à améliorer l'utilisation du fourrage pour l'alimentation animale (Akin, 1993).

La dégradabilité d'un fourrage peut être mesurée directement *in situ*, l'outil le plus utilisé est le mouton standard en cage. Cependant, cette méthode est longue, lourde et nécessite un aliment de composition constante. De plus, de fortes variations individuelles ou raciales sont constatées.

La dégradabilité peut être également estimée par des méthodes *in vitro* (Jung and Engels, 2002) ayant pour principe de simuler le processus digestif chez l'animal en utilisant du jus de rumen ou des enzymes. Les méthodes enzymatiques (IVDMD, in vitro dry matter digestibility) donnent des résultats moins concordants avec les valeurs *in vivo* que les méthodes microbiologiques (Schubiger *et al.*, 2001).

Pour les plantes fourragères, la dégradabilité enzymatique de la paroi cellulaire diminue au cours de la maturation des plantes (Morrison *et al.*, 1998), en lien avec la lignification progressive de la paroi (Jung and Deetz, 1993; Kondo *et al.*, 1998). Ainsi, la teneur en lignines dans la paroi est très tôt apparue comme la principale limitation à la dégradabilité des parois. Les mutants brown-midrib de maïs (Cherney *et al.*, 1991; Barriere and Argillier, 1993) présentent une réduction forte de la teneur en lignines. Cette modification de la teneur en lignines n'est pas le seul facteur touché chez ces mutants et par conséquent il peut être un peu rapide de conclure sur le seul effet de la teneur en lignines sur les propriétés observées. Cette diminution forte de la teneur en lignines des mutants bm participe de façon importante à l'altération de la valeur agronomique de la plante (Pedersen *et al.*, 2005).

Les études prenant en compte les relations entre la composition pariétale des plantes et leur dégradabilité pour améliorer cette dernière sont nombreuses. Deux types d'approches peuvent être envisagés pour comprendre l'impact de la composition pariétale sur la dégradabilité des parois. Des études in planta et des études *in vitro*. Ainsi peut-on :

1) S'attacher à étudier un matériel végétal afin de rechercher les relations entre la composition de la paroi et sa dégradabilité (Jung *et al.*, 2000; Mechin *et al.*, 2000; Novo-Uzal *et al.*, 2011; Boon *et al.*, 2012).

2) Utiliser la modélisation *in vitro* de la lignification (Fukuda, 1992; Grabber *et al.*, 1996b; Milioni *et al.*, 2001). Ces travaux de modélisation peuvent utiliser différentes méthodes. Dans ces 20 dernières années, l'équipe de Grabber a approché ces questions de modélisation via l'utilisation de cultures cellulaires de maïs. Dans ces études (Grabber, 2005), les parois non lignifiées des cellules de maïs contiennent des

férulates, ensuite et selon l'objectif de l'étude ces cultures sont incubées avec des concentrations/compositions variables de monolignols, methyl *p*-coumarate (pour empêcher l'acylation de *p*-coumarate), sinapyl *p*-coumarate, etc… Les parois des cultures cellulaires lignifiées sont ensuite analysées comme dans les approches développées *in planta*.

Dans la dernière partie de cette introduction, nous allons donc essayer de synthétiser l'impact des différents facteurs pariétaux phénoliques sur la dégradabilité des parois que ces études ont pu mettre en évidence. Nous n'avons pas repris dans cette partie les résultats relatifs à l'impact de la teneur en lignines, étant bien entendu que ce facteur, dès lors qu'il varie, est toujours très fortement et négativement relié à la dégradabilité des parois. Nous nous sommes concentrés sur l'impact de la composition monomérique et de la structure des lignines ainsi que sur celle de la teneur en acides *p*-hydroxycinnamiques.

3.1. Impact de la composition monomérique et de la structure des lignines sur la dégradabilité des parois

Les lignines de gymnospermes, entre autres différences avec celles d'angiospermes (Tableau I-8) (Achyuthan *et al.*, 2010), sont principalement composées de sous unités G et présentent une structure très condensée du fait de cette richesse. Une conséquence directe de cette composition/structure des lignines est que les arbres gymnospermes se prêtent moins bien aux traitements papetiers que les arbres angiospermes lors de la préparation de la pâte à papier (Whetten and Sederoff, 1991). Chez les arbres angiospermes, les modifications génétiques permettant une augmentation du rapport S/G aboutissant à des propriétés papetières améliorées (Boerjan *et al.*, 2003). Des travaux récents sur la production de biocarburants à partir de bois ont montré que durant le prétraitement, les lignines de type syringyle sont plus facile à solubiliser (Li *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Ainsi, un rapport S/G élevé est associé à un taux de récupération des sucres plus élevé (Santos *et al.*, 2012). Une étude sur la modification structurale des lignocelluloses causée par les termites (Ke *et al.*, 2011) a montré que les termites sont efficaces pour hydrolyser la cellulose et les hémicelluloses au sein de la matrice pariétale complexe. Dans les fèces de termites, les auteurs retrouvent des assemblages macromoléculaires issus des lignines qui ont subi des modifications structurales mais qui cependant ont conservé leurs abondantes liaisons β-O-4 entre sous unités des lignines.

Tableau I-8. Composition et structure des lignines de gymnospermes (bois tendre) et d'angiospermes (bois de feuillu) (Achyuthan *et al.*, 2010).

Softwood Lignin	Hardwood Lignin
Lignin content is ~ 28%	Lignin content is ~ 20%
Lignin dissociates faster in solution	Lignin dissociates slower in solution
Lignin self-associates greater in solution	Lignin self-associates less in solution
Harder to breakdown lignocellulosic biomass	Easier to breakdown lignocellulosic biomass
Coniferyl alchol primarily (~80%)	Coniferyl (~56%) and Sinapyl (~40%) alcohols
Guaiacyl (coniferyl alcohol derived) G-lignin	Guaiacyl-Syringyl (G-S) lignin; Syringyl is sinapyl alcohol derived lignin
Gymnosperms	Angiosperms, Dicotyledons
Molecular mass is larger than hardwood lignin	Molecular mass is lower than softwood lignin
Branching is higher	Branching is lower; Lignin is more linear
Cross-links are greater	Cross-links are fewer
C-C bonds are greater	C-C bonds are fewer
5' Linkages more common	5' Linkages less common
$-OCH_3$ content is ~20%	$-OCH_3$ content is ~14%
β-O-4 ether bonds are lower	β-O-4 ether bonds are higher
β-β and β-5 bonds are higher	β-β and β-5 bonds are fewer
Deconstruction is harder	Deconstruction is easier
Lignin is condensed	- - - - -

Dans de nombreuses espèces fourragères la teneur en lignines comme le rapport S/G augmentent avec la maturité des tiges (Jung and Vogel, 1986; Buxton and Russell, 1988). Ces facteurs se trouvent en outre négativement corrélés avec la dégradabilité (Buxton and Russell, 1988; Grabber *et al.*, 1992; Sewalt *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1997). En 2010, Taboada et al. (2010) ont étudié plus d'une centaine d'échantillons d'ensilage (Lolium multiflorum et Trifolium) et ont montré que la dégradabilité était le plus limité par les sous unités S d'une part et les acides *p*-hydroxycinnamiques éthérifiés d'autre part.

Pour réussir à mesurer l'impact des modifications de structure et de composition des lignines sur la dégradabilité, de nombreux travaux ont fait appel à des modifications génétiques qui ciblent un ou des gènes de la voie de biosynthèse des lignines. De nombreuses études visent les dernières étapes de la voie de biosynthèse des lignines en ciblant principalement la CAD et/ou la CCR. Ces dernières étapes permettent en général assez efficacement de moduler le rapport S/G. Les études sur dicotylédones : modification de la CAD sur tabac (Bernard-Vailhe *et al.*, 1996), modification de la CAD (Baucher *et al.*, 1999) modification de la CAD et de la CCR (Jackson *et al.*, 2008) sur luzerne, ou modification de la CCR sur arabidopsis (Goujon *et*

al., 2003) suggèrent qu'un rapport S/G plus faible permet une meilleure dégradabilité de paroi. Dans certaines des études citées précédemment, une diminution du rendement β-O-4 peut également être associée avec une augmentation de la dégradabilité. Une étude récente (Reddy *et al.*, 2005) vise des gènes plus en amont de la voie de biosynthèse des lignines chez la luzerne pour étudier les relations entre la teneur et la composition des lignines avec la qualité des fourrages. La dégradabilité est fortement augmentée chez les luzernes modifiées pour la C4H et la C3H, modérément pour celles impactées sur la cOMT et la CCoAOMT et pas du tout pour celles touchées sur la F5H. Ces améliorations de dégradabilité sont associées négativement à la teneur en lignines, mais aussi au rendement β-O-4 alors que le rapport S/G semble sans effet. En 2007, cette équipe a complété ces travaux avec notamment l'ajout d'un transformant luzerne HCT et des mesures de potentiel de saccharification sur l'ensemble des mutants (Chen and Dixon, 2007). Les transformants HCT et C3H présentent le plus fort potentiel de saccharification (mais aussi une forte réduction de quantité de biomasse). Ces deux transformants sont caractérisés par une forte teneur en sous unités H dans leurs lignines. Si les échantillons ne sont pas prétraités avant dégradation enzymatique alors la teneur en lignines ainsi que sa composition influent sur la dégradabilité alors qu'en cas de prétraitement, seule la teneur en lignines a un impact. D'autres études, comme celle développée sur le mutant F5H d'arabidopsis (Jung *et al.*, 1999) ou bien encore celles portant sur des travaux de modélisation sur cellule de maïs lignifiées artificiellement (Grabber *et al.*, 2003) ont conclu sur l'absence d'effet du rapport S/G sur la dégradabilité. Quelques plus rares études ciblent des gènes codant des facteurs de transcription qui ont pour cible des gènes de la voie de biosynthèse des lignines. C'est le cas des travaux développés sur dicotylédones par Wang et al. (Wang *et al.*, 2010) ou encore ceux présentés par Fornale et al. (Fornale *et al.*, 2010). Wang et al. (2010) ont ainsi obtenu des plantes qui lignifient fortement leurs parois dans la moelle jusqu'à atteindre des teneurs en lignines deux fois supérieures et également des quantités d'unités S très fortement accrues. Ces auteurs ne rapportent pas sur la dégradabilité de ces plantes (mais l'on peut imaginer qu'elle doit être diminuée). Le gène ZmMYB31 placé au centre de l'étude de Fornalé et al. (2010) réprime l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des lignines (4CL, C3H, F5H et cOMT) et diminue la teneur globale en lignines dans les plantes qui le sur-exprime tout en diminuant l'épaisseur des parois des vaisseaux. Ces plantes ne semblent pas présenter de modification de leurs proportions en sous unités S et G alors qu'elles ont 4 fois plus de sous unités H. Chez ces transformants, ces modifications sont associées à une augmentation de 14% de la dégradabilité de paroi.

Si l'on regarde plus spécifiquement ce qui a déjà été fait sur maïs, les mutants brown-midrib sont de précieux outils. Les résultats obtenus sur ces mutants sont synthétisés dans Barrière et al. (2004) dont est issu le tableau I-9. La meilleure dégradabilité (IVNDFD dans le tableau I-9) de ces 4 mutants (dans le fond génétique F2 et F292) est également associée à une diminution de la teneur en lignines.

Tableau I-9. Analyse comparative des composantes pariétales et de la dégradabilité *in vitro* des parois entre les lignées mutantes brown-midrib (dans le fond génétique F2 et F292) et leurs lignées isogéniques normales F2 et F292. (Barriere *et al.*, 2004)

	NDF	IV NDFD	LK/NDF	ester *p*CA	ester FA	ether FA
F292	56.2	15.9	16.4	49.5	11.9	3.2
F292bm1	54.9	19.2	14.6	26.0	9.8	2.4
F292bm2	51.3	20.2	13.6	45.5	12.4	1.8
F292bm3	52.2	23.1	13.0	28.5	12.8	3.0
F292bm4	53.4	22.8	14.3	45.1	12.6	2.6
F2	49.2	20.1	18.0	40.0	10.3	4.6
F2bm1	46.7	25.7	14.0	21.8	10.6	2.3
F2bm2	45.7	20.5	15.2	35.9	13.6	1.7
F2bm3	46.0	28.4	13.3	20.9	12.3	4.7
Standard error	1.2	2.2	0.5	0.9	0.3	0.8

	H	G	S	5-OH-G	S + G	S/G
F292	18.4 ± 0.7	325 ± 12	547 ± 25	3.0 ± 0.06	872	1.68
F292bm1	11.7 ± 0.4	182 ± 18	286 ± 31	2.0 ± 0.06	468	1.57
F292bm2	18.5 ± 0.7	298 ± 14	557 ± 42	2.8 ± 0.05	855	1.87
F292bm3	9.7 ± 0.4	436 ± 20	231 ± 16	74.0 ± 5	667	0.53
F292bm4	15.0 ± 0.5	264 ± 27	514 ± 48	3.1 ± 0.3	778	1.95
F2	12.7 ± 0.6	442 ± 22	453 ± 22	1.2 ± 0.04	895	1.02
F2bm1	6.6 ± 0.3	225 ± 18	227 ± 16	1.1 ± 0.06	452	1.01
F2bm2	12.5 ± 0.6	286 ± 4	400 ± 32	2.6 ± 0.05	686	1.40
F2bm3	7.8 ± 0.3	531 ± 31	183 ± 17	71 ± 6	714	0.34

NDF, teneur en paroi; IVNDFD, dégradabilité in vitro des parois; KL/NDF, teneur en lignine Klason dans la paroi; ester *p*CA, ester FA, ether FA, teneur en acide *p*-coumarique estérifié, acide férulique estérifié et éthérifié ($mg.g^{-1}$ NDF) ; H, G, S et 5-OH-G, sous-unité des lignines liées par des liaisons β-O-4 ($\mu mol.g^{-1}$ lignine Klason).

Chez les mutants bm1 et bm3 cette amélioration de la dégradabilité est aussi associée à une diminution du rendement β-O-4 et chez bm3 à une forte diminution du rapport S/G. Chez les mutants bm2 et bm4 par contre le rendement β-O-4 est peu modifié alors que les rapports S/G de ces deux mutants sont élevés en comparaison avec celui de leur isogénique normal. La

forte augmentation de ce S/G est certainement la caractéristique la plus forte de ces deux mutants. En 2000, Méchin et al. (2000) ont mis en évidence au sein d'une collection de lignées naturelles de maïs une relation positive entre le rapport S/G et la dégradabilité des parois alors que le rendement β-O-4 ne présentait pas de corrélation avec cette dégradabilité des parois.

Les résultats présentés au-dessus allant des études réalisées sur gymnospermes, en passant par les arbres angiospermes puis par les angiospermes dicotylédones pour finir très rapidement par quelques travaux sur angiospermes monocotylédones soulignent tout d'abord les fortes différences suivant les études quant à l'impact des différents facteurs structuraux des lignines sur la dégradabilité des parois. Ce rôle controversé du rapport S/G ou bien encore de la proportion de liaisons β-O-4 est évident. Je pense qu'il est important dans ces questions de souligner à nouveau les spécificités fortes des lignines/parois de graminées. En effet ces lignines comportent des unités H en proportion non négligeable, les unités S sont acylées par l'acide *p*-coumarique dans 20-40% des cas et l'acide férulique occupe une place importante dans les parois de graminées. Il est donc fort probable qu'il faille considérer de façon un peu particulière la question relative à la dégradabilité des parois de graminées en relation avec leur composition. Dans la partie qui suit, nous allons voir quelles peuvent être les relations entre la présence des acides *p*-hydroxycinnamiques dans les parois et la dégradabilité de celles-ci.

3.2. Impact sur la dégradabilité des parois d'une spécificité forte des parois de graminées : la présence d'acides *p*-hydroxycinnamiques

Une étude utilisant de la cellulose isolée et un polymère modèle pour les lignines (polyeugenol) a indiqué que la digestibilité de la cellulose est réduite uniquement lorsqu'il y a réticulation chimique à la lignine (Gressel *et al.*, 1983). Un peu plus tard, il a été proposé que la réticulation de la lignine et des arabinoxylanes via FA limite aussi la digestibilité des parois cellulaires en limitant l'accès physique des enzymes microbiennes hydrolytiques aux polysaccharides (Jung and Shalitajones, 1990; Jung and Deetz, 1993).

En 1972, Hartley (1972) rapportait une corrélation négative entre la dégradabilité des parois de ray-grass anglais (Lolium perenne L.) et le rapport de *p*-coumarate/férulate esters. Depuis, des études plus approfondies ont démontré que la réticulation des lignines et des

arabinoxylanes via FA est responsable d'une partie de la limitation de la dégradabilité chez les graminées (Argillier and Barriere, 1996; Grabber *et al.*, 1998b).

Dans des études de modélisation *in vitro* de la lignification, l'équipe de Grabber a mimé les réticulations par FA dans la paroi cellulaire de maïs. Leurs analyses de corrélation ont montré que la dégradabilité *in vitro* (avec utilisation de jus de rumen) est négativement affectée par l'augmentation de la réticulation par FA (Grabber *et al.*, 1998b). Dans une étude dédiée à plusieurs graminées vivaces, le même type de résultats a été mis en avant par Casler et ses collaborateurs (Casler and Jung, 1999, 2006; Casler *et al.*, 2008). Ils ont montré que la dégradabilité *in vitro* (avec utilisation de jus de rumen) était plus élevée pour les plantes dont les parois présentent des niveaux bas de réticulation par FA. Ils ont estimé que l'impact négatif de la réticulation par FA sur la dégradabilité était deux fois plus important que celui du à la teneur en lignines (Casler and Jung, 1999, 2006; Casler *et al.*, 2008).

En outre, les études de modélisation de Grabber et al. (1998b) ont aussi révélé que les diférulates (diFA) qui pontent entre elles des chaines d'arabinoxylanes limitent aussi le degré de dégradation par les enzymes. Dans le même ordre d'idée, une étude sur le son de blé a indiqué que le degré de dégradation des xylanes par des endoxylanases était liée au taux de substitution des arabinoses et à la présence de diférulates (Beaugrand *et al.*, 2004). L'utilisation d'estérases a permis de partiellement surmonter cette limitation en clivant les liaisons esters mettant en jeu des diFA.

Ces observations du rôle essentiel de FA sur la réticulation des parois ainsi que sur la dégradabilité des parois laissent penser que la réduction des ponts FA offre une possibilité d'amélioration de la qualité des fourrages tout comme du potentiel de saccharification. La sélection de génotype qui présente de faibles concentrations en ponts FA semble être une approche raisonnable pour remplir cet objectif d'amélioration. Cette sélection demande a être développée en veillant cependant à ne pas impacter négativement la valeur agronomique des plantes (Casler, 2005).

Des études ont montré que le dépôt des FA a lieu pendant le dépôt des parois secondaires (Bernard-Vailhe *et al.*, 2000; Jung, 2003). La formation de liaisons éther entre FA et les lignines est une réaction radicalaire et est donc essentiellement hors d'un contrôle enzymatique (Grabber *et al.*, 1998b), tandis que la synthèse de féruloylarabinoxylane est connue pour se dérouler dans l'appareil de Golgi (Figure I-22) (Meyer *et al.*, 1991; Myton and Fry, 1994; Hatfield and Marita, 2010) et dépend d'action notamment de transférases.

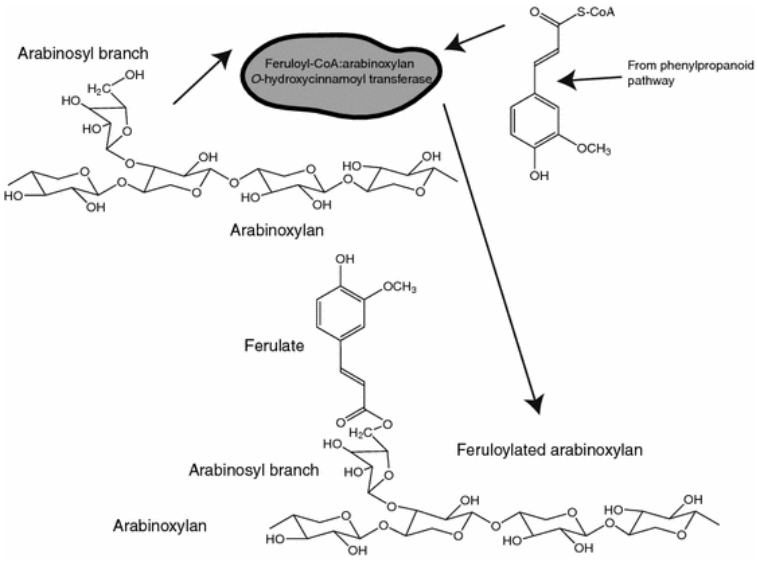


Figure I-22. Mécanisme possible pour la féruloylation des arabinoxylanes par des féruloyltransférases chez les graminées. (Hatfield and Marita, 2010)

Une mutation dans un gène dont le produit intervient dans le dépôt des FA au sein des parois peut permettre de limiter l'impact de l'acide férulique sur la dégradabilité des parois. Dans ce contexte, l'équipe de Jung a lancé un vaste programme de criblage, sur la base de la teneur en FA estérifié, de 4 populations de transposon-tagging de maïs créées initialement par le croisement d'une lignée mutator b3-mum9 avec 4 lignées (Chomet, 1994). Leur objectif majeur était de trouver un mutant taggué présentant une biosynthèse réduite de FA (estérifié) chez le maïs. Jung et Phillips présentent la caractérisation des mutants retenus dans leur étude de 2010 (Jung and Phillips, 2010). Un total de 380 plantes a été identifié dans ces populations comme présentant des teneurs élevées ou réduites en FA estérifié. Les 10 plantes présentant la plus faible teneur en FA estérifié dans des feuilles matures ont été retenues. Ces auteurs font l'hypothèse que le dépôt réduit de FA estérifié dans les tissus immatures pourrait expliquer une réduction des pontages entre lignines et arabinoxylanes par les férulates avec pour conséquence une augmentation de la dégradabilité *in vitro* des parois.

Cette hypothèse est cohérente dans le sens où une plus faible disponibilité en amorces féruliques pourrait entrainer un pontage réduit au stade mature. Peut-être faut-il cependant relativiser cette diminution en esters féruliques que les auteurs décrivent au stade immature. En effet tous leurs résultats sont présentés en g/kg de matière sèche (Tableau I-10, A et B).

Tableau I-10. A, Comparaison de la teneur en FAest et FAeth à différents stades (S, IM, M) et dans différents organes (Feuille, gaine, tige) des maïs W23 et des lignées sfe présentées dans Jung et Phillips (2010); B, Interprétation des données de Jung et Phillips (2010) : comparaison des composantes pariétales et de la dégradabilité de la tige de maïs entre W23 et les lignées sfe (valeurs rapportées par rapport à la matière sèche) ; C, Interprétation des données de Jung et Phillips (2010) : comparaison des composantes pariétales et de la dégradabilité de la tige de maïs entre W23 et les lignées sfe (valeurs rapportées par rapport à la teneur en paroi). (Jung and Phillips, 2010)

A

Line	Ferulate esters							Ferulate ethers					
	Leaf blade			Sheath		Stem		Leaf blade		Sheath		Stem	
	S	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M	IM	M
	g kg^{-1} dry matter												
W23	1.50	3.22	2.28	3.96	4.97	1.93	3.52	2.45	2.17	1.73	2.29	1.25	2.90
sfe lines													
M04-2	1.43	3.33	2.28	3.91	4.71	1.94	3.00	2.41	1.89	1.62	1.89	1.33	2.09
M04-4	1.48	3.29	2.25	3.96	4.76	1.95	3.07	2.43	1.97	1.59	1.99	1.26	2.40
M04-13	1.33	3.35	2.44	4.19	4.97	2.12	3.05	2.45	1.82	1.65	2.23	1.30	1.97
M04-21	1.23	3.41	2.37	4.10	4.98	2.20	3.09	2.36	1.70	1.66	1.85	1.24	1.71
W23 × *sfe* lines													
M04-2bx	1.43	3.24	2.39	4.02	4.95	2.04	3.59	2.46	2.07	1.70	2.15	1.36	2.82
M04-4bx	1.45	3.25	2.29	4.09	4.91	1.97	3.56	2.42	2.15	1.67	2.13	1.45	2.84
M04-13bx	1.42	3.26	2.37	4.07	5.02	2.14	3.47	2.40	1.95	1.68	2.23	1.39	2.72
M04-21bx	1.39	3.28	2.35	4.09	5.04	2.14	3.43	2.39	1.92	1.66	2.06	1.24	2.38
SEM	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.07	0.08	0.03	0.05	0.02	0.04	0.07	0.14
Contrasts													
W23 vs. *sfe*	***	***	NS	NS	**	NS	***	NS	***	***	***	NS	***
sfe vs. W23 × *sfe*	**	***	NS	NS	***	NS	***	NS	***	**	***	NS	***
W23 vs. W23 × *sfe*	*	NS†	NS	*	NS	NS	NS	NS	*	*	**	NS	NS

*$P < 0.05$.
**$P < 0.01$.
***$P < 0.001$.
†NS, nonsignificant ($P > 0.05$).

B	Tige immature					Tige mature				
lignée	FA ester(g/kg DM)	FA ether (g/kg DM)	PC ester(g/kg DM)	NDF (g/kg DM)	Dégradabilité 96h (g/kg)	FA ester (g/kg DM)	FA ether (g/kg DM)	PC ester(g/kg DM)	NDF (g/kg DM)	Dégradabilité 96h (g/kg)
W23	1.93	1.25	7.2	463	764	3.52	2.9	18.58	618	597
sfe	2.05	1.28	7.3	471	774	3.05	2.04	16.3	542	614

C	Tige immature					Tige mature				
lignée	FA ester (g/kg NDF)	FA ether (g/kg NDF)	PC ester(g/kg NDF)	ADL (g/kg NDF)	Dégradabilité 96h (g/kg)	FA ester (g/kg NDF)	FA ether (g/kg NDF)	PC ester (g/kg NDF)	ADL (g/kg NDF)	Dégradabilité 96h (g/kg)
W23	4.2	2.7	15.6	38	764	5.7	4.7	30.1	57.8	597
sfe	4.3	2.7	15.5	38	774	5.6	3.8	30.1	49.3	614

PC ester / FA ester / FA éther, teneur en acide *p*-coumarique estérifié / acide férulique estérifié et éthérifié (mg.g^{-1} NDF) ; NDF, teneur en paroi; ADL, teneur en lignine.

Une simple variation de teneur en paroi entre W23 et les lignées sfe pourrait expliquer les variations observées. Si l'on reprend leurs résultats en les exprimant, de façon plus rigoureuse et juste en fonction de la teneur en paroi (Tableau I-10C) alors il s'avère que les différences entre W23 et les lignées sfe deviennent très faibles. Il n'y a notamment pas de différence au stade immature en termes de teneur en ester féruliques. Au stade mature, ni les esters féruliques ni les esters *p*-coumariques ne présentent de différence. Une légère différence peut être notée pour les éthers féruliques mais surtout une forte différence de teneur en lignines est observée. Cette différence doit probablement expliquer une part importante des variations de dégradabilité observées. En comparaison avec les mutations bm, la mutation sfe serait plus spécifique mais il s'avère quand même qu'elle semble très discrète en termes d'effet sur la composition/structure des parois. Il n'en reste pas moins que le gène responsable de cette mutation pourrait avoir un intérêt pour l'amélioration de la dégradabilité mais nous relativisons l'impact attendu. Les résultats (non publiés) obtenus sur les mutant bm5 nous semblent beaucoup plus prometteurs à ce niveau-là. De façon très brève et confidentielle, ce mutant est caractérisé par une forte augmentation de sa dégradabilité de paroi associée à d'importantes diminutions des teneurs en FA éthérifié et en PC estérifié ainsi qu'à un rapport S/G très élevé.

Les gènes candidats impliqués dans la biosynthèse des féruloylarabinoxylanes ont été identifiés (Nair *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2007; Piston *et al.*, 2010), mais les mécanismes par lesquels FA influence la dégradabilité des parois cellulaires ne sont toujours pas clairs (Jung *et al.*, 2012). Une fois que ces gènes impliqués dans la mise en place des amorces féruliques recrutées pour la réticulation seront identifiés et clonés, une amélioration de la dégradabilité via leur sur/sous-expression sera envisageable.

Le rôle de PC dans la limitation de la dégradabilité des parois cellulaire n'est pas non plus clairement établi. PC n'est pas connu pour former des ponts comme le font les acides féruliques au sein des parois de graminées (Ralph *et al.*, 1994a). On peut donc imaginer que l'impact négatif de PC sur la dégradabilité est plus limité (Jung and Deetz, 1993; Grabber and Lu, 2010).

Des études sur le développement de tiges de maïs ont indiqué que l'incorporation de PC augmente avec la maturation des tiges (Scobbie *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1994). Une étude détaillée des entrenœuds divisés en tissus en haut de l'entrenœud (plus mature) et base de l'entrenœud (moins mature) dans le maïs a rapporté également des teneurs en PC qui

augmentent avec la maturité de l'entrenœud (Hatfield *et al.*, 2008). Comme nous l'avons déjà mentionné, plusieurs études ont montré que la teneur en PC augmente avec la lignification des parois (Scobbie *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1998; Hatfield and Chaptman, 2009). Il y a une relation positive entre la teneur en PC et la teneur en lignines dans la paroi.

Cette relation a au moins deux conséquences : i) il a été très souvent dit, voire admis, que le PC n'avait pas de rôle propre sur la limitation de la dégradabilité des parois mais un rôle indirect dû à sa liaison aux lignines. ii) l'idée que PC joue un rôle actif dans la formation des lignines des parois cellulaires du fait de son accrochage aux sous unités S commence à se faire une place importante dans les questions relatives à la lignification chez les graminées.

Au sein de la paroi des graminées, une caractéristique importante pour les *p*-coumarates est qu'ils se présentent comme des groupes terminaux avec un OH libre. Ils sont libérés facilement par hydrolyse alcaline à température ambiante et sont également évident sur des spectres RMN 13C (Ralph *et al.*, 1994a). Les acides *p*-coumarique, férulique et sinapique peuvent acyler les polysaccharides et sont potentiellement impliqués dans des liaisons polysaccharides-polysaccharides (Ralph, 2010). Chez les graminées, il faut noter que 90% des acides *p*-coumariques sont sur les unités S des lignines (Grabber *et al.*, 1996a; Lu and Ralph, 1999). Les pontages entre polysaccharides se font par déhydrodimérisation et sont bien établis pour les férulates et sinapates mais sont moins évidents pour les *p*-coumarates (Ralph, 2010). Les *p*-coumarates seraient plutôt concernés par des mécanismes de cyclodimérisation photochimique qui donne lieu à la formation d'acides truxilliques et truxiniques (Ford and Hartley, 1989). Une grande question subsiste : pourquoi l'acide *p*-coumarique (contrairement à l'acide férulique) ne subit-il pas de réactions de couplage radicalaire ? Ralph (2010) a indiqué qu'in *vitro* les *p*-coumarates participent à des couplages radicalaires mais rien n'a montré à ce jour qu'ils en étaient capables dans les parois de graminées. Il semble qu'il s'agisse d'une tendance chez les *p*-coumarates à transférer leur radical aux autres composés phénoliques et particulièrement aux sous unités S qui produisent des radicaux plus stables (Figure I-12) (Hatfield *et al.*, 2008).

Le concept de transfert de radical des *p*-coumarates vers les alcools sinapyliques a été introduit par Takahama et al. (Takahama *et al.*, 1996). Avec la plupart des oxydases, l'alcool sinapylique est un mauvais substrat et la génération du radical alcool sinapylique est très lente. Le *p*-coumarate agit donc comme un "catalyseur d'oxydation" pour l'alcool sinapylique.

Il est donc évident que le rôle de PC est crucial dans la polymérisation des lignines de graminées. Méchin et al. (2000) et Taboada et al. (2010) ont discuté du rôle négatif de PC sur la dégradabilité des parois. Au contraire, Jung et al. (2012) ont présenté un théorie opposée sur le rôle des *p*-coumarates sur le dévelopement et la dégradabilité de la paroi cellulaire. Ils ont indiqué que les *p*-coumarates liés aux lignines pouvaient agir comme des groupes terminaux et de ce fait limiter la taille des lignines. Par conséquent, les polymères « lignines » plus petits pourraient être moins couvrants pour les polysaccharides et limiteraient moins l'accès des enzymes aux polysaccharides. Pour vérifier leur hypothèse, ils ont proposé de transformer la luzerne avec un gène codant une *p*-coumaroyl-transférase (récemment, une BAHD acyltransférase a été identifié chez le riz (Withers *et al.*, 2012)) pour vérifier si alors la luzerne pouvait incorporer du PC à ses lignines et si cela conduisait alors à des polymères de plus petite taille.

3.3. Impact des différents tissus d'une tige sur la dégradabilité des parois

Bien qu'il existe de nombreuses données dans la littérature sur les relations entre la composition biochimique de la paroi cellulaire et la dégradabilité de la plante, ces informations ne permettent pas de rendre compte de l'intégralité des variations de dégradabilité de paroi observées. La structure des tiges et les proportions des différents tissus peuvent jouer un rôle dans l'explication de ces variations de dégradabilité.

Ainsi la variabilité dans le développement de la paroi cellulaire des tissus et les proportions relatives des différents types de tissus pourraient conduire à de fortes différences de dégradabilité de la plante. Il a été suggéré qu'au sein de la plante, la structure anatomique pourrait être plus importante que les facteurs biochimiques pour expliquer le taux et l'étendue de la dégradabilité (Wilson and Hatfield, 1997; Barros-Rios *et al.*, 2012). Chez la luzerne, les variations de dégradabilité ont été reliées en partie aux variations de proportion des tissus (Jung and Engels, 2002; Guines et al., 2003). Une comparaison anatomique des tiges de switchgrass de plantes sélectionnées pour des dégradabilités contrastées a mis en évidence d'importants changements dans la distribution des tissus lignifiés (Sarath *et al.*, 2005). Les génotypes de switchgrass qui présentaient les digestibilités les plus réduites étaient également ceux qui affichaient une lignification complète du parenchyme et du sclérenchyme cortical. Une analyse de ces plantes a également montré une différence d'accessibilité aux cellulases. Ces travaux indiquent clairement que des différences dans l'architecture de la paroi cellulaire

existent et que ces différences en plus des variations dans la composition pariétale impactent la dégradabilité des parois (Sarath *et al.*, 2008). De la même façon, les lignées brown-midrib de maïs connues pour leur bonne dégradabilité présentent aussi une plus grande proportion de tissus non lignifiées (Ehlke and Casler, 1985). Chez le maïs toujours, mais au sein de la variabilité naturelle, il a été montré que les différents tissus rencontrés au sein d'une tige, leur répartition et leurs proportions au sein de cette tige ainsi que leur lignification peuvent aussi rendre compte d'une part importante des variations de dégradabilité de paroi (Méchin *et al.*, 2005 ; Jung and Casler, 2006b).

Jung et Casler (2006b) ont étudié en détail la dégradation enzymatique de la région corticale de tiges d'hybrides de maïs au cours du développement. Ainsi sur des entre nœuds encore jeunes, après 24h d'attaque enzymatique par les microorganismes du rumen la majorité des tissus de la coupe sont reconnaissables mais tous, excepté le protoxylème des vaisseaux (qui est le premier à se lignifier au cours du développement), présentent des signes de dégradation importante (Figure I-23b).

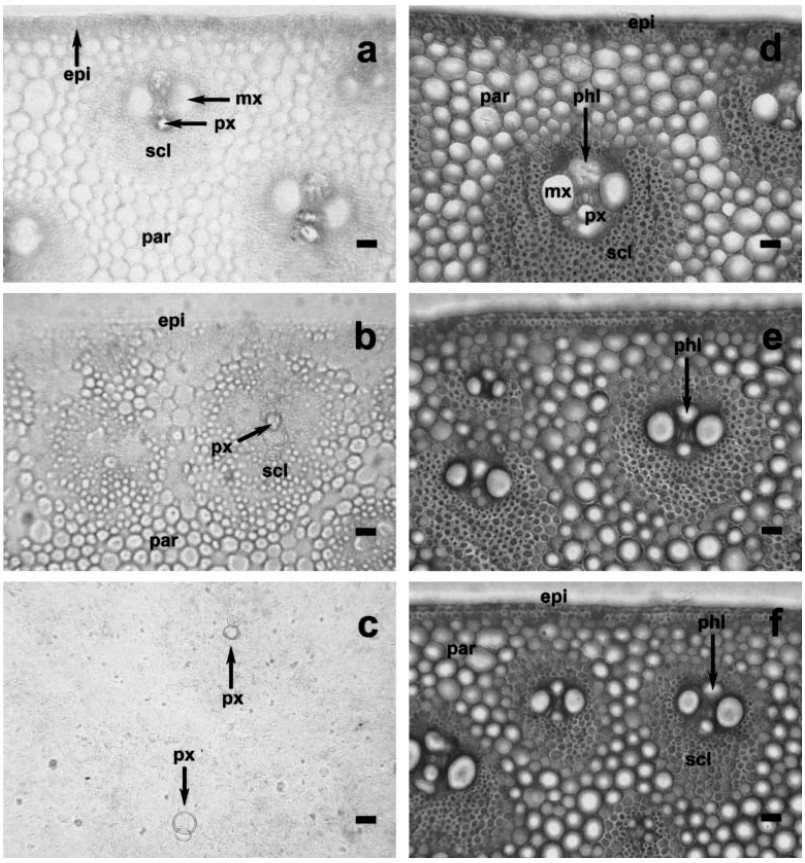


Figure I-23. Comparaison des tissus épidermiques intacts au stade immature (a) et mature (d) et après la dégradation par des jus de rumen pendant 24h (b, e) ou 96h (c, f) (Jung and Casler, 2006b). Bande = 40 µm ; scl : sclérenchyme ; par : parenchyme ; epi : épiderme ; phl : phloème ; mx : metaxylème ; px, protoxylème.

Après 96h d'attaques enzymatiques, les seules structures pariétales reconnaissables sont les anneaux de protoxylème (Figure I-23c). Sur des entre nœuds beaucoup plus âgés, seul le phloème est complètement dégradé (Figure I-23, e et f). Les travaux développés par Méchin et al. (2005) sont plus globaux et ne détaillent pas de façon tissus spécifiques les mécanismes de dégradabilité. Ces travaux s'attachent à étudier, au sein de la variabilité génétique naturelle chez le maïs, l'impact des variations de facteurs biochimiques et histologiques sur les variations de dégradabilité de paroi. Ils ont montré que la surface lignifiée au sein de coupes d'entre nœud de maïs permettait d'expliquer 40% des variations de dégradabilité de parois à elle seule. De surcroit, cette étude a montré que la combinaison de facteurs biochimiques et histologiques permettait de rendre compte de la quasi-totalité (89%) des variations pour la dégradabilité des parois. Le modèle proposé par Méchin et al. (2005) utilise une combinaison de 2 facteurs biochimiques (la teneur en acide *p*-coumarique et le rapport S/G) et 2 facteurs histologiques (la surface rouge lignifiée sur les coupes et le nombre de couches de cellules dans le sclérenchyme cortical) pour rendre compte des variations de dégradabilité de paroi. Ainsi ces auteurs proposent-ils un idéotype de maïs pour la dégradabilité des parois qui aurait une teneur raisonnable en lignines, que ses lignines soient plutôt plus riches en sous unités S qu'en sous unités G et qu'elles soient préférentiellement localisées dans la région corticale plutôt que dans la moelle. Nous ajoutons que les résultats obtenus dans ce travail montrent aussi que les lignines de cet idéotype doivent être peu acylées par l'acide *p*-coumarique.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

1. Le matériel végétal

1.1. Les 8 lignées recombinantes (LR) choisies dans la population issue du croisement entre F286 et F7012

F286 et F7012 ont été retenues en 2003 pour réaliser le croisement de départ d'une population de lignées recombinantes dédiée à l'étude de l'impact des acides *p*-hydroxycinnamiques sur la dégradabilité des parois. Ces deux lignées présentent de bonnes dégradabilités de parois et sont assez contrastées en termes de teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques. En 2006, les F6 ont été mises en essai au champ en valeur propre sur 2 lieux (Lusignan (86) et Le Pin (61)). Une forte sensibilité au charbon a alors été détectée dans cette population dont la création a été stoppée et le génotypage non réalisé. En 2007, un core-collection de 48 LR a été constituée (et la fixation du matériel a été poursuivie pour ces génotypes) en retenant des individus peu sensibles au charbon et présentant des valeurs hautes et basses pour leurs teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques. Au début de ce travail de thèse, 8 LR ont été retenues parmi les 48 en fonction de leurs teneurs en lignines (ADL (%NDF)) comparable et leurs dégradabilités de parois contrastées au stade ensilage. Les deux parents de départ ont également été caractérisés dans ce travail.

1.2. Les 7 lignées naturelles de maïs choisies

Sept lignées ont été retenues au sein d'une collection de lignées caractérisées à Lusignan durant les 15 dernières années. Les lignées retenues l'ont été, là aussi, sur un critère teneur en lignines comparable au stade ensilage et pour couvrir une large gamme de variation en termes de dégradabilité de paroi (prédit par NIRS) (Figure II-1). Ces 7 lignées ont été prélevées à 6 stades de développement des plantes comme détaillé juste en dessous. Les points rouges représentent les 7 lignées retenues. Sur ces 7 lignées seules trois ont pu être caractérisées intégralement au cours du travail de thèse (nom en rouge sur la figure II-1). Les 4 restantes (nom en vert sur la figure II-1) le seront ultérieurement.

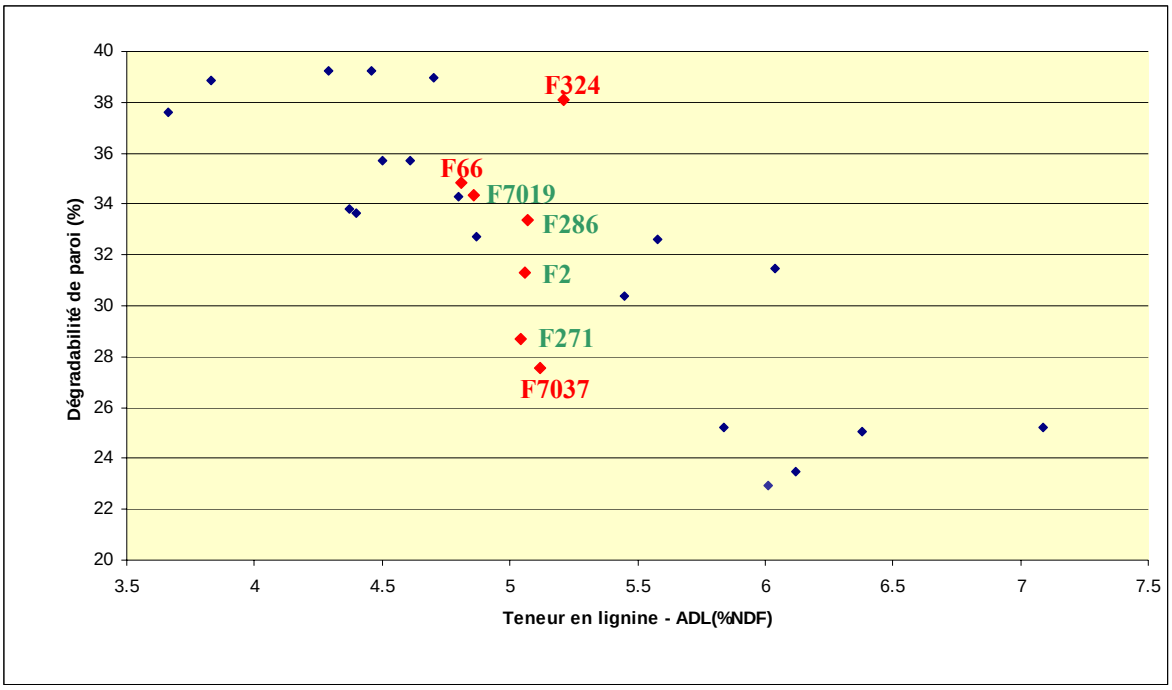


Figure II-1. Sélection des 7 lignées naturelles de maïs.

2. Les expérimentations au champ

2.1. Culture et récolte en plantes entières sans épis pour les 8 LR

Les 8 LR retenues ainsi que les deux parents (F286 et F7012) de la population de LR ont été cultivés à Lusignan (INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, France) en 2008 et 2009. Les essais ont été réalisés sous forme de blocs randomisés de trois répétitions d'une ligne de 5.2 m de long. La densité de semis était de 90 000 plantes par hectare. Les essais ont été irrigués de mi-juin à fin août afin de limiter le stress hydrique. Pour chacun des 10 génotypes, les plantes entières sans épis ont été récoltées au stade ensilage. Les prélèvements ont ensuite été séchés pendant environ 48 heures (étuve à 60°C) puis broyés à la grille de 1 mm pour obtenir les poudres de matières sèches (MS) sur lesquelles les analyses ont ensuite été réalisées.

2.2. Culture et prélèvements au cours du développement des entrenœuds pour les 7 lignées

Les 7 lignées retenues ont été cultivées dans les mêmes conditions que les LR en 2009, 2010 et 2011. Pour chaque répétition terrain, les entrenœuds sous épis ont été prélevés pour chaque lignée à 6 stades de développement différents en 2009 et 2010: 8 feuilles ligulées (S1), 10 feuilles ligulées (S2), panicule visible (S3), floraison femelle (S4), 14 jours après floraison femelle (S5) et stade ensilage (S6) (Figure II-2). Pour S1 et S2, 50 entrenœuds ont été prélevés pour les deux premiers stades puis 15 entrenœuds pour les quatre stades suivants. Les entrenœuds ont ensuite été séchés et broyés à la grille de 1 mm. Pour chacune des lignées et dans chacune des répétitions terrain, 5 entrenœuds sous épis ont été récoltés en 2011 et conservés dans une solution d'éthanol à 70%.

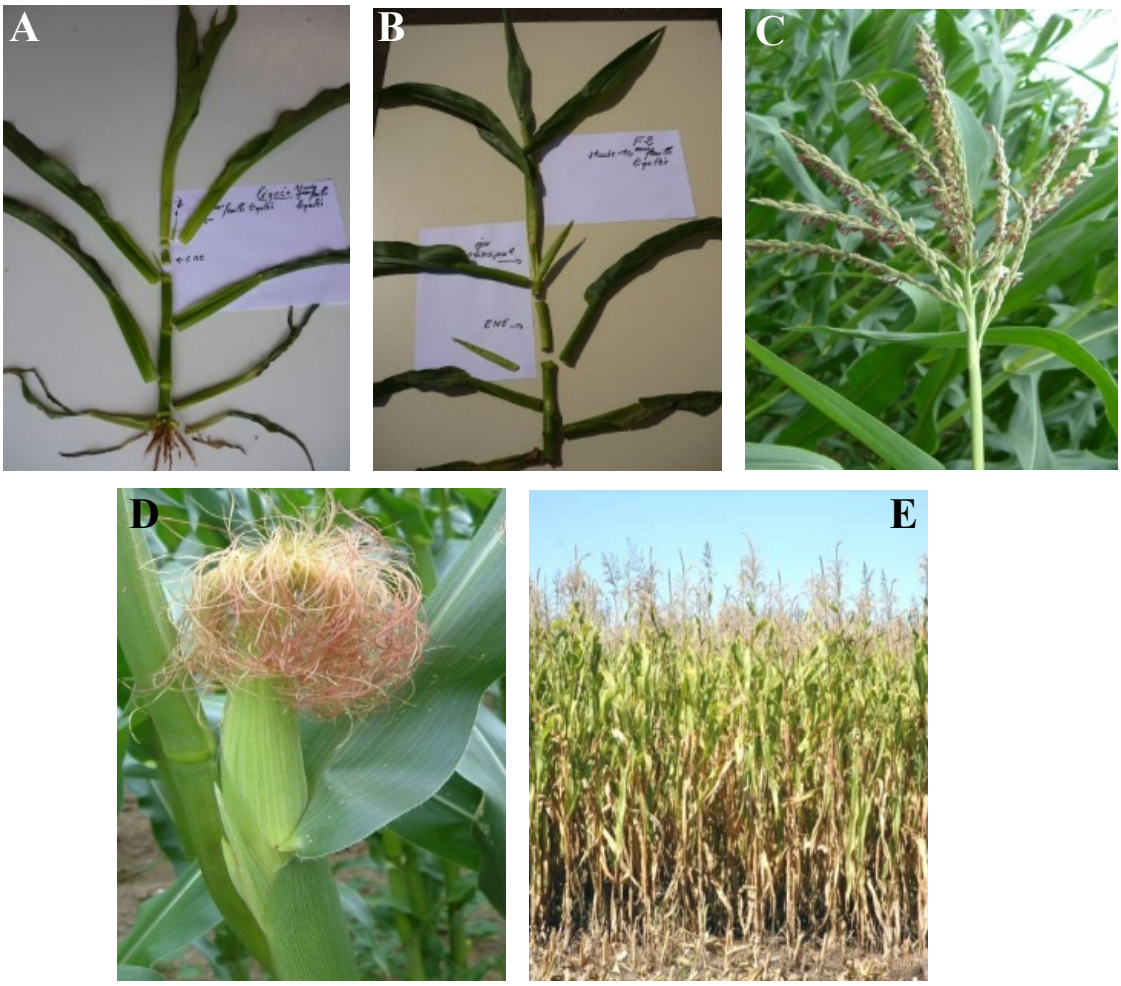


Figure II-2. Les différents stades de développement des maïs dans notre étude. A, 8 feuilles ligulées (S1) ; B, 10 feuilles ligulées (S2) ; C, panicule visible (S3) ; D, floraison femelle (S4) ; et E, stade ensilage (S6).

3. Les méthodes d'analyses biochimiques mises en œuvre

3.1. Détermination de la teneur en paroi et obtention du résidu pariétal (RP)

Deux procédures (Soxhlet ; ASE) ont été utilisées pour préparer les résidus pariétaux (RP) et estimer la teneur en paroi durant la thèse. Cette étape est également une étape préparative du RP qui est utilisé dans les différentes analyses biochimiques réalisées par la suite.

Extraction au soxhlet

Une double extraction au soxhlet est effectuée afin d'éliminer les extractibles. La poudre broyée à 1 mm est placée dans une cartouche de fibre de verre (Whatman, glass micro fibre). Les cartouches sont ensuite placées dans la chambre d'extraction qui permet le passage des solutions d'extraction. Les solutions d'extraction sont chauffées dans un ballonnet puis recondensées par un réfrigérant de façon à remplir régulièrement la chambre d'extraction et extraire les composés solubles. Une première extraction à l'éthanol pendant 2 jours permet d'éliminer les lipides. Une seconde extraction à l'eau pendant 3 jours permet d'éliminer les composés hydrosolubles (les oses, les pectines et les protéines) avant d'être séchés à l'air puis mis à l'étuve (70°C) pendant 48h.

La pesée des échantillons placés dans les cartouches avant et après extraction permet de déterminer la teneur en paroi et en extractibles de l'échantillon.

Extraction par ASE

Pour les échantillons des entrenœuds des trois lignées de maïs (F324, F66 et F7037) prélevés en 2009, un dispositif d'extraction accélérée par solvant (ASE, dionex) a été utilisé pour réaliser des extractions solide/liquide à partir des poudres de départ. Une cellule de 34 ml est remplie par environ 3 g d'échantillon. L'échantillon est extrait sous pression (laquelle) et à 100°C par plusieurs solvants successifs : 3 fois 20 ml d'eau milliQ puis 3 fois 20 ml d'éthanol. Le RP sont ensuite séchés à l'air puis 48 H à 70°C dans l'étuve afin d'éliminer les traces de solvant.

La pesée des échantillons placés dans les cartouches avant et après extractions permet de déterminer la teneur en paroi et en extractibles de l'échantillon.

3.2. Détermination de la teneur en lignines

Dosage par la méthode Klason (Dence and Lin, 1992)

Un échantillon de 300 mg de RP est mis en suspension dans 3 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) 72% (p/v) pendant 2 heures à température ambiante. La suspension est agitée toutes les demi-heures, puis diluée avec de l'eau (43 ml, v/v) afin de maintenir les échantillons dans une concentration de 5% en H_2SO_4 pendant 3 heures, à 100°C à reflux. Le résidu insoluble correspondant à la lignine Klason. Ce résidu est récupéré par filtration sur un creuset de porosité et muni d'un filtre de verre (Whatman, glass micro fibre) puis rincé en plusieurs fois par 100 ml d'eau sur le filtre. L'ensemble du résidu et du filtre sont séchés une nuit à 100°C dans l'étuve. La masse du résidu est pesée après avoir refroidi à l'abri de l'humidité. La teneur en lignine Klason est corrigée de la teneur en cendre déterminée par incinération du filtre contenant le résidu sec à 550°C pendant 3 heures. Pour chacun des échantillons, les essais ont été réalisés en double.

Dosage par la méthode Van Soest (Goering and Van Soest, 1970)

Dans une première étape, 250 mg de RP sont pesés dans un sachet filtre (ANKOM F57) et soumis à l'action d'une solution d'ADS (2% CTAB dans H_2SO_4 1N) pendant 1 heure à 100°C sous pression, avec un rapport de nombre de sachets / volume de réactifs de 12 sachets par 1 l de ADS. Cette solution permet la solubilisation des hémicelluloses contenues dans le RP. Le résidu ADF contient donc essentiellement les lignines et la cellulose. Les sachets sont rincés à l'eau bouillante et à l'acétone puis séchés une nuit à l'étuve à 70°C. Ils sont alors pesés. Par différence entre la masse de RP placé dans les sachets et la masse d'ADF obtenue, on peut donc déterminer la quantité d'hémicelluloses solubilisées.

Dans une seconde étape, les sachets contenant le résidu ADF sont soumis à une attaque acide par H_2SO_4 à 72% pendant 3 h à température ambiante tout en agitant régulièrement. Cette attaque permet de solubiliser la cellulose et le résidu ainsi obtenu n'est donc essentiellement constitué que de lignines (ADL). Les sachets sont rincés à l'eau bouillante et à l'acétone puis séchés une nuit à l'étuve à 70°C. Ils sont alors pesés. Par différence entre la masse d'ADF dans les sachets et la masse d'ADL obtenue, on peut donc déterminer la quantité de cellulose (ADF – ADL). La teneur en lignine ADL est corrigée par la teneur en cendre déterminée par

l'incinération du sachet contenant le résidu sec à 500°C pendant 4 heures (ADL – cendre). Pour chacun des échantillons, les essais ont été réalisés en double.

3.3. Détermination de la composition monomérique des lignines par thioacidolyse

Selon le protocole défini par Lapierre et al. (Lapierre *et al.*, 1986), l'analyse par thioacidolyse (dégradation chimique et désulfuration) fournit de nombreuses informations structurales. Les principaux monomères thioéthylés Ar-CHSEt-CHSEt-CH_2Set (Ar = cycle *p*-hydroxyphényle, gaïacyle, ou syringyle) sont issus des unités de lignines liées uniquement par liaison β-O-4 labile. Leur analyse par CPG-SM informe sur la proportion d'unités phénylpropanes liées uniquement en β-O-4 dans l'échantillon (Figure II-3).

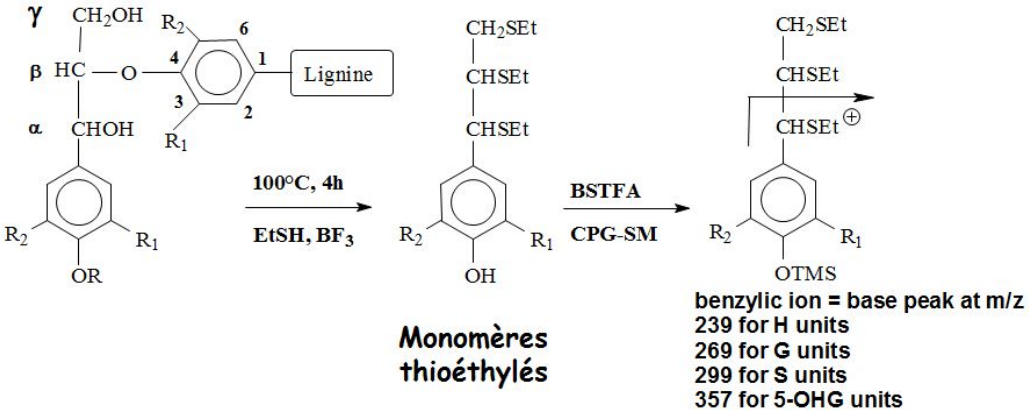


Figure II-3. Principe de la méthode de thioacidolyse. Les trois unités principales H, G, et S engagées uniquement dans des liaisons β-O-4 génèrent des monomères thioéthylés spécifiques. Après silylation (BSTFA), ces monomères sont analysées en CPG-SM ; les chromatogrammes reconstruits sur chaque ion benzylique permettent d'évaluer de manière univoque la fréquence relative des unités générées par ces monomères (Lapierre *et al.*, 1995).

15 mg de RP sont placés en présence de 10 ml de réactif de thioacidolyse et de 1 ml d'une solution d'étalons internes (hydrocarbures C_{19} + C_{21} + C_{22}, 0,5 $mg.ml^{-1}$ pour chacun et DMT 2 $mg.ml^{-1}$). Ce réactif de thioacidolyse est un mélange d'éthanethiol (10 ml), de BF_3 étherate (2,5 ml) et de dioxane (qsp 100 ml). Les tubes contenant les mélanges sont placés dans un bain d'huile à 100°C pendant 4 heures. Ils sont ensuite refroidis dans un bain de glace pour

arrêter la réaction. Le contenu du tube ainsi qu'un tube d'eau de rinçage sont versés dans un bécher contenant 30 ml de CH_2Cl_2. Le pH de la phase aqueuse est ajusté à 3-4 avec quelques gouttes de HCl 6 N. les monomères de lignines sont alors extraits par deux fois 20 ml de CH_2Cl_2. L'extrait organique est séché sur Na_2SO_4 anhydre puis évaporé sous pression réduite à 40°C. Le résidu final est repris dans environ 1 ml de CH_2Cl_2 et conservé à 4°C sur Na_2SO_4 pour les analyses chromatographiques (les thioacidolysats peuvent se conserver très longtemps à 4°C).

8 µl de ce thioacidolysat sont silylés par 100 µl de BSTFA et 10 µl de pyridine à température ambiante pendant au moins 1 heure. L'échantillon silylé (5 µl) est injecté et analysé par CPG-SM (Varian 2100, colonne : PDMS, 30 × 0,25, 40°C à 180°C à + 30°C.min^{-1}, 180°C à 260°C à + 2°C.min^{-1}, ionisation I.E. 70 eV, détection en mode positif)

3.4. Détermination des teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques

Rupture des liaisons esters ou ester + éther par hydrolyse alcaline

Les teneurs en acide férulique (FA) et *p*-coumarique (PC) sont mesurées après traitement du RP par de la soude selon la procédure de Morrison et al. (1993). Cette méthode emploie deux traitements alcalins différant dans leur sévérité.

Les acides *p*-hydroxycinnamiques liés par liaisons esters sont libérés en soumettant les échantillons de RP (50 mg) à une hydrolyse douce avec de la soude 2 N (5 ml) à température ambiante pendant 20 heures sous agitation mécanique.

Les acides *p*-hydroxycinnamiques liés à la fois par liaisons esters et éthers sont libérés en soumettant les échantillons de RP (50 mg) à une attaque alcaline plus sévère avec de la soude 4 N (5 ml) à une température de 170 °C pendant 2 heures dans des autoclaves.

Les milieux réactionnels issus de ces deux types d'hydrolyses sont alors soumis aux mêmes procédures pour récupérer les acide *p*-hydroxycinnamiques libérés.

Deux méthodes de récupération ont été mises en œuvre au cours de la thèse. Dans les deux cas, l'objectif est de purifier les composés phénoliques de la fraction polymérique solubilisée en milieu alcalin.

Purification par extraction à l'acétate d'éthyle

Cette méthode d'extraction utilisée classiquement a été appliquée pour l'analyse des 8 LR issue de F286 × F7012 ainsi que les deux parents.

Après avoir ajouté 1 ml de la solution d'étalon interne (1 $mg.ml^{-1}$ éthyl vanilline dans le méthanol), le milieu réactionnel est centrifugé (1700 rpm pendant 10 min), puis le surnageant est acidifié à pH 2-3 par une solution d'HCl 3N (pour l'hydrolyse alcaline douce) ou 6N (pour l'hydrolyse alcaline sévère) avant d'être placé une nuit à 4°C pour assurer la précipitation des polymères (hémicelluloses et lignines alcalin-solubles). Les suspensions obtenues sont alors extraites par trois fois 20 ml d'acétate d'éthyle. Après séchage sur sulfate de sodium (Na_2SO_4), le solvant est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris dans 2 ml de méthanol et filtré sur filtre GH polypro membrane (0,45 µm, GHP Acrodisc, German) en vue de l'analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Durant toutes les étapes, y compris l'extraction et l'analyse, les échantillons sont conservés au maximum à l'abri de la lumière afin d'éviter la dégradation et l'isomérisation des acides *p*-hydroxycinnamiques.

Purification par précipitation avec les réactifs de Carrez

Cette méthode de purification adaptée par Culhaoglu et al. (2011) pour l'extraction des acides *p*-coumarique et férulique a été appliquée pour les analyses des 7 lignées naturelles de maïs. Cette méthode consiste à faire précipiter sélectivement par complexation des hydrocoloïdes présents dans le milieu réactionnel et à maintenir en solution les composés d'intérêt. Après ajout de 1 ml de la solution d'étalon interne (éthyl vanilline, 1 mg/ml dans le méthanol), l'échantillon hydrolysé est acidifié par une solution d'acide chlorhydrique. Le pH est ramené à 5-6 en vue de récupérer le maximum d'acides férulique et *p*-coumarique sans risquer de former des vapeurs toxiques d'acide cyanhydrique à un pH plus acide. 750 µl de la suspension est mélangée avec 1 ml d'éthanol. On ajoute ensuite 70 µl de solution Carrez I (solution d'acétate de zinc à 0,1 $mol.ml^{-1}$) et on vortexe pendant 2 min. On ajoute ensuite 70 µl de solution Carrez II (solution de ferrocyanure de potassium à 0,1 $mol.ml^{-1}$) et l'on mélange pendant 20 s. Le surnageant récupéré après centrifugation à température ambiante (10000 rcp pendant 10 min) est ultrafiltré (0,45 µm GFP, Acrodisc, Gelman) avant analyse par CLHP.

Les extraits obtenus par la méthode d'extraction par solvant et par la méthode de précipitation Carrez sont analysés par CLHP. La chaîne CLHP (Thermo Electron Corporation) est équipée

d'un détecteur UV à barrettes de diode (PDA) (190 – 600 nm). La séparation est effectuée sur une colonne de silice greffée C18 (Highpurity, therme Electron Corporation) grâce au gradient de solvants présenté dans le tableau II-1 :

Tableau II-1. Gradient de solvant utilisé en CLHP analyse.

Temps (min)	Débit ($ml.min^{-1}$)	Acétonitrile avec 1‰ HCOOH	H_2O avec 1‰ HCOOH
0	0.8	5	95
5	0.8	9	91
15	0.8	9	91
22	0.8	11	89
38	0.8	18	82
40	0.8	18	82
41	0.8	80	20
49	0.8	80	20
0	0.8	100	0

Les acide *p*-hydroxycinnamiques sont dosés selon la méthode de l'étalonnage interne et après détermination de coefficient de réponse pour chaque composé grâce à l'injection d'une solution de référence de concentration connue. Les quantités en acide férulique et *p*-coumarique liés par liaison ester sont ainsi directement obtenues par analyses des échantillons issus de l'hydrolyse douce. Les quantités en acide férulique et *p*-coumarique liés par liaison éther sont, quant à elles, obtenues en faisant la différence entre les quantités d'acides totaux libérés par hydrolyse sévère et les quantités d'acides liés en ester uniquement (hydrolyse douce). Deux répétitions analytiques ont été réalisées pour chacun des échantillons.

3.5. Estimation des dégradabilités

La dégradabilité de la matière sèche des échantillons (IVDMD pour in vitro dry mater degradability) a été estimée par la méthode de solubilité enzymatique (protocole adapté de la méthode Libramont-Limagrain (Ronsin, 1990)), qui fait appel à une succession de dégradations par des enzymes. Les échantillons de matière sèche (500 mg) sont placés dans des sachets (ANKOM F57 Filter Bags) puis soumis aux différentes attaques enzymatiques. La première attaque enzymatique est assurée par des pepsines en milieu acide (7 g pepsine dans 1 l de HCl 0.1 N), 24 h à 40 °C sous rotation finie par 30 min à 80°C. Une seconde attaque est ensuite réalisée par un mélange de cellulases et d'hémicellulases (2.95 ml acide acétique, 6.8 g sodium acétate, 1g cellulase et 1.5 ml amyloglucosidase, qsp 1 l H2O) 24 h à 40°C sous rotation. La différence entre la quantité de matière sèche de l'échantillon de départ et le résidu obtenu après ces deux attaques, constitue la quantité de matière sèche dégradée.

La dégradabilité de la paroi a été estimée en posant comme hypothèse que les parties non-paroi étaient complètement dégradables, et en utilisant la teneur en RP et la dégradabilité de la matière sèche des échantillons (Mechin *et al.*, 1998):

$$IVCWRD = 100 \times (IVDMD - (100 - RP)) / RP$$

4. Les méthodes utilisées pour l'étude histologique

4.1. Coupe des tiges de maïs

Un tronçon d'environ 1 cm de long est coupé au milieu de chaque entrenœud conservé dans l'éthanol à 70°. Ce tronçon est mis à tremper dans l'eau pendant 1 nuit pour les hydrater. Pour chaque tronçon, 15 coupes de 150 µm d'épaisseur ont été préparées au vibratome (Leica VT1000 S) avec une lame saphir (DDK- Permanent Steel Microtome Knives 160 mm). Cette épaisseur de coupes a été retenue pour minimiser l'observation de couches cellulaires superposées.

4.2. Coloration des coupes de tiges de maïs

Les coupes ainsi réalisées sont colorées pendant toute une nuit par une solution de Fasga diluée au 1/8ème (v/v) dans l'eau distillée. La solution mère de Fasga est composée de 0,05%

safranine O, 0,2% de bleu alcian, 1,5% d'acide acétique et 46% de glycérine dans l'eau distillée. Après coloration, les coupes sont rincées deux fois 5 min avec de l'eau distillée puis montées entre lame et lamelle avec une goutte d'eau. La safranine O est un colorant rouge, basique, cationique, et le bleu alcian est un colorant anionique acide. Comme les lignines sont acides (en raison des groupes hydroxyles phénoliques), les tissus lignifiés sont colorés en rouge. La coloration au Fasga fait donc apparaître les tissus lignifiés en rouge, alors que les tissus non lignifiés ou faiblement lignifiés sont colorés en bleu.

4.3. Acquisition des images

Prise d'image des coupes colorées au Fasga

Les images des coupe colorées au Fasga sont acquises à l'aide d'une loupe (× 1, Nikon SMZ 1000) ou d'un microscope (× 10 Leica DMRB) équipés d'une caméra ProgRes® C10 Plus. La loupe permet d'observer les coupes dans leur intégralité. Les images acquises ont été numérisées sous forme d'images couleur avec une résolution de 10 microns par pixel.

Les images acquises sur les six stades de développement pour le génotype F324 sont présentées dans la figure II-4 pour illustration.

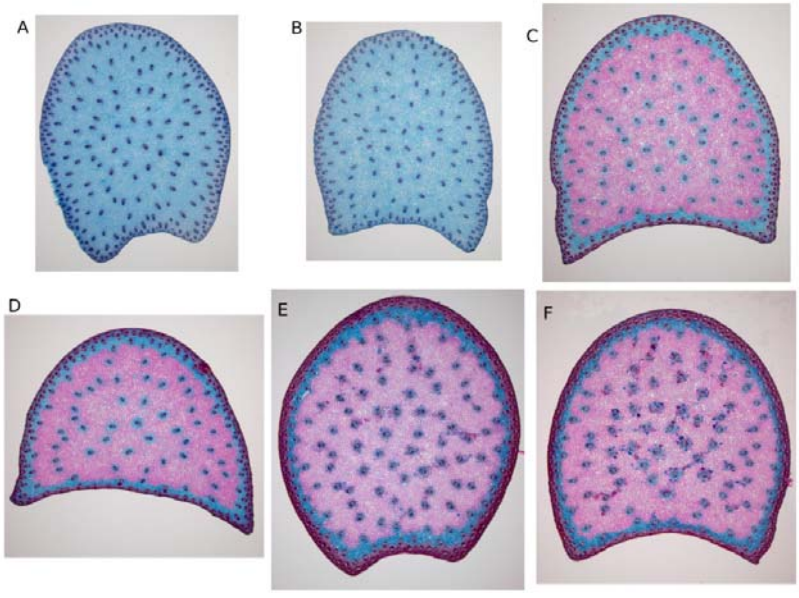


Figure II-4. Images acquises (x 1) après coloration au Fasga des coupes de 150 µm pour chaque stade de développement. A, 8 feuilles ligulées; B, 10 feuilles ligulées ; C, panicule visible ; D, floraison femelle ; E, 14 jours après floraison femelle et F, stade maturité ensilage.

Prise d'image, des coupes non colorées, à l'échelle macroscopique

Un dispositif d'acquisition d'images à l'échelle macroscopique a été construit dans l'unité BIA (INRA Nantes). Ce dispositif, appelé BlueBox, comprend une caméra CCD, des objectifs,

un système d'éclairage dont l'intensité est contrôlée, des platines motorisées pour positionner la caméra et les échantillons (Figure II-5). Ce matériel est décrit plus en détails dans Papineau et al. (2008).

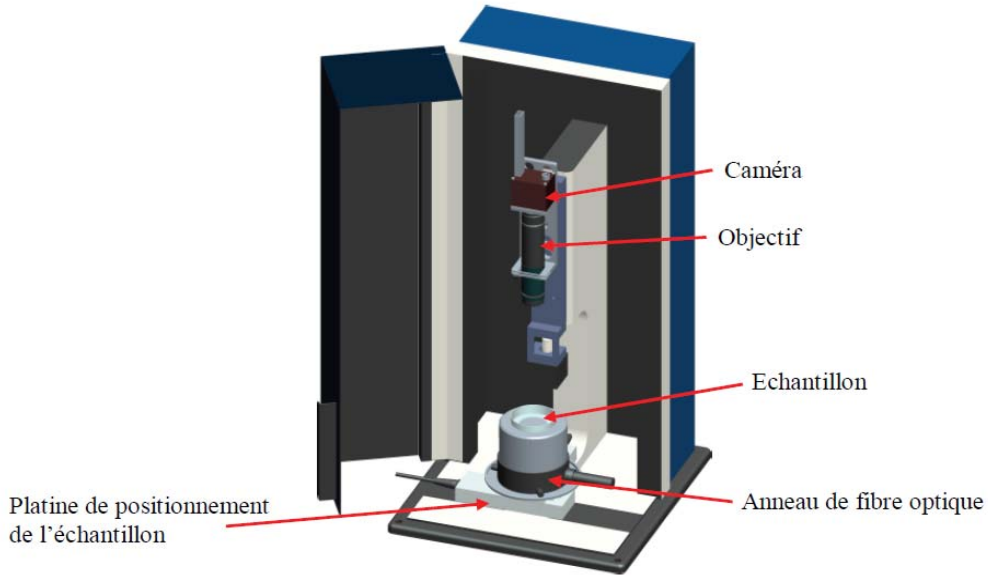


Figure II-5. Système d'acquisition d'image BlueBox.

Un anneau de fibres optiques (SCHOTT DCR® IV Light Source) est placé sur un fond noir de manière à rétro-éclairer les coupes avec un angle de 35° environ. La coupe de 150 µm des tiges de maïs non colorées sont déposées dans une boite de pétri placée 5 cm au-dessus du fond noir. Des images monochromes de 1620 × 1220 pixels (taille de pixel : 3.63 µm) dont les niveaux de gris sont codés soit sur 8 bits entre 0 (noir) et 255 (blanc), soit sur 12 bits entre 0 (noir) et 4096 (blanc) sont acquises. L'utilisation des platines motorisées permet d'acquérir des images adjacentes sans rotation de l'échantillon qui peuvent être facilement assemblées sous la forme d'images mosaïques dont un exemple est présenté en figure II-6 pour le génotype F324 au stade S4.

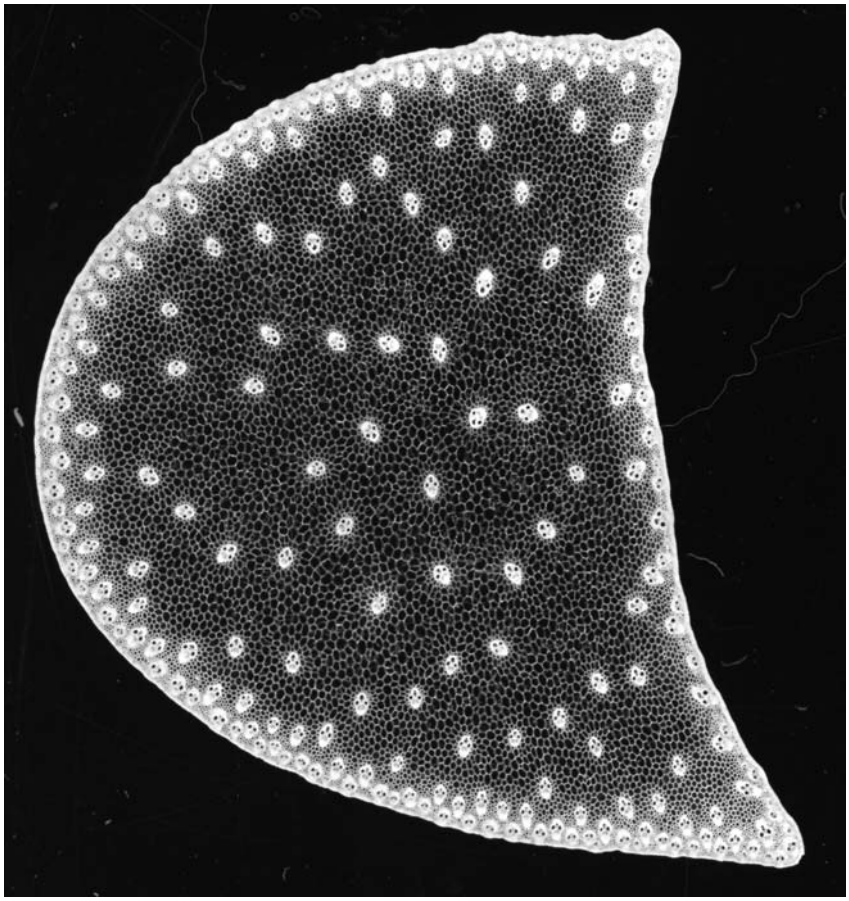


Figure II-6. Example d'images mosaïques d'une coupe de tige de maïs (F324 au stade 4). Résolution : 3664 × 3888 pixel, soit 1 pixel = 3.63 µm.

4.4. Analyses des images

Analyse granulométrique des images en niveaux de gris acquises sur la BlueBox

L'analyse granulométrique par morphologie mathématique a été développée à l'Ecole des Mines de Paris. Son intérêt pour l'analyse de la taille des cellules de péricarpes de tomate a été montré dans Devaux et al. (Devaux *et al.*, 2008).

Le principe de base de la morphologie mathématique est de transformer l'image au travers d'un masque de géométrie que l'on déplace de façon à ce que son origine passe par toutes les positions de l'image. La taille et la forme de cet élément sont choisies pour mettre en évidence certaines caractéristiques de l'image. Dans le cas des images de tissus végétaux, les cellules apparaissent en sombre et la taille des cellules est analysée en utilisant des fermetures de taille croissante. Après une fermeture, la somme des niveaux de gris dans l'image augmente. Cette

augmentation dépend de la quantité de cellules éliminées. Une courbe granulométrique est calculée comme le pourcentage d'augmentation de la somme des niveaux de gris en fonction de la taille de fermeture. Les courbes granulométriques sont tracées en fonction de la taille de l'élément structurant exprimée en pixel ou en µm. Des procédures d'analyse granulométrique en niveaux de gris ont été développées sous Matlab (V2007a - www.mathworks.fr) pour s'appliquer à des collections d'images.

Quantification de la distribution des surfaces lignifiées sur coupes colorées au Fasga

A partir des images acquises à la loupe sur les coupes colorées au Fasga, nous avons dans un premier temps déterminé la surface rouge totale représentant la surface de tissus lignifiés. Nous avons dans un second temps développé une méthode d'analyse d'image automatisée pour quantifier la distribution des lignines au sein des coupes. Cette méthode repose sur l'analyse des profils rouge et bleu en fonction de la distance par rapport à l'épiderme. Ce développement fait l'objet d'une publication soumise à « Journal of Agricultural and Food Chemistry » et présentée dans le chapitre IV-2.1. De façon très brève nous avons défini des régions concentriques sur chaque image. Puis nous avons calculé l'intensité moyenne de rouge et de bleu dans chaque région ainsi définie. Ceci nous a permis de décrire la distribution des tissus lignifiés et non lignifiés en fonction de la distance par rapport à l'épiderme. Enfin, nous avons défini le taux de lignification comme étant le rapport d'intensité rouge sur bleu dans les différentes régions. Le profil du rapport intensité rouge sur bleu correspond ainsi au profil de distribution des lignines le long de la coupe et ceci en fonction de la distance à l'épiderme. L'étape ultime de ce développement a consisté à quantifier la lignification dans trois régions spécifiques des coupes : l'épiderme, la moelle et une zone qui sépare les deux précédentes et reste généralement bleue.

5. Les méthodes d'analyses statistiques des résultats

5.1. Analyse de variance au sein des 8 LR ainsi que les deux lignée parents

Pour comparer l'influence relative des effets génétiques, l'année et le bloc au sein des 10 lignées. L'analyse de variance a été réalisée en utilisant la procédure GLM de (SAS) selon le modèle suivant:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + G_j + AG_{ij} + B_k/A_i + R_{ijk}$$

Avec Yijk est la valeur de l'année i dans le génotype j, dans le bloc k, μ est la moyenne générale ; Ai, l'effet principal de l'année i; Gj, l'effet du génotype j; AGij, l'effet d'interaction entre le génotype j et l'année i; Bk / Ai, le principal effet de la répétition k hiérarchisé à l'année i, et Rijk, la résiduelle.

5.2. Analyse de variance au sein des trois lignées prélevé en cinétique

Pour comparer l'influence relative des effets génétiques, l'année et le stade. L'analyse de variance a été réalisée en utilisant le logiciel R package « Rcmdr » (http://cran.r-project.org/web/packages/Rcmdr/index.html) selon le modèle suivant :

$$Yijkl = \mu + Ai + Gj + Sk + AGij + ASik + GSjk + Rijkl$$

Avec Yijkl est la valeur de l'année i, dans le génotype j, dans le stade k et dans le bloc l, μ est la moyenne générale ; Ai, l'effet principal de l'année i; Gj, l'effet du génotype j; Sk, l'effet de stade k ; AGij, l'effet d'interaction entre le génotype j et l'année i; ASik, l'effet d'interaction entre l'année i et bloc k ; GSik l'effet d'interaction entre le génotype j et stade k, et Rijkl, la résiduelle.

5.3. Corrélations et régressions multiples

Les données de RIL ont été combinés en sur les deux années, les répétitions terrain et les répétitions analytiques avant la détermination des coefficients de corrélation et l'analyse de régression multiple en utilisant R package « Rcmdr ».

CHAPITRE III : RECHERCHE DES FACTEURS BIOCHIMIQUES EXPLICATIFS DES VARIATIONS DE DEGRADABILITE DE PAROI DANS UN CONTEXTE DE TENEUR EN LIGNINES FIXE ET IMPACTS SUR LES PERFORMANCES AGRONOMIQUES CHEZ LE MAÏS

CHAPITRE III : Recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations de la dégradabilité des parois dans un contexte de teneur en lignine fixe et impacts sur les performances agronomiques chez le maïs

INTRODUCTION

La mise en place des lignines au sein des parois entraine une modification de la qualité de la biomasse lignocellulosique et une limitation de sa valorisation agricole et/ou industrielle (ensilage, pâte à papier, biocarburants). Par ailleurs, l'étude de la variabilité génétique des caractères liés à la dégradabilité de la biomasse nous a montré que la teneur en lignines est le premier facteur limitant la dégradabilité des parois (Jung and Buxton, 1994; Argillier *et al.*, 1996; Casler, 2005; Grabber *et al.*, 2010; Canbolat, 2012; Wang *et al.*, 2012).

Cependant, des plantes présentant une teneur drastiquement réduite en lignines présentent aussi de très faibles performances agronomiques (Barriere *et al.*, 1988; Barriere and Argillier, 1993). Bien que les relations entre la teneur en lignines et la performance des plantes ne soient pas entièrement élucidées (Wolf *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 2005), une lignification minimale est nécessaire pour la survie des plantes (Goujon et al., 2003; Reddy et al., 2005; Vignau-Loustau and Huyghe, 2008). En effet, pour assurer la tenue de la plante, protéger les plantes contre les attaques parasitaires ou encore assurer la conduction de la sève une lignification minimale est indispensable. Il est donc nécessaire de rechercher d'autres facteurs que la teneur en lignines qui peuvent permettre d'améliorer la dégradabilité des parois tout en assurant les performances agronomiques des plantes.

De nombreux travaux ont montré que d'autres facteurs comme la composition des lignines (Jung *et al.*, 1999; Mechin *et al.*, 2000; Grabber *et al.*, 2009), la structure des lignines (Grabber *et al.*, 1998b; Baucher *et al.*, 1999; Grabber, 2005; Casler *et al.*, 2008) et les teneurs en acides *p*-hydroxycinnamiques (Jung and Engels, 2002; Piston *et al.*, 2010; Ralph, 2010) présentent des impacts sur la dégradabilité de la paroi. Cependant, il est souvent difficile de mettre en évidence les effets de ces facteurs biochimiques qui se trouvent masqués par les effets de la teneur en lignines.

Mon projet de thèse s'inscrit directement dans ce contexte : afin de pouvoir mieux évaluer l'impact des différents facteurs biochimiques de la paroi, nous avons souhaité pouvoir nous affranchir de l'effet de la teneur en lignines. Pour cela nous avons choisi de retenir des génotypes de maïs entre lesquels le taux de lignines est comparable. Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats obtenus sur des génotypes choisis au sein d'une population de lignées recombinantes (LR) de maïs issue du croisement entre la lignée F286 et la lignée F7012. Ces deux lignées parentales ont été retenues à l'origine de la création de cette population car elles présentent des dégradabilités de parois élevées et sont contrastées en termes de teneur en acides *p*-hydroxycinnamiques. Au sein de cette population, nous avons choisi 8 LR en fonction de leur teneur en lignines d'une part et d'autre part de leur dégradabilité de parois évaluées par NIRS. Nous avons choisi ces lignées pour qu'elles présentent une teneur en lignines aussi proche que possible mais des dégradabilités de paroi contrastées afin de couvrir la gamme la plus large possible sur ce paramètre.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé biochimiquement ces lignées de façon approfondie. Nous avons estimé la teneur en résidu pariétal dans la matière sèche (RP exprimé en pourcentage de la matière sèche) ; la teneur en lignines dans la paroi (KL ou ADL exprimé en pourcentage de RP); la teneur en cellulose (Cell, exprimé en pourcentage de RP) et en hémicelluloses (Hcell, exprimé en pourcentage de RP) dans la paroi; la solubilité enzymatique *in vitro* (utilisation d'un cocktail enzymatique contenant de la pepsine, des cellulases et des hémicellulases) de la matière sèche (IVDMD, in vitro dry matter degradability) et calculé à partir de là la dégradabilité des parois (IVCWRD, in vitro cell wall residues degradability). Nous avons également étudié la composition monomérique des lignines par thioacidolyse (caractérisation des sous unités liées uniquement par des liaisons β-O-4) suivie d'une analyse par GC-MS et dosé les acides *p*-hydroxycinnamiques liés par des liaisons esters et des liaisons esters + éthers. Nous avons alors réalisé les analyses statistiques adaptées pour rendre compte de la variabilité génétique pour ces caractères. Nous avons ensuite recherché les facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de parois. Cette partie de mon travail a été valorisée sous forme d'une publication acceptée dans « Journal of Agricultural and Food Chemistry ».

Dans un deuxième temps, nous avons également étudié la variabilité génétique pour des caractéristiques morphologiques. Nous avons ensuite regardé les relations entre ces performances agronomiques et la dégradabilité des parois. Une étude des relations entre facteurs biochimiques et facteurs morphologiques a ainsi été réalisée afin d'étudier les

impacts des facteurs biochimiques explicatifs des variations de la dégradabilité des parois sur les performances agronomiques des plantes. L'objectif de cette partie de notre étude est de discuter sur la possibilité d'améliorer la dégradabilité des parois tout en maintenant des performances agronomiques correctes pour les plantes.

1. Recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations pour la dégradabilité des parois de maïs dans un contexte de teneur comparable en lignine (Article I).

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

ARTICLE

pubs.acs.org/JAFC

Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability

Yu Zhang,[†] Tanya Culhaoglu,[†] Brigitte Pollet,[†] Corinne Melin,[‡] Dominique Denoue,[‡] Yves Barrière,[‡] Stéphanie Baumberger,[†] and Valérie Méchin*[,†]

[†]Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA/AgroParisTech, Pôle SCSM, 78000 Versailles, France

[‡]Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, 86600 Lusignan, France

ABSTRACT: In this study, eight maize recombinant inbred lines were selected to assess both the impact of lignin structure and the impact of cell wall reticulation by *p*-hydroxycinnamic acids on cell wall degradability independently of the main "lignin content" factor. These recombinant lines and their parents were analyzed for in vitro degradability, cell wall residue content, esterified and etherified *p*-hydroxycinnamic acid content, and lignin content and structure. Lignin structure and esterified *p*-coumaric acid content showed significantly high correlation with in vitro degradability ($r = -0.82$ and $r = -0.72$, respectively). A multiple regression analysis showed that more than 80% of cell wall degradability variations within these 10 lines (eight recombinant inbred lines and their two parents) were explained by a regression model including two main explanatory factors: lignin content and estimated proportion of syringyl lignin units esterified by *p*-coumaric acid. This study revealed new biochemical parameters of interest to improve cell wall degradability and promote lignocellulose valorization.

KEYWORDS: Cell wall, lignin content, lignin structure, esterified *p*-coumaric acid, ferulic acid, in vitro cell wall degradability

INTRODUCTION

Strong worldwide demand for energy and concern over global climate change has led to a resurgence in the development of alternative energy to replace fossil transportation fuel. In response, many countries have initiated extensive research and development programs in biofuels. The U.S. Department of Energy Office of the Biomass Program has developed a scenario for supplying 30% of motor gasoline demand with biofuels by the year 2030. Similarly, the European Union has developed a strategy in which one-fourth of the EU transportation fuels will be derived from biofuels by 2030.

Presently, starch from corn and wheat grain and simple sugars from sugar cane and beets are used for the production of bioethanol by fermentation. These first generation biofuels may compete with food needs, and it is now imperative to make effective second generation biofuels based on lignocellulosic agricultural residues. Cellulose, the "green gold" of high industrial and nutritional interest, is mainly located in secondary lignified plant cell walls. Its biological conversion into fermentable sugars is hindered by its association with lignins, a phenolic polymer fairly resistant to chemical and microbiological attacks. To harness the structural sugars contained in lignocellulose, it is necessary to understand the reasons for lignocellulosic biomass recalcitrance related to the presence of lignins and other phenolic compounds in secondary cell walls.

Most studies related to genetics, genomics, and biochemistry of lignins have been performed on perennial or annual dicot or gymnosperm species, whereas most forage plants or bioenergetics resources are grasses. Today, the bioenergy boom justifies an investment in graminaceous cell walls. Cell walls are complex molecular assemblies involving polysaccharidic (cellulose and hemicelluloses) and phenolic (lignins and *p*-hydroxycinnamic acids) components. Grass lignins are polymers of mainly three types of constitutive units (*p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl units) interconnected by aryl ether bonds (β-*O*-4 linkages) and/or resistant carbon−carbon bonds. *p*-Hydroxycinnamic acids, namely, ferulic and *p*-coumaric acids are an important specificity of grass cell wall. These acids are able to establish covalent bonds with lignins and/or other cell wall polymers. Whereas *p*-coumaric acid is known to be ester-linked to the γ-position of the side chains of syringyl lignin units,[1] ferulic acid is linked both to polysaccharides through ester linkages and to lignins via radical coupling mechanisms, leading to various bonding patterns of the ether and carbon−carbon types.[2,3] Both lignins and *p*-hydroxycinnamic acids have been reported to limit forage cell wall degradability by increasing their resistance to enzymatic or microbial degradation.[4,5]

Undoubtedly lignin content is the first factor negatively correlated with cell wall degradability. However, it is not possible to construct plants with drastically reduced lignin contents since a minimum degree of lignification is needed to ensure plant posture, avoid lodging, allow sap flow in vessels, and protect the plant against parasitic attacks. It is therefore necessary to turn to other biochemical parameters to increase the potential for grass degradability improvement while preserving acceptable agronomical performances. The influence of such factors on degradability is difficult to assess since lignin content often screens their effects.

In the present study, we propose to eliminate the lignin content parameter to focus on other parameters potentially responsible for limited cell wall degradability. Among them, the lignin structure has already been addressed, but its effect is still

Received: April 23, 2011
Accepted: August 10, 2011
Revised: August 9, 2011
Published: August 10, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

much debated. Several studies carried out on tobacco,[6] alfalfa,[7] and *Arabidopsis*[8] suggest that at equal lignin content a lower syringyl/guaiacyl lignin units (S/G) ratio would be beneficial to degradability. We observed the opposite effect with maize,[9] whereas other studies performed on a F5H *Arabidopsis* mutant[10] and on artificially lignified maize cell wall[11] showed no effect of the S/G ratio on cell wall degradability. Given these conflicting results, we suspect that cell wall degradability is not exactly related to the monomeric composition of lignin but more precisely to specific structures linked to the lignin skeleton. Indeed, a crucial structural point needs to be examined when considering grasses and notably maize: *p*-coumaroylation of lignin syringyl units. Lu and Ralph[12] have established that sinapyl alcohol was acylated before its incorporation in lignin but until now, the impact of this *p*-coumaroylation on the incorporation of sinapyl alcohol in lignin polymers has been unknown. In addition to the *p*-coumaroylation of syringyl lignin units, cell wall cross-linking by ferulic acid accounts for grass originality. Ester-linked to hemicelluloses on the one hand and ether-linked to lignin on the other, ferulic acid acts as a bridge between the two cell wall constituents.

The present study focuses on grass cell wall structural specificities using maize as a grass model. We propose to take advantage of the genetic variability of a maize recombinant inbred line (RIL) population developed at INRA Lusignan, France, and already characterized for global parameters such as cell wall degradability or lignin content. To rule out the impact of lignin content, we selected individuals within this RIL population with a quite similar lignin level and variable cell wall degradability. This material is ideal to determine the impact of lignin structure, lignin organization, and cell wall reticulation by *p*-hydroxycinnamic acids on grass cell wall degradability.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Cropping Conditions. Eight RILs were selected within the F286 × F7012 RIL population developed at INRA Lusignan to present a similar lignin content and contrasted cell wall degradabilities as predicted by near-infrared reflectance spectrophotometer (NIRS). The eight RILs and their two parental lines were cropped at INRA Lusignan for two successive years (2008 and 2009). The trials were randomized block designs with three replicates. Each plot consisted of one 5.2 m long row, and the density was 90 000 plants per hectare. Irrigation was applied from mid-June to the end of August to prevent water stress. At the ensiling stage, plants without ears were sampled and chopped. The samples were oven-dried (70 °C) and ground with a hammer mill to pass through a 1 mm screen.

Chemical Analysis. The cell wall residue (CWR) was obtained after a three-stage extraction of the dry matter by toluene/ethanol (1:1, v/v), ethanol, and water.[13] The lignin content was estimated using two different methods: the Klason procedure[14] and the Goering and Van Soest procedure.[15] The lignin content was expressed as the weight percentage of Klason lignin (KL) or sulfuric acid detergent lignin (ADL) in CWR. The difference between KL content and ADL content was computed.

The *p*-hydroxycinnamic acid content was measured after treating CWR fractions with NaOH according to a previously described procedure,[9] which involves two alkaline treatments with different levels of severity. Esterified *p*-hydroxycinnamic acids were released by subjecting CWR samples (50 mg) to a mild alkaline hydrolysis (2 N NaOH, 5 mL, 20 h at room temperature). Other CWR samples (50 mg) were treated with 5 mL of 4 M NaOH for 2 h at 170 °C to release both esterified and etherified hydroxycinnamates. Samples recovered from mild and severe alkaline hydrolysis were subjected to the same precipitation procedure[16] prior to high-performance liquid chromatography−mass spectrometry (HPLC-MS) analysis. The concentration of esterified *p*-coumaric and ferulic acids corresponds to the amount of *p*-coumaric and ferulic acids released by mild alkaline hydrolysis, whereas etherified ferulic acid was calculated as the difference between ferulic acid amounts released by the severe and mild alkaline treatments.

The lignin monomeric composition was studied by thioacidolysis performed on 15 mg of CWR placed in a screw-cap glass tube together with 1 mL of internal standard (long-chain hydrocarbons C19, C21, and C22, 0.5 mg/mL each) and 10 mL of dioxane/ethanethiol mixture (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate, for 4 h in an oil bath at 100 °C.[17] After extraction of the lignin-derived monomers, the analysis of their trimethylsilyl derivatives was run by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Varian Saturn 2100, polydimethylsiloxane capillary column [SPB1, Supelco, 30 m × 0.25 m, 0.25 μm], ion trap spectrometer detector [IE 70 eV, positive mode]). The molar yield in *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignin-derived monomers was calculated on the basis of the KL content of the sample.

We also estimated the percentage of syringyl lignin units acylated by *p*-coumaric acid (S-PC) assuming that all of the *p*-coumaric acid was esterified to syringyl lignin units and extrapolating the percentage of syringyl units in the uncondensed lignin part to the whole lignin. Thus S-PC was calculated as mentioned above:

$$\text{S-PC} = (100 \times \text{esterified } p\text{-coumaric acid})/(\text{KL} \times \% \text{ syringyl lignin units})$$

In vitro dry matter degradability was determined by an adapted Libramont−Limagrain protocol. Briefly, 500 mg of initial sample (dry matter) in a small bag was incubated 24 h, at 40 °C, under rotation in a pepsin solution (7 g of pepsin in 1 L of 0.1 N HCl). After 30 min at 80 °C, bags were incubated 24 h, at 40 °C, and under rotation in a cellulase/amyloglucosidase solution (2.95 mL of acetic acid, 6.8 g of sodium acetate, 1 g of cellulase, and 1.5 mL of amyloglucosidase, supplemented to 1 L with H_2O). The sample was then profusely rinsed with water and dried at 70 °C for 48 h before being weighed.

In vitro CWR degradability was computed assuming that the non-CWR part was completely degradable:[18]

$$\text{in vitro CWR degradability} = 100 \times [\text{in vitro dry matter degradability} - (100 - \text{CWR})]/\text{CWR}$$

All of the analyses were performed in duplicate.

Statistical Analysis. To compare the relative influence of genetic, year, and plot effects, variance analysis was carried out using the GLM procedure in SAS according to the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + G_j + AG_{ij} + B_k/A_i + R_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the value of genotype j in year i and for plot replicate k; μ is the overall mean; A_i denotes the main effect of year i; G_j denotes the effect of genotype j; AG_{ij} denotes the interaction effect between genotype j and year i; B_k/A_j denotes the main effect of replicate k nested in year j; and R_{ijk} is the random residual term. Data for RILs were combined over year, field, and analysis replicates before determination of correlation coefficients and multiple regression analysis using *R*.

RESULTS AND DISCUSSION

We report here on the variability in biochemical composition and in vitro degradability before addressing the question of lignin determination. Finally, we discuss two structural parameters accounting for degradability variations.

Relative Influence of Genetic and Year Effects on Biochemical Composition and in Vitro Degradability Values.

Table 1. *F* Value of the ANOVA Test of Cell Wall Composition and Degradability for the Eight RILs and Two Parent Lines[a]

	F value year	Pr > *F*	*F* value genotype	Pr > *F*	*F* value genotype × year	Pr > *F*	*F* value block	Pr > *F*
DF	1		9		9		4	
			in vitro degradability					
in vitro CWR degradability (%)	67.5	<0.0001	8.5	<0.0001	1.67	0.1357	2.92	0.0354
			cell wall composition					
CWR (% DM)	160.73	<0.0001	22.77	<0.0001	6.65	<0.0001	0.52	0.7185
KL (% CWR)	6.28	0.0172	16.59	<0.0001	2.81	0.0138	3.07	0.0292
ADL (% CWR)	2.08	0.1582	2.93	0.011	2.85	0.013	3.14	0.0267
			lignin structure					
p-hydroxyphenyl (μmol/g KL)	1.19	0.2837	18.69	<0.0001	3.32	0.0052	1.96	0.1236
guaiacyl (μmol/g KL)	13.41	0.0008	11.63	<0.0001	2.84	0.0131	2.12	0.0997
syringyl (μmol/g KL)	30.96	<0.0001	3.77	0.0022	3.07	0.0084	0.87	0.4923
β-*O*-4 yield (μmol/g KL)	25.88	<0.0001	6.38	<0.0001	3.04	0.0088	0.95	0.4457
S/G	9.72	0.0037	13.99	<0.0001	4.22	0.001	4.37	0.0059
			p-hydroxycinnamic acids					
esterified *p*-coumaric acid (mg/g CWR)	16.7	0.0003	41.15	<0.0001	1.93	0.0799	1.01	0.416
etherified ferulic acid (mg/g CWR)	3.87	0.00574	4.9	0.00003	2.66	0.0188	1.84	0.1439

[a] DF, degree of freedom.

Table 2. Mean, Maximum, and Minimum Values and Variation Coefficients for Cell Wall Chemical Composition and in Vitro Degradability among the Eight RILs and Their Two Parent Lines[a]

	mean	max	min	P1	P2	VC
		in vitro degradability				
in vitro CWR degradability (%)	45.4	50.5	39.9	45.7	48.1	7.6
		cell wall composition				
CWR (% DM)	69.2	74.8	62.7	64.8	70.9	5.6
KL (% CWR)	13.8	15.2	12.4	13.2	13.9	6.8
ADL (% CWR)	5.9	6.9	5.1	5.1	6.1	9.3
KL-ADL (% CWR)	7.9	9.0	6.6	8.1	7.8	10.5
		lignin structure				
p-hydroxyphenyl (μmol/g KL)	10.4	14.8	7.3	10.3	9.5	22.4
guaiacyl (μmol/g KL)	221.4	273.8	178.2	244.9	178.2	14.9
syringyl (μmol/g KL)	246.4	289.8	201.3	256.3	201.3	10.0
β-*O*-4 yield (μmol/g KL)	478.2	573.5	389.0	511.4	389.0	11.1
S/G	1.13	1.38	0.96	1.05	1.12	11.63
		p-hydroxycinnamic acids				
S-PC	12.4	15.8	8.2	15.8	9.3	19.0
esterified *p*-coumaric acid (mg/g CWR)	8.7	10.5	6.2	10.5	6.7	17.8
etherified ferulic acid (mg/g CWR)	2.3	2.7	1.8	1.8	2.3	14.0

[a] P1, P2, two parent lines.

The biochemical composition and degradability of maize plants showed very little changes due to field replicates (Table 1).

Clear-cut year effects were observed for in vitro cell wall degradability, CWR content, lignin structure, and *p*-hydroxycinnamic acid content (esterified *p*-coumaric acid and etherified ferulic acid). In contrast, no year effect or weak year effect was detected for lignin content (KL and ADL) (Table 1). In previous studies, the year factor has been reported to affect the lignin content (KL) but not the phenolic acid concentrations.[9,19] The plant material used in our study has been chosen to limit the variation in lignin content but to expand the range of variation for cell wall degradability and cell wall biochemical composition. This factor may explain the unusual absence of year effect on lignin content and in contrast the detected effect on *p*-hydroxycinnamic acid content.

All biochemical traits and degradability parameters reported in Table 1 were markedly affected by the genotype, in agreement with literature data. This genotype effect surpasses the year effect,

Table 3. Correlation Coefficients between Cell Wall Composition Parameters[a]

	KL	ADL	KL-ADL	guaiacyl	syringyl	β-*O*-4 yield	S/G	esterified *p*-coumaric acid	S-PC	etherified ferulic acid
KL	1.00	0.49	0.81[b]	0.42	0.40	0.44	−0.15	0.12	−0.20	0.43
ADL		1.00	−0.11	−0.26	−0.22	−0.28	0.20	−0.64[a]	−0.80[b]	0.34
KL-ADL			1.00	0.36	−0.30	0.66[a]	−0.30	0.57	0.31	0.26
guaiacyl				1.00	0.66[a]	0.94[b]	−0.71[a]	0.60	0.60	0.13
syringyl					1.00	0.87[b]	0.05	0.73[a]	0.51	0.07
β-*O*-4 yield						1.00	−0.43	0.71[a]	0.62	0.14
S/G							1.00	−0.14	−0.36	−0.11
esterified *p*-coumaric acid								1.00	0.91[b]	−0.22
S-PC									1.00	−0.34
etherified ferulic acid										1.00

[a] $P < 0.05$. [b] $P < 0.01$.

except for syringyl monomer concentrations. Genotype × year interactions were found to be significant for some values, which is not unusual.[9,20] However, genotypic differences always accounted for more of the variation than did genotype × year interactions. This result highlights the widely predominant genotype effect on cell wall composition and degradability.

KL and ADL Lignin Are Estimations of Two Different Parts of the Lignin. There are many methods to solubilize cell wall carbohydrates and thus determine by gravimetric measurement the lignin content of the cell wall. The Klason procedure[14] developed in the early 1900s by Klason is the most commonly used. Goering and Van Soest[15] proposed using two sequential treatments to first solubilize hemicelluloses (ADF residue) and then solubilize cellulose to ultimately obtain a lignin residue. We retained these two common procedures to estimate the lignin content of the 10 selected lines.

The KL in the cell wall varied from 12.4 to 15.2% CWR and the ADL lignin content from 5.1 to 6.9% CWR (Table 2). As extensively presented in different studies,[18,21−24] KL values were higher than ADL values. Both methods may underestimate the lignin content due to the possible partial solubilization of lignin during the treatment. However, this underestimation is lower with the KL method,[18] which suggests that the loss of lignin is reduced with this method. Another hypothesis for the differential between KL and ADL contents could be due to the presence of contaminating proteins condensed onto the KL residue.[25] However, in grass, the difference between ADL and KL values was of too great a magnitude to be explained by protein condensed in the residues.[21] In fact, as presented in Hatfield and Fukushima,[24] when applied to grasses, the acid detergent solution used in the Van Soest procedure dissolves more than 50% of the lignin, which explains the drastically lower values encountered for the ADL lignin content. The correlation coefficient between KL (% CWR) and ADL (% CWR) was not significant ($r = 0.49$) (Table 3). This absence of correlation indicates that KL and ADL estimates correspond, in grasses, to two different lignin "realities". We calculated for each sample the difference between the KL and the ADL lignin content, a parameter that can be assigned to the fraction of lignin dissolved during the specific detergent treatments of the ADL procedure. This difference was found to vary between 6.6 and 9.0% CWR (Table 2) and to be positively and significantly correlated to the total yield in thioacidolysis monomers only involved in β-*O*-4 bonds (Table 3). This result suggests that the difference between KL and ADL residues would refer to the lignin fraction rich in β-*O*-4 bonds.

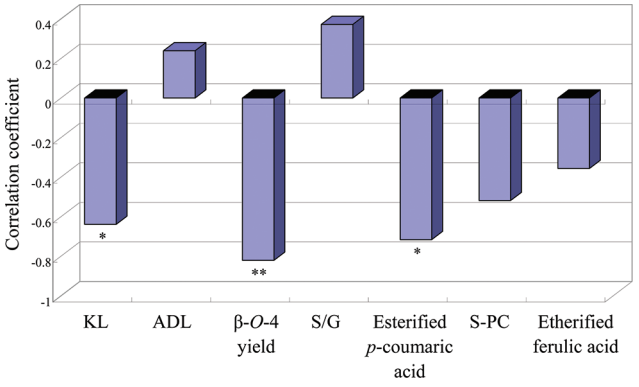


Figure 1. Correlation coefficient between in vitro CWR degradability and cell wall composition for the 10 selected lines (eight RIL and their two parents). KL, % CWR; ADL, % CWR; β-*O*-4 yield, total yield of thioacidolysis monomers (μmol/g KL); esterified *p*-coumaric acid (mg/g CWR); and etherified ferulic acid (mg/g CWR). *$P < 0.05$, and **$P < 0.01$.

Hatfield et al.[21] showed that syringyl-rich lignins were preferentially solubilized during the H_2SO_4 hydrolysis step of both KL and ADL procedures. It is to our knowledge the first time that a correlation has been established between the β-*O*-4 yield characterizing the lignin structure and its susceptibility to detergent solubilization.

Moreover, we illustrate that KL procedure is more suitable for the global determination of lignin, whereas the ADL procedure could be used to assess the proportion of the condensed lignin fraction. Our preliminary objective was to eliminate the lignin content parameter (based on KL NIRS prediction) in the selected lines. Although we have not completely satisfied this objective, we succeeded in considerably reducing the range of variation (three points of variation within the 10 lines) (Table 2), as compared to previous studies, namely, 8,[22] 5,[9] and 6[21] points of variation, respectively. Even in this narrow range, a negative and significant correlation ($r = −0.64$, $P < 0.05$) between in vitro cell wall degradability and KL lignin content was obtained. In contrast, and as previously reported,[23] no significant correlation between in vitro CWR degradability and ADL lignin content was detected. While KL lignin content partly accounts for in vitro cell wall degradability variation, it is not necessarily the best parameter to explain these variations. Indeed, unlike many studies presenting lignin content as the first impediment to cell wall degradability, several other parameters turned out here to be

significantly correlated to in vitro cell wall degradability (Figure 1). The KL-ADL parameter exhibited the highest significant correlation with in vitro CWR degradability ($r = -0.89$, $P < 0.01$).

Uncondensed Lignin Is the First Obstacle to Cell Wall Degradability. The proportion of *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignin building units was evaluated by thioacidolysis and thus only reflects the units involved in β-*O*-4 bonds (the so-called "uncondensed" part of the lignin polymer). The total β-*O*-4 yield in thioacidolysis monomers, when calculated on the basis of the lignin content in the cell wall, provides an estimate of the proportion of lignin units only involved in β-*O*-4 bonds. This total yield ranged from 389 to 574 μmol/g KL (500 μmol/g KL corresponded to about 10% of the total KL content) and the S/G ratio range from 0.96 to 1.38 (Table 2).

In our study, the β-*O*-4 yield showed a high significant correlation coefficient with in vitro CWR degradability ($r = -0.82$, $P < 0.01$), whereas there was no strong relationship between the S/G ratio and the in vitro cell wall degradability ($r = 0.37$, ns). As observed for the total β-*O*-4 yield, the correlation between the two main lignin unit yields exhibited a negative and significant correlation with the in vitro cell wall degradability ($r = -0.77$, $P < 0.05$ for guaiacyl unit and $r = -0.72$, $P < 0.05$ for syringyl unit).

The influence of lignin composition on cell wall degradability is still controversial, and results can be very different when studying monocotyledons,[9] dicotyledons,[7,8,10] or artificially lignified cell walls.[11] Our results are in accordance with results obtained previously[26] on artificially lignified maize cell walls. The latter demonstrated that *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignin units have similar inhibitory effects on degradability.[26] The effect of S/G ratio on cell wall degradability is still unclear. Similarly, the impact of lignin structure on cell wall degradability is still uncertain. In our study, β-*O*-4 content is an important impediment to cell wall degradability. It indicates that the more uncondensed (high β-*O*-4 yield) the lignin is the less degradable the cell wall. This result can be explained by considering the impact of interunit bonds on lignin conformation. In 2005, Besombes and Mazeau,[27] using molecular modelization, presented an illustrative picture of the lignin/cellulose association at the atomic scale. They showed that a lignin oligomer containing only β-*O*-4 interunit bonds adsorbs flat on the surface to maximize the interactions with cellulose. In contrast, an oligomer containing 5-5 and/or β-5 interunit bonds cannot straightforwardly orient parallel to the surface to optimize its interaction with cellulose. Thus, β-*O*-4-rich lignins would have a more extended shape likely to adsorb all along the cellulose fibers, whereas the more globular shape of condensed lignins leads to a lower coverage rate than β-*O*-4 rich lignins. For a given lignin content, an increase in the proportion of β-*O*-4 bonds in lignin may result in a lower accessibility of hydrolytic enzymes to cellulose fibers. By reducing the variation in lignin content within the selected group of lines, for the first time, we could show the clear-cut impact on cell wall degradability of the lignin interunit bonding pattern and the lack of impact of the S/G ratio in maize.

Esterified *p*-Coumaric Acid Is Preferentially Encountered in the Uncondensed Lignin Part and Induces a Limitation of Cell Wall Degradability Whereas Ferulic Bridges Have No Impact on Cell Wall Degradability. *p*-Hydroxycinnamic acids are known to be of importance in grass cell wall reticulation and organization. While *p*-coumaric acid is mainly ester-linked to S-lignin units,[1,28] ferulic acid is associated both with

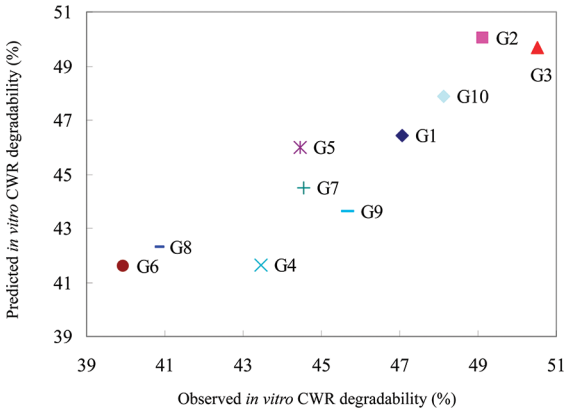


Figure 2. In vitro cell wall degradability observed vs in vitro CWR degradability predicted by applying the regression model using two variates, according to the following equation and for the eight RIL and their two parents (G1 to G10): in vitro CWR degradability = 96.6 − 2.84 KL − 0.98 S-PC.

hemicelluloses through ester linkages and with lignin via radical coupling mechanisms, which lead to a variety of bonding patterns (ether and C−C).[2,3] Thus, ferulate esters linked to hemicelluloses are nucleation sites for lignification in grass cell wall resulting in a bridge between hemicelluloses and lignin. At the beginning of this study, we hypothesized that cell wall reticulation by ferulic acid could be the most likely parameter to explain cell wall degradability variations in the context of a fairly constant lignin level. However, it is worth noting that etherified ferulic acid content was not correlated with in vitro CWR degradability ($r = -0.27$, ns) in this set of maize sister-lines unlike to results obtained in other studies.[29−31]

In contrast, esterified *p*-coumaric acid was found to be negatively and significantly correlated with in vitro CWR degradability ($r = -0.72$, $P < 0.05$). The negative impact of esterified *p*-coumaric acid has been reported in several studies.[32,33] The latter have suggested that the content in esterified *p*-coumaric acid indirectly and detrimentally affects cell wall degradability due to its positive correlation with lignin content.[19,33] However, as in previous studies,[9] we did not find any negative correlation between esterified *p*-coumaric acid content and KL lignin content ($r = 0.12$, ns) (Table 3). On the contrary, there was a significant correlation between esterified *p*-coumaric acid and total β-*O*-4 yield ($r = 0.71$, $P < 0.05$) or syringyl thioacidolysis units ($r = 0.73$, $P < 0.05$). On the whole, it appears that we have a correlation between the noncondensed lignin part and esterified *p*-coumaric acid content. Esterified *p*-coumaric acid could thus be preferentially linked to the syringyl lignin units only involved in β-*O*-4 bonds. Hence, it would be more accurate to say that S-PC units are more inclined to β-*O*-4 bonds and that esterified *p*-coumaric acid is thus preferentially encountered when associated with syringyl lignin units in the uncondensed lignin part. Indeed, Ralph et al.[28] showed that *p*-coumaric acid was not associated with syringyl lignin units after its incorporation in the polymer but that S-PC was imported in the grass cell wall to be incorporated in lignin. To conclude, we can assume that esterified *p*-coumaric acid is preferentially encountered in the uncondensed lignin and induces a decrease in cell wall degradability. This also explained the negative and significant correlation between ADL content and esterified *p*-coumaric acid since the lignin lost during the two step ADL procedure has been shown to be

richer in syringyl units[23] and more uncondensed. We thus demonstrated, in our set of lines, that the two main structural parameters, which explain cell wall degradability variations, were first the proportion of uncondensed lignin and second the content in esterified *p*-coumaric acid.

Multiple Regression Analysis and in Vitro Cell Wall Degradability Estimation. A multiple regression analysis was attempted to more comprehensively explain the in vitro CWR degradability observed variations. The best fitting regression equations were selected for in vitro CWR degradability, using KL, cellulose content, hemicellulose content, esterified *p*-coumaric acid, etherified ferulic acid, thioacidolysis total yield, thioacidolysis S/G ratio, and calculated parameter estimating the S-PC as explanatory variables. The best fitting regression model was obtained by a stepwise regression analysis. This model used two variables and significantly explained as much as 84% of the observed in vitro CWR degradability variations (Figure 2). The two variables were KL lignin content in the cell wall and the proportion of syringyl units acylated by *p*-coumaric acid, according to the following equation:

$$\text{in vitro CWR degradability} = 96.6 - 2.84\ \text{KL} - 0.98\ \text{S-PC}$$

where $R^2 = 84\%$ and $p = 5.5 \times 10^{-6}$.

Thus, when using more than one explanatory variable, the KL content came out together with S-PC, and none of the remaining variables could be significantly added in the regression. It was noteworthy that, even if limited, the variation in lignin content in the cell wall within the 10 selected lines was included in the best prediction equation together with a composite variable, which estimated the proportion of syringyl lignin units esterified by *p*-coumaric acid.

When only one variable to account for in vitro CWR degradability variations is used, the β-*O*-4 thioacidolysis yield appears to be the explanatory variable, whereas the S/G ratio had no impact. The second best explanatory variable was esterified *p*-coumaric acid content. When using a multivariable analysis, the best variables resulting from the experiments were KL content and a composite variable, which takes into account the proportion of syringyl lignin units acylated by *p*-coumaric acid. Thus, we highlighted the impact of both the proportion of uncondensed lignin and its acylation by *p*-coumaric acid in limiting cell wall degradability, whereas, in our plant material, ferulate bridges appeared to have no impact on the latter. Lignin condensation and cell wall *p*-coumaroylation were the two targets to take into consideration to increase cell wall degradability. This study offers applied perspectives for the development of second generation bioethanol by selecting plant material with improved susceptibility to biological conversion while maintaining a viable lignin content.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +33.1.30.83.37.96. Fax: +33.1.30.83.33.19. E-mail: vmechin@versailles.inra.fr.

Funding Sources

This work was funded by the French Research National Agency (ANR) in the context of the MAGIC program (ANR-08-BLAN-0307-01), and Y. Zhang was supported by a grant from INRA CEPIA and INRA BV.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge L. Cézard and F. Legée for their participation in lignin analysis, C. Minault and P. Vernoux for their valuable contribution in field experiments, and M. Seletti for the improvement in English grammar.

ABBREVIATIONS USED

ADL, acid detergent lignin; CWR, cell wall residue; KL, klason lignin; NIRS, near-infrared spectroscopy; RIL, recombinant inbred line; S/G, syringyl/guaiacyl lignin units ratio; S-PC, syringyl lignin units acylated by *p*-coumaric acid

REFERENCES

(1) Grabber, J. H.; Quideau, S.; Ralph, J. *p*-Coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for β-ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1189–1194.

(2) Lam, T. B. T.; Iiyama, K.; Stone, B. A. An approach to the estimation of ferulic acid bridges in unfractioned cell walls of wheat internodes. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 327–333.

(3) Ralph, J.; Grabber, J. H.; Hatfield, R. D. Lignin−ferulate cross-links in grasses: Active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* **1995**, *27*, 167–178.

(4) Besle, J. M.; Cornu, A.; Jouany, J. P. Roles of structural phenyl propanoids in forage cell wall digestion. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *64*, 171–190.

(5) Jung, H. J. G.; Deetz, D. A. Cell wall lignification and degradability. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*; Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D., Ralph, J., Eds.; American Society of Agronomy: Madison, WI, 1993; pp 315−346.

(6) Bernard-Vailhé, M. A.; Cornu, A.; Robert, D.; Maillot, M. P.; Besle, J. M. Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1164–1169.

(7) Baucher, M.; Bernard, M. A.; Vailhe, B.; Chabbert, J. M.; Besle, C.; Opsomer, M.; Montagu, V.; Botterman, J. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 437–447.

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

(9) Mechin, V.; Argillier, O.; Menanteau, V.; Barrière, Y.; Mila, I.; Pollet, B.; Lapierre, C. Relationship of cell wall composition to *in vitro* cell wall digestibility of maize inbred line stems. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 574–580.

(10) Jung, H. J. G.; Ni, W.; Chapple, C. C. S.; Meyer, K. Impact of lignin composition on cell wall degradability in an Arabidopsis mutant. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 922–928.

(11) Grabber, J. H.; Hatfield, R. D.; Ralph, J. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4984–4989.

(12) Lu, F. C.; Ralph, J. Detection and determination of *p*-coumaroylated units in lignins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1988–1992.

(13) Effland, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi* **1977**, *60*, 143–144.

(14) Dence, C.; Lin, S. Y. The Determination of Lignin. In *Methods in Lignin Chemistry*; Lin, S. Y., Dence, C. W., Eds.; Springer: Berlin, 1992; pp 33−61.

(15) Goering, H. K.; Van Soest, P. J. Forage Fiber Analysis: Apparatus, Reagents, Procedures, and some applications. *USDA ARS Agricultural Handbook 379*; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1970.

(16) Culhaoglu, T.; Zheng, D.; Baumberger, S.; Méchin, V. A green purification method for the analysis of ferulic and *p*-coumaric acids in maize cell-wall. *J. Chrom. B*, submitted for publication.

(17) Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C. Preparative thioacidolysis of spruce lignin: Isolation and identification of main monomeric products. *Holzforschung* **1986**, *40*, 47–50.

(18) Méchin, V.; Argillier, O.; Barrière, Y.; Menanteau, V. Genetic variation in stems of normal and brown midrib 3 maize inbred lines. Towards similarity for *in vitro* digestibility and cell wall composition. *Maydica* **1998**, *43*, 205–210.

(19) Jung, H. J. G.; Ni, W. T.; Chapple, C. C. S.; Meyer, K. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in vitro degradability for stem internodes. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66*, 313–322.

(20) Lundvall, J. P.; Buxton, D. R.; Hallauer, A. R.; George, J. R. Forage quality variation among maize inbreds: In vitro digestibility and cell-wall components. *Crop Sci.* **1994**, *34*, 1672–1678.

(21) Hatfield, R. D.; Jung, H. G.; Ralph, J.; Buxton, D. R.; Weimer, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *65*, 51–58.

(22) Jung, H. G.; Mertens, D. R.; Payne, A. J. Correlation of acid detergent lignin and klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. *J. Dairy. Sci.* **1997**, *80*, 1622–1628.

(23) Fukushima, R. S.; Hatfield, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3713–3720.

(24) Hatfield, R.; Fukushima, R. S. Can lignin be accurately measured. *Crop Sci.* **2005**, *45*, 832–839.

(25) Van Soest, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, 1994.

(26) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S. *p*-Hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl lignins have similar inhibitory effects on wall degradability. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2530–2532.

(27) Besombe, S.; Mazeau, K. The cellulose /lignin assembly assessed by molecular modeling. Part 2: Seeking for evidence of organization of lignin molecules at the interface with cellulose. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 277–286.

(28) Ralph, J.; Hatfield, R. D.; Quideau, S.; Helm, R. F.; Grabber, J. H.; Jung, H. J. G. Pathway of *p*-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9448–9456.

(29) Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R. D. Ferulate crosslinks limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2609–2614.

(30) Casler, M. D.; Jung, H. G. Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *125*, 151–161.

(31) Jung, H. G.; Phillips, R. Putative Seedling Ferulate Ester (*sfe*) Maize mutant: Morphology, biomass yield, and stover cell wall composition and rumen degradability. *Crop Sci.* **2010**, *50*, 403–418.

(32) Taboada, A.; Novo-Uzal, E.; Flores, G.; Loureda, M.; Ros Barceló, A.; Masa, A.; Pomar, F. Digestibility of silages in relation to their hydroxycinnamic acid content and lignin composition. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1155–1162.

(33) Gabrielsen, B. C.; Vogel, B. E.; Anderson, B. E.; Ward, J. K. Alkali-labile cell-wall phenolics and forage quality in switchgrasses selected for differing digestibility. *Crop Sci.* **1990**, *30*, 1313–1320.

Dans ce travail, nous avons donc mis en évidence le rôle majeur de la structure des lignines et de la *p*-coumaroylation sur la dégradabilité des parois. Nous avons ainsi montré que lorsque le facteur « teneur en lignines » est maintenu relativement fixe alors d'autres facteurs biochimiques pariétaux permettent de rendre compte d'une dégradabilité de paroi augmentée. Ainsi, dans notre matériel, des lignines contenant moins de liaisons β-O-4 et donc plus condensées et présentant un teneur limitée en acide *p*-coumarique présentent des valeurs plus élevées de dégradabilité de paroi. Nous avons voulu pour compléter ce travail prendre en compte quelques mesures agronomiques simples afin de pouvoir évaluer si les génotypes qui présentent des dégradabilités de parois supérieures présentent également des performances agronomiques respectables. C'est ce que nous allons présenter dans la partie qui suit.

2. Variabilité génétique pour les caractéristiques agronomiques et études des relations avec les facteurs biochimiques pariétaux et la dégradabilité des parois.

Toutes les mesures morphologiques ont été réalisées sur des maïs qui ont été cultivés en 2010 suite aux résultats présentés dans le chapitre précédent et obtenus sur des cultures de 2008 et 2009. Pour chacun des 10 génotypes nous avons mesuré au stade ensilage, la hauteur des plantes (H plante), la hauteur d'insertion de l'épi principal (H épi) et le diamètre de la tige juste en dessous de l'épi principal (D tige). Nous avons également estimé le rendement moyen pour chaque génotype.

2.1. Variabilité génétique pour les facteurs morphologiques au sein des 10 génotypes

Les résultats synthétisés pour des facteurs morphologiques sont résumés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1. Analyse de variation des facteurs morphologiques au sein des 8 lignées recombinantes et des 2 lignées parentales.

	n	Moyenne	Max.	Min.	CV	F7012	F286
H plante (cm)	10	98,62	129,40	57,20	18,11	102,40	101,60
H épi (cm)	10	44,34	64,20	16,60	31,21	53,00	35,60
D tige (cm)	10	11,92	13,86	8,78	12,82	13,86	11,92
Rendement (t/ha)	10	2,76	4,47	0,66	37,48	4,47	2,26

CV, coefficient de variation; H plante, la hauteur de plante; H épi, la hauteur d'épi principal; D tige, le diamètre de tige au-dessous de l'épi principale; Rendement, le rendement de la matière sèche.

Les deux lignées parentales (F7012 et F286) affichent des hauteurs de plante assez comparables, mais par contre F7012 a son épi principal inséré beaucoup plus haut que F286, il présente un diamètre de tige supérieur et surtout un rendement deux fois plus élevé que F286. Ainsi, d'un point de vue agronomique, F7012 est plus performant que F286 pour les

caractères que nous avons mesurés. Les lignées descendantes présentent des transgressions positives et négatives pour les hauteurs de plante et d'épis, et des transgressions négatives uniquement pour le diamètre de la tige et le rendement. Dans ces descendants, l'une des lignées retenue dans notre étude cumule de bonnes caractéristiques agronomiques avec notamment des hauteurs de plante et d'insertion d'épis et un diamètre de tige (108.6 cm, 64.2 cm, et 13.5 cm, respectivement) équivalents à ceux de F7012. Par contre, cette lignée a un rendement (3.81 t/ha) qui reste très en deçà de celui de F7012. Dans cette étude, nous nous sommes focalisé spécifiquement sur la tige pour mesurer les quelques caractères via lesquels nous estimons nos performances agronomiques. Au sein de ces 10 génotypes, la hauteur de plants, la hauteur d'épis et le diamètre d'épis permettent d'expliquer 57%, 77% et 56% des différences de rendement estimé. Il semble que le rendement de la plante ne peut pas être totalement expliqué par la variation de la morphologie de la tige, les autres facteurs comme notamment la taille des feuilles, le rapport de masse de feuilles / masse de tiges doivent aussi pris en compte pour décrire ces performances agronomiques de façon complète. Nous n'avons cependant, faute de temps, pas pu prendre en compte l'ensemble de ces caractères et nous nous sommes donc contentés des 4 caractères présentés dans le tableau III-1 pour estimer les performances agronomiques des plantes. En général, nous avons donc ici, pour une teneur en lignines comparable, une bonne variabilité des performances agronomiques des plantes au stage ensilage. Comme la paroi joue un rôle clé dans le contrôle de la morphologie de la plante (Pedersen et al., 2005), nous avons ensuite regardé si les variations morphologiques observées pouvaient être liées à des modifications des caractéristiques pariétales.

2.2. Etude des relations entre les facteurs morphologiques et les facteurs biochimiques

La teneur en lignines estimée par la méthode Klason (KL) n'est corrélée avec aucun des facteurs morphologiques. En revanche, il y a une corrélation négative et significative entre la teneur en lignine estimée par la méthode Van Soest (ADL) et tous les facteurs morphologiques sauf D tige (Tableau III-2). Dans la partie précédente nous avons établi que la teneur en lignine KL pourrait décrire la teneur totale en lignine alors que la teneur en lignine ADL pouvait refléter la proportion de la fraction condensée des lignines (Zhang et al., 2011). De plus nous observons ici que le rendement β-O-4 (partie non-condensée des lignines) présente une corrélation positive mais pas significative avec les facteurs morphologiques

(Tableau III-2). Une corrélation positive et significative a également été détectée entre les paramètres morphologiques et la teneur en acide *p*-coumarique estérifié ainsi qu'avec le pourcentage d'unités S acylées par l'acide *p*-coumarique.

Tableau III-2. Coefficient de corrélation entre les facteurs biochimiques et les facteurs morphologiques.

	H plant	**H épis**	**D tige**	**Rendement**
RP	0,25	-0,04	-0,53	-0,25
KL	0,16	-0,05	0,01	-0,09
ADL	-0.63*	-0.71*	-0,53	-0.73*
G	0,57	0,51	0,46	0,57
S	0,48	0,47	0,08	0,43
S/G	-0,38	-0,31	-0,59	-0,42
Rendement β-O-4	0,60	0,56	0,33	0,57
PCest	0.63*	0.68*	0.64*	0.72*
%S-PC	0,59	0.70*	0.74*	0.78**
FAeth	0,22	0,11	-0,20	-0,08

H plante, la hauteur de plante; H épis, la hauteur de l'épis principal; D tige, le diamètre de la tige au-dessous de l'épis principal; RP, résidu pariétale; KL, teneur en lignine Klason; ADL, acid detergent lignin; G, unité G; S, unité S; Rendement β-O-4, quantité totale de monolignols liés par des liaisons β-O-4; PCest, teneur en acide *p*-coumarique estérifié; %S-PC, pourcentage d'unité S acylées par le *p*-coumarate; FAeth, teneur en acide férulique éthérifié.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Ainsi les facteurs morphologiques semblent liés négativement avec la partie « cœur » des lignines alors qu'une tendance positive avec la partie β-O-4 apparaît et qu'une relation nette avec la *p*-coumaroylation des parois est soulignée. Il ne faut pas perdre de vue que dans notre matériel nous avons limité les variations de teneur en lignines et que par conséquent les propriétés mécaniques des tiges ne peuvent pas être améliorées par une augmentation

quantitative simple de la teneur en lignines. Il apparaît ici que les améliorations agronomiques sont accompagnées par une augmentation de la *p*-coumaroylation des parois et par un enrichissement en liaisons β-O-4 au sein des lignines alors qu'une augmentation des lignines de cœur a au contraire un effet négatif sur les performances agronomiques. Ainsi, la rigidité nécessaire aux plantes pour pouvoir être plus grandes et donc pour atteindre un meilleur rendement semble conférée par des lignines plus linéaires et plus *p*-coumaroylées. Cela va dans le sens de ce que nous avions montré dans la partie précédente où une meilleure dégradabilité de paroi allait de pair avec une plus faible teneur en liaisons β-O-4 et une diminution de la *p*-coumaroylation.

Tout cela nous amène à souligner ici la « plasticité pariétale » déjà évoquée par Vermerris et al. (2010). Il est assez courant maintenant de parler de plasticité des lignines (Lapierre *et al.*, 1988; Boudet, 1998; Ralph *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 2001; Lapierre *et al.*, 2004; Vermerris *et al.*, 2010), cette plasticité consistant lors de la lignification à incorporer dans le polymère des sous unités «inhabituelles » lorsque les classiques H, G et S viennent à être moins disponibles. Cette plasticité peut aussi être envisagée à l'échelle plus globale de la paroi. Dans notre étude, lorsque nous limitons la gamme de variation de la teneur en lignines nous constatons que la « rigidité » pariétale peut être assurée via la mise en place de lignines plus linéaires et par la *p*-coumaroylation des parois. La plante utilise donc un autre facteur à la place de la teneur en lignines pour maintenir la capacité de la paroi.

Plusieurs études ont montré que la fin de croissance cellulaire est associée à un dépôt des parois secondaires lignifiées (Jung and Casler, 2006a). Le développement de la taille des plantes (hauteur et diamètre de tige) est ainsi arrêté par la lignification de la paroi cellulaire. La teneur en lignines est connue pour être reliée aux paramètres morphologiques des plantes (Goujon *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2005; Chen and Dixon, 2007). Chez les mutants brown-midrib (bm) de maïs (Barriere and Argillier, 1993), une réduction de la teneur en lignine par rapport aux plantes non mutantes est généralement associée aux faibles performances agronomiques. Cependant, les mutants bm présentent aussi des faibles valeurs pour de nombreux autres facteurs pariétaux : teneur en acide phénolique, structure des lignines, rapport S/G, etc. Du fait de la modification simultanée de nombreux paramètres il est délicat de conclure sur l'impact réel et direct d'un seul paramètre. Dans un autre travail sur des mutants laccases chez Brachypodium (Jouanin et al., 2010), la teneur en lignines est réduite (entre 6 et 19%) et la dégradabilité des parois est augmentée sans que pour autant la taille des plantes ne soit affectée.

Un des objectifs essentiels de cette partie de mon travail était de vérifier quel impact pouvait avoir les facteurs explicatifs des variations de la dégradabilité de paroi identifiés précédemment sur les performances agronomiques des plantes. De façon certainement peu surprenante nous montrons que les facteurs qui limitent la dégradabilité des parois sont aussi ceux qui favorisent la taille des plantes et le rendement. Ces résultats suggèrent qu'il faut rester prudent lors d'une sélection pour une meilleure dégradabilité de paroi et bien veiller à ne pas diminuer fortement les performances agronomiques des plantes et vice versa. C'est ce qui n'a pas été pris en compte des années 1950 à 1990 lors d'une sélection du maïs sur des critères « rendement grain » uniquement sans prise en compte de la valeur alimentaire animale et qui a entrainé une très forte diminution des propriétés de dégradabilité accompagnée d'une très forte augmentation du rendement (Argillier and Barriere, 1996).

2.3. Relations entre les facteurs morphologiques et la dégradabilité de paroi

Nous avons des corrélations négatives et significatives entre la hauteur de plante, la hauteur de l'épi principal et IVCWRD (Tableau III-3). De plus, les corrélations entre le diamètre de la tige en dessous de l'épi principal, le rendement et IVCWRD ne sont pas significatives. Entre tous les paramètres morphologiques, ce sont les deux paramètres « Hauteur » qui limitent le plus la dégradabilité. Comme déjà mentionné, la tenue de la plante est assurée en partie par la rigidité de la paroi cellulaire (Vignau-Loustau and Huyghe, 2008). Plus la plante est haute, plus l'organisation de sa paroi doit être rigide pour permettre une bonne tenue. Ceci peut expliquer que les paramètres « Hauteur » soient plus liés avec la propriété de dégradabilité de la paroi. Des conclusions similaires ont été rapportées dans des études antérieures (Jung and Buxton, 1994; Casler *et al.*, 2002).

L'objectif de notre étude est avant tout de comprendre comment améliorer la dégradabilité du maïs fourrage sans trop perdre en termes de performances agronomiques. Afin de trouver l'équilibre entre l'amélioration de la dégradabilité et la diminution du rendement, nous avons calculé pour chacune des lignées le rendement × sa dégradabilité, que l'on appelle « le rendement dégradable » (Tableau III-4). Il semble ici que l'augmentation du rendement est plus efficace que l'augmentation de la dégradabilité pour augmenter le rendement dégradable. Une des raisons probable est qu'au sein de nos 10 lignées de maïs, la variation du rendement est beaucoup plus importante que celle de la dégradabilité (coefficient de variation de 37,48 pour le rendement et de 7,59 pour la dégradabilité).

Tableau III-3. Coefficient de corrélation entre la dégradabilité des parois et les facteurs morphologiques.

	H plant	H épis	D tige	Rendement
IVCWRD	-0.70*	-0.65*	-0,48	-0,51

H plante, la hauteur de plante; H épis, la hauteur d'épis principal; D tige, le diamètre de tige au-dessous de l'épi principal; IVCWRD, dégradabilité de la paroi.* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Tableau III-4. Le rendement dégradable au sein de 10 génotypes de maïs.

Ge	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**F7012**	**F286**
Rdt dégradable (t/ha)	1,27	1,58	0,33	0,98	1,09	1,32	1,09	1,55	2,04	1,09

Ge 1-8 : les 8 RILs de maïs ; Rdt dégradable : le rendement de la matière sèche dégradable.

D'un point de vue général, les résultats de cette étude, montrent que la modification génétique ou la sélection des plantes pour améliorer la dégradabilité, peut avoir des effets négatifs immédiats sur la performance agricole. Ces performances agronomiques doivent donc être évaluées pour vérifier si l'augmentation de la dégradabilité peut compenser la perte de rendement. Le point le plus positif qu'il ne faut pas perdre de vue et qui ressort également de notre étude, c'est qu'il est aussi possible d'améliorer la dégradabilité sans perdre pour autant au niveau des performances agronomiques. En effet, il est intéressant de noter qu'au sein de nos 10 génotypes, les RIL 2 et 6 sont comparables en termes de rendement (3,22 t MS/ha pour la RIL2 et 3.30 t MS/ha pour la RIL6), mais sont par contre différentes en termes de dégradabilité (49,12% pour la RIL2 et 39,94% pour la RIL6). La RIL2 présente aussi des faibles quantités de PCest et un rendement β-O-4 faible. Nous avons montré que ces deux facteurs sont clés pour améliorer la dégradabilité de paroi et cet exemple nous permet de souligner que cette augmentation de dégradabilité ne se fait pas toujours au détriment des performances agronomiques. La question peut aussi se poser pour des travaux futurs de savoir quel(s) facteur(s) a(ont) permis le maintien de bonnes qualités agronomiques conjointement

avec cette augmentation de dégradabilité de paroi. Nous avons en tout cas ici du matériel qui peut servir de base pour la compréhension de ce qu'est un idéotype de maïs cumulant bonne dégradabilité de paroi et bonnes performances agronomiques.

Cette analyse succincte des qualités agronomiques de nos 10 lignées de maïs, nous a permis d'observer les relations entre la dégradabilité de la plante, sa performance agronomique et ses caractéristiques biochimiques pariétales. Une haute dégradabilité du fourrage peut être associée à une performance agronomique limitée mais certains génotypes échappent à cet écueil. Dans des travaux récents, cette corrélation entre la dégradabilité et la performance agronomique est expliquée par la variation de la teneur en lignines (Pedersen et al., 2005). Dans notre étude, il a été intéressant de montrer que pour une teneur fixée en lignines, les performances agronomiques sont améliorées lorsque le degré de condensation des lignines diminue et lorsque la *p*-coumaroylation des parois augmente. Cette plasticité pariétale qui favorise les performances agronomiques risque par contre de pénaliser la dégradabilité des parois. Il est donc crucial, lorsque l'on cherche à améliorer la dégradabilité, de veiller à ne pas perde la performance agronomique des plantes. Il faut donc parvenir au meilleur équilibre possible entre amélioration de la dégradabilité de la plante et maintien du rendement.

CONCLUSION

Dans cette première partie de mon étude, nous avons étudié l'impact des facteurs biochimiques sur la dégradabilité des parois en travaillant à teneur en lignines (KL) relativement constante au sein de 10 génotypes choisis dans une population de lignées recombinantes de maïs au stade ensilage. Nous avons complété cette étude par une caractérisation des propriétés agronomiques des plantes.

D'un point de vue méthodologie, nous avons comparé deux méthodes couramment utilisées d'estimation de la teneur en lignine : la méthode Klason et la méthode Van Soest. D'abord, l'absence de corrélation entre la teneur en lignines estimée par ces deux méthodes indique que KL et ADL correspondent à l'estimation de deux parties différentes de lignines chez les graminées. La différence entre KL et ADL présente une corrélation positive et significative avec le rendement β-O-4 (fraction non-condensée des lignines). Nous avons montré dans Zhang et al. (2011) que la méthode Klason permettait ainsi d'estimer la quantité « totale » de lignines alors que la méthode Van Soest ne permettait d'estimer que la « Core lignine » (fraction plus condensée de lignine).

Nous avons ensuite étudié les facteurs biochimiques explicatifs des variations pour la dégradabilité des parois. La teneur en liaison β-O-4 des lignines et la teneur en acide *p*-coumarique estérifié sont les deux principaux facteurs explicatifs des variations de dégradabilité des parois. Les liaisons β-O-4 conduisent à des polymères plus linéaires qui de ce fait s'adsorbent plus facilement sur les chaînes de polysaccharides. Les enzymes arrivent donc plus difficilement à accéder aux polysaccharides et ainsi la dégradabilité peut être diminuée. Une augmentation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère lignine peut aussi entrainer une diminution des groupements OH libres et de ce fait augmenter l'hydrophobicité du polymère. Cette hydrophobicité accrue peut aussi intervenir en augmentant la mise en place d'interactions non spécifiques avec les cellulases. Les cellulases se retrouvent ainsi piégées et ne sont plus disponibles pour dégrader les polysaccharides. L'impact d'une augmentation en liaisons β-O-4 au sein des lignines pourrait donc avoir un double effet de limitation de l'accès aux sucres, d'une part en bloquant physiquement l'accès des enzymes aux polysaccharides et d'autre part en adsorbant ces enzymes sur les lignines de façon non spécifique.

J'ai, en fin de thèse, souhaité confirmer ces hypothèses d'adsorption non spécifique des cellulases en relation avec l'augmentation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du

polymère. Pour ce faire, j'ai retenu 14 échantillons en fonction de leur teneur en acide *p*-coumarique estérifié constante (pour limiter la variation de ce facteur apparu comme important également dans notre étude pour influencer la dégradabilité) mais présentant une teneur en β-O-4 contrastée. J'ai, sur ces échantillons, voulu essayer de voir si la teneur en liaisons β-O-4 des lignines a des impacts sur l'adsorption non spécifique des cellulases. Dans des travaux récents, Heiss-Blanquet et al. (2011) ont montré que l'adsorption des cellulases Cel7A, Cel6A et Cel7B de *T. reesei* est corrélée négativement avec la teneur en lignine dans le substrat (paille de blé). Dans cette étude l'adsorption des enzymes est évaluée après 1h d'incubation en déterminant la concentration d'enzyme dans le surnageant (enzymes non-adsorbées). J'ai souhaité appliquer ce protocole aux échantillons retenus afin de mesurer l'impact de la proportion de liaisons β-O-4 sur l'adsorption des enzymes. J'ai rencontré quelques difficultés quant à la répétabilité de l'adsorption non spécifique de ces enzymes sur les matières sèches de nos échantillons. Je n'ai pas réussi à définir les conditions favorables (concentration d'enzyme, temps de réaction) pour l'adsorption complète de ces cellulases. Une des raisons possibles est que nous avons utilisé un cocktail d'enzymes au lieu d'enzymes purifiées. La compétition d'adsorption de ces enzymes sur le substrat influence probablement la quantité totale d'enzyme adsorbée. Il est peut être possible également que notre matière sèche ne puisse pas adsorber une quantité mesurable d'enzymes. En effet, Heiss-Blanquet et al. (2011) ont montré une augmentation d'environ 70-90% de fixation des enzymes au substrat après un prétraitement. Dans notre cas, nous ne souhaitions pas prétraiter nos échantillons afin de ne pas modifier la structure des lignines.

En prenant en compte deux facteurs ensemble, teneur en lignine Klason et %S-PC, nous expliquons 84% des variations de dégradabilité. Ces résultats nous montrent que, dans notre matériel végétal, bien que la variation de la teneur en lignines ait été limitée, elle conserve toujours un rôle pour expliquer une part des variations de dégradabilité. La *p*-coumaroylation des sous unités S des lignines ainsi que leur degré de condensation apparaissent comme deux facteurs clés d'amélioration de la dégradabilité des parois.

L'étude morphologique que nous avons réalisée nous a permis d'arriver à une conclusion intéressante. Nous avons observé la relation entre la dégradabilité de la plante et ses performances agronomiques. Les facteurs biochimiques limitant la dégradabilité peuvent par contre s'avérer favorables pour assurer la performance agronomique de la plante via des mécanismes de plasticité pariétale. Le fait que nous ayons mis à jour un génotype capable de cumuler une bonne dégradabilité de paroi et de bonnes performances agronomiques ouvre des

perspectives intéressantes pour l'amélioration conjointe de ces deux caractères chez le maïs ensilage. A l'avenir, il nous faudra comprendre quels autres paramètres (féruloylation ? répartition des lignines au sein de la tige ? etc.…) permettent cette amélioration conjointe.

Dans la suite de mon travail, j'ai choisi de voir si dans une base génétique plus large le degré de condensation des lignines ainsi que la *p*-coumaroylation de ces lignines étaient toujours de bons paramètres explicatifs des variations de dégradabilité de paroi. Pour ce faire, nous avons retenu 7 lignées de maïs présentant des teneurs en lignine comparables au stade ensilage et là encore une gamme de variation importante en termes de dégradabilité de paroi. J'ai complété la caractérisation biochimique approfondie de ce matériel par une étude de la répartition des lignines au sein de coupes de tiges afin d'en mesurer l'impact sur la dégradabilité. J'ai également souhaité utiliser ces génotypes pour étudier si, pour des teneurs en lignine comparables au stade mature, la mise en place de la lignification des parois se faisait toujours suivant le même mode au cours du développement des plantes.

CHAPITRE IV : MISE EN PLACE DES PAROIS, DE LEUR LIGNIFICATION ET DE LEUR RETICULATION AU SEIN DE LA TIGE DE MAÏS PENDANT LE DEVELOPPEMENT

CHAPITRE IV : Mise en place des parois, de leur lignification et de leur réticulation au sein de la tige de maïs pendant le développement

INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, dans un set de 10 génotypes, nous avons proposé des facteurs biochimiques explicatifs des variations pour la dégradabilité de paroi au stade ensilage. Nous avons ainsi montré que la teneur en liaisons β-O-4 ainsi que la teneur en acide *p*-coumarique estérifié sont deux facteurs clés qui limitent la dégradabilité des parois lorsque la teneur en lignines est relativement stable. Nous avons discuté aussi des impacts de ces facteurs biochimiques sur les performances agronomiques des plantes afin d'aborder la question relative à l'amélioration de la dégradabilité des parois conjointement à un maintien des performances agronomiques des plantes.

Cette seconde partie de mon travail de thèse vise à atteindre deux objectifs majeurs. Dans un premier temps, j'ai souhaité regarder dans une base génétique plus large que celle visée dans le chapitre précédent si les deux facteurs biochimiques identifiés étaient toujours de bons paramètres explicatifs des variations de dégradabilité de paroi. Dans un second temps, j'ai voulu étudier le schéma de mise en place des parois au cours du développement des plantes pour des génotypes de maïs présentant des teneurs en lignines comparables au stade ensilage mais des dégradabilités de parois contrastées. Mon intention était de voir s'il existait un seul mode spatio-temporel de mise en place des parois pour obtenir une lignification finale globale identique ou si différents schémas et structures de parois pouvaient être recrutés, participant ainsi à l'explication d'une part des différences de dégradabilité de parois observées.

Pour répondre à ces deux objectifs, nous avons retenu 7 lignées de maïs présentant des teneurs en lignines comparables au stade ensilage et là encore une gamme de variation importante en termes de dégradabilité de paroi. Nous avons travaillé sur l'entre nœud soutenant l'épi principal. L'étude d'entre nœud est connue comme un bon modèle pour l'étude du développement de la paroi (Morrison *et al.*, 1998). Faute de temps, j'ai dû durant ma thèse, limiter mon analyse à 3 des 7 génotypes au cours du développement.

Les entrenœuds des 3 génotypes retenus (F324, F66, et F7037) ont été prélevés au cours du développement comme présentés dans le « CHAPITRE II : Matériel et Méthodes », de ce manuscrit. Nous avons caractérisé biochimiquement ces entrenœuds de façon approfondie. Cette caractérisation biochimique approfondie des trois génotypes au cours de leur développement fait l'objet d'un projet d'article pour « Journal of Experimental Botany ». D'autre part, suite aux résultats obtenus par notre équipe (Méchin *et al.*, 2005) et en nous appuyant également sur les bases bibliographiques qui montrent l'évolution au cours du développement des différentes structures anatomiques des tiges (Jung and Engels, 2002; Jung and Casler, 2006a; Boon *et al.*, 2012) ainsi que les relations avec la limitation de la dégradabilité des parois (Wilson, 1993; Wilson and Hatfield, 1997; Jung and Casler, 2006b), nous avons souhaité compléter notre étude au cours du développement par une caractérisation histologique détaillée. Dans les travaux développés en 2005 (Méchin et *al.*, 2005) nous nous « contentions » d'évaluer la répartition des lignines via la surface de tissus lignifiés colorés en rouge par le Fasga sur les coupes. Dans cette étude, nous avons souhaité aller plus loin et quantifier la variation de la distribution spatiale des lignines tout au long de la coupe pendant le développement. Cette caractérisation a fait en tout premier lieu l'objet d'un développement méthodologique permettant une analyse d'image automatique. Ce développement est présenté sous forme d'un article soumis à « Journal of Agricultural and Food Chemistry ». Je présente ensuite l'étude histologique des trois génotypes au cours du développement en utilisant la méthode d'analyse d'image automatique développée. Enfin, je me consacre pour finir ce chapitre à l'analyse des relations entre dégradabilité de paroi, caractères biochimiques et caractères histologiques.

1. Etude cinétique de la mise en place de la lignification des parois et les différents composants pariétaux au cours du développement des plantes (Article II).

Cell wall establishment during maize stem development

Authors: Y. Zhang[a], , Y. Barrière[b], , V.Méchin[a]*

[a] Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles, France

[b] Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, 86600 Lusignan, France.

*Corresponding author. Tel, : +33 (0)1 30 83 37 96; Fax : +33 (0)1 30 83 33 19.

E-mail address: valerie.mechin@versailles.inra.fr

Abstract

Keywords:

Introduction

Cell wall structure and composition have been proposed as important factors that may modify cell wall degradability. Cell wall is a complex molecular assembly involving polysaccharidic (cellulose and hemicellulose) and phenolic (lignin and *p*-hydroxycinnamic acids) components. Lignin is formed via the oxidative coupling of three main monolignols: *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, and sinapyl alcohol, which give rise to p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), and syringyl (S) units interconnected by aryl ether bonds (β-O-4 linkages) and/or carbon-carbon bonds. In grass cell walls, *p*-hydroxycinnamic acids are able to establish covalent bonds with lignin and/or other cell wall polymers. Whereas *p*-coumaric acid is known to be ester-linked to the γ-position of the side chains of S lignin units (Grabber *et al.*, 1996), ferulic acid is linked both to polysaccharides through ester linkages and to lignin through ether bonds (Ralph *et al.*, 1995; Hatfield *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2009).

The deposition of lignin in cell walls has far-reaching consequences for the mechanical stability, apoplastic solute conductance and pathogen resistance of forage crops (Lewis and Yamamoto, 1990; Wallace and Fry, 1994). However, the enzymatic degradability of forage declines during maturation because of accumulation and progressive lignification of primary and secondary cell walls (Jung and Deetz, 1993). Until now, many studies related to genetics, genomics and biochemistry of lignin have been performed on grass and have revealed that lignin content is the first factor negatively correlated with cell wall degradability. However, simple reduction in lignin content may risk losing the forage agricultural fitness traits (Casler *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2005). So studies related to the quest for explanatory factors for cell wall degradability variations have focused on the influence of other cell wall parameter such as cell wall composition, lignin composition and structure and *p*-hydroxycinnamic acids content (Jung *et al.*, 1999; Grabber, 2005; Grabber *et al.*, 2009); (Bernard-Vailhe *et al.*, 1996;

Baucher *et al.*, 1999; Mechin *et al.*, 2000). While there are extensive data in the literature on cell wall biochemical factors and their impact on degradability, the role of these factors remains uncertain and opposite conclusion often occurs. Several studies suggested that cross-linking between lignin and polysaccharides through ferulic acid may be a major determinant of cell wall degradability, nevertheless, consistent relationship have not always been observed for this parameter (Jung and Buxton, 1994; Mechin *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011). Concerning lignin structure, it has been proposed that lignin rich in carbon-carbon bonds are more inhibitory for cell wall degradability (Jung and Deetz, 1993). However, in a previous published study, we demonstrated that β-O-4 rich lignin have a more extended shape likely to adsorb all along the cellulose fibers, thus resulting in a lower accessibility of hydrolytic enzymes to polysaccharides (Zhang *et al.*, 2011).

Plant cell wall development is an integrated process during which several components are deposited successively. Some studies describe this sequential process in a biochemical point of view in detail (Hatfield, 1993; Terashima *et al.*, 1993; Boon *et al.*, 2012). Contrariwise, in our knowledge, there is no data concerning the genetic variability for cell wall establishment in maize excepted a comparison between two hybrids performed by Boon et al. (2005a, b; 2008; 2012) for cell wall thickness and VanSoest measurements. In Jung (2003) or in Jung and Casler (2006a) three maize hybrids were studied two years all along internode development but quite surprisingly presented data were averaged across the three genotypes and two years. The three hybrids are supposed to show the same patterns. Such studies along maize internode development for several genotypes are quite tedious but we thought it was important to fill this gap on genetic variability for cell wall establishment and on its impact on the final cell wall structure.

Moreover, in a previous study, we highlighted the impact of both the proportion of uncondensed lignin and its acylation by *p*-coumaric acid in limiting cell wall degradability, whereas ferulate bridges appeared to have no impact on the latter (Zhang et al., 2011).

We present here a study conducted to describe the patterns of cell wall establishment in three distinct genotypes selected for their quite similar lignin content and their contrasted cell wall degradability at silage stage. Study was conducted using the maize internode supporting the ear. Developmental patterns for internode cell wall composition are reported with an emphasis on the pattern of lignification, *p*-coumaroylation and feruloylation.

The objective was to identify if genotypes with same mature lignin content but with contrasted cell wall degradability presented equivalent cell wall structure and moreover if the developmental scheme retained for cell wall establishment could have an impact on the final cell wall structure and reticulation potentially explaining further cell wall degradability differences.

Data on developmental patterns for tissues lignification among the stem section and on cell wall degradability of maize internodes are described in a companion paper

Materials and Methods

Plant material

Three maize inbred lines F324, F66 and F7037 were cropped at INRA Lusignan (86, France) for three successive years (2009 to 2011). The trials were randomized block designs with three replicates. Plots consisted of one 5.2m long row and the density was 90 000 plants per hectare. Irrigation was applied from mid-June to end of August to prevent water stress.

In 2009 and 2010, for biochemical an analysis, principal ear's internode was sampled at 6 stages of development beginning when the plants had reached the V8 (eight expanded leaves). The next five stages were V10 (ten expanded leaves), tasseling, silking, 14 days after silking and silage stage. For each inbred line, 50 internodes were sampled at V8 and V10, 15 internodes were sampled at the four other stages. The internodes were chopped oven dried (70°C) and ground with a hammer mill to pass through a 1 mm screen.

In 2011, on five plants for each stage, the length of the internodes was measured with a ruler. Diameter of internodes was measured with calipers in the middle of the internode, across the short axe.

Biochemical analyses

Cell wall residue (CWR) was obtained after a two-stage extraction of the dry matter by ethanol and water (Effland, 1977). Lignin content was estimated according to the Klason procedure (Dence and Lin, 1992) and expressed as the weight percentage of Klason lignin (KL) in CWR.

p-hydroxycinnamic acid content was measured after treating CWR fractions with NaOH according to a previously described procedure (Mechin *et al.*, 2000) which involves two

alkaline treatments with different levels of severity. Esterified p-hydroxycinnamic acids were released by subjecting CWR samples (50 mg) to a mild alkaline hydrolysis (NaOH 2N, 5 ml, 20h at room temperature). Other CWR samples (50 mg) were treated with 5 ml of 4 M NaOH for 2h at 170°C to release both esterified and etherified hydroxycinnamates. Samples recovered from mild and severe alkaline hydrolysis were subjected to the same precipitation procedure (Culhaoglu *et al.*, 2011) prior to HPLC-MS analysis. The concentration of esterified p-coumaric (PCest) and ferulic (FAest) acids correspond to the amount of PC and FA released by mild alkaline hydrolysis whereas etherified ferulic acid (FAeth) was calculated as the difference between FA amounts released by the severe and mild alkaline treatments.

Lignin monomeric composition was studied by thioacidolysis performed on 15 mg CWR placed in a screw-cap glass tube together with 1ml of internal standard (C19, C21, C22 0.5mg/ml each) and 10 mL of dioxane/ethanethiol mixture (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate, for 4h in an oil bath at 100°C (Lapierre *et al.*, 1986). After extraction of the lignin-derived monomers, the analysis of their trimethylsilyl derivatives was run by GC/MS. The molar yield in H, G and S lignin-derived monomers was calculated on the basis of the KL content of the sample.

We also estimated the percentage of S lignin units acylated by p-coumaric acid (S-PC) assuming that all the PC was esterified to S lignin units and extrapolating the percentage of S units in the uncondensed to the whole lignin. Thus S-PC was calculated as mentioned above:

$$\text{S-PC} = (100 \times \text{PCest}) / (\text{LK} \times \%\text{S})$$

All the analyses were performed in duplicate.

Statistical analysis

Any block effect nor interaction with any other factor with block was detected thus to compare the relative influence of genotype, year and stage, variance analysis was carried out using R according to the following model:

$$Yijkl = \mu + Ai + Gj + Sk + AGij + ASik + GSjk + Rijkl$$

where Yijkl is the value of genotype j, in year I, for stage k anf for block l; μ is the overall mean; Ai denotes the main effect of year i; Gj denotes the effect of genotype j; Sk denotes the main effect of stage k; AGij denotes the interaction effect between genotype j and year i; ASik denotes the main effect of stage k nested in year i; GSjk denotes the main effect of genotype j nested in stage k; and Rijk is the random residual term.

Data were combined over year, field and analysis replicates before determination of correlation coefficients using R.

Results

Genetic variation for internode elongation within the 3 genotypes throughout development

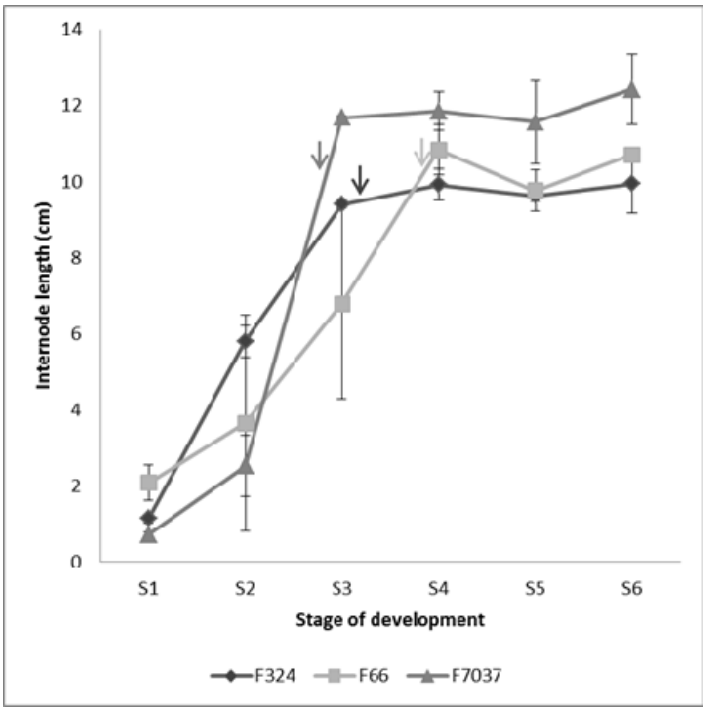


Figure 1. Length of the principal ear's internode for the three maize lines (F324, F66, and F7037) sampled at 6 developmental stages. Data were averaged across the three blocks collected in 2011. S1: V8; S2: V10; S3: tasseling; S4: silking; S5: 14 days after silking and S6: silage stage. The arrows indicate the time when elongation of the internodes ceased.

The length of the principal ear's internode was measured at each developmental stage for each genotype. The three inbred lines presented different growth patterns along development (Figure 1). The length of the principal ear's internode of F324 rapidly increased from 1.14 to 9.40cm between the first and the third stages. F7037 showed a very fast elongation of the principal ear's internode from 2.52 to 11.67cm between second and third stages. Internode elongation of F7037 appeared to be essentially complete by stage 3, whereas internodes of F324 maintained a slight growth up to stage 4. F66 was a tardy genotype, principal ear's internode length of this genotype increased slowly and consistently from 2.08 to 10.83cm between first and fourth stages, and the elongation seems to be complete by stage 4. At the sixth stage (silage stage), F324 and F66 showed a similar length of the principal ear's internode (9.94 ± 0.79 cm for F324 and 10.7 ± 0.12 cm for F66), while, F7037 internode was

greater (12.42 ± 0.92 cm) than the two others. Internode diameter growth was less important than length (Data not shown). Growth in internode diameter was complete when elongation ended. At the silage stage, F7037 showed also a largest internode diameter (1.33 ± 0.01 cm) than F324 (1.20 ± 0.05 cm) and F66 (1.13 ± 0.02 cm).

Scobbie et al. (1993) showed that, when elongation ceased in maize internodes cells near of the top of the internode had already shifted to extensive secondary wall deposition, whereas at the base of the internode cell walls appeared to still be more primary in nature. Similarly, Jung (2003) indicated that cell wall development shifted from a mixture of primary and secondary wall deposition to only secondary wall development after the end of elongation of the internode.

Thus, in our three inbred lines the shift in the developmental pattern for internode elongation should be associated with different process of cell wall development at a given stage. These differences should be visible in our in depth biochemical characterization.

Internode cell wall composition within the 3 genotypes throughout development

Relative influence of year, genetic and stage effects on biochemical composition

The variance analysis for cell wall biochemical composition indicated that throughout internode development, the three genotypes differed for most biochemical parameters. The genotype effect was even very significant ($P < 0.001$) for KL, G, β-O-4 yield, *p*-coumarate esters and ferulate esters (Table 1). This is the first time the genetic variation for cell wall biochemical composition has been reported during internode development. In previous studies

Table 1. ANOVA results for fixed effects for cell wall biochemical composition of the principal ear's internode for the three maize lines (F324, F66, and F7037) grown in 2009 and 2010 and sampled at 6 developmental stages.

		Variances effects					
		An	Ge	St	An*Ge	An*St	Ge*St
S1-S6	L Internode		*	***			**
	KL	***	***	***	NS	***	***
	G	***	***	***	**	***	NS
	S	***	**	***	NS	***	***
	β-O-4 yield	***	***	***	NS	***	**
	S/G	NS	NS	***	***	NS	***
	PC est	***	***	***	NS	***	***
	SPC	NS	**	***	NS	*	***
	FA est	***	***	***	*	***	***
	FA eth	***	NS	***	NS	*	***
S1-S4	L internode		NS	***			**
	KL	***	***	***	NS	**	***
	G	***	***	***	NS	***	NS
	S	***	*	***	NS	***	**
	β-O-4 yield	***	***	***	NS	***	*
	S/G	NS	NS	***	*	*	***
	PC est	***	***	***	**	***	***
	SPC	NS	NS	***	NS	*	**
	FA est	***	***	***	NS	***	***
	FA eth	NS	**	***	NS	NS	***
S4-S6	L internode		***	NS			NS
	KL	*	***	*	*	NS	NS
	G	***	**	**	**	NS	NS
	S	***	***	***	NS	NS	NS
	β-O-4 yield	***	***	***	*	NS	NS
	S/G	NS	NS	***	**	NS	NS
	PC est	NS	***	***	NS	NS	NS
	SPC	NS	***	**	NS	*	*
	FA est	***	***	***	NS	NS	**
	FA eth	***	NS	*	NS	NS	NS

An, year effects; Ge, genotype effects; St, stage effects; An*Ge, year × genotype interaction; An*St, year × stage interaction; Ge*St, genotype × stage interaction; L internode, internode length; KL, klason lignin content; G, guaiacyl thioacidolysis monomers; S, syringyl thioacidolysis monomers; β-O-4 yield, total yield of thioacidolysis monomers; S/G ratio,

syringyl/guaiacyl ratio; PC est, esterified p-coumaric acid; %S-PC, percentage of S units acylated by p-coumaric acid; FA est, esterified ferulic acid; FA eth, etherified ferulic acid; * Probability level of 0.05; ** Probability level of 0.01; *** Probability level of 0.001; NS, no significant ($P > 0.05$).

no differences in pattern of development have been summarized in different species (Engels and Jung, 1998; Jung, 2003; Jung and Casler, 2006a). The plant material used in our study has been chosen to limit the variation in lignin content at the silage stage, such genetic variation make us to believe that even with quite comparable lignin content at the maturity stage, the development of the cell wall lignification within genotypes followed different way during internode development. As observed in previous studies (Jung, 2003; Jung and Casler, 2006a), the stage effect was very significant ($P < 0.001$) for all cell wall biochemical parameters.

In the current study, the evolution of most biochemical compositions showed clearly two step of development: (1) a fast accumulation over the earlier stages intervals (first four stages) followed by (2) a slow accumulation over the maturity stage intervals (last three stages). The variance analysis carried out for each interval indicated the lack of significant gentoype*stage interactions for late stages (Table 1) whereas these interactions were significant over both S1 to S6 and S1 to S4. Thus at late stages, all the three genotypes had similar comportment and accumulated in the same way the different cell wall components. The main differences for all biochemical parameters were thus concentrated at young stages, before flowering.

Throughout internode growth different developmental patterns were observed for lignin content, composition and structure

**** Evolution of lignin content all along the development***

Among the three genotypes, quite similar low lignin content was observed at first stages of development (4.5 ± 0.5 %, 5.6 ± 1.0% and 5.2 ± 1.0% for F324, F66 and F7037 respectively, Figure 2).

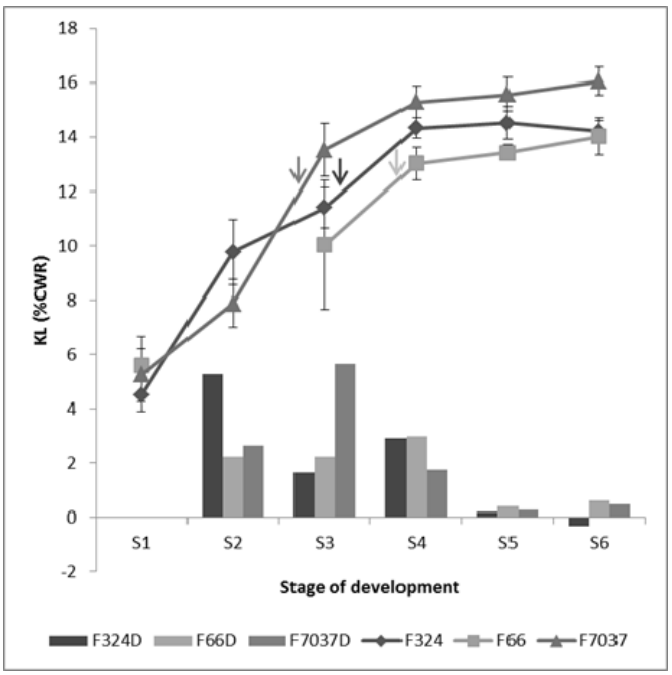


Figure 2. Klason lignin content (line) and increase of Klason lignin content (bars) of the principal ear's internode for the three maize lines (F324, F66, and F7037), sampled at 6 developmental stages. Data are averaged across years and blocks. S1, V8; S2, V10; S3, tasseling; S4, silking; S5, 14 days after silking and S6, silage stage. The arrows indicate the approximate time when elongation of the internodes ceased.

A rapid increase in KL lignin content was observed for the three genotypes in a first developmental period between first and fourth stages. Lignin content for F324 increased very rapidly between the first and the second stages in such a way that F324 showed the highest KL content at the second stage. F7037 showed a very rapid increase of lignin content between the second and the third stages, close to half of the lignin was deposed during this fast step for F7037. That's how F7037 displayed the highest KL content at the third stage. After cessation of internode elongation, lignin content in these two genotypes increased slowly consistently.

F66 presented a quite different pattern. F66 lignin content slowly and consistently increased since the earlier stages. Across genotypes, maximum lignin content was reached after cessation of internode elongation. Beyond, the lignin accumulation in the principal ear's internode was less significant ($P < 0.05$) over the maturity stages intervals (S4 – S6) (Table 1). During this interval, the rate of KL deposition seems to be comparable for the three genotypes.

**** Evolution of lignin structure and composition all along development***

The proportion of H, G and S lignin building units was evaluated by thioacidolysis and thus only reflects the units only involved in β-O-4 bonds. The total β-O-4 yield in thioacidolysis monomers, when calculated on the basis of the lignin content in the cell wall, provides an estimate of the proportion of lignin units only involved in β-O-4 bonds (β-O-4 yield), the so-called "uncondensed" part of the lignin polymer.

The analysis of variance indicated that during internode development, interactions between genotypes and stages were not significant for β-O-4 yield, G and S monomer content, which suggested that development of each of these cell wall traits followed the same pattern for the three genotypes. The following data for β-O-4 yield, and G and S monomer contents (Figure 3) were presented by genotypes to compare the evolution of these cell wall traits.

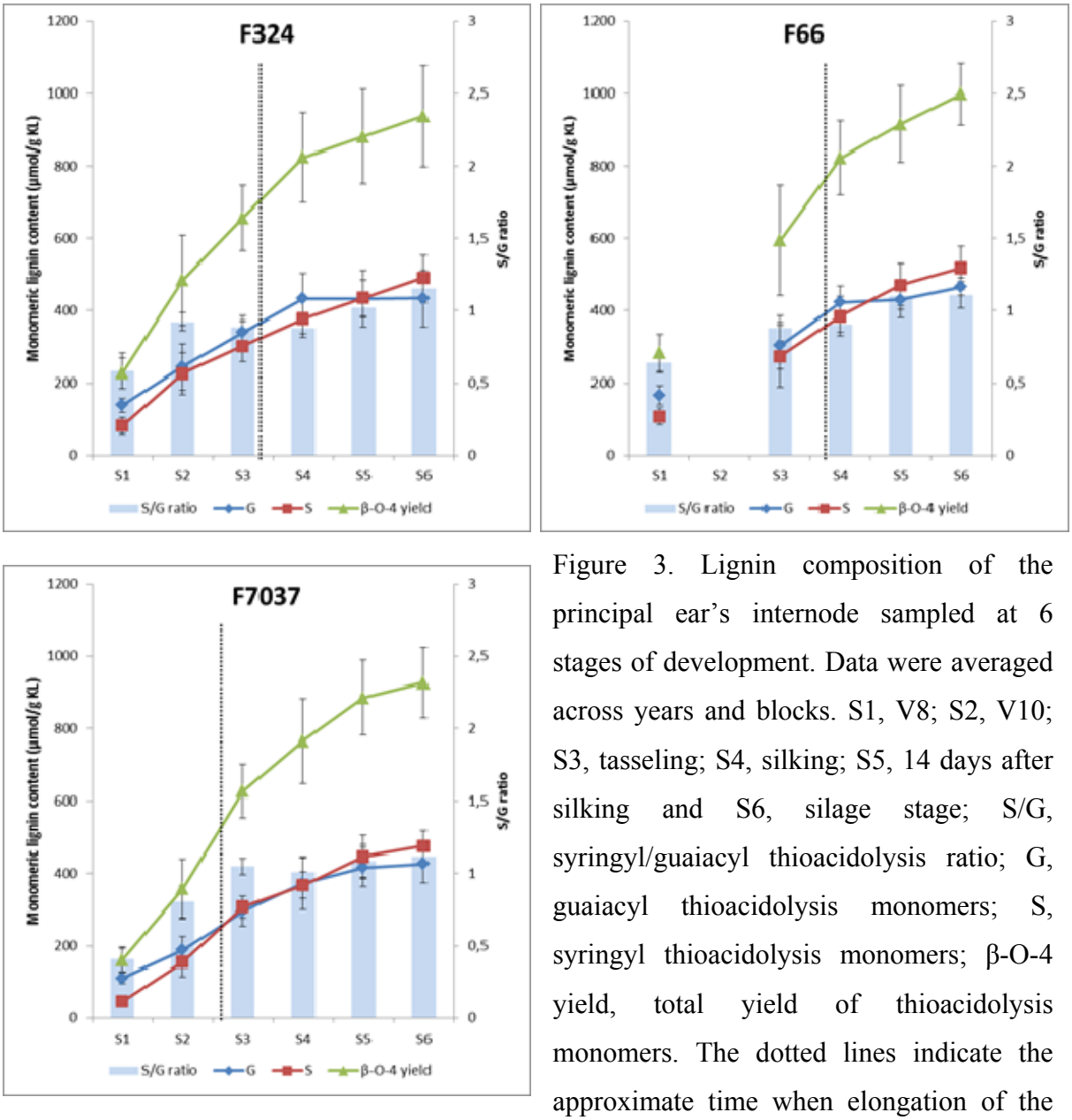


Figure 3. Lignin composition of the principal ear's internode sampled at 6 stages of development. Data were averaged across years and blocks. S1, V8; S2, V10; S3, tasseling; S4, silking; S5, 14 days after silking and S6, silage stage; S/G, syringyl/guaiacyl thioacidolysis ratio; G, guaiacyl thioacidolysis monomers; S, syringyl thioacidolysis monomers; β-O-4 yield, total yield of thioacidolysis monomers. The dotted lines indicate the approximate time when elongation of the internodes ceased.

A very important effect of stage ($P < 0.001$) was observed for β-O-4 yield which corresponded to a consistent increase of the uncondensed part of the lignin polymer in the principal ear's internode during internode development. The accumulation of S lignin monomers followed the same scheme. Accumulation of G lignin monomer involved in bO4 bonds occurred during the four first stages. At the first stage of development, the relatively

low syringyl to guaiacyl ratio (S/G ratio) was consistent with the known shift in H, G and S lignin subunit deposition during lignification as highlighted by Terashima et al. (1993). Thus, we actually observed that G accumulation ceased before S accumulation which continues until the last stage. Thus, during the internode development, the S/G ratio gradually increased until the last stage. The S/G ratio is quite similar between the three genotypes at each developmental stage ($P > 0.05$).

We conceded that lignin structure and composition were very similar for the three genotypes at maturity stage but also presented quite analogous developmental patterns.

Lignin content and composition modifications during internode development has been reported in previous studies (Hatfield, 1993; Terashima *et al.*, 1993; Boon *et al.*, 2012) and the effects of the lignification process on cell wall degradability have also been reported in different grass species (Jung and Engels, 2002; Jung and Casler, 2006b; Boon *et al.*, 2012). Lignification of cell wall begins in primary and is characterized by the accumulation of guaiacyl rich lignins. When lignification reached the secondary cell wall, syringyl rich lignin content and S/G ratio increased (Terashima *et al.*, 1993). This shift from guaiacyl rich lignin to syringyl rich lignin is a general phenomenon of secondary cell wall development in grass tissues (Jung and Casler, 2006a). Many studies have reported than deposition of secondary wall causes cessation of cell elongation. Morrison et al. (1994) indicated that at the whole internode level cell wall development provide a spatial resolution of the temporal events; new cells are produced at the base of the internode, when the earlier-formed (older) cells at the top of the internode are lignifying. Thus, tissues at the top of an elongating maize internode had begun to lignify before the elongation was complete (Morrison *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2002).

In our study, the fast increase of lignin content observed before the cessation of internode elongation probably reflects the rapid lignification of both the primary and secondary cell

walls. Once elongation was complete, fast lignification concerned secondary cell walls and rapidly slow down before S4.

At earlier stages, the three studied genotypes did not differ in their developmental pattern for β-O-4 yield, but differ for their developmental pattern for KL lignin content. Thus between stage 4 and stage 6 about 150 µmol.g-1 KL of β-O-4 lignin units were deposed while the total lignin content only increased in a very few extent. Therefore, from stage 4 to 6 β-O-4 was probably the only linkage formed during this slowly lignification step. Rapid polymerization favors C-C coupling of monolignols; in contrast, gradual polymerization favors β-O-4 coupling between monolignols into lignin polymer (Mechin *et al.*, 2007). This is in accordance with our results which showed that rapid lignin accumulation was certainly the place for mixed bonding pattern within the lignin polymer, with an important place for C-C bonds whereas the slow lignin accumulation of the three last stages was the place of bO4 bonding pattern within the lignin polymer. This finding suggested that the genetic variation in KL lignin accumulation was more depended of the fast development of C-C bonds lignins at earlier stage than of the slow development of β-O-4 bond lignins at later stages. In the current study, the three genotypes selected did not differ for accumulation of β-O-4 lignins, thus similar development patterns were observed for the KL accumulation at late stages.

We can wonder if the establishment of bO4 bonds is “just” a chemical question (oxidative coupling, reactivity, quinone stability and so one) or if this bonding pattern also has genetic foundation which could have spatiotemporal regulation, but the objective of this paper is not to debate this point.

Throughout internode growth different developmental patterns were observed for esterified *p*-coumaric acid content

Deposition of *p*-coumaric acid (PC) followed the same pattern as observed for the KL lignin content (Figure 4A). Strong correlation was observed between esterified PC content and LK content over both the earlier and maturity stage intervals (Data not show). The evolution of percentage of S units acylated by PC (%S-PC) also followed similar pattern as observed for KL (Figure 4B).

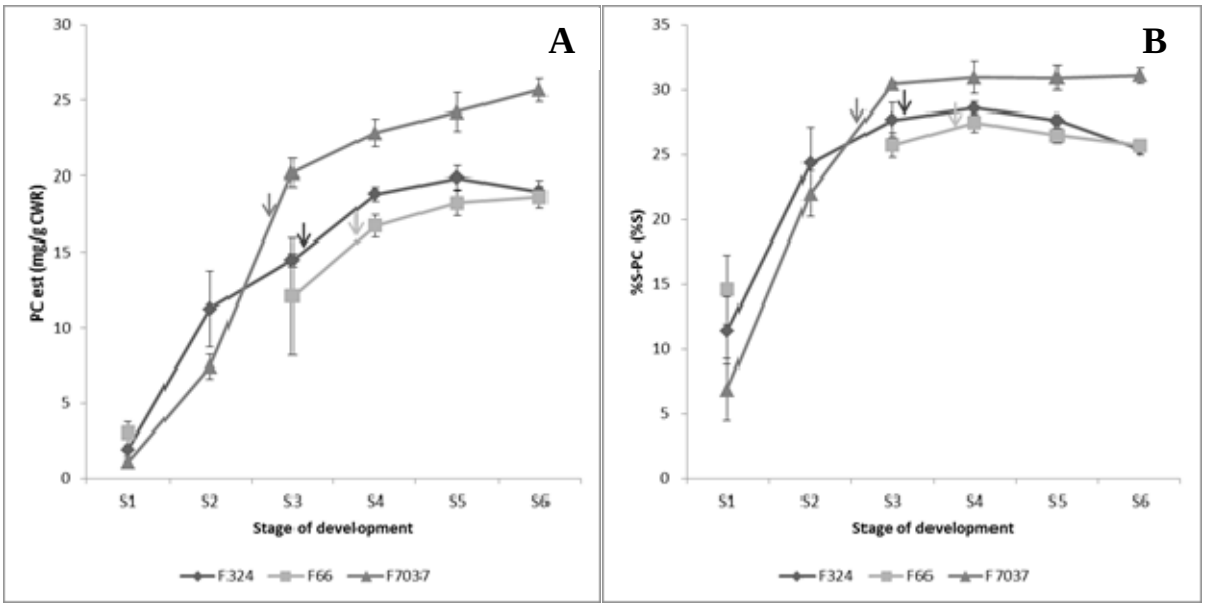


Figure 4. Esterified *p*-coumaric acid (PC) content (A) and percentage of S units acylated by *p*-coumarate (%S-PC) (B) of the principal ear's internode for the three maize lines (F324, F66, and F7037) sampled at 6 developmental stage. Data are averaged across years and blocks. S1, V8; S2, V10; S3, tasseling; S4, silking; S5, 14 days after silking and S6, silage stage. The arrows indicate the approximate time when elongation of the internodes ceased.

The %S-PC increased fast over earlier stages reaching its maximum at stage four. Analysis of variance showed a significant genotype effect for PC content and %S-PC over the maturity stages. At the silage stage, large genotypic variations were observed for PC content and %S-

PC. F7037 which had the highest KL content had thus the highest PC content and %S-PC. F324 and F66 had similar KL content and also presented similar PC content and %S-PC.

In grass, PC is mainly esterified to the γ-position of the side chains of S lignin units, making PC accumulation an indicator of lignin deposition (Lu and Ralph, 1999). Several studies have shown a positive relationship between PC content in the cell wall and level of lignin (Scobbie *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1998; Hatfield and Chaptman, 2009). The current study reinforces this observation, during maize cell wall development esterified PC content increased following the same trajectory as KL content.

It is well established that PC content in the cell wall dramatically increased during maize secondary cell wall development and that PC is mainly associated to the syringyl-rich lignin (Jung and Casler, 2006a). Recent work has demonstrated that S units were enzymatically preacylated by PC in the cytosol (Hatfield *et al.*, 2009), these acylated monolignols are then incorporated into the lignin polymer by polymerization and co-polymerization with the traditional monolignols, resulting in acylated lignin (Ralph, 2010). The role of lignin acylated by PC is not yet very clear. It sure as hell that *p*-coumaroylated S unit is crucial for radical transfer mechanisms in order to improve S unit incorporation into lignin polymer. In the current study, %S-PC greatly increased in the third first stages. Thus and quite logically, the %S-PC increased when S units became more abundant in the lignification process. As from stage three, the %S-PC leveled off. This plateau was higher for F7037 compared to F324 and F66. Thus, about 31% of the S units appeared to be acylated by PC in F7037 to about 25% in the two other genotypes. We have shown earlier that at late stages, mainly uncondensed β-O-4 lignin was formed; these lignins are thus also strongly p-coumaroylated. The enzymatic step of S unit acylation by PC could thus be a key step to control lignin final structure and composition. Especially when considering the results obtained by Zhang et al. (2011) which demonstrated that p-coumaroylated S lignin units were a major limiting factor for cell wall

degradability. Recent works presented by Withers et al. (2012) on an acyltransferase that catalyzes the acylation of monolignols in grass open up the possibility to modify gene expression and thus to modulate and regulate acylation in plants.

Esterified ferulic acids were deposed all along plant development but used to anchor lignification only at early stages

Variance analysis indicated that the three genotypes differed for esterified ferulic acid content (FAest) over developmental stages ($P < 0.01$) (Table 1). In grass FA firstly ester linked to arabinoxylans are deposited in the primary cell wall (Hatfield *et al.*, 1999). Once incorporated into the wall peroxidases oxidize the FA to form several possible FA dimers (Ralph *et al.*, 1994) but also couple FA to monolignols (Quideau and Ralph, 1997). Ralph et al., (1995) suggested that FAest probably serve as initialization site for lignification. In the present study, FAest was relatively high from the first stage, especially for F66 (Figure 5A) which appeared to be very early for this characteristic. This early deposition of FAest should play a crucial role for the development of lignification in primary wall. Faest accumulation was high during the three first stages and slowed down once secondary wall development begun. However, it was important to be said that FAest accumulation carried on at late stages for F66 and F324 but surprisingly not for F7037 (Figure 5A). Our results are consistent with those presented by Jung (2003) indicated that FAest deposition is not limited to primary walls and that approximately 60% of FAest are presents when the secondary wall formation begins in maize. At the same time, etherified FA content were all present at stage three. FAeth are supposed to bridge together hemicelluloses and lignins. Beyond stage three no supplementary bridge between these two polymers were thus set up. The possibility remained that feruloylarabinoxylan polymers continued to be laid down in the secondary wall, but no more FA radically couple to monolignol. This is extremely consistent with the fact that lignin

synthesized during the last stages were mainly constituted of bO4 bond subunits. This predominance of bO4 bonds was the sign of an endwise mechanism as debate in Méchin et al. (2010). Thus, at the end of the plant development few lignins were synthesized but the new ones were not fixed to new FA primers but were an elongation via bO4 bonding of the existent lignins. FA primers were thus recruited before stage 4 to install lignification.

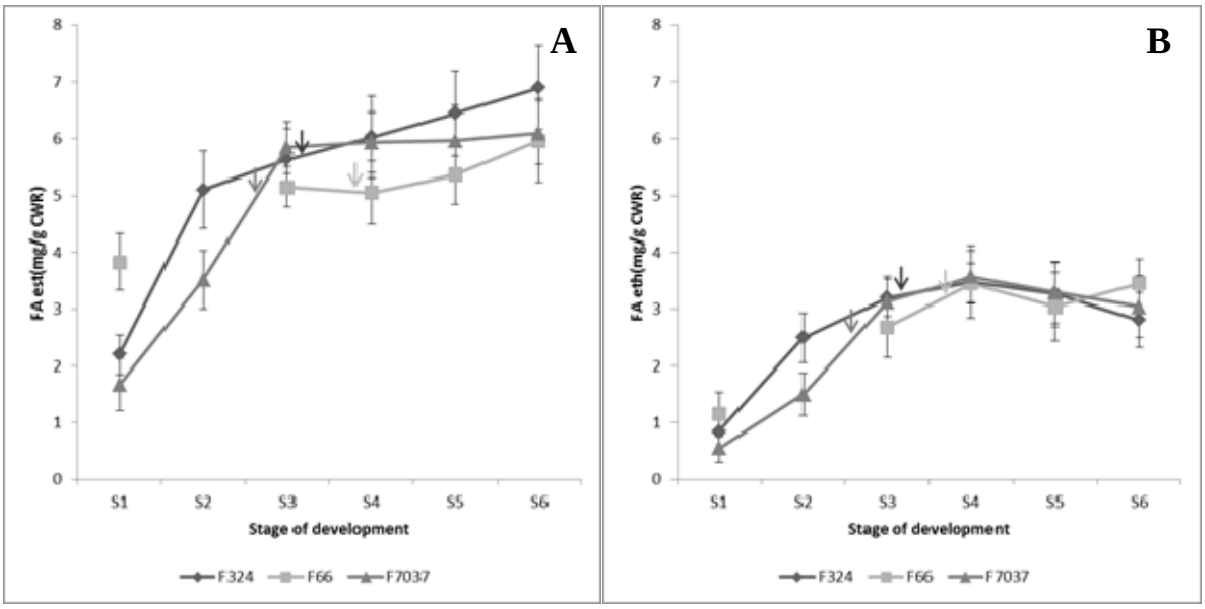


Figure 5. Esterified ferulic acid concent (FA est) (A) and etherified ferulic acid content (FA eth) (B) in the principal ear's internode for the three maize lines (F324, F66, and F7037), sampled at 6 developmental stages. Data were averaged across years and blocks. S1, V8; S2, V10; S3, tasseling; S4, silking; S5, 14 days after silking and S6, silage stage. The arrows indicate the approximate time when elongation of the internodes ceased.

The cell wall development pattern

In the present study, maize stem cell wall development followed three different steps (1) a fast deposition of primary cell wall; (2) a fast deposition of secondary wall and (3) a slow

deposition of secondary wall. Deposition of cell wall components and development of cell wall structure varied among these three developmental steps and was also clearly genotype dependant. In primary cell wall, FAest was predominantly deposed, and the large genetic variation for FAest content was likely to be critical for the variation of lignification in the primary cell wall. In the second step, deposition of both fast C-C and β-O-4 bonds lignins lead to the fast development of secondary cell wall. Different development pattern were observed for KL and PC contents among the three genotypes which could be related in part to the genetic variation of C-C bonds lignin deposition. Once the fast C-C bonds lignin deposition ended, β-O-4 bonds lignins were likely the only ones formed during the late lignification.

In the present study, no genetic variation was observed for β-O-4 lignin deposition. KL and PC deposition kept the same rate during the third step of cell wall development. Genetic variations were observed for these parameters what suggested that selection for improvement of cell wall and as a result for forage quality cannot be simply based on wall biochemical traits at maturity, the development of structural cell wall parameters during the plant growth may also be important.

Acknowledgments

The authors sincerely acknowledge L. Cézard and F. Legée for their participation in lignin analysis, C. Minault, P. Vernoux, and D. Denoue for their precious contribution in field experiments.

This work was funded by the French Research National Agency (ANR) in the context of the MAGIC program (ANR-08-BLAN-0307-01) and Y. Zhang was supported by a grant from INRA CEPIA and INRA BV.

Bibliography

Baucher M, Bernard-Vailhe MA, Chabbert B, Besle JM, Opsomer C, Van Montagu M, Botterman J. 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Molecular Biology* **39**, 437-447.

Bernard-Vailhe MA, Cornu A, Robert D, Maillot MP, Besle JM. 1996. Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1164-1169.

Boon E, Engels FM, Struik PC, Cone JW. 2005a. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. I. Relevant morphological parameters. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **53**, 71-85.

Boon E, Engels FM, Struik PC, Cone JW. 2005b. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. II. Relation between in vitro rumen fermentation characteristics and anatomical and chemical features within a single internode. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **53**, 87-109.

Boon EJMC, Struik PC, Engels FM, Cone JW. 2012. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. IV. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **59**, 13-23.

Boon EJMC, Struik PC, Tamminga S, Engels FM, Cone JW. 2008. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stern variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **56**, 101-122.

Casler MD, Buxton DR, Vogel KP. 2002. Genetic modification of lignin concentration affects fitness of perennial herbaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 127-131.

Chen L, Auh C, Chen F, Cheng XF, Aljoe H, Dixon RA, Wang ZY. 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5558-5565.

Culhaoglu T, Zheng D, Mechin V, Baumberger S. 2011. Adaptation of the Carrez procedure for the purification of ferulic and p-coumaric acids released from lignocellulosic biomass prior to LC/MS analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **879**, 3017-3022.

Dence C, Lin SY. 1992. The Determination of Lignin. In Methods in Lignin Chemistry. *Springer: Berlin*, 33-61.

Effland MJ. 1977. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi* **60**, 143-144.

Engels FM, Jung HG. 1998. Alfalfa stem tissues: Cell-wall development and lignification. *Annals of Botany* **82**, 561-568.

Grabber JH. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* **45**, 820-831.

Grabber JH, Mertens DR, Kim H, Funk C, Lu F, Ralph J. 2009. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 122-129.

Grabber JH, Quideau S, Ralph J. 1996. p-coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for beta-ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* **43**, 1189-1194.

Hatfield RD. 1993. Cell Wall Polysaccharide Interactions and Degradability. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 285-313.
Hatfield RD, Chaptman AK. 2009. Comparing-Corn Types for Differences in Cell Wall Characteristics and p-Coumaroylation of Lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4243-4249.
Hatfield RD, Marita JM, Frost K, Grabber J, Ralph J, Lu F, Kim H. 2009. Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. *Planta* **229**, 1253-1267.
Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH. 1999. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 403-407.
Jung HG, Casler MD. 2006a. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop Science* **46**, 1793-1800.
Jung HG, Casler MD. 2006b. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Science* **46**, 1801-1809.
Jung HG, Deetz DA. 1993. Cell Wall Lignification and Degradability. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 315-346.
Jung HG, Engels FM. 2002. Alfalfa stem tissues: Cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science* **42**, 524-534.
Jung HJG. 2003. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry* **63**, 543-549.
Jung HJG, Buxton DR. 1994. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in-vitro degradability for stem internodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**, 313-322.
Jung HJG, Ni WT, Chapple CCS, Meyer K. 1999. Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an Arabidopsis mutant. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 922-928.
Lam TB, Iiyama K, Stone BA. 2003. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass Phalaris aquatica and Lolium perenne and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochemistry* **64**, 603-607.
Lapierre C, Monties B, Rolando C. 1986. Preparative Thioacidolysis of Spruce Lignin: Isolation and Identification of Main Monomeric Products. *Holzforschung* **40**, 47-50.
Lewis NG, Yamamoto E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**, 455-496.
Lu FC, Ralph J. 1999. Detection and determination of p-coumaroylated units in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1988-1992.
Mechin V, Argillier O, Menanteau V, Barriere Y, Mila I, Pollet B, Lapierre C. 2000. Relationship of cell wall composition to in vitro cell wall digestibility of maize inbred line stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 574-580.
Mechin V, Baumberger S, Pollet B, Lapierre C. 2007. Peroxidase activity can dictate the in vitro lignin dehydrogenative polymer structure. *Phytochemistry* **68**, 571-579.
Morrison TA, Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD. 1998. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Science* **38**, 455-460.
Morrison TA, Kessler JR, Burton DR. 1994. Maize internode elongation patterns. *Crop Science* **34**, 1055-1060.
Pedersen JF, Vogel KP, Funnell DL. 2005. Impact of reduced lignin on plant fitness. *Crop Science* **45**, 812-819.
Quideau S, Ralph J. 1997. Lignin-ferulate cross-links in grasses .4. Incorporation of 5-5-coupled dehydrodiferulate into synthetic lignin. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 2351-2358.
Ralph J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* **9**, 65-83.

Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD. 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* **275**, 167-178.

Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. 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.

Scobbie L, Russell W, Provan GJ, Chesson A. 1993. The Newly Extended Maize Internode: A. Model for the Study of Secondary Cell Wall. Formation and Consequences for Digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **61**, 217-225.

Terashima N, Fukushima K, He L-F, Takabe K. 1993. Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 247-270.

Wallace G, Fry SC. 1994. Phenolic components of the primary cell wall. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 151* **151**, 229-267.

Zhang A, Lu F, Sun R, Ralph J. 2009. Ferulate-coniferyl alcohol cross-coupled products formed by radical coupling reactions. *Planta* **229**, 1099-1108.

Zhang Y, Culhaoglu T, Pollet B, Melin C, Denoue D, Barriere Y, Baumberger S, Mechin V. 2011. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 10129-10135.

Dans ce travail, nous avons donc décrit la mise en place de la lignification des parois et des différents constituants phénoliques pariétaux au cours du développement des plantes pour trois lignées de maïs qui présentent des teneurs en lignines assez comparables au stade mature. Nous avons ainsi montré que la mise en place des parois est un processus complexe et que les différents composants pariétaux sont incorporés graduellement au cours du développement. Bien que les trois lignées étudiées présentent des teneurs en lignines assez comparables, nous avons mis en évidence une variabilité génétique assez importante dans la mise en place des parois, variabilité qui conduit à des profils pariétaux bien distincts. Pour aller plus loin, nous avons souhaité compléter ce travail par une étude à une échelle tissulaire. Cette échelle devant nous permettre d'avoir une bien meilleure idée de la mise en place des différents tissus lignifiés au cours du développement au sein des tiges de ces trois génotypes.

C'est ce que nous allons présenter dans les deux parties qui suivent. La première partie correspond au développement méthodologique que nous avons réalisé en termes d'analyse d'image pour automatiser la détection des tissus lignifiés sur des coupes colorées et pouvoir ensuite aller plus en profondeur dans la caractérisation des différentes zones lignifiées au sein des coupes. Ce travail est en cours de valorisation par une publication soumise à Journal of Agricultural and Food Chemistry. Ensuite, nous présenterons l'application de ces développements aux trois génotypes étudiés au cours de leur développement.

2. Etude cinétique de la distribution spatiale des lignines au sein des entrenœuds de maïs par analyse automatique d'images de coupes colorées au Fasga.

2.1. Color quantification of Fasga stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem (Article III).

Colour quantification of Fasga-stained maize stem section describes lignin spatial distribution within the whole stem

Y. Zhang,[†] S. Legay,[†] Y. Barrière,[‡] V. Méchin,[†] and D. Legland[*,¶]

Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, 86600 Lusignan, France., INRA, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France, and AgroParisTech, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

E-mail: david.legland@grignon.inra.fr

Abstract

The lignification of cell walls during plant development has a considerable impact on its usage properties, particularly by limiting cell wall degradability for forage or biofuel purposes. Since global lignin content estimation does not fully explain degradability, the spatial distribution of lignin within tissues is of interest to better understand relationships between lignification and degradability.

[*]To whom correspondence should be addressed

[†]Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318 INRA-AgroParisTech, INRA Centre de Versailles-Grignon, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France

[‡]Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, 86600 Lusignan, France.

[¶]INRA, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

[§]AgroParisTech, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval-Grignon, France

This work presents a method to quantify the lignification of maize tissues by automated colour image analysis of maize stem cross-sections. Fasga staining shows lignified tissues in red and non-lignified tissues in blue. Lignification is assessed by the ratio of red intensity over blue intensity. The automated identification of lignified regions makes it possible to roughly quantify the global lignification of cross-sections. Spatial distribution of lignification within the stem is assessed through profiles of red/blue intensity ratio in relation to the distance to the epidermis. Lignification profiles are analysed by computing summary parameters that describe the lignification in three specific stem regions: the epidermis, the blue ring and the pith.

Our method enabled us to quickly assess the distribution of lignification depending on the position in the section and on the development stage, providing new insights into the lignification process. The high throughput screening method presented here will render the characterisation of a wide range of samples possible, allowing us to screen the genetic variations in relation to cell wall degradability.

Keywords: Lignin distribution; internode development; Fasga-stained stem cross-section; image analysis; colour quantification

Introduction

Strong worldwide demand for energy and concern over global climate change has led to a resurgence in the development of alternative energy to replace fossil transportation fuel. In response, many countries have initiated extensive research in this area. Cellulose, the "green gold" of high industrial and nutritional interest, is mainly located in lignified plant secondary cell walls and is the main target for the production of second generation biofuels. To make these biofuels based on lignocellulosic agricultural residues effective, it is essential to identify the factors that induce lignocellulosic biomass recalcitrance in the presence of lignin and other phenolic compounds in secondary cell walls.

Plant cell walls are complex molecular assemblies that include polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) and phenolic components (lignin and p-hydroxycinnamic acids). Lignin associ-

ation with other cell wall constituents greatly modifies cell wall properties, including enzymatic degradability of structural polysaccharides.[1] In addition to woody plants, grasses constitute the majority of bioenergy biomass resources. It has been shown that grass degradability severely declines with maturity in relation to the increase of cell wall lignification during plant development.[2,3]

Many studies have been performed to link degradability to lignin content,[4,5] lignin composition,[6,7] and/or structure.[8–10] While extensive data on biochemical cell wall composition and relationships between cell wall composition and degradability exist in the literature, this information has not yet led to a complete understanding of how cell wall lignification results in the observed patterns of reduced degradability. Although it is clear that lignin has a negative impact on plant cell wall degradability, lignin content does not always appear to be a major factor in controlling degradability[11] and can only partially explain grass cell wall degradability variations.[10] Moreover, the pattern of lignification within the stem could lead to very different degradability profiles thus highlighting the importance of anatomical structure and, more importantly, lignin distribution within the different stem tissues, on grass cell wall degradability. It has been suggested that anatomical structure might be more important than wall chemistry in determining the rate and extent of cell wall degradability.[12] Modifications of biochemical composition and, more specifically, of lignin content and/or composition can have a significant impact on cell wall thickness and architecture.[13–15] These differences in anatomical structures for different tissues have been shown to widely influence accessibility to potentially degradable polysaccharides by rumen microorganisms.[12,16,17] Several studies demonstrated that assessment of lignin distribution in stem tissues is necessary to evaluate its impact on grass cell wall degradability and thus to better optimise cell wall polysaccharides accessibility.[18–22]

Plant cross-section staining is often used in plant biology to compare lignification profiles between wild type and lignin mutants.[15,23–31] Establishment of lignification during plant development is an important issue, especially with regards to its impact on the final stem degradability. For this reason, we have developed an accurate method to quantify lignification in the main regions of maize stem cross-sections throughout stem development.

Various techniques have been developed for the investigation of lignin distribution in tissues. These techniques include the use of a wide variety of stains and antibodies, and manual[32,33] and preparative laser capture microdissection approaches.[34,35] Microdissective approaches are often combined with microbiochemical characterisation,[32,36–38] thus providing very detailed information on tissue lignification. However, these microdissections entail very tedious work[19,33,39] and are limited to the *a priori* choice of specific tissues. A continuous profile of lignification depending, for example, on the distance to the epidermis would be of interest, but can not easily be obtained with these approaches.

Histological stains are an alternative that can reveal specific components on a thin stem cross-section. In a previous study, Méchin et al. (2005)[20] compared the use of Maüle,[40] phloroglucinol[41] and Fasga stainings[42] to assess the global lignification of maize stem cross-sections. Fasga staining coupled with image analysis was shown to be the most effective method. Fasga stains lignified tissues in red, whereas non-lignified or poorly lignified tissues are stained in blue.

To our knowledge, no work has yet been dedicated to the accurate quantification of lignin distribution within stem cross-sections. Thus, the aim of this work was to develop an accurate method to quantify spatial lignin distribution in whole stem cross-sections. In most cases, when performing image analysis on stained sections, colour information is used to help to segment (i.e. to identify) the different structures in the image. The approach proposed in this study consists of the use of colour as a quantitative measure that will be related to lignification. The subsequent colour variations will thus make it possible to quantify lignin distribution in tissues.

The quantitative comparison of several stained cross-sections can be made through global parameters such as the stem diameter or the rind width. The comparison of spatial distributions is more complicated since the cross sections present various shape and sizes. It is therefore necessary to consider a reference space that is common to all images. In the case of plant organs, variations of cellular morphology can be assessed as a function of the relative distance to the epidermis.[43–45]

The strategy of the proposed work is broken down into three steps. First, as presented in Méchin et al. (2005),[20] the proportion of lignified surface is measured on the whole stem to assess

the global lignification. Secondly, variations of lignin distribution within the entire cross-section are described through profiles ranging from the epidermis to the centre. Given the variability for stem diameter and shape, we used normalised profiles to study spatial lignin distribution during stem development. Finally, in order to compare profiles measured on different cross-sections, summary parameters were computed to describe the lignification in specific stem regions.

The work presented in this paper was performed on stem cross-sections of maize harvested at six developmental stages in order to cover a large range of variation for lignin distribution.

Materials and Methods

Plant material

The maize inbred line F324 was grown at the INRA Lusignan Centre (France) over three successive summers from 2009 to 2011. Plots consisted of one 5.2-m-long row with a density of 90,000 plants per hectare. Irrigation was applied from mid-June to the end of August to prevent water stress.

During the summer 2011, principal ear internodes were sampled at six developmental stages beginning when the plants had reached the V8 (eight expanded leaves) stage. The next five stages were V10 (ten expanded leaves), tasselling, silking, 14 days after silking, and silage. Five internodes per developmental stage were immediately placed in 70% ethanol:water (v/v) for subsequent histological analysis. During the summers 2009 and 2010, 50 internodes were sampled at the V8 and V10 stages, and 15 internodes were sampled at the four other stages for biochemical analysis. The internodes were oven-dried (70°C) and ground with a hammer mill to pass through a 1-mm screen.

Biochemical analyses

Cell wall residue was obtained after a two-stage extraction of the dry matter by ethanol and water.[46] Lignin content was estimated according to the Klason procedure[47]and expressed as the weight

percentage of Klason lignin in cell wall residue.

Image acquisition

A 1-cm-long segment was sampled in the middle part of each internode and soaked in water for one night. For each segment, 15 serial stem cross-sections, 150-µm thick, were prepared with a vibratome (Leica VT1000 S).

Sections were stained overnight using a Fasga solution diluted in distilled water (1:8, v/v). The Fasga solution was composed of 0.05% safranin O, 0.2% Alcian blue, 1.5% acetic acid and 46% glycerine in distilled water. Safranin is a red, basic, cationic dye, and Alcian blue is an acidic anionic dye. After staining, sections were rinsed twice for 5 min with distilled water. Sections were examined under a magnifying glass (×1, Nikon SMZ 1000) and were digitised as colour images with a resolution of 10µm per pixel. Because lignin is acidic (due to its phenolic hydroxyl groups), specific to lignin alone. Fasga thus stained lignified tissues in red, whereas non-lignified or poorly lignified tissues appeared as blue. Images acquired for the six development stages are presented in Fig. 1.

[Figure 1]

Colour normalisation

Since variations of the background light intensity were observed, a normalisation procedure was applied to remove heterogeneity within and between images. The region of interest corresponding to the stem was segmented by applying Otsu's threshold on the green channel (Fig. 2B), and the background image was extracted (Fig. 2C). For each channel of the background image, a polynomial model depending on pixel coordinates was fitted from background values, resulting in an estimated background model for each image (Fig. 2D). Normalised images were computed as the ratio of image over the corresponding background estimate (Fig. 2E).

[Figure 2]

Proportion of lignified area

The lignification of the whole stem was assessed from normalised colour images through the area fraction of lignified tissues. Since the Fasga staining did not colour the interior of the cells, the coloration presented large variability, even in homogeneously stained tissues. A morphological opening was applied on each channel of the normalised colour image.[48] All of the pixels of a given cell were associated with the colour of its neighbourhood, resulting in an image with homogeneous coloured regions (Fig. 3B).

The red, green and blue channels of each image were separated (Figs. 3C, D and E). The ratios of normalised red values over normalised blue values were used to assess the lignification corresponding to each pixel in the image (Fig. 3F). The green channel was used to determine the region in the image corresponding to the parenchyma (Fig. 3G). By applying a threshold to the ratio of red and blue intensities and combining it with that of the parenchyma region, it was possible to identify the lignified regions within the parenchyma (Fig. 3H). The stem section was therefore classified into two regions: lignified and non-lignified. The ratio of lignified area over total parenchyma area was used as the index of global lignification.

[Figure 3]

Profile computation

Variations of lignification within the stem section were investigated in relation to the distance to the epidermis. A distance map was computed for each pixel within the stem section (Fig. 4), measuring an approximation of the Euclidean distance to the nearest background pixel. This distance map was divided into several concentric regions, corresponding to different classes of distances. A normalised distance was chosen: each stem section was divided into the same number of regions where each region in a given image had the same breadth. Figure 4 shows an example of a division into ten regions. A total of 80 regions were chosen for all sections. Since the sizes of the sections vary, the breadths of the regions do not refer to the same physical breadth.

[Figure 4]

The red and blue intensity profiles relative to the distance to the outer epidermis (Fig. 5A) were obtained by image analysis of the Fasga-stained cross-section. These profiles corresponded to the distribution of lignin (red intensity) and cellulose (blue intensity) within these sections. Since it was difficult to automatically recognise the location of vascular bundles and of sclerenchyma, no distinction was made between the different types of tissues. The blue profile of the sample image was lower in the epidermis region than in the middle of the cross-section. The red profile started to increase at a relative distance to the outer epidermis that was greater than that of the blue profile. The differences between the two profiles corresponded to the blue ring visible on Fig. 4. Fluctuations observed in the red profile were interpreted as the presence of vascular bundles, which appeared to be lowly lignified on the original image.

The lignification profile was assessed by computing the ratio of the red intensity profile over that of the blue intensity profile (Fig. 5B). The outer epidermis was clearly characterised by a high red/blue intensity ratio measured in the range of 0-0.04. The blue ring that can be observed on the image corresponds to the minimum value for the ratio. The pith region is then determined by the range 0.25-0.95 of the relative distance to the epidermis.

[Figure 5]

Results and discussion

Proportion of lignified area

In a previous study, Méchin et al. (2005)[20] established the accuracy of the Fasga staining method to study lignification of maize stem sections. Red and blue areas could be quite easily discriminated by automatic image analysis of the section. Even though red safranin stain has been reported not to be strictly specific to lignins,[49,50] this staining appeared to be perfectly suitable for lignification studies.

[Figure 6]

In the present work, the first two young developmental stages were poorly lignified, as ex-

pected. Only several small regions were lignified, mainly in the epidermis or around vascular bundles (Fig. 1). The proportion of lignified area subsequently increased to 62% at stage 3 (Fig. 6), and gradually increased to 81% between stages 3 and 6. The lignified tissues were constituted quite exclusively of parenchyma, and vascular bundles were not detected as lignified. This global increase of lignified area was in agreement with visual observations of Fasga-stained stem sections, and was found to adequately describe stem lignification during development.

The proportion of lignified area was found to be significantly correlated with the Klason lignin content (data not shown, $r = 0.88$, $P < 0.01$). The similarity of these two biochemical and histological estimates of lignin levels could be expected and are in accordance with previous studies. Indeed, a correlation between the red lignified area measured on Fasga-stained sections and the lignin content have also been previously reported at the silage stage.[20] The similarity between the lignin estimation by the Klason procedure or the phloroglucinol staining method was also highlighted in rice mutant.[51] Noticeable differences could be observed in the quantification of lignification by histological and biochemical methods: biochemical analysis revealed a non-negligible lignin concentration in the first two developmental stages, whereas no red coloration was observed on these first two developmental stages. A possible explanation could be that the histological and biochemical data in current studies were derived from maize plants harvested in different years. It could also be that the proportion of lignified surface measured by the image analysis only takes account of the tissues that present a red/blue ratio greater than a given threshold. Consequently, some tissues may be weakly lignified but may not be detected by the image analysis. Moreover, tissues detected as lignified may present quantitative differences in lignin content.[19] On the basis of these results, it can be concluded that the proportion of lignified surface can only be roughly related to the global lignification of stem sections. However, more precise and thorough quantification of lignification is necessary. The required improvements should assess more quantitative measurements of local lignification, and/or give access to the spatial distribution of lignified tissues. In the following, these two aspects are investigated through profiles of lignification depending on the distance to the epidermis.

Profile of lignification

The average profiles of the red/blue intensity ratio for each developmental stage are presented in Fig. 7. The evolution of this ratio reflects the variations of lignification within stem sections from the epidermal region to the central part of the stem section.

[Figure 7]

The first two stages of development revealed homogeneous profiles with a relatively low value of the red/blue intensity ratio, corresponding to low global lignin content. In contrast, lignification profiles for the last four developmental stages presented higher values and large variations within the cross-section.

Stage 2 presented a small increase of lignification (intensity ratio: ~0.6) within the whole section compared to stage 1 (intensity ratio ~0.5), indicating that lignin deposition probably occurred between stage 1 and stage 2. This result was in agreement with the results obtained from biochemical analyses. This difference in global lignification could not be detected by previous analysis of the proportion of lignified area. Hence, the computation of the lignification profile through the red/blue intensity ratio provided more precise information than a simple threshold for the whole image.

For the last four development stages, global lignification was greater. The variation of lignification through the distance to the epidermis followed a quite similar pattern for the last four stages. Maximum values and differences between the stages were found in the epidermal region (relative distance range: 0-0.04). These epidermal values of the red/blue intensity ratio increased during the internode development from 1.1 at stage 3 to 1.4 at stage 6, and made it possible to discriminate stages 3 and 4 from stages 5 and 6. Old stages presented an intense lignification in the epidermal region whereas mid stages presented intermediate lignification in the epidermal region that was comparable with lignification in the pith region. The lowest values of the red/blue intensity ratio were observed in the region that corresponded to the “blue ring” observed in Fasga-stained section images (Fig. 1). No significant variation was observed for the red/ blue intensity ratio in either the “blue ring” or the pith region over stages 3 to 6. It could be hypothesized that the “blue ring” dis-

appeared over time while lignification occurred. However, this lignin-free region remained present while the intensification of lignification occurred in the epidermal region alone. In the same way, it was found that the parenchyma tissues were more degradable in this region than in the pith.[52] These results confirmed the very low lignification of the pith.

A great increase in the red/blue intensity ratio in the epidermis and pith regions between stages 2 and 3 could be related to the lignification process of these regions. In the epidermis region, relatively high values of the red/blue intensity ratio indicated that cells from this region were much more lignified than those of other regions. Lignin content in this region increased until the last stage of development. The pith region presented lower lignification than the epidermis. Moreover, no significant variation of the lignification was observed in the pith region for the last four stages.

This finding clearly suggested that during internode development, lignin distribution and lignification were heterogeneous in the different regions of the stem sections. This level of information cannot be achieved by the Klason content estimation. The image analysis method developed in this work could therefore be of great benefit to gain access to this information.

Lignification of pivotal stem regions

The comparison of profiles can be simplified if they can be reduced to just a few numbers of summary parameters. Following the results presented above four summary parameters are proposed in this study:

- Lignification of the epidermis region, computed as the average value of the red/blue intensity ratio measured in the range of 0–0.04.

- Lignification of the pith region, computed as the average value of the red/blue intensity ratio measured in the range of 0.25–0.95

For the developmental stages 3 to 6, a blue ring corresponding to low-lignified tissues adjacent to the epidermis could be distinguished. The position of the blue ring was assessed from individual

profiles by computing the set of contiguous regions close to the epidermis for which the lignification rate was lower than 0.8. The shape of the blue ring was defined by the following parameters:

- Lignification of the blue ring region, computed as the average value of the red/blue intensity ratio within the blue ring.
- Relative width of the blue ring.

Figure 8 shows the evolution of the lignification for the three stem regions during internode development.

[Figure 8]

The lignification of the epidermis region progressively increased all along the developmental stages, starting from 0.47 ± 0.13, reaching a plateau around 1 at stages 3 and 4, and further increasing at the later stages with a maximum value of 1.29 ± 0.16 at stage 5.

The lignification of the pith showed a similar pattern for early development stages. Values increased from 0.44 ± 0.25 at stage 1 to 0.92 ± 0.03 at stage 3. For later developmental stages, lignification reached a plateau with a value of 0.94 ± 0.04 at stage 6.

Lignin deposition rates in the epidermis and pith regions were identical up to stage 3 and then became differential. In grass, cell wall development shifts to a rapid deposition of lignified secondary wall development after the end of internode elongation.[52] In this study, internode elongation was complete at stage three (data not shown). After cessation of internode elongation, the epidermis region developed an extensively lignified secondary wall, which is revealed by the gradual increase of lignification until the last stage. This lignification of a secondary wall does not seem to occur in the pith region, where no significant increase of lignin content was measured beyond stage 3.

The lignification of the "blue ring" region was low (0.66 ± 0.08). No evolution of this parameter was found during internode development after stage 3. The relative width of the "blue ring" was 0.14 ± 0.01 at stage 3, which corresponded to 14% of the section radius (data not shown). During internode development, no significant variation was observed for this parameter.

At the last stages of development (S5 and S6), the three regions clearly presented strong differences in lignification. Differences of lignification between the epidermis and the pith regions have been previously reported from chemical analyses of dissected tissues.[19] Further investigations showed that these differences were associated with variations of degradability since the tissues from the epidermis region are less degradable.[33,39] The parameters computed in this work are essential to better understand the regulation of plant degradation.

Discussion

This work presented a method to quantify the lignification of maize tissues by using colour image analysis of Fasga-stained maize stem cross-sections. Global lignification was assessed through the characterisation of the proportion of the red area of each cross-section. Lignification profiles within the stem were assessed by computing red/blue intensity ratio variations in relation to the distance to the epidermis. Variation profiles were analysed by computing summary parameters describing the lignification of three specific stem regions: the epidermis, the blue ring and the pith.

Lignification of maize internodes during development was thus explored in the major defined stem section regions. This level of observation is impossible to obtain with biochemical lignin content estimation except when using very tedious and complex microdissection approaches. The method developed in this paper makes it possible to easily and rapidly describe the lignification process during internode development. At young stages, lignification first occurs in the pith. After the silking stage, lignification becomes much more intense in the epidermal region.

The parameters summarised from the red/blue intensity ratio profiles made it much easier to quantify the differences in lignification rate among stem regions. Results are in agreement with the biochemical analysis of dissected tissues in the literature. A great advantage of the proposed method is the possibility to quickly assess the distribution of lignin depending on the position in the section, without having to physically dissect the tissues.

The proposed method is generic and could be applied to other plant species. This methodology could also be extended to analyse images obtained from alternative staining methods such as Maule

or phloroglucinol. Several layers of non-lignified parenchyma cells were visible around vascular bundles in the pith on several images. It would therefore be of interest to quantify the profile of the lignification rate depending on the distance to the nearest vascular bundles. The difficulty would be the automatic identification of the bundles and of their boundary.

Further studies will focus on analysing various maize lines to exhibit genotypic variations and the relationship between these histological parameters and cell wall degradability. The comparison of parameters obtained from Fasga quantification will also be compared to parameters obtained at the microscopic scale, in order to link lignification to cell morphology. For example, it would be of interest to link the lignin content of cell walls to cell size or cell wall thickness.

The proposed method was a prerequisite for further studies devoted to the enhancement of cell wall degradability through cell wall improvement and to the elucidation of the genetic basis of lignin deposition and distribution all along the stem sections. The high throughput screening method presented here will make it possible to characterise a wide range of samples. The natural genetic variation for lignin distribution within the stem in relation to cell wall degradability will be the focus of future studies. We will also develop studies devoted to the genetic determinism of lignification both in the pith and in the epidermal regions. Work devoted to studying the genetic determinism of lignification, both in the pith and in the epidermal regions, will be undertaken and the use of recombinant inbred line populations will undoubtedly shed light onto the QTLs steering these parameters.

Acknowledgments

The authors sincerely acknowledge F. Legée and L. Cézard for their participation in lignin analysis, H. Morin for her assistance in histological analysis, and C. Minault, P. Vernoux and D. Dénoue for their precious contribution to field experiments. The histological analyses were performed at the Plateforme de Cytologie et Imagerie Végétale (IJPB, Versailles). This work was funded by the French National Research Agency (ANR) in the context of the MAGIC programme (ANR-08-

340 BLAN-0307-01). Y. Zhang was supported by a grant from INRA CEPIA and INRA BV.

References

(1) Jung, H.; Samac, D.; Sarath, G. Modifying crops to increase cell wall digestibility. *Plant Sci.* **2012**, *185*, 65–77.

(2) Buxton, D.; Russell, J. Lignin Constituents and Cell-Wall Digestibility of Grass and Legume Stems. *Crop Sci.* **1988**, *28*, 553–558.

(3) Vogel, K.; Jung, H. Genetic modification of herbaceous plants for feed and fuel. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2001**, *20*, 15–49.

(4) Argillier, O.; Barrière, Y.; Lila, M.; Jeanneteau, F.; Gelinet, K.; Menanteau, V. Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. *Agronomie* **1996**, *16*, 123–130.

(5) Casler, M.; Jung, H. Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *125*, 151–161.

(6) Jung, H.; Ni, W.; Chapple, C.; Meyer, K. Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an Arabidopsis mutant. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 922–928.

(7) Grabber, J.; Mertens, D.; Kim, H.; Funk, C.; Lu, F.; Ralph, J. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 122–129.

(8) Bernard-Vailhé, M.; Cornu, A.; Robert, D.; Maillot, M.; Besle, J. Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1164–1169.

(9) Baucher, M.; Bernard-Vailhé, M.; Chabbert, B.; Besle, J.; Opsomer, C.; Van Montagu, M.; Botterman, J. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa

(*Medicago sativa L.*) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 437–447.

(10) Méchin, V.; Argillier, O.; Menanteau, V.; Barrière, Y.; Mila, I.; Pollet, B.; Lapierre, C. Relationship of cell wall composition to in vitro cell wall digestibility of maize inbred line stems. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 574–580.

(11) Jung, H.; Buxton, D. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in-vitro degradability for stem internodes. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66*, 313–322.

(12) Wilson, J.; Mertens, D. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.* **1995**, *35*, 251–259.

(13) Chabannes, M.; Ruel, K.; Yoshinaga, A.; Chabbert, B.; Jauneau, A.; Joseleau, J.; Boudet, A. *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J.* **2001**, *28*, 271–282.

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

(15) Vermerris, W.; Sherman, D.; McIntyre, L. Phenotypic plasticity in cell walls of maize brown midrib mutants is limited by lignin composition. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 2479–2490.

(16) Wilson, J.; Hatfield, R. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Aust. J. Agric. Res.* **1997**, *48*, 165–180.

(17) Boon, E.; Struik, P.; Engels, F.; Cone, J. Stem characteristics of two forage maize (*Zea mays L.*) cultivars varying in whole plant digestibility. IV. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *NJAS-Wagen J. Life Sc.* **2012**, *59*, 13–23.

(18) Engels, F.; Schuurmans, J. Relationship between structural development of cell walls and degradation of tissues in maize stems. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59*, 45–51.

(19) Wilson, J.; Mertens, D.; Hatfield, R. Isolates of cell types from sorghum stems: digestion, cell wall and anatomical characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 407–417.

(20) Méchin, V.; Argillier, O.; Rocher, F.; Hebert, Y.; Mila, I.; Pollet, B.; Barrière, Y.; Lapierre, C. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5872–5881.

(21) Jung, H.; Casler, M. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Sci.* **2006**, *46*, 1801–1809.

(22) Sarath, G.; Dien, B.; Saathoff, A.; Vogel, K.; Mitchell, R.; Chen, H. Ethanol yields and cell wall properties in divergently bred switchgrass genotypes. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 9579–9585.

(23) Roth, R.; Boudet, A.; PontLezica, R. Lignification and cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in developing stems of tomato and poplar: A spatial and kinetic study through tissue printing. *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 247–254.

(24) Zhong, R.; Ripperger, A.; Ye, Z. Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two Arabidopsis mutants. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 59–69.

(25) Guo, Y.; Halfter, U.; Ishitani, M.; Zhu, J. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **2001**, *13*, 1383–1399.

(26) Piquemal, J.; Chamayou, S.; Nadaud, I.; Beckert, M.; Barrière, Y.; Mila, I.; Lapierre, C.; Rigau, J.; Puigdomenech, P.; Jauneau, A.; Digonnet, C.; Boudet, A.; Goffner, D.; Pichon, M. Down-regulation of caffeic acid O-methyltransf erase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1675–1685.

(27) Sibout, R.; Eudes, A.; Mouille, G.; Pollet, B.; Lapierre, C.; Jouanin, L.; Seguin, A. Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2059–2076.

(28) Ding, L.; Hofius, D.; Hajirezaei, M.-R.; Fernie, A.; Boernke, F.; Sonnewald, U. Functional analysis of the essential bifunctional tobacco enzyme 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase in transgenic tobacco plants. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 2053–2067.

(29) Bomal, C.; Bedon, F.; Caron, S.; Mansfield, S.; Levasseur, C.; Cooke, J.; Blais, S.; Tremblay, L.; Morency, M.-J.; Pavy, N.; Grima-Pettenati, J.; Seguin, A.; MacKay, J. Involvement of Pinus taeda MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3925–3939.

(30) Tamasloukht, B. et al. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase 1 (CCR1) mutant in maize: effects on lignification, fibre development, and global gene expression. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 3837–3848.

(31) Zhang, K.; Bhuiya, M.-W.; Pazo, J.; Miao, Y.; Kim, H.; Ralph, J.; Liu, C.-J. An engineered monolignol 4-o-methyltransferase depresses lignin biosynthesis and confers novel metabolic capability in Arabidopsis. *Plant Cell* **2012**, *24*, 3135–3152.

(32) Chesson, A.; Provan, G.; Russell, W.; Scobbie, L.; Chabbert, B.; Monties, B. Characterisation of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *73*, 10–16.

(33) Barros-Rios, J.; Santiago, R.; Malvar, R.; HG, J. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2012**, *172*, 223–236.

(34) Matsunaga, S.; Yamashita, T.; Tsukamoto, S.; Fusetani, N. Three new antibacterial alkaloids from a marine sponge Stelletta species. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1202–1204.

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

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

(37) Nakashima, J.; Chen, F.; Jackson, L.; Shadle, G.; Dixon, R. Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (Medicago sativa): effects on lignin composition in specific cell types. *New Phytol.* **2008**, *179*, 1675–1685.

(38) Ruel, K.; Berrio-Sierra, J.; Derikvand, M.; Pollet, B.; Thevenin, J.; Lapierre, C.; Jouanin, L.; Joseleau, J.-P. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **2009**, *184*, 99–113.

(39) Hatfield, R.; Wilson, J.; Mertens, D. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 891–899.

(40) Browning, B. *Methods of Wood Chemistry. Vols. I and II*; John Wiley and Sons. New York., 1967.

(41) Brauns, F. *The Chemistry of Lignin*; Academic Press. New York., 1952.

(42) Tolivia, D.; Tolivia, J. Fasga: A new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues. *J. Microsc.* **1987**, *148*, 113–117.

(43) Ho, Q.; Verboven, P.; Verlinden, B.; Schenk, A.; Delele, M.; Rolletschek, H.; Vercammen, J.; Nicolaï, B. Genotype effects on internal gas gradients in apple fruit. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 2745–2755.

(44) Legland, D.; Guillon, F.; Kiêu, K.; Bouchet, B.; Devaux, M.-F. Stereological estimation of cell wall density of DR12 tomato mutant using three-dimensional confocal imaging. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 265–276.

(45) Legland, D.; Devaux, M.; Bouchet, B.; Guillon, F.; Lahaye, M. Cartography of cell morphology in tomato pericarp at the fruit scale. *J. Microsc.* **2012**, *247*, 78–93.

(46) Effland, M. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi* **1977**, *60*, 143–144.

(47) Dence, C.; Lin, S. *Methods in Lignin Chemistry*; Springer: Berlin, 1992; Chapter The Determination of Lignin, pp 33–61.

(48) Soille, P. *Morphological Image Analysis*; Springer-Verlag Berlin, 2003.

(49) Johansen, D. *Plant Micro Technique*; McGraw-Hill: New York., 1940.

(50) Wilcox, W. *Preparation of decayed wood for microscopic examination*; U.S. Forestry Service Research Note FPL-056, 1964.

(51) Li, Y.; Qian, O.; Zhou, Y.; Yan, M.; Sun, L.; Zhang, M.; Fu, Z.; Wang, Y.; Han, B.; Pang, X.; Chen, M.; Li, J. Brittle Culm1, which encodes a COBRA-like protein, affects the mechanical properties of rice plants. *Plant Cell* **2003**, *15*, 2020–2031.

(52) Jung, H.; Casler, M. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop Sci.* **2006**, *46*, 1793–1800.

Figure

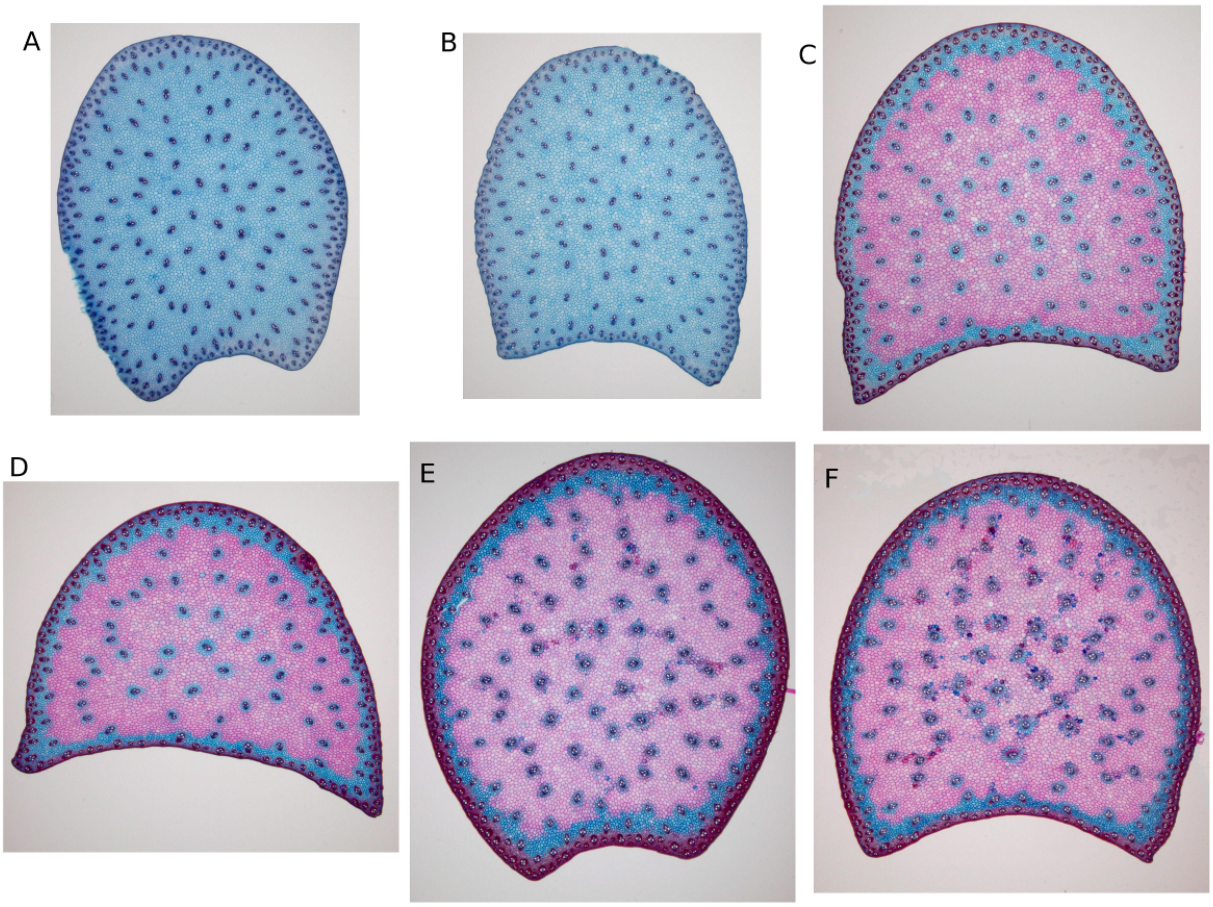


Figure 1: Image acquired (x1) after Fasga staining of 150-µm slices for each development stage. A: eight expanded leaves; B: ten expanded leaves; C: tasseling; D: silking; E: 14 days after silking; and F: silage stage.

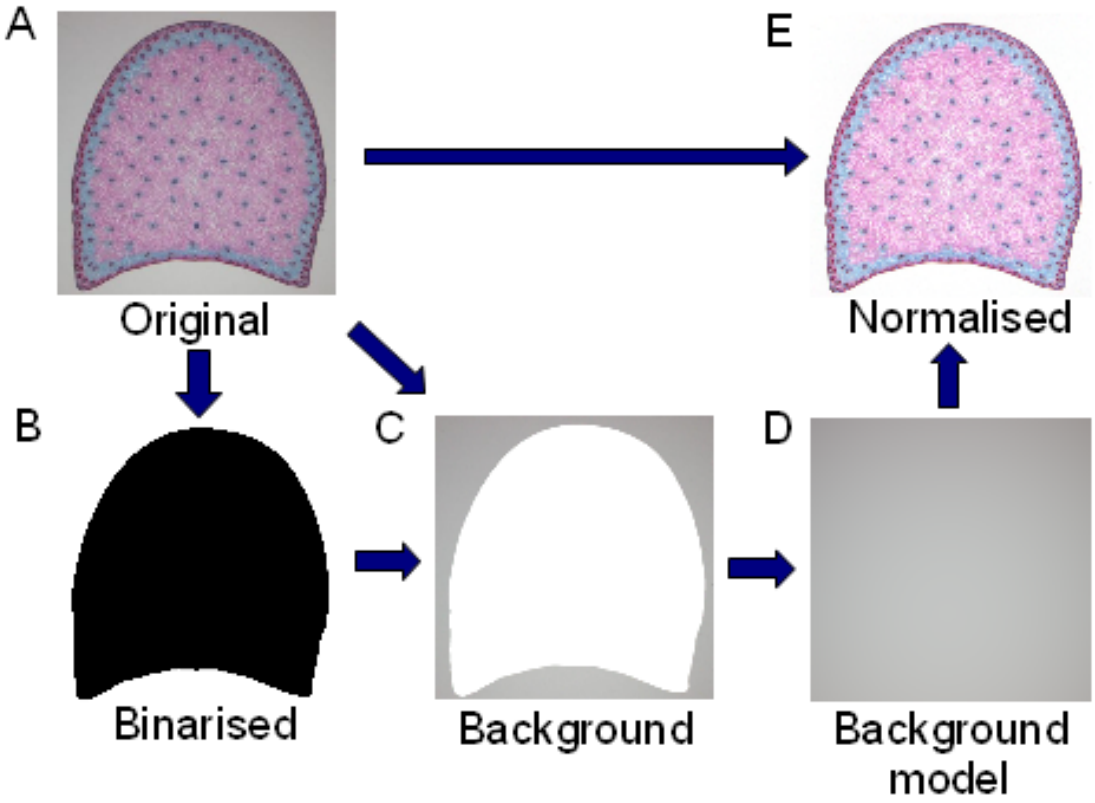


Figure 2: Normalisation of colour images using background model. A: Original image; B: Region of interest; C: Background image; D: Estimated background model; and E: Normalised images.

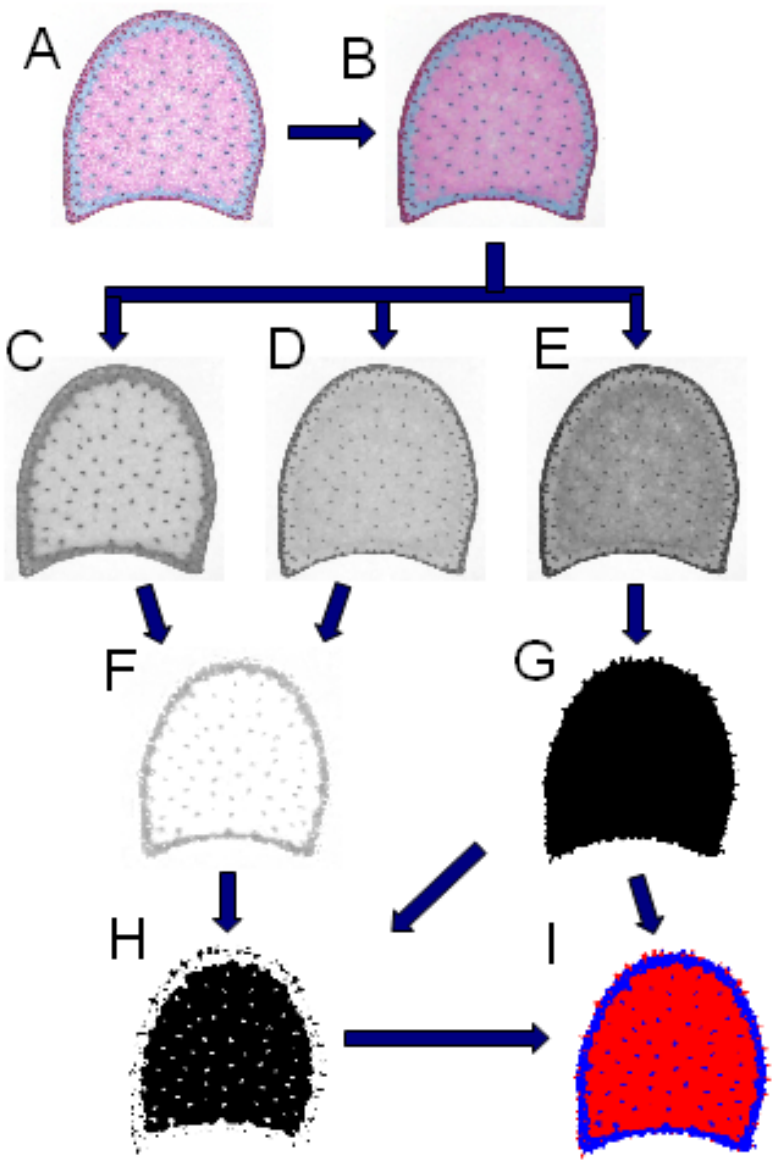


Figure 3: Computation of the proportion of lignified surface on a sample normalised image. (A) Original image; (B) Morphological filtering; (C), (D), (E): red, blue and green channels of filtered image, respectively; (F) Local red/blue ratio; (G) Segmentation of parenchyma; (H) Segmentation of lignified tissues; (I) Classification of stem section into lignified and non-lignified regions.

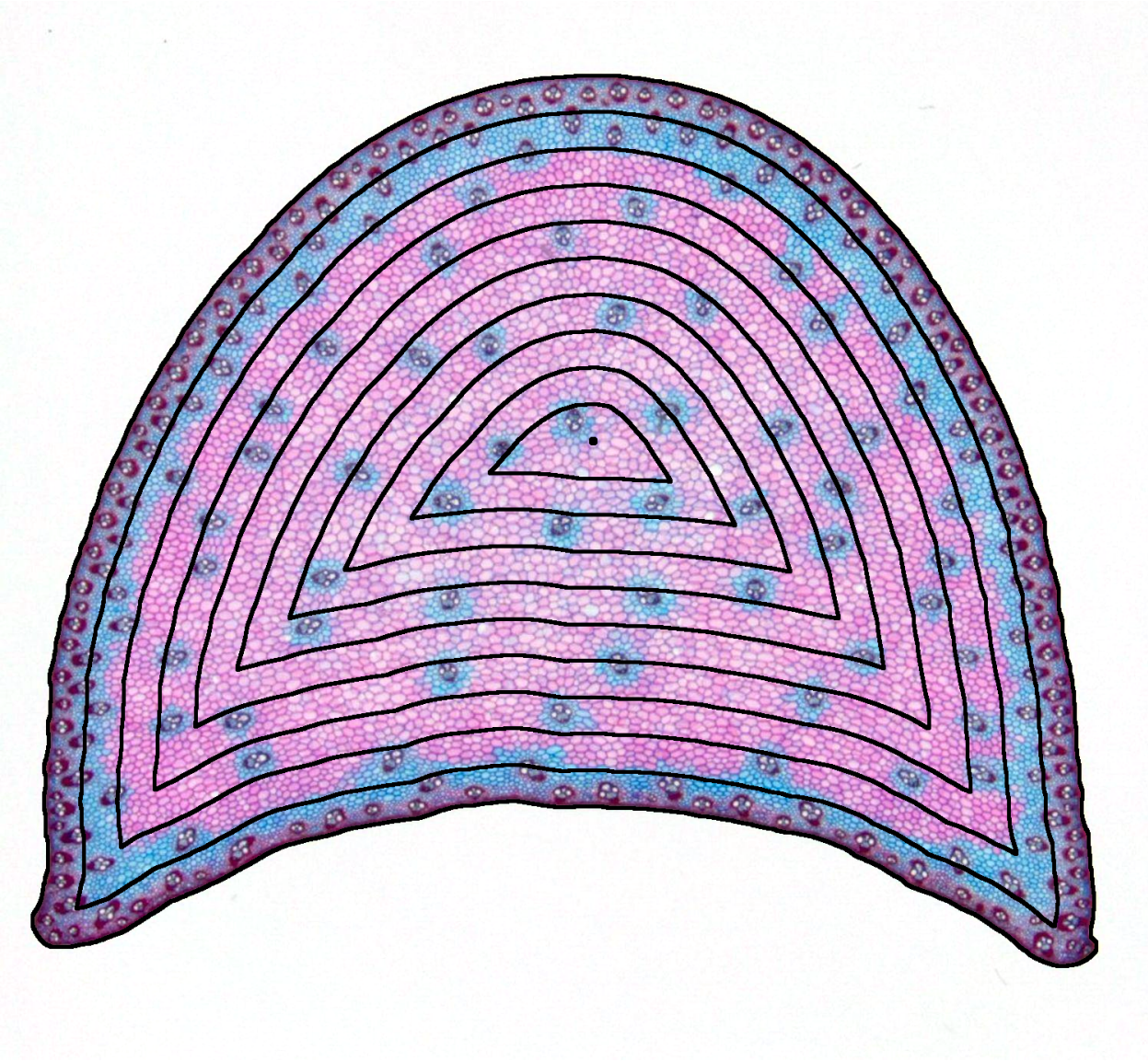


Figure 4: Partition of a stem section into a fixed number of regions. Ten regions are represented in this example.

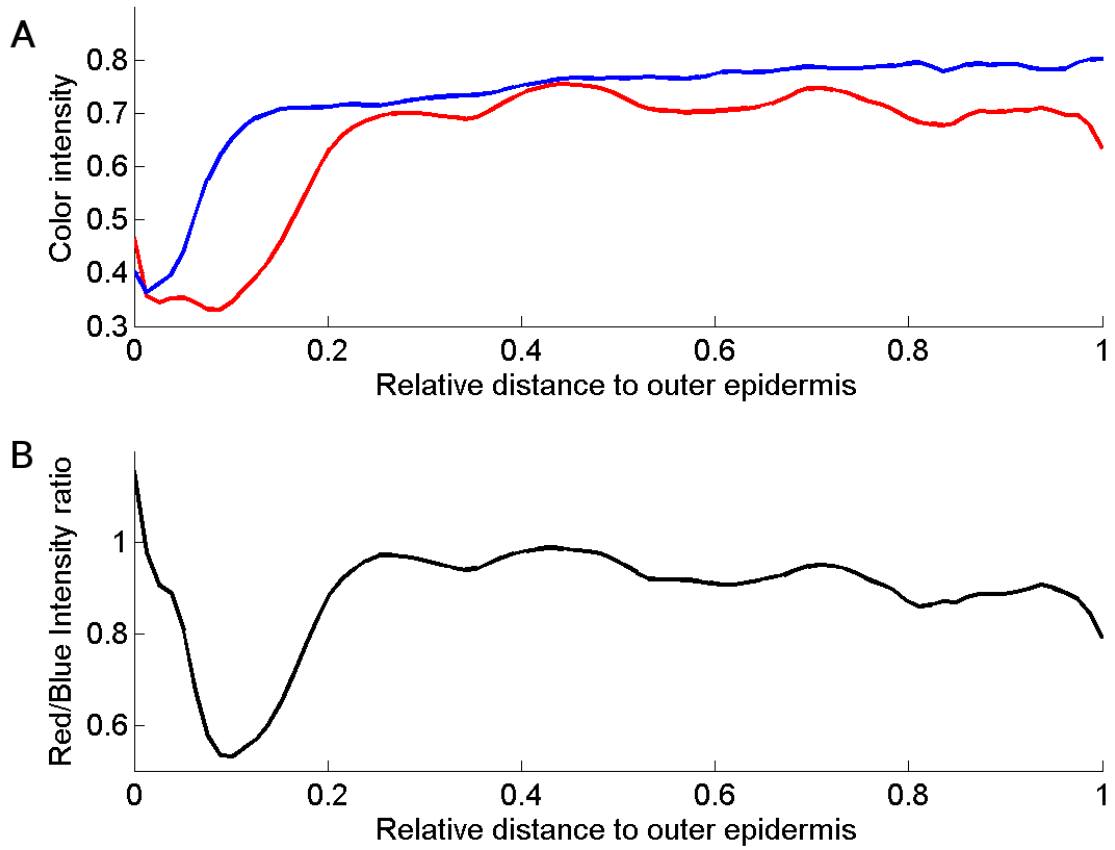


Figure 5: Intensity profiles measured according to the relative distance to the outer epidermis. (a) Profiles of the blue and red intensity; (b) Profile of the red/blue intensity ratio. The epidermis and pith regions are indicated.

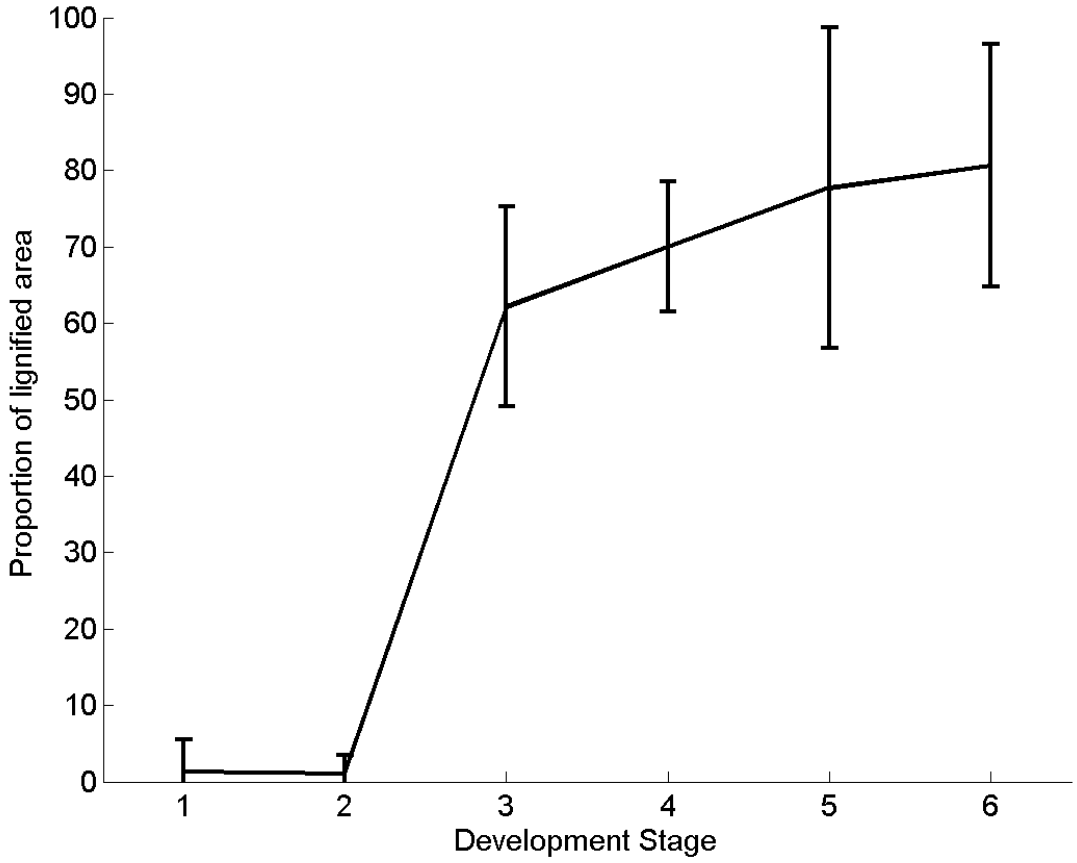


Figure 6: Evolution of the proportion of lignified area in Fasga-stained sections during internode development. S1: V8; S2: V10; S3: tasseling; S4: silking; S5: 14 days after silking; and S6: silage stage.

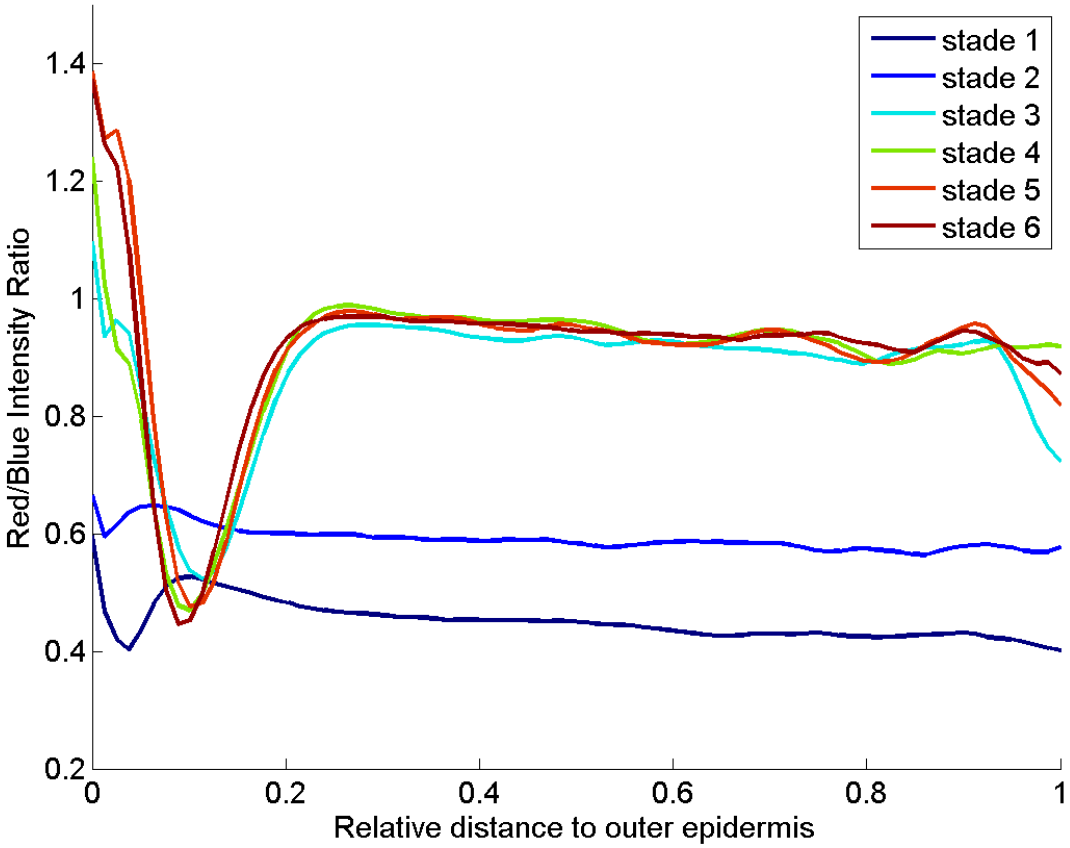


Figure 7: Average profiles of the red/blue intensity ratio relative to the distance to the outer epidermis for six stages of development. S1: V8; S2: V10; S3: tasseling; S4: silking; S5: 14 days after silking; and S6: silage stage.

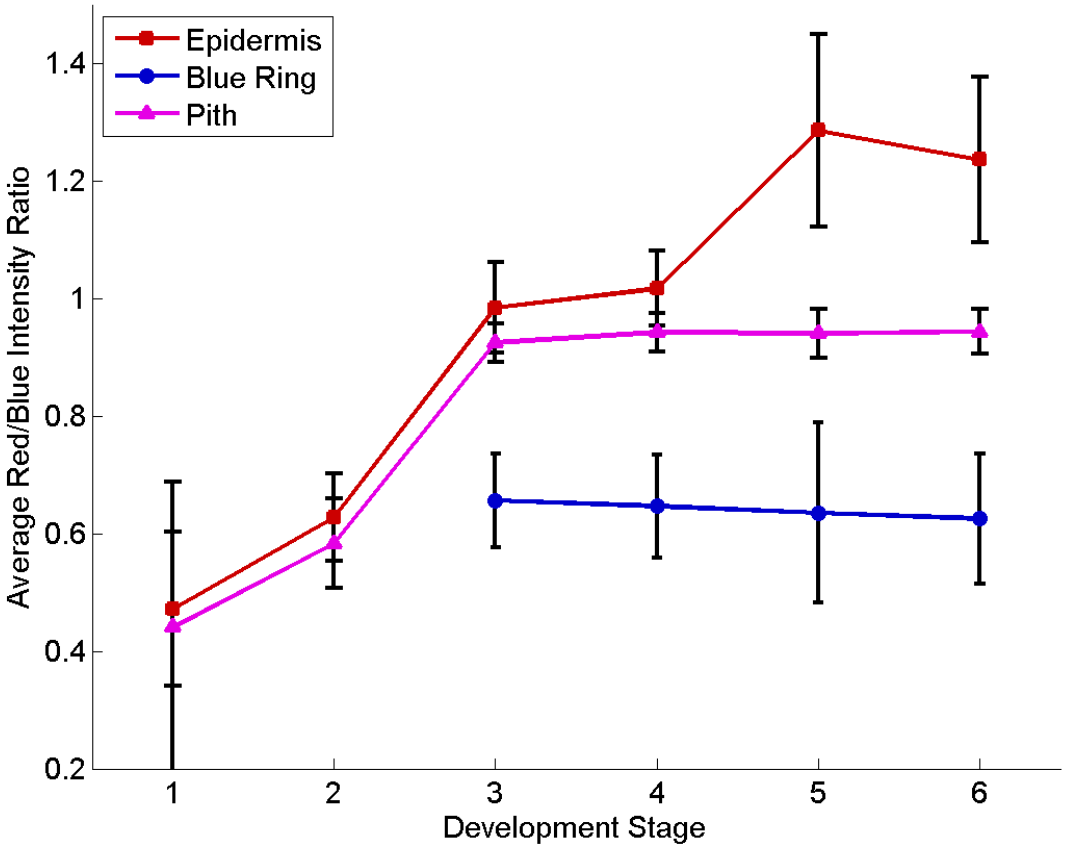


Figure 8: Evolution of the lignification for each region (pith, epidermis, blue ring) of the stem sections during internode development.

2.2. Analyse anatomique par granulométrique en niveau de gris

La figure IV-1 présente une image mosaïque d'entrenœud de maïs acquise en lumière visible sur des coupes d'épaisseur 150 µm. Deux structures principales ressortent sur cette image : les faisceaux conducteurs qui apparaissant comme des taches blanches de grande taille et les cellules de parenchymes situées entre les faisceaux. La granulométrie par fermeture en niveaux de gris a été appliquée pour déterminer la taille des cellules de parenchymes.

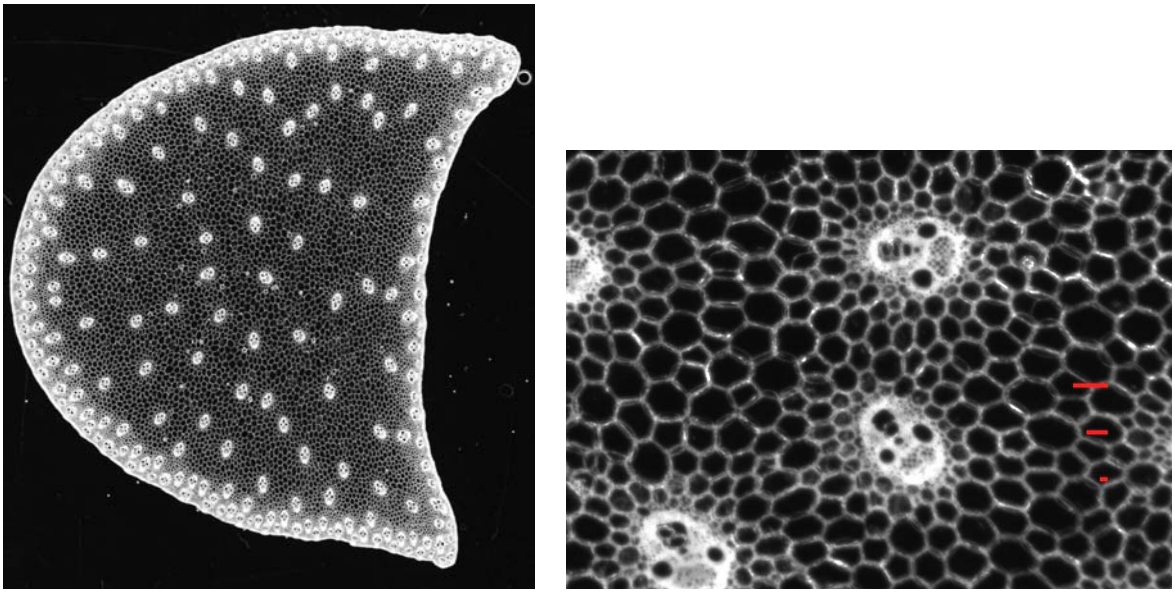


Figure IV-1. Image mosaïque d'une coupe longitudinale d'entrenœud du génotype F324 au stade 4 en lumière visible. (Résolution : 3664 × 3888 pixel, soit 1 pixel = 3.63 µm). Zoom sur une région de 2,3 x 1,7 mm avec des lignes de longueur 25, 75 et 125 µm.

La courbe granulométrique est tracée en fonction de la taille des cellules mesurée exprimée en µm (Figure IV-2). Les variations de niveaux de gris ont été observées principalement pour des tailles variant entre 25 et 125 µm avec un maximum à 75 µm, qui correspond à la taille majeur des cellules observée dans cette coupe. La taille majeure des cellules observées dans l'entrenœud a été calculée pour chaque génotype et pour chaque stade de développement. Au cours du développement de la plante, de façon surprenante, aucune variation de la taille des cellules n'a été observée. Cette absence d'effet du développement a été confirmée par analyse de variance alors qu'un effet génotype fort a été mis en évidence.

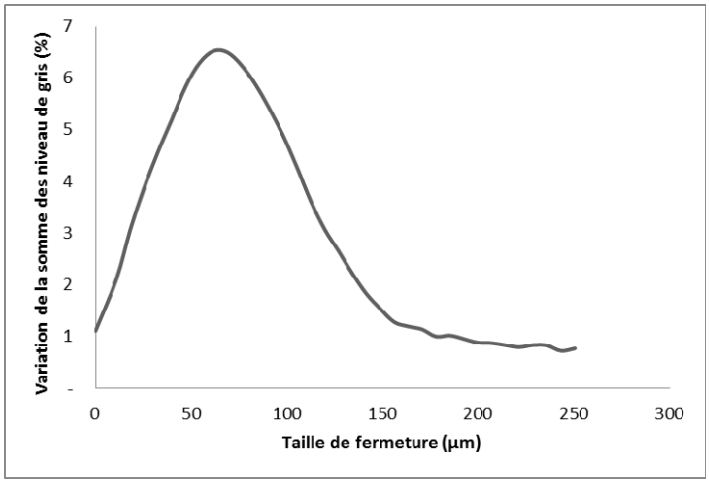


Figure IV-2. Distribution de la taille des cellules de maïs (Courbe granulométrique par fermeture à l'aide d'éléments structurants carrés).

Comme le montre la figure IV-3, F7037 présente les plus petites cellules (45,9 ± 5,4 µm) et F324 les plus grandes (73,2 ± 4,7 µm). Il est surprenant que la taille des cellules ne varie pas au cours du développement d'entrenœud comme nous aurions pu l'intuiter. L'impact de cette variation génétique de la taille des cellules sera rapidement discuté dans le paragraphe 4 de ce chapitre.

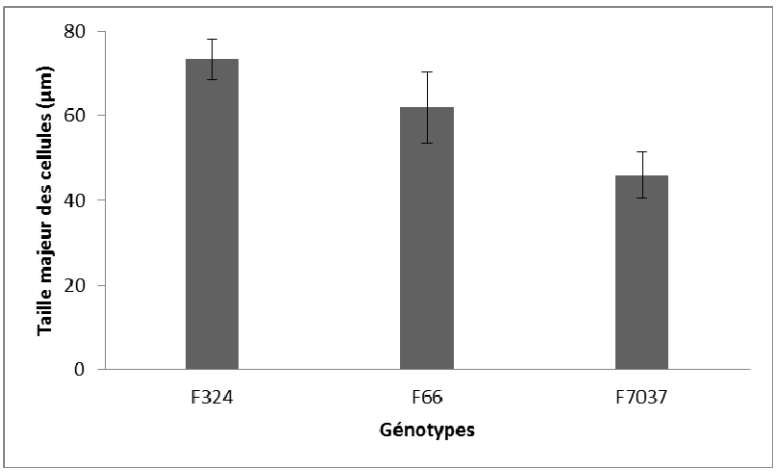


Figure IV-3. Valeur moyenne sur l'ensemble des stades de la taille majeure des cellules des trois génotypes.

2.3. Analyse cinétique de la distribution spatiale des lignines au sein des entrenœuds des trois génotypes de maïs F324, F66 et F7037

Dans l'article présenté dans la partie (Chapitre IV-2.1.), nous avons développé une méthode d'analyse d'images de coupe de tige de maïs colorées au Fasga afin de quantifier la distribution spatiale des lignines tout au long de la coupe. Cette distribution est quantifiée sous la forme d'un taux de lignification dans les régions spécifiques de la coupe, à savoir l'épiderme, la moelle et une zone bleue située entre les deux précédentes. Par cette méthode nous avons réussi à quantifier la variation zonale de la lignification, variation qui pourrait être reliée à des différences de structure anatomique des parois comme cela a été montré dans la littérature (Wilson, 1993; Wilson and Hatfield, 1997; Jung and Casler, 2006a). Nous avons appliqué cette méthode de quantification développée sur F324 aux deux autres génotypes étudiés dans la partie biochimie de ce travail afin de pouvoir évaluer la mise en place des tissus lignifiés chez les 3 lignées (F324, F66, F7037) au long du développement (Figure IV-4) .

Dans ce qui suit, nous allons présenter les résultats d'analyse d'image obtenus sur ces coupes.

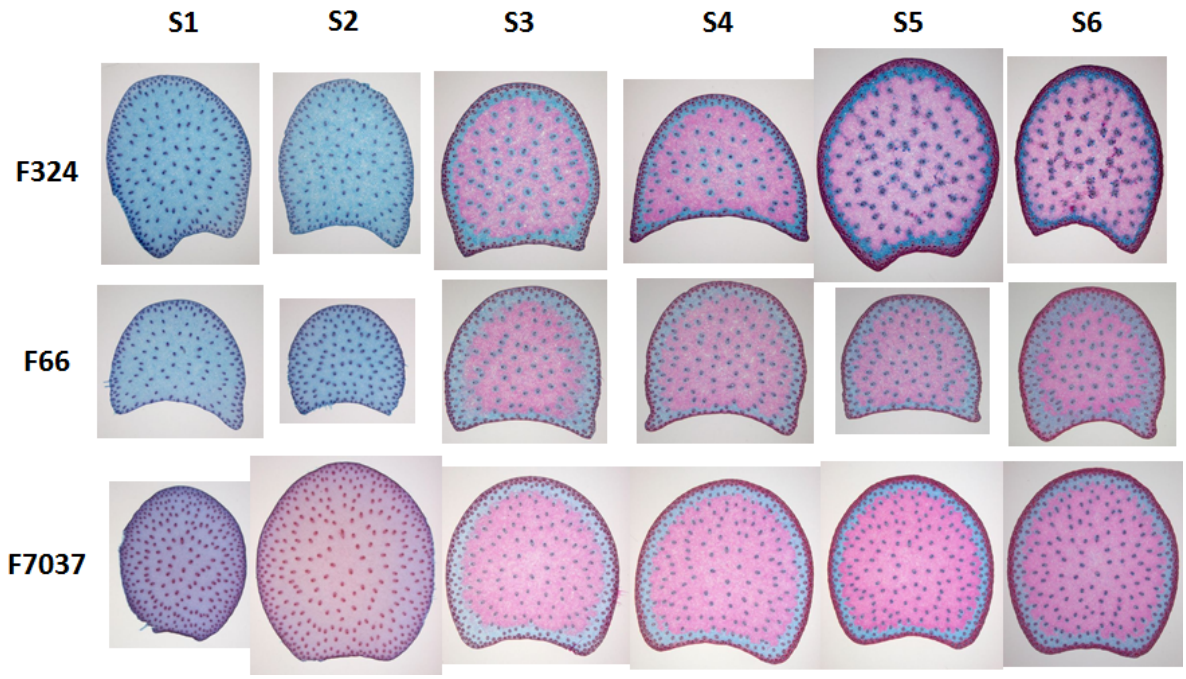


Figure IV-4. Images des coupes colorées au Fasga pour les entrenœuds des trois génotypes aux six stades de développements. S1 : 8 feuilles ligulées ; S2 : 10 feuilles ligulées ; S3 : panicule visible ; S4 : floraison femelle ; S5 : 14 jours après floraison femelle ; S6 : stade ensilage.

2.3.1. La surface lignifiée au sein des tiges

La Figure IV-5A montre l'évolution de la surface lignifiée au sein des coupes colorées au cours de développement pour les trois génotypes. Pour les deux premiers stades de développement, les coupes sont très peu lignifiées pour F324 et F66, et la lignification se présente principalement dans des faisceaux vasculaires (Figure IV-4). La proportion de la surface lignifiée augmente ensuite rapidement (entre S2 et S3 pour F324 ou entre S2 et S4 pour F66) puis s'en suit une évolution plus lente, variable suivant les génotypes. Pour F324, cette surface augmente jusqu'à la fin du développement contrairement à F66.

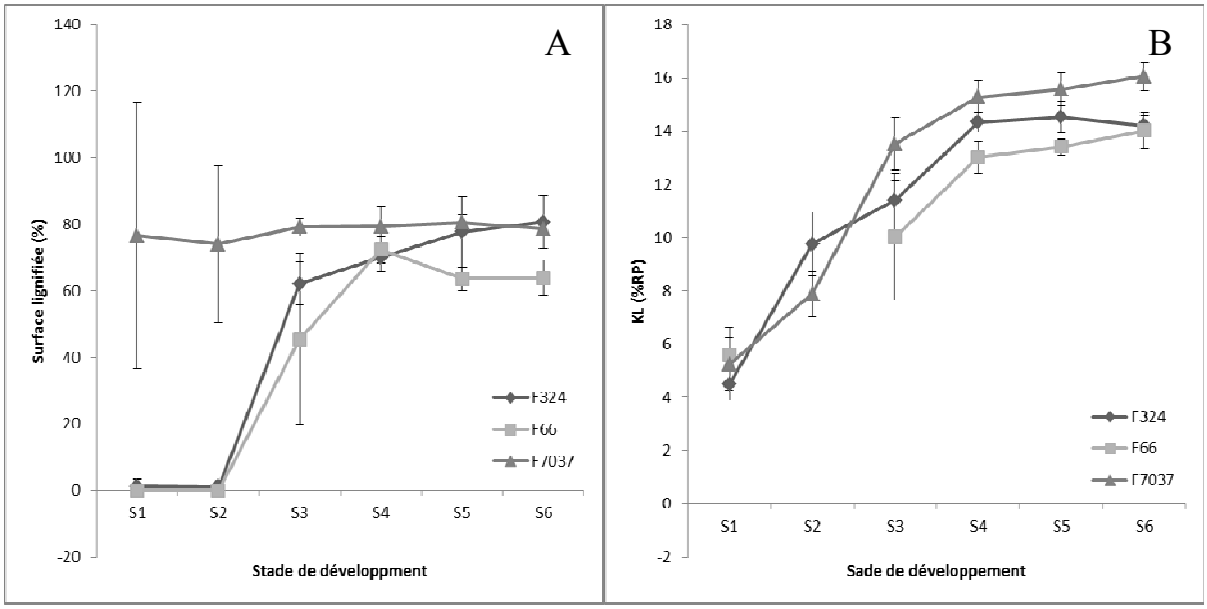


Figure IV-5. Evolution de la proportion de la surface contenant des lignines au sein des coupes colorées au Fasga (**A**) et de la teneur en lignine Klason (**B**) au cours du développement de l'entrenœud. S1 : 8 feuilles ligulées ; S2 : 10 feuilles ligulées ; S3 : panicule visible ; S4 : floraison femelle ; S5 : 14 jours après floraison femelle ; S6 : stade ensilage.

F7037 est un génotype présentant un comportement assez particulier. Sur la figure IV-5A F7037 présente une importante surface lignifiée dès les deux premiers stades de développement. En fait, comme cela est bien visible sur la figure IV-4 les coupes présentent une coloration rosée sur ces deux premiers stades. Il y a donc bien lignification mais elle est faible et la méthode développée n'intègre pas cette dimension d'intensité. Si l'on regarde l'intensité moyenne du rouge sur les coupes au cours du développement (Figure IV-6) on

constate que, certes il y a présence de rouge dès les deux premiers stades chez F7037 mais que ce rouge est en intensité plus faible que dans les stades suivants. Nous n'avions pas mesuré ce biais lors de notre développement méthodologique sur F324 et allons modifier cela pour les prochaines études, ce que nous n'avons pas eu le temps de faire ici.

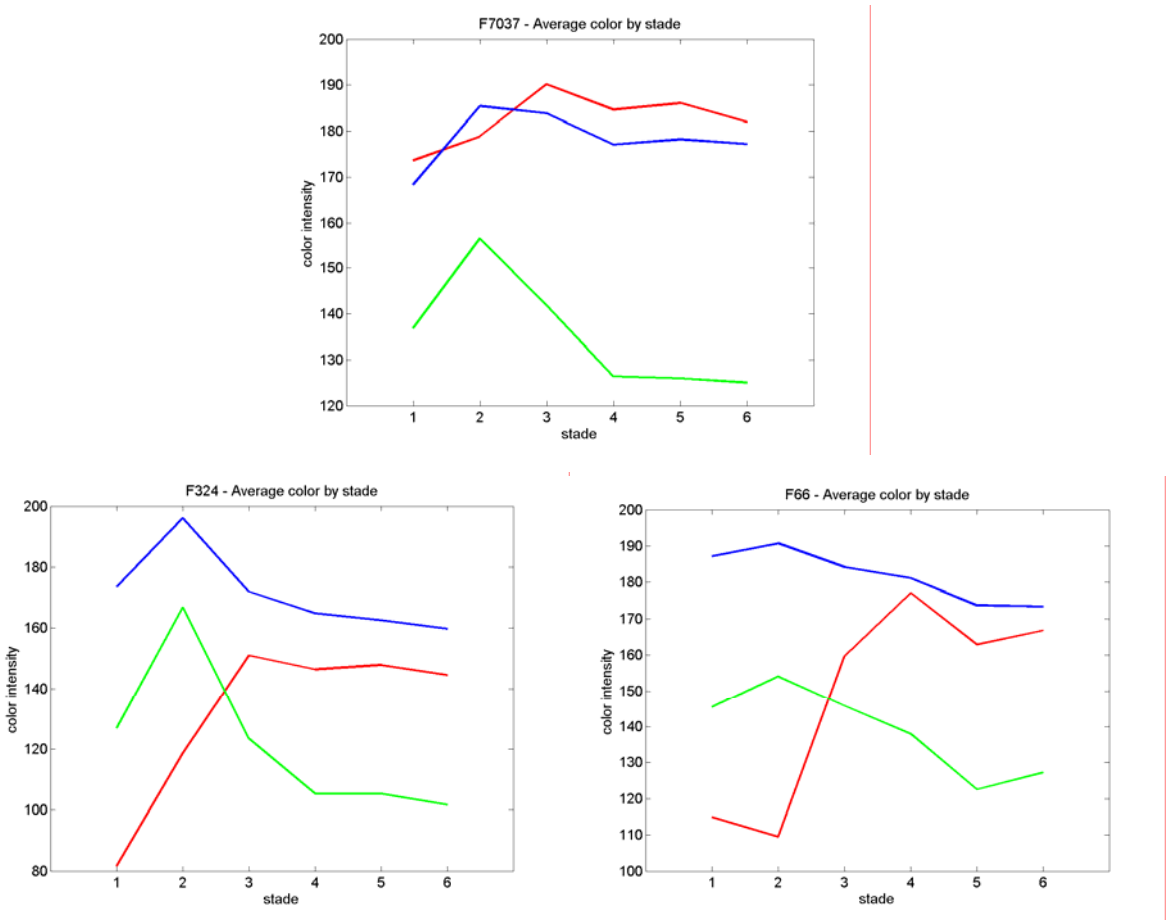


Figure IV-6. Profil moyen sur l'ensemble de la coupe rouge, bleu et vert (ligne rouge bleu, et vert, respectivement) pour chacun des 3 génotypes à chaque stade de développement. S1 : 8 feuilles ligulées ; S2 : 10 feuilles ligulées ; S3 : panicule visible ; S4 : floraison femelle ; S5 : 14 jours après floraison femelle ; S6 : stade ensilage.

Si l'on met en regard les résultats obtenus dans le dosage Klason de la teneur en lignine et cette estimation des surfaces lignifiées (Figure IV-5B), ce biais observé pour les deux premiers stades chez F7037 est très net. On peut également constater que la teneur en KL n'est pas nulle pour F324 et F66 aux deux premiers stades de développement contrairement à la surface lignifiée. Cette différence résulte d'une part de la définition d'un seuil en dessous duquel la proportion de rouge n'est pas prise en compte et d'autre part de la sensibilité de la

coloration au Fasga pour de faibles teneurs en lignines. Une surface si faible est donc plus la signature d'une lignification faible plutôt que celle d'une lignification absente. Ainsi pour les jeunes stades peu lignifiés, la détermination de surface globale lignifiée n'est pas tout à fait satisfaisante. La corrélation entre la teneur KL et la surface lignifiée est de 0.67 ($P < 0.01$) sur l'ensemble des 3 génotypes et des 6 stades et de 0.84 ($P < 0.01$) sur les stades 3 à 6. Cette corrélation de 0.84 souligne bien la proximité des deux évaluations comme nous l'avions déjà montré en 2005 (Méchin *et al.*, 2005). A la seule différence que la surface lignifiée représente la distribution dans le plan des tissus contenant des lignines et KL la teneur globale en lignines dans l'échantillon. Le fait que ces deux grandeurs soient corrélées tend à montrer que plus il y a de lignines dans la plante, plus la répartition se fait sur toute la surface de la coupe. Cependant la corrélation n'est que de 0.84 (R^2 de 70%) ce qui montre que la surface lignifiée apporte des informations supplémentaires sur la distribution des lignines qui ne sont pas apportées par le paramètre teneur en KL.

Nous avons donc souhaité aller plus en profondeur sur ces informations supplémentaires apportées par l'analyse de la répartition des lignines sur les coupes et nous avons notamment souhaité accéder à la distribution spatiale des lignines tout au long de la coupe chez les trois génotypes étudiés au cours du développement.

2.3.2. L'évolution de la lignification de l'épiderme contribue fortement à la variation totale de lignification entre les génotypes au cours du développement

Comme mentionné dans l'article présenté dans le (Chapitre IV-2.1.) nous avons défini des paramètres synthétiques qui nous permettent de suivre le taux de lignification dans trois zones clées de la coupe. Nous avons donc caractérisé les trois génotypes au cours du développement pour ces paramètres (Figure IV-7).

Pendant les jeunes stades (S1 - S3 pour F324 et F66 ; S1 - S2 pour F7037), le même taux de lignification a été observé entre les régions de l'épiderme (ligne rouge, Figure IV-7) et de la moelle (ligne rose, Figure IV-7) pour chaque génotype.

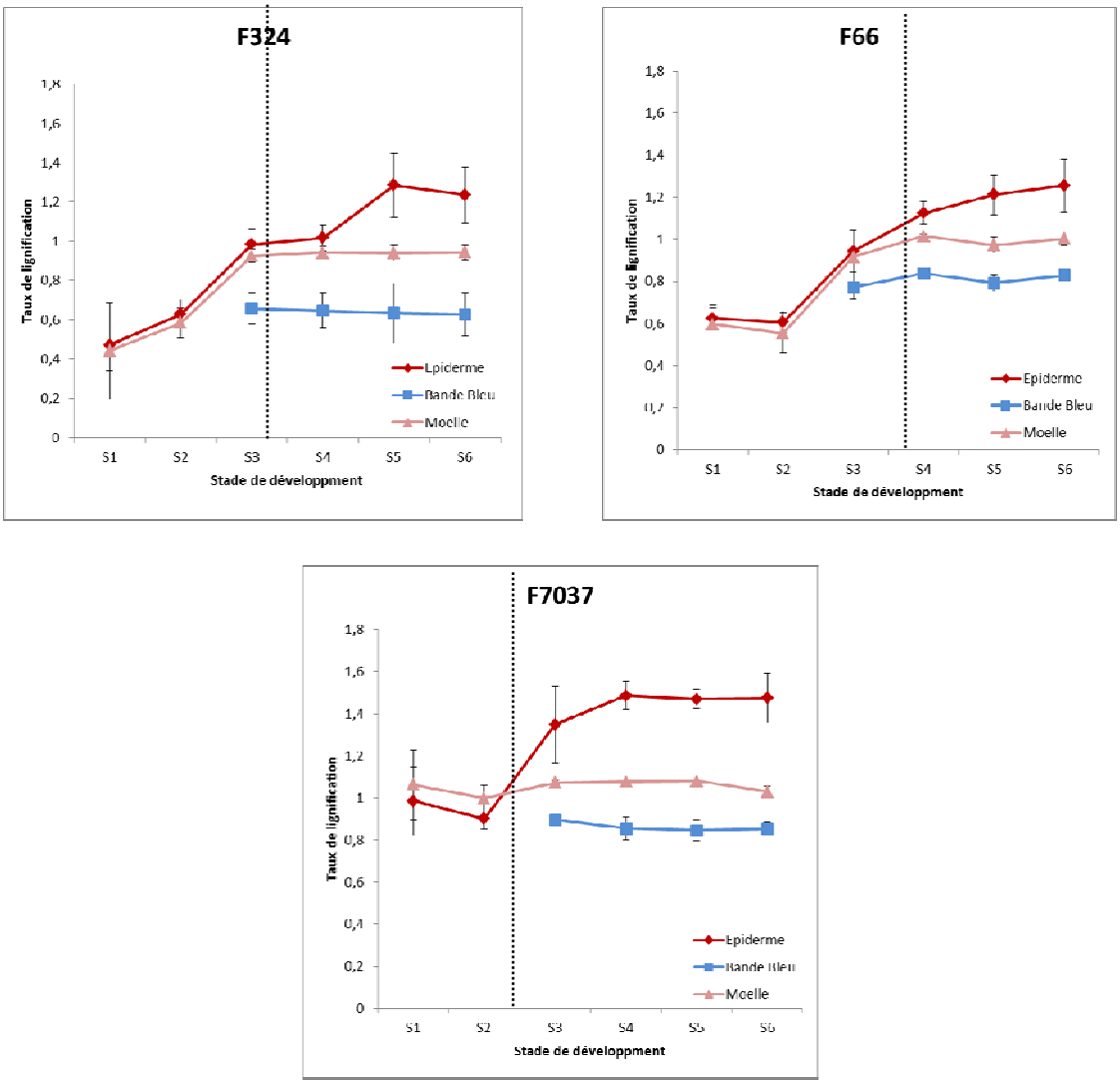


Figure IV-7. Taux de lignification dans les trois régions observées pour les trois génotypes au cours du développement de l'entrenœud. S1 : 8 feuilles ligulées ; S2 : 10 feuilles ligulées ; S3 : panicule visible ; S4 : floraison femelle ; S5 : 14 jours après floraison femelle ; S6 : stade d'ensilage. Les lignes pointillées indiquent le temps approximatif de la fin d'élongation d'entrenœuds.

Ainsi pendant les stades jeunes, le dépôt des lignines est similaire dans les deux régions. Jung et Casler (2006b) ont lancé une étude sur l'analyse de l'influence du développement des tissus sur la dégradabilité des parois d'entrenœud de maïs. Ils ont montré que, en fin d'élongation de l'entrenœud (stade comparable à S3 dans notre étude) la plupart des tissus dans l'épiderme et la moelle présentaient les mêmes dégradabilités importantes. Notre analyse, permet d'avancer

que cette similitude en dégradabilité peut être expliquée quantitativement par un même taux de lignification dans ces deux régions.

A partir du stade S3, une région peu lignifiée que nous avons nommée « bande bleue » se trouve entre l'épiderme et la moelle. Le taux de lignification dans cette région est très faible et ne présente pas d'évolution pendant les quatre derniers stades pour les trois génotypes. Ceci correspond à la région à l'intérieur d'épiderme qui se dégrade très facilement comme l'ont observé Jung et Casler (2006b). Dans une étude réalisée au stade ensilage sur une quinzaine de génotype, Méchin (Mechin, 2000) avait observé l'existence de cette bande bleue chez les génotypes normaux (moins visible chez les mutants bm3 à la moelle bleue car très peu lignifiée). Il semble donc y avoir au sein des tiges une bande sous épidermale plus ou moins large qui ne se lignifie pas ou très peu.

Une fois l'élongation de l'entrenœud finie, l'évolution du taux de lignification présente un plateau dans la moelle et une augmentation progressive dans l'épiderme (Figure IV-7). Ainsi, au stade ensilage, le taux de lignification est plus élevé dans l'épiderme que dans la moelle. La moelle des tiges de graminées et de légumineuses est constituée par du parenchyme, ce parenchyme médullaire atteint la sénescence au cours du développement. Les graminées annuelles en C4 comme le maïs et le sorgho constituent une exception à ce phénomène car elles conservent un parenchyme médullaire vivant jusqu'au stade mature (Jung *et al.*, 2012). Jung et Casler (2006b) ont montré que les cellules du parenchyme médullaire sont caractérisées, chez ces graminées, par une faible épaisseur de paroi et une lignification modérée au cours de la maturation. En conséquence, le parenchyme de la moelle reste plus facile à digérer que l'épiderme (Jung and Casler, 2006b). Dans notre étude, après la fin de l'élongation de l'entrenœud, la lignification de la paroi semble s'arrêter dans la moelle. Au stade ensilage, les trois génotypes présentent des taux faibles et similaires à ce niveau. Dans l'analyse biochimique de ces échantillons (Chapitre IV-1), nous avons suggéré que pendant les jeunes stades, le dépôt rapide de lignines riches en liaison C-C dans les parois primaires et parois secondaires. Quand l'élongation est terminée la lignification évolue et on assiste alors au dépôt lent dans les parois secondaires de lignines riches en liaisons β-O-4. Ceci nous amène à suggérer que, les parois cellulaires de la moelle, dont la lignification est terminée au stade S3, ne subissent pas l'étape de lignification lente des parois secondaires qui enrichie ces dernières en lignines riches en liaisons β-O-4. Ces parois de la moelle contiennent donc probablement essentiellement des lignines riches en liaisons C-C.

Dans Zhang et al. (2011) présenté dans le chapitre III-1, nous avons montré que, les différentes parties des lignines présentent également des impacts différents sur la dégradabilité de la paroi. La lignine riche en β-O-4 limite plus la dégradabilité des parois. Ainsi pensons nous que la différence de dégradabilité observée entre les tissus de la moelle et de l'épiderme n'est pas simplement expliqué par des différences de taux de lignification, mais qu'elle est également due à des différences de structure des lignines. Les lignines présentent dans les parois de la moelle étant pauvres en liaisons β-O-4 elles inhibent moins la dégradabilité.

Les trois génotypes étudiés présentent une lignification similaire au niveau de la moelle, la variabilité pour la dégradabilité des parois ne dépend donc pas de ce facteur.

Après la fin de l'élongation, le dépôt des lignines continue donc dans l'épiderme. Les trois génotypes présentent pour ce paramètre des comportements différents. Il est bien connu que la paroi dans l'épiderme et la moelle se développe différemment (Chen *et al.*, 2002; Jung and Engels, 2002; Jung and Casler, 2006a; Boon *et al.*, 2012), mais à notre connaissance, cette étude est la première à se pencher sur la question de la variabilité génétique et à quantifier dans ce détail la lignification au cours du développement. Pour illustrer plus en détail cette variabilité génétique nous avons également retenu des images prises en microscopie des régions épidermales des trois génotypes au cours du développement (Figure IV-8). Au stade 3, F7037 présente le taux de lignification le plus élevé dans l'épiderme, suivi par F324 et F66 (Figure IV-3). F7037 est un génotype qui commence à se lignifier précocement. Son taux de lignification dans l'épiderme augmente très rapidement entre les stades 2 et 3. Chez F7037 les parois sont très lignifiées à ce stade 3 (Figure IV-8). Les parois du sclérenchyme vasculaire de F324 et F66 sont beaucoup moins lignifiées que celles de F7037, et les parois du parenchyme commencent juste à se lignifier pour F324 et pas encore pour F66, comme le confirme le taux de lignification dans l'épiderme plus élevé pour F324 que pour F66 à ce stade.

Pour F7037, le taux de lignification dans l'épiderme augmente jusqu'au stade 4 avant d'atteindre un plateau. Au contraire, ce paramètre continue d'augmenter progressivement jusqu'au dernier stade chez F324 et F66 dont les parois continuent de s'épaissir (Figure IV-8). Au stade ensilage (S6), ces trois génotypes sont très différents en termes de taux de lignification dans l'épiderme et F7037 présente la valeur plus élevée.

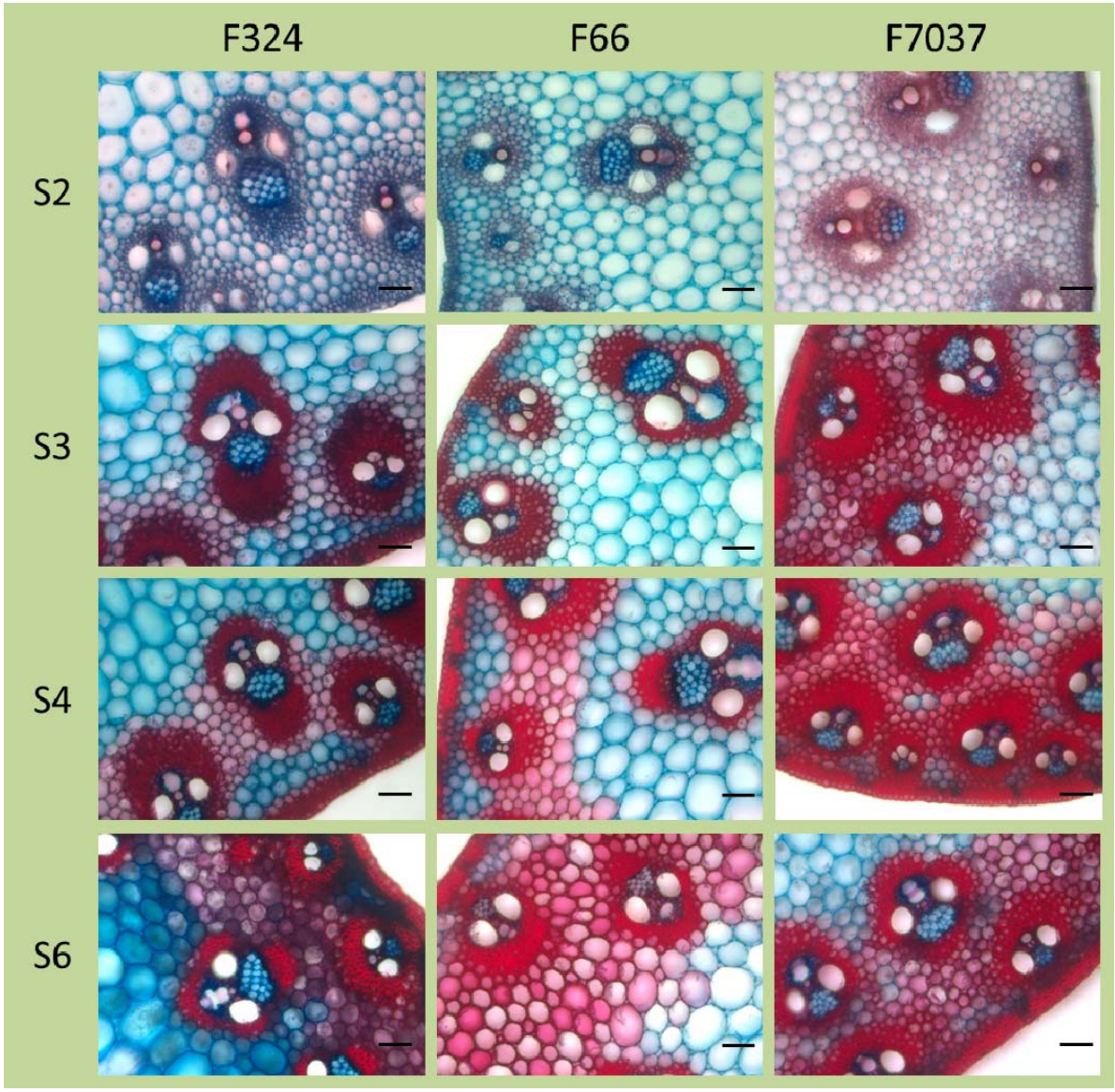


Figure IV-8. Image microscopique des tissus épidermiques colorés au Fasga au cours du développement de l'entrenœud. S2 : 10 feuilles ligulée ; S3 : panicule visible ; S4 : floraison femelle ; S6 : stade d'ensilage. Bande = 100 µm.

L'analyse biochimique montre qu'au stade ensilage, F7037 contient le plus faible teneur en lignines riches en liaisons β-O-4 (Tableau IV-1). Bien que les données biochimiques soient obtenues sur l'entrenœud entier, si notre hypothèse précédente est vraie, le dépôt lent des lignines riches en liaisons β-O-4 ne devrait avoir lieu que dans l'épiderme. Cette teneur relativement faible en liaisons β-O-4 et le plus grande taux de lignification correspond donc le plus grande teneur en lignines riches en liaisons C-C en épiderme pour F7037 ce qui est cohérent avec une lignification finie d'installée au stade 4. Dans la partie relative à l'analyse

biochimique, nous avons suggéré que la différence de lignification entre les trois génotypes est influencée principalement par le dépôt rapide des lignines riches en liaisons C-C.

En fonction de tous ces résultats, nous pouvons conclure que les différences de lignification de l'entrenœud entre les trois génotypes est principalement expliquée par la différence de dépôt des lignines riches en liaison C-C dans l'épiderme. L'épiderme de F7037 déposerait plus rapidement et en plus grande quantité des lignines riches en liaisons C-C, ce qui conduirait à un entrenœud lignifié plus précocement et aussi le plus lignifié au stade ensilage.

Il a été suggéré que la structure anatomique des parois peut être plus importante que les facteurs biochimiques pour limiter la dégradabilité car la structure anatomique influence l'accessibilité aux polysaccharides et impacte donc potentiellement la dégradabilité (Wilson and Mertens, 1995). Cependant, jusqu'à présent, très peu d'études ont été menées sur la variabilité génétique pour cette structure anatomique des parois (Barros-Rios et *al.*, 2012; Hatfield and Chaptman, 2009). Dans cette étude, nous avons montré qu'il existait une variabilité génétique pour la mise en place des lignines et également pour la structure de la lignification des parois dans les tissus épidermiques qui contribuent fortement à la limitation de la dégradabilité comme l'a montré Wilson (1993). Cette variabilité génétique au sein des tissus épidermiques va aider à l'identification des facteurs pariétaux qui pourraient être ciblés dans les programmes d'amélioration de la qualité des fourrages.

2.4. Analyse des relations entre la dégradabilité de la paroi et les facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux

Nous avions à l'origine retenu 7 génotypes contrastés en termes de dégradabilité de paroi et asses semblables en termes de teneur en lignines pour réaliser cette étude au cours du développement. Des contraintes de temps nous ont amenés à n'analyser que 3 de ces 7 génotypes ce qui bien entendu diminue fortement notre puissance pour analyser les relations entre les différents caractères. Nous nous limiterons donc à une comparaison entre les 3 lignées. Au stade ensilage, nous avons observé des différences importantes entre les 3 lignées pour les facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux ainsi que pour la dégradabilité des parois (Tableau IV-1).

Tableau IV-1. Comparaison de la dégradabilité de la paroi et des facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux entre les trois génotypes au stade ensilage.

	F324	F66	F7037
IVCWRD (%)	32,90	28,40	22,50
L entrenœud (cm)	9,90	10,70	12,40
Taille des cellules (µm)	74,40	58,80	47,20
KL (% CWR)	14,20	14,00	16,10
C-C lignine (%CWR)	11,54	11,20	13,12
G (µmol.g^{-1} KL)	434,20	466,10	426,90
S (µmol.g^{-1} KL)	492,00	518,10	475,50
Rendement β-O-4 (µmol.g^{-1} KL)	938,20	999,20	926,30
S/G	1,20	1,10	1,10
PC est (mg g^{-1} CWR)	19,00	18,60	25,70
SPC (%S)	25,40	25,70	31,10
FA est (mg g^{-1} CWR)	6,90	6,00	6,10
FA eth (mg g^{-1} CWR)	2,80	3,50	3,00
TL épi	1,24	1,26	1,47
TL moelle	0,94	1	1,03

IVCWRD, dégradabilité de la paroi ; L entrenœud, longueur de l'entrenœud ; KL, teneur en lignine Klason; C-C lignine, teneur en lignine riche en liaison C-C ; G, unité G; S, unité S; Rendement β-O-4, quantité totale de monolignols liés par des liaisons β-O-4; PCest, teneur en acide *p*-coumarique estérifiée; %S-PC, pourcentage d'unités S acylées par du *p*-coumarate; FAest, teneur en acide férulique estérifié ; FAeth, teneur en acide férulique éthérifiée ; TL épi, taux de lignification dans l'épiderme ; TL moelle, taux de lignification dans la moelle.

Nous avons introduit dans cette comparaison un paramètre « taille principale des cellule de parenchyme au sein la coupe» qui est obtenu par l'analyse granulométrique des images en niveaux de gris acquises sur la BlueBox (Devaux *et al.*, 2008). Il est intéressant de noter que la taille des cellules est un facteur assez relié avec la dégradabilité. Plus les cellules du parenchyme sont grandes, plus l'entrenœud est dégradable. Nous émettons l'hypothèse que pour un surface d'entrenœud donnée, plus la paroi est lignifiée, plus elle est épaisse, plus la cellule est petite et de ce fait moins l'entrenœud est dégradable. Ce résultat serait à verifier sur d'autres génotypes.

Nous avons également introduit un paramètre teneur en lignine riche en liaison C-C (C-C lignine, Tableau IV-1), qui est calculé en combinant la teneur en lignine Klason et le rendement β-O-4 (G 180g.mol^{-1} et S 210 g.mol^{-1}, d'où 500 µmol.g^{-1} KL qui correspondent à environ 10% de la teneur en KL), d'où : C-C lignine = KL – (rendement β-O-4 / 500 × 0.1 × KL)

Au stade ensilage F324 est le génotype le plus dégradable suivi par F66 et F7037. Dix points de dégradabilité de parois séparent ces trois génotypes. Par rapport à F324 et F66, l''entrenœud de F7037 est plus lignifié. Il présente 15% de plus en teneur en KL, 17% de plus de teneur en lignine riche en liaison C-C, 17% de plus de taux de lignification dans l'épiderme et également 38.2% de PC estérifié en plus. Comme déjà évoqué, la lignification de l'entrenœud est aussi expliquée en bonne partie par le dépôt de lignines riches en liaisons C-C dans l'épiderme. Chez F7037, la teneur en lignine ainsi que celle en PC estérifiée explique une dégradabilité plus faible. La teneur en PC dans les parois a déjà été rapportée comme ayant un impact négatif sur la dégradabilité des parois chez le maïs (Mechin *et al.*, 2000; Fontaine *et al.*, 2003). Le rôle de PC dans la limitation de la dégradabilité des parois cellulaire n'est pas très clair. PC n'est pas connu pour former des ponts comme le font les acides féruliques au sein des parois de graminées (Ralph *et al.*, 1994a). Et, par conséquent, il a souvent été avancé que PC avait un impact indirect, lié à sa liaison avec la teneur en lignines (Chesson, 1993; Jung and Deetz, 1993; Mechin *et al.*, 2000; Grabber and Lu, 2010). Dans le chapitre III, nous avons montré la forte implication de PC dans la limitation de la dégradabilité des parois malgré l'absence de relation entre la teneur en lignine et cette *p*-coumaroylation des parois. Nous pensons que le rôle joué par PC dans la paroi ne peut pas, chez les graminées, être réduit à sa simple relation souvent rencontrée avec la teneur en lignines. Selon nous, la teneur en PC estérifié est un réel levier pour améliorer la dégradabilité des parois et les mécanismes par lesquels ce PC est acylé aux sous unités S des lignines est une cible importante. Une modification de cette étape d'acylation pourrait être à envisager pour améliorer la dégradabilité de paroi, comme le proposent Withers et al. (2012).

Les entrenœuds de F324 et F66 présentent les mêmes teneurs en KL, en lignine riche en liaisons C-C, en PC et le même taux de lignification dans l'épiderme. F324 qui est le plus dégradable, présente 6% de moins de lignines riches en liaisons β-O-4, 20% de moins de FAeth, des plus grandes cellules et 6% de moins de taux de lignification dans la moelle. La plus forte proportion de liaisons β-O-4 et de FAeth peuvent expliquer la plus faible dégradabilité de F66. Dans notre étude sur les LR présentée dans le chapitre III-1 (Zhang *et*

al., 2011), nous avons proposé que les liaisons β-O-4 conduisent à des polymères plus linéaires qui de ce fait s'adsorbent plus facilement sur les chaînes de polysaccharides. Les enzymes arrivent donc plus difficilement à accéder aux polysaccharides et ainsi la dégradabilité peut être diminuée. Donc, quand la variation de la teneur en lignines est limitée, c'est le rendement β-O-4 qui explique plus la variation de la dégradabilité des parois. L'influence de la teneur en FAeth peut s'expliquer par le pontage entre les lignines et les hémicelluloses dans lequel est impliqué cet acide férulique. L'impact de ce pontage férulique sur la dégradabilité des parois cellulaires n'est toujours pas clair (Jung *et al.*, 2012). Dans des études de modélisation *in vitro* de la lignification, il a été proposé que la réticulation des lignines et des arabinoxylanes via FA limite la digestibilité des parois cellulaires en limitant l'accès physique des enzymes microbiennes hydrolytiques aux polysaccharides (Grabber *et al.*, 1998). Cependant, cette corrélation n'est pas toujours observée dans les études portants sur des plantes (Jung and Buxton, 1994; Mechin *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

De cette comparaison entre seulement 3 génotypes, nous pouvons conclure que la teneur en lignines, de façon habituelle, explique en premier lieu les variations de dégradabilité de paroi mais dès lors que ce facteur ne varie pas alors la teneur en FAeth ici mais aussi la taille des cellules pourraient expliquer les variations observées entre F66 et F324.

CONCLUSION

Dans cette deuxième partie de mon étude, nous avons dans un premier temps étudié la mise en place de la lignification des parois et des différents composants pariétaux au sein des trois génotypes de maïs (F324, F66 et F7037) au cours du développement. Dans un deuxième temps, j'ai complété la caractérisation biochimique approfondie de ce matériel par une étude de la structure anatomique et histologique des parois au sein de coupes de tiges afin d'en mesurer l'impact sur la dégradabilité.

Dans cette étude, nous avons développé une méthode par analyse d'image de la coupe de tige de maïs coloré au Fasga afin de quantifier la distribution spatiale des lignines tout au long de la coupe des entrenœuds de maïs. Cette distribution des lignines a été quantifiée sous forme d'un taux de lignification dans trois régions spécifiques de l'entrenœud. Cette méthode rend beaucoup plus facile la quantification des variations de lignification, tant d'un point de vue spatial que temporel. Les résultats sont en accord avec l'analyse biochimique des tissus disséqués dans la littérature (Wilson, 1993; Wilson and Hatfield, 1997; Jung and Casler, 2006a). Un grand avantage de la méthode proposée est la possibilité d'évaluer rapidement la structure des parois en fonction de la position dans la coupe d'entrenœud, sans avoir à disséquer les tissus. Elle nous ouvre aussi la possibilité pour nos études futures de caractériser un grand nombre d'échantillons et d'atteindre un niveau d'étude moyen débit. Cette capacité d'analyse va nous permettre d'envisager la mise en place de l'étude large de la diversité et du déterminisme génétique de ces caractères histologiques en relation avec celle des caractères liés à la dégradabilité et à la composition pariétale. Ces recherches de QTL seront le premier pas vers la quête de gènes candidats permettant d'expliquer les variations pour ces caractères.

L'analyse cinétique de la mise en place des parois au sein de l'entrenœud que nous avons réalisée nous a permis de décrire le développement de l'entrenœud d'un point de vue à la fois biochimique et histologique. Dans notre étude, le développement de l'entrenœud a été abordé sur des axes temporel et spatial.

D'un point de vue temporel, les différentes composantes pariétales sont ainsi incorporées graduellement, en fonction du stade de développement. Trois étapes majeures de développement ont été identifiées, (1) dans la première étape nous assistons à un dépôt rapide des parois primaires associé à la mise en place des réticulations féruliques; (2) ensuite le développement se décale vers un dépôt rapide des parois secondaires associé à l'arrêt de

l'élongation de l'entrenœud. Dans cette étape des lignines riches en liaisons C-C sont déposées. Dans le même laps de temps, la teneur en PC est augmentée pendant la secondarisation. Lorsque ce dépôt rapide des lignines riches en liaisons C-C est terminé, (3) la troisième étape de développement commence. Elle est caractérisée par un dépôt lent de lignines riches en liaisons β-O-4. Cette fraction des lignines est moins condensée et affiche une proportion plus élevée en unité S, ainsi qu'en acide *p*-coumarique.

D'un point de vue spatial, au sein de l'entrenœud, le développement des parois est différent selon les régions. Aux stades jeunes, la lignification est homogène sur tout l'entrenœud. Les parois primaires et secondaires enrichies en lignines riches en liaisons C-C sont co-déposées dans l'épiderme et dans la moelle. Une fois l'élongation de l'entrenœud terminée, la lignification des parois secondaires ne se fait plus que dans l'épiderme. Ainsi, en fin de développement, les tissus de l'épiderme sont très épais et lignifiés, les tissus de la moelle moins épais et faiblement lignifiés, et les tissus de la bande bleue pas lignifiés du tout.

F3037, le génotype le plus lignifié, présente aussi la plus grande quantité de lignines riches en liaisons C-C, l'épiderme le plus lignifié, et s'avère être de loin le génotype le moins dégradable. F324 et F66 qui se lignifient à la même vitesse et qui présentent la même quantité finale de lignine, affichent également les mêmes teneurs en lignines riches en liaisons C-C et le même taux de lignification dans l'épiderme. C'est le facteur rendement β-O-4 et le FAeth qui différent ces deux lignées et semblent limiter la dégradabilité de F66. Dans le chapitre III, nous avions également montré l'implication du rendement β-O-4 dans la limitation de la dégradabilité des parois lorsque la variation de teneur en lignines est limitée.

CHAPITRE V : SYNTHESE – TRAVAUX A POURSUIVRE – DISCUSSION GENERALE

Synthèse - travaux à poursuivre - discussion générale

Mon travail de thèse s'inscrivait dans un contexte général de recherche de facteurs capables d'apporter une amélioration de dégradabilité de paroi lorsqu'une teneur seuil en lignines était fixée. Mon étude s'est déroulée selon un double objectif (1) de recherche des facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de parois dans un contexte de teneur en lignine fixée et de leurs impacts sur les performances agronomiques chez le maïs, et (2) d'étude de la mise en place des parois, de leur lignification et de leur réticulation au sein de la tige de maïs tout au long de son développement. Les résultats que nous avons obtenus après ces trois années de recherches vont être synthétisés et discutés ici, suivant deux angles d'approches. La première de ces deux parties concernera notre compréhension de la lignification, de la *p*-coumaroylation et de la féruloylation des parois ainsi que l'impact des différents facteurs biochimiques comme histologiques sur la dégradabilité des parois. Nous reviendrons sur les deux développements méthodologiques réalisés au cours de cette thèse et terminerons cette partie en proposant quelques travaux à mener, à plus ou moins long termes, pour prolonger ce travail. Dans la seconde partie nous essaierons de voir comment utiliser ces résultats en vue d'une sélection/amélioration du matériel végétal.

1. Compréhension de la lignification

1.1. Développements méthodologiques autour de l'estimation de la lignification

1.1.1. Estimation globale de la teneur en lignines – Méthode Klason versus méthode Van Soest

Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer quantitativement la teneur en lignines dans un échantillon, ces méthodes peuvent être divisées en deux grandes catégories, celles qui s'appuient sur une procédure de solubilisation et celles qui sont basées sur une méthode non invasive (Hatfield and Fukushima, 2005). Les méthodes non invasives se focalisent sur les propriétés de la lignine à absorber le rayonnement dans des régions discrètes du spectre. C'est le cas des méthodes UV (ultra-violet) et NIRS (Spectroscopie proche infrarouge) par exemple. Les méthodes de solubilisation impliquent souvent une procédure d'hydrolyse des lignines (méthode du bromure d'acétyle) ou des sucres (méthode de Klason et méthode Van Soest)

dans la paroi cellulaire suivie d'une détermination des résidus par mesure d'adsorption UV ou mesure gravimétrique. La méthode Klason utilise de l'acide sulfurique 72% pour solubiliser et hydrolyser les sucres (cellulose et hémicelluloses) dans la paroi cellulaire en laissant le résidu de lignine acido-résistant et les matières minérales. La méthode de Van Soest permet d'accéder séquentiellement aux différents constituants de la paroi (cellulose, hémicelluloses et lignines). Dans cette méthode, le résidu pariétal est traité par une solution de détergent acide pour estimer la teneur en hémicellulose; puis par l'acide sulfurique 72% pour estimer la teneur en cellulose; et après la minéralisation nous obtenons la teneur en acide detergent lignine (ADL).

Dans mon étude, nous avons comparé ces deux méthodes biochimiques couramment utilisées pour estimer la teneur en lignines : la méthode Klason (KL) et la méthode Van Soest (ADL). Cette comparaison fait l'objet d'un développement dans l'article (Zhang et *al.*, 2011) présenté dans le chapitre III. Tout d'abord, comme présenté dans différentes études (Hatfield *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 1997; Mechin *et al.*, 1998; Fukushima and Hatfield, 2004), les valeurs KL sont toujours plus élevées que les valeurs ADL. C'est également ce que nous avons observé. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de corrélation entre les teneurs en lignines estimées par ces deux méthodes. Cette absence de corrélation indique que KL et ADL correspondent à l'estimation de deux parties différentes des lignines chez les graminées. Nous avons calculé pour chaque échantillon étudié la différence entre KL et ADL. Cette différence présente une corrélation positive et significative avec la teneur en sous unités liées uniquement par des liaisons β-O-4 (rendement β-O-4). Ce résultat suggère que les différences entre KL et ADL se réfèrent à la partie des lignines riche en liaisons β-O-4.

Une corrélation négative et significative entre la dégradabilité des parois et KL a été observée. Par contre, aucune corrélation entre cette dégradabilité et la teneur en lignine ADL n'a été détectée.

Cette comparaison entre ces deux méthodes d'estimation de la teneur en lignines chez le maïs nous a invités à conclure que la méthode Klason permettait ainsi d'estimer la quantité « totale » de lignines alors que la méthode Van Soest ne permettait d'estimer que la « Core lignine » représentant la fraction plus condensée de lignines. De ce fait, l'utilisation de l'une ou de l'autre des méthodes doit se faire avec prudence et les résultats obtenus doivent être, encore plus chez les graminées, utilisés et commentés en connaissance de cause.

1.1.2. Estimation de la lignification sur coupe de tiges colorées au Fasga

Dans les travaux de notre équipe développés au début des années 2000 (Méchin et *al.*, 2005) nous nous « contentions » d'évaluer la répartition des lignines via la surface de tissus lignifiés colorés en rouge par le Fasga sur les coupes. Dans cette étude, nous avons souhaité aller plus loin et quantifier le profil de lignification au sein de la coupe. Nous avons développé une méthode d'analyse d'images de coupe de tige de maïs colorées au Fasga afin de quantifier la distribution spatiale des lignines tout au long de la coupe. Dans cette méthode, la distribution des lignines est d'abord décrite par le profil de lignification en fonction de la distance par rapport à l'épiderme externe. Ensuite ce profil est quantifié sous la forme d'un taux de lignification dans les régions spécifiques de la coupe, à savoir l'épiderme, la moelle et une zone bleue située entre les deux précédentes. Ce travail fait l'objet d'un article soumis à Journal ou Agricultural and Food Chemistry (Zhang *et al.*, soumis). Par cette méthode nous avons réussi à quantifier la variation zonale de la lignification, variation qui pourrait être reliée à des différences de structure anatomique des parois comme cela a été évoqué dans la littérature (Wilson, 1993; Wilson and Hatfield, 1997; Jung and Casler, 2006a). Cependant, ces travaux impliquent souvent une étape de microdissection des tissus (Chesson et *al.*, 1997, Angeles-Ruel et *al.*, 2006, Nakashima et *al.*, 2008, Ruel et *al.*, 2009). Ces travaux sont lourds à mettre en œuvre et très fastidieux. La méthode développée dans notre étude pour quantifier la distribution spatiale de la lignine tout au long de la coupe des entrenœuds de maïs rend ainsi possible la caractérisation d'un grand nombre d'échantillons. Elle nous offre ainsi la possibilité d'étudier la lignification au cours du développement d'un point de vue spatial, approche que nous allons rediscuter dans la suite.

1.2. Mise en place des parois et de leur lignification au cours du développement de l'entrenœud de maïs

La mise en place des parois est un processus complexe au cours duquel les différentes composantes pariétales sont incorporées graduellement en fonction du stade de développement pour former la structure pariétale. Sur la base de nos résultats, et des conclusions présentées dans la littérature, nous avons proposé un schéma descriptif de ce processus sur un axe temporel (Figure V-1). La lignification de la paroi commence par un dépôt précoce et rapide des acides féruliques estérifiés (FAest) dans la paroi primaire. Ces

acides féruliques portés par les arabinoses des hémicelluloses vont fonctionner comme site d'initiation de la lignification.

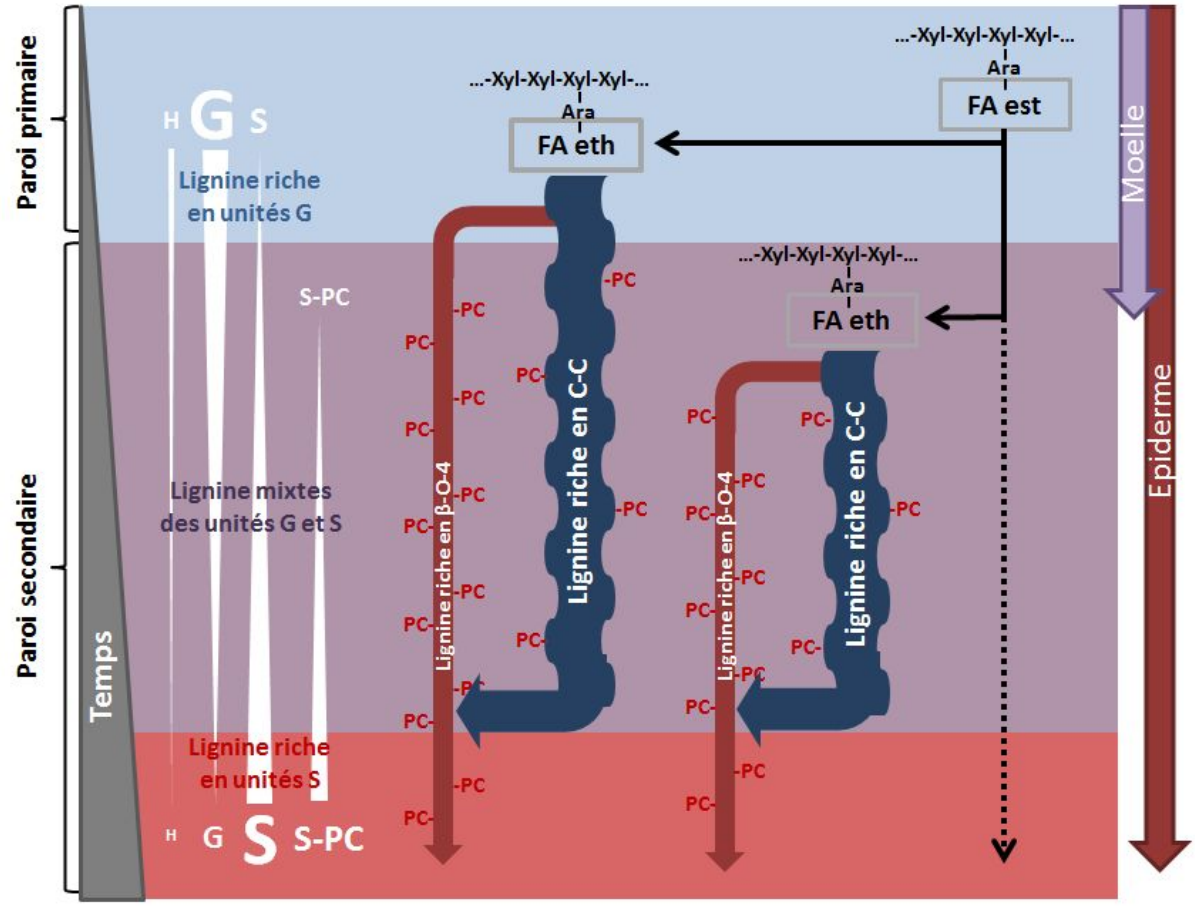


Figure V-1. Illustration de la lignification de la paroi cellulaire végétale. Le dépôt temporel des différentes composantes de la paroi cellulaire végétale ainsi que la structure des lignines sont représentées. Les contributions relatives des principaux monolignols constitutifs de la lignine dans les différentes étapes sont indiquées.

Dans la paroi primaire, une réticulation entre les lignines et les hémicelluloses est ainsi formée via le pontage par le FA. Pendant ce début de lignification, le dépôt d'alcool coniférylique (G) est prédominant (accompagné aussi d'un dépôt de sous unités H) et il se forme donc des lignines de type guaiacyle dans la paroi primaire. Ensuite et un peu plus tard, la lignification diffuse dans les parois secondaires. L'alcool coniférylique co-polymérise avec des quantités croissantes d'alcool sinapylique et de sous unités S acylées par l'acide *p*-

coumarique pour former des lignines mixtes G et S, en même temps que la teneur en PC augmente avec cette lignification des parois secondaires. Pendant cette période, le dépôt rapide des lignines riches en liaisons C-C est prédominant, les lignines présentent ainsi une structure condensée. Il faut également noter que, dans cette étape de la formation des parois secondaires il se produit toujours un dépôt d'acide férulique estérifié aux arabinoses et par conséquent il continue de se mettre en place de nouveaux sites potentiels d'initiation de la lignification. En fin de développement des parois secondaires, la troisième étape de lignification fait appel à une fraction prédominante d'alcool sinapylique et d'unités S acylées par PC pour terminer par une phase lente de dépôt de lignines riches en liaisons β-O-4. Cette partie des lignines est plus linéaire et présente un teneur plus élevée en unités S et PC. Pendant cette dernière étape de lignification, il n'y a ni nouveaux sites d'initiation, ni condensation de la lignine. Nous nous trouvons dans une phase d'allongement des lignines par mise en place de liaisons β-O-4.

2. Facteurs explicatifs des variations de dégradabilité des parois et mise en place de la lignification des parois au cours du développement

2.1. Facteurs biochimiques explicatifs des variations de dégradabilité de paroi des plantes au stade ensilage

2.1.1. Facteur « teneur en lignines »

Un des objectifs de ce travail était de réussir à comprendre et expliquer la variabilité pour la dégradabilité des parois en excluant le facteur « teneur en lignine ». Dans le matériel végétal retenu dans cette étude, bien que la variation de la teneur en lignines ait été très limitée, elle conserve toujours un rôle pour expliquer une part des variations de dégradabilité de paroi observées. Cependant, dans notre matériel végétal, la teneur en lignines n'est pas le premier facteur explicatif de la variabilité pour la dégradabilité de parois comme cela est toujours le cas dans les nombreux travaux de la littérature (Jung and Buxton, 1994; Argillier and Barriere, 1996; Mechin *et al.*, 2000; Casler and Jung, 2006).

Notre stratégie de choix de matériel végétal semble avoir été assez efficace pour limiter les variations de la teneur en lignines et nous permet d'atteindre les objectifs fixés au début de ce travail.

En outre, comme mentionné, la teneur en lignines peut être subdivisée en deux parties : la teneur en lignines condensées (riche en liaison C-C) et la teneur en lignines riches en liaisons β-O-4. Chacune de ces deux parties des lignines présente un impact différent sur les propriétés des parois. Ainsi, dans les études futures, et en fonction de l'objectif visé, il sera possible de cibler une partie des lignines plutôt qu'une autre.

2.1.2. La proportion de liaisons β-O-4 et la teneur en acide p-coumarique : deux facteurs clés explicatifs des variations de dégradabilité de parois chez le maïs

Dans notre étude, deux facteurs apparaissent comme cruciaux pour expliquer la variation de dégradabilité de parois : la proportion de liaisons β-O-4 au sein des lignines et la teneur en acide *p*-coumarique estérifié. Pour expliquer l'effet important du rendement β-O-4, nous avons fait l'hypothèse que les liaisons β-O-4 conduisent à des polymères plus linéaires qui de ce fait s'adsorbent plus facilement sur les chaînes de polysaccharides, diminuant ainsi l'accessibilité aux sucres et donc la dégradabilité des parois. Une augmentation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère lignine peut aussi entrainer une diminution des groupements OH libres et de ce fait augmenter l'hydrophobicité globale du polymère. Cette hydrophobicité accrue peut aussi intervenir en augmentant la mise en place d'interactions non spécifiques entre les cellulases et les lignines. Les cellulases se retrouveraient ainsi piégées et ne seraient plus disponibles pour dégrader les polysaccharides. L'impact d'une augmentation en liaisons β-O-4 au sein des lignines chez le maïs pourrait donc avoir un double effet de limitation de l'accès aux sucres, d'une part en bloquant physiquement l'accès des enzymes aux polysaccharides et d'autre part en adsorbant ces enzymes sur les lignines de façon non spécifique. Jusqu'à maintenant, le rôle de la structure des lignines a toujours eu des effets plus ou moins controversés comme nous l'avons évoqué déjà à plusieurs reprises au cours de ce manuscrit. Cependant, le rôle de ce paramètre structural a toujours était considéré dans des contextes où la teneur en lignine masquait beaucoup ses effets potentiels. Notre travail montre clairement que chez le maïs, le degré de condensation des lignines présente un réel potentiel pour l'amélioration de la dégradabilité des parois.

En parallèle, nous avons montré que PC est, lui aussi, un facteur important à prendre en compte dans la limitation de la dégradabilité des parois. Jusqu'à maintenant ce rôle de PC n'était pas clair et de surcroit était la plupart du temps considéré comme indirect et lié

uniquement à la relation entre la teneur en lignines et celle en PC au sein de la paroi. Comme le PC n'est pas connu pour former des ponts comme le font les acides féruliques au sein des parois de graminées (Ralph *et al.*, 1994a), l'impact de ce facteur a très souvent été mis de côté bien que la corrélation négative entre la teneur en PC et la dégradabilité des parois ait été observée dans différent études (Scobbie *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1998; Hatfield and Chaptman, 2009). Cette corrélation a été attribuée à la relation positive entre la teneur en PC et la teneur en lignines au lieu d'un effet direct sur la dégradabilité (Chesson, 1993; Jung and Deetz, 1993; Mechin *et al.*, 2000; Grabber and Lu, 2010). Cependant, dans notre étude, cet impact de PC est indépendant de la teneur totale en lignines. Nous avons également montré que dans un contexte stable de teneur en lignines, alors de bonnes performances agronomiques des plantes étaient permises/accompagnées par une augmentation de la teneur en PC et par un enrichissement en liaisons β-O-4 au sein des lignines. Ainsi, la plasticité pariétale fait que pour compenser une absence de rigidification des parois par l'augmentation de la teneur en lignines alors la teneur en PC est augmentée, ainsi que la proportion en liaisons β-O-4 dans les lignines. Tous ces résultats vont dans le sens que PC est un facteur très important dans la performance de la paroi.

2.2. Mise en place de la lignification des parois au cours du développement

La teneur en lignines, même si sa variation est limitée, reste un facteur important et comme nous venons de le voir, la proportion de liaisons β-O-4 ainsi que la teneur en PC sont centrales pour expliquer les variations de dégradabilité de paroi. Nous allons revenir, dans ce qui suit, sur la mise en place de ces différentes composantes au cours du développement de la plante.

2.2.1. Mise en place des amorces de la lignification dans la paroi primaire

A des stades jeunes de développement, la lignification des parois n'est pas encore commencée et tout se concentre sur la formation de sites d'initiation dans la paroi primaire. Ces sites d'initiation résident dans la mise en place des acides féruliques estérifiés aux arabinoses des hémicelluloses. La formation de liaisons éthers entre FA et les alcools précurseurs des monolignols au niveau de la paroi se fait ensuite par réaction radicalaire hors d'un contrôle enzymatique (Grabber *et al.*, 1998a). Pendant cette première étape de lignification, la variabilité génétique de dépôt des amorces féruliques (FAest) dans les parois doit avoir de

l'importance (Figure V-1). Nous avons montré dans le chapitre IV de cette thèse que les FAest se déposent en quantité importante avant le début de lignification mais qu'ils continuent encore à se déposer pendant la lignification des parois secondaires.

Dans des études de modélisation *in vitro* de la lignification, l'équipe de Grabber a miné l'impact des réticulations par FA dans des parois primaires de maïs en lignification. Leurs analyses montrent que la dégradabilité *in vitro* est négativement affectée par l'augmentation de la réticulation par le FA (Grabber *et al.*, 1998b).

2.2.2. Mise en place des fractions condensées et non condensées des lignines

Une fois que la lignification se distribue dans la paroi secondaire, un focus a lieu sur la partie condensée des lignines. La variabilité génétique semble intervenir surtout au niveau de la vitesse de polymérisation des lignines riches en liaison C-C, et en même temps sur les composants co-déposés avec ces lignines de la paroi secondaire, comme le PC. Cette partie des lignines correspond à une proportion importante de la lignine totale et par conséquent la variabilité génétique sur ce paramètre contribue de façon importante à la variation de la teneur totale des lignines pariétales. La dernière étape de lignification des parois, dans le temps, est consacrée à l'allongement des lignines existantes. Aucun nouveau site d'initiation férulique n'est mis en place et la proportion de liaisons condensées dans les lignines n'augmente plus. Si l'on récapitule, l'effet génétique dans la lignification de la paroi secondaire touche essentiellement la composition monomérique des lignines, la structure de lignine (rapport de liaison C-C et β-O-4 dans la lignine) et le taux d 'incorporation des PC.

De nombreux travaux ont étudiés l'impact de modifications génétiques sur la structure et la composition des lignines ainsi que sur les conséquences sur la dégradabilité des parois. Ces études visent généralement des gènes de la voie de biosynthèse des lignines et la modification de ces gènes altère souvent le rapport S/G (Bernard-Vailhe *et al.*, 1996; Baucher *et al.*, 1999; Goujon *et al.*, 2003; Chen and Dixon, 2007; Jackson *et al.*, 2008) ou/et le rendement β-O-4 (Barriere *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2005). Dans ces études la diminution du rapport S/G ou/et la diminution du rendement β-O-4 peuvent être associées avec une augmentation de la dégradabilité. Cependant, dans certaines de ces études, une diminution importante de la teneur totale en lignines est rapportée. Donc, il est là encore difficile de conclure que l'amélioration de la dégradabilité est associée plutôt avec la diminution de la teneur totale des lignines

qu'avec la variation de la composition/structure des lignines (Goujon *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2005; Chen and Dixon, 2007). Par ailleurs, les lignines sont connues pour leur très grande plasticité. L'incorporation dans le polymère de sous unités «inhabituelles» lorsque les classiques H, G et S viennent à être moins disponibles peut être importante sans affecter pour autant la performance globale de la plante.

Des travaux récents ont proposé une autre possibilité d'altérer la structure des lignines, sans toucher aux gènes de la voir de biosynthèse des monolignols. En effet, Méchin et al. (2007) ont montré, par modélisation in vitro, que lorsque les monolignols sont mis à disposition rapidement, comme c'est le cas dans la paroi primaire et la première étape de la paroi secondaire, alors la formation de liaisons C-C entre les monomères est favorisée. Lorsqu'au contraire les monolignols sont apportés progressivement comme c'est le cas dans la deuxième étape de lignification de la paroi secondaire, la concentration locale de monomère n'est pas élevée, ce qui favorise la formation des liaisons β-O-4 entre les monomères (Jurasek, 1996 ; Méchin *et al.*, 2007). Entre les trois génotypes analysés dans notre étude cinétique, F7037 est un génotype qui commence à se lignifier précocement et rapidement, ce qui va dans le sens logique pour F7037 d'une le plus grande teneur en lignine riche en liaisons C-C. F7037 est trouvé le moins dégradable. F324 et F66 sont deux génotypes qui affichent la même teneur totale de lignines, cependant, F66 est un génotype qui se lignifie très lentement, ce qui va dans le sens d'une un peu plus forte proportion de lignines riches en liaisons β-O-4 et ce qui peut aussi participer à expliquer le fait que F324 soit plus dégradable.

Selon nous, la modulation de la structure des lignines via le processus de polymérisation peut être une piste pour améliorer la dégradabilité des parois. Jusqu'à présent, un tel facteur explicatif de la dégradabilité a été peu étudié, nous allons discuter de quelques suggestions pour l'avenir dans la partie relative aux futurs travaux à développer.

2.3. Variabilité génétique de la distribution spatiale des lignines au sein de l'entrenœud

Grâce à la méthode de quantification de la lignification au sein de la coupe d'entrenœud développée dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence, d'un point de vue spatial, des différences importantes des parois entre les régions observées des entrenœuds. Aux stades jeunes, le dépôt rapide de lignines riches en liaison C-C dans les parois primaires

et parois secondaires est similaire dans les régions épidermiques et médullaires. Pendant ce temps, une région peu lignifiée (appelée « bande bleue ») est également quantifiée entre ces deux régions. Une fois l'élongation de l'entre nœud terminée, le dépôt dans les parois secondaires de lignines à la fois riches en liaisons C-C et riches en liaisons β-O-4 n'a lieu que dans l'épiderme. Ainsi, au stade ensilage, le taux de lignification est le plus élevé dans l'épiderme suivi par la moelle, et le moins élevé dans la « bande bleue ».

Il a été suggéré que la structure anatomique des parois peut être plus importante que les facteurs biochimiques pour limiter la dégradabilité des parois car la structure anatomique influence l'accessibilité aux polysaccharides et impacte donc potentiellement la dégradabilité (Wilson and Mertens, 1995). Le développement différent des parois dans l'épiderme et dans la moelle contribue fortement à la variation de la dégradabilité entre les tissus de ces deux régions (Wilson, 1993; Jung and Casler, 2006a; Boon *et al.*, 2012). Cependant, jusqu'à présent, très peu d'études ont été menées sur la variabilité génétique pour cette structure anatomique des parois (Barros-Rios *et al.*, 2012; Hatfield and Chaptman, 2009). Dans ce travail, nous avons observé une variation génétique sur le dépôt dans les parois secondaires des lignines dans l'épiderme, et avons pu la relier avec la variation génétique de la dégradabilité. Nous avons indiqué que la lignification rapide est associée à un plus grand taux de lignification dans les tissus épidermiques qui conduit à un entrenœud moins dégradable. A notre connaissance, notre étude est la première à se pencher sur la question de la variabilité génétique et à quantifier dans ce détail la lignification au cours du développement. Cette variabilité génétique nous permet de comprendre d'un point de vue anatomique comment la lignification des parois, au sein d'un entre nœud, influence sa dégradabilité et nous aidera probablement pour retenir de nouveaux facteurs anatomiques en vue d'améliorer la qualité des fourrages.

2.4. Mise en place de *p*-coumaroylation des parois

L'incorporation de PC augmente spécifiquement avec la lignification des parois secondaires. En même temps, le taux d'unités S acylées par PC (%S-PC) augmente. Chez les graminées, PC est conjugué avec l'alcool sinapylique (S-PC) dans le cytosol. Ce processus est sous le contrôle des *p*-coumaroyl transférases. Pendant la lignification des parois, si l'activité de cette enzyme est constante, le facteur %S-PC estimé doit être constant aussi. Cependant, cette enzyme semble être plus active pendant la formation des parois secondaires, et présente une

activité maximum au cours du dépôt des lignines riches en liaisons β-O-4. Une autre façon de voir les choses pourrait consister à dire que les unités S-PC sont beaucoup plus impliquées dans la formation de liaisons β-O-4. Il est donc évident que le rôle de PC est crucial dans la lignification et dans la structure des lignines des parois secondaires. Il a été suggéré que la *p*-coumaroylation des sous unités S chez les graminées pourrait être un moyen de mieux incorporer les unités S dans les lignines puisqu'en effet les unités S seules forment assez difficilement des radicaux via l'action des oxydases. Un transfert de radical du radical *p*-coumarate vers les unités S serait favorisé et permettrait ainsi leur incorporation dans le polymère (Ralph *et al.*, 2004; Hatfield *et al.*, 2009). Ainsi plus il y a de PC acylé sur les lignines, plus les unités S seraient polymérisées facilement, et plus les lignines sont riches en unité S. Ceci est un phénomène général observé lors du développement des parois secondaires chez les graminées (Chen *et al.*, 2002 ; Jung and Caslet, 2006).

En outre, Barros-Rios *et al.*, (2012) ont rapporté une variabilité génétique de la composition pariétale des tissus de l'épiderme et de la moelle, et les ont relié avec la dégradabilité des parois. Il est intéressant de noter que, dans cette étude, la teneur en PC est plus élevée dans l'épiderme que dans la moelle, et que la corrélation entre la teneur en PC et la dégradabilité est aussi plus élevée dans l'épiderme. Ce résultat apporte un soutien à notre conclusion de l'effet de PC sur la lignification des parois secondaires.

2.5. Comparaison schématique de F324, F66 et F7037 au cours du développement

Nous avons repris le schéma présenté en Figure V-1 pour l'adapter à chacun des trois génotypes étudiés au cours du développement des plantes dans ce travail (Figure V-2). Nous avons, en pointillés jaunes, mis en avant les principales caractéristiques qui peuvent expliquer les différences de dégradabilité de paroi observées entre les trois lignées. F324 est la lignée la plus digestible au stade ensilage, suivie d'assez près par F66 alors que F7037 présente une dégradabilité réduite.

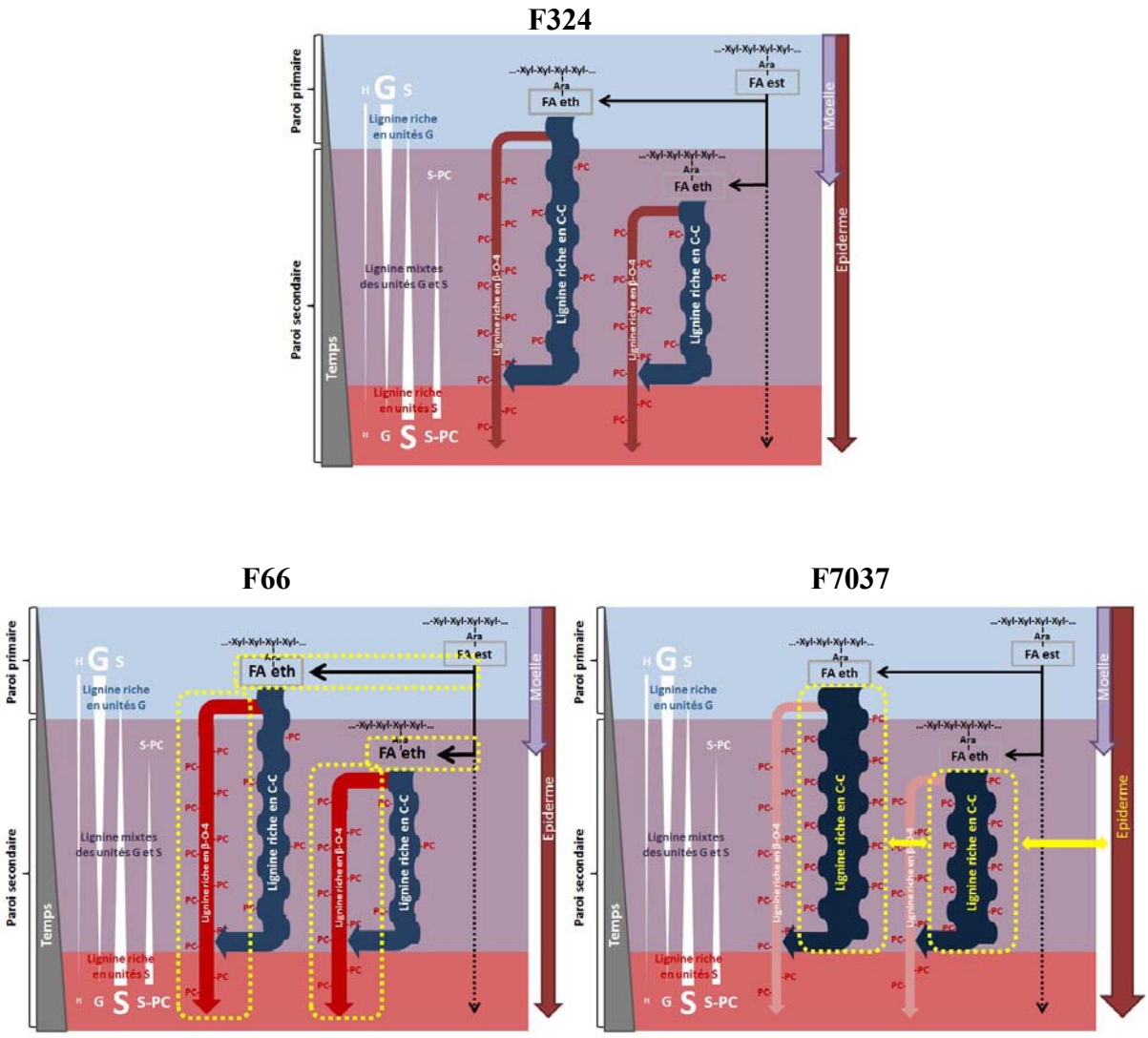


Figure V-2. Représentation schématique et synthétique des principales caractéristiques biochimiques et histologiques caractérisant les lignées F324 (de très bonne dégradabilité de paroi), F66 (de bonne dégradabilité de paroi) et F7037 (de faible dégradabilité de paroi). En pointillés jaunes sont soulignés les principaux points de divergence entre ces lignées de dégradabilités de parois différentes.

3. Travaux à poursuivre à plus ou moins long terme

3.1. Complément de l'analyse cinétique de la mise en place des parois

Nous avions à l'origine retenu 7 génotypes contrastés en termes de dégradabilité de paroi et assez semblables en termes de teneur en lignine pour réaliser cette étude au cours du développement. Des contraintes de temps nous ont amenés à n'analyser que 3 de ces 7 génotypes ce qui bien entendu diminue fortement notre puissance pour analyser les relations

entre les différents caractères. Bien que nous ayons observé des différences importantes entre les 3 lignées pour les profils de mise en place des parois, pour les facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux ainsi que pour la dégradabilité des parois, nous n'avons pas pu aller aussi loin que nous l'aurions souhaité. Il sera donc intéressant de continuer l'analyse sur les 4 génotypes qui restent, afin de remplir complètement l'objectif de départ et pouvoir regarder dans une base génétique plus large que celle visée dans le chapitre III de ma thèse si les deux facteurs biochimiques identifiés (proportion de liaisons β-O-4 et teneur en PC) étaient toujours de bons paramètres explicatifs des variations de dégradabilité de paroi. Cette étude complète nous permettra également d'élargir notre analyse histologique et d'avoir plus de puissance pour déceler les paramètres anatomiques clés pour moduler la dégradabilité des parois.

3.2. Démonstration de l'effet de la proportion de liaisons β-O-4 sur la dégradabilité

Dans ma thèse, la teneur en liaisons β-O-4 au sein des lignines est l'un des principaux facteurs explicatifs des variations de dégradabilité des parois. Pour expliquer cette relation, nous avons émis l'hypothèse, en nous appuyant sur les travaux de Besombes et Mazeau (2005), que les liaisons β-O-4 conduisent à des polymères plus linéaires qui de ce fait s'adsorbent plus facilement sur les chaînes de polysaccharides. Les enzymes arrivent donc plus difficilement à accéder aux polysaccharides et ainsi la dégradabilité peut être diminuée. Si cette hypothèse est vraie, une augmentation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère lignine peut entrainer une diminution de la capacité d'adsorption spécifique des cellulases au sein du résidu.

Comme mentionné, j'ai, en fin de thèse, souhaité confirmer cette hypothèse d'adsorption des cellulases en relation avec l'augmentation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère. La stratégie de cet essai a été discutée dans la conclusion du chapitre III. Dans un premier temps, j'ai essayé de transférer le protocole de Heiss-Blanquet et al. (2011) dans notre laboratoire. Cependant, j'ai rencontré quelques difficultés quant à la répétabilité de l'adsorption des enzymes sur les matières sèches des échantillons. Je n'ai pas réussi à définir les conditions favorables (concentration d'enzyme, temps de réaction, etc.…) pour l'adsorption complète de ces cellulases. Il serait toujours intéressant de relancer cet essai de test d'adsorption dans le futur, en utilisant peut être cette fois des enzymes purifiées ou en utilisant des méthodes de dosage plus sensibles (par ex : ELISA) afin d'éviter les problèmes

que nous avons rencontrés. Quand le transfert le protocole sera effectif, il sera possible de caractériser le matériel que nous avions retenu à cet effet pour essayer de conclure sur l'implication de la proportion de liaisons β-O-4 dans les lignines sur cette adsorption. Ensuite, ce paramètre de « capacité d'adsorption des cellulases » pourra aussi être utilisé couramment dans les futures études.

D'autre part, nous avons montré qu'au sein de la paroi, la teneur totale en lignines est associée avec la partie des lignines riche en liaison C-C. Cette partie de lignine limite moins la dégradabilité par rapport aux lignines riches en liaisons β-O-4. Cependant, dans notre étude cinétique nous observons assez peu de variations pour la mise en place des rendements β-O-4. Donc il serait intéressant de pouvoir lancer une analyse cinétique sur du matériel qui présenterait une plus large gamme de variation, afin de comprendre le mécanisme qui contrôle la structure des lignines. Dans un premier temps, il faut sélectionner des plantes qui présentent une même teneur en lignines riches en liaisons C-C mais des teneurs contrastées en lignines riches en liaisons β-O-4. Ensuite, l'analyse biochimique et anatomique de ces plantes nous aidera à comprendre le mécanisme qui contrôle la structure des lignines, quels autres facteurs pariétaux participent à cette mise en place et également à comprendre la relation entre la mise en place de lignines riches en liaisons β-O-4 et la dégradabilité.

3.3. Mise en évidence de l'effet de l'acide *p*-coumarique sur la performance des parois secondaires

Suite aux résultats que nous avons obtenus sur l'impact de l'acide *p*-coumarique sur la dégradabilité des parois, nous proposons ici un projet qui se focaliserait sur la fonction des PC dans le développement des parois secondaires.

3.3.1. Analyse des relations entre PC et lignification des parois secondaires

La première étape de ce projet viserait à analyser la relation entre PC et la mise en place des parois secondaires. Pour atteindre cet objectif, nous suggérons d'utiliser les tissus épidermiques d'entre nœud. Tout d'abord, nous avons montré que l'entre nœud en développement est un bon modèle pour étudier le développement des parois. Ensuite les tissus épidermiques présentent des profils extrêmes de développement des parois secondaires, dans

ma thèse nous avons rapporté une variabilité génétique pour ces développements des parois secondaires dans l'épiderme. C'est pourquoi nous pensons qu'il s'agit là d'un bon modèle pour notre objectif.

Des méthodes de microdissection physique des tissus suivie par une analyse biochimique approfondie ont été largement utilisées pour caractériser différents tissus au sein des entrenœuds (Chesson *et al.*, 1997; Angeles *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2008; Ruel *et al.*, 2009a). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'analyser de façon approfondie les différentes composantes pariétales de différents tissus ciblés. Il serait intéressant de s'engager dans ce type d'étude.

Notre stratégie sera, tout d'abord, de sélectionner un matériel végétal qui présente une bonne variation du développement des parois secondaires dans l'épiderme. Cette étape pourra être réalisée à l'aide de la méthode de quantification des tissus lignifiés sur coupes colorées développée dans Chapitre IV-2.1. Nous sélectionnerons donc des plantes qui présentent un taux de lignification similaire au stade jeune (paroi primaire similaire) mais contrasté dans l'épiderme à stade mature afin de couvrir une gamme important du développement des parois secondaires. Il conviendra ensuite de microdisséquer l'entre nœud de ces plantes et de collecter les tissus épidermiques. Ensuite, nous lancerons les analyses biochimiques nécessaires avant d'étudier la relation entre la teneur en PC et la lignification des parois secondaires. Nous pensons ainsi pouvoir expliquer des variations de la lignification des parois secondaires par des différences dans le dépôt de PC.

3.3.2. Amélioration de la dégradabilité de paroi via l'acylation par PC

Si la lignification des parois secondaires est effectivement expliquée en partie par le PC estérifié, la modulation de l'acylation des lignines par PC nous semble être une étape logique. Cette approche pourra aussi être un premier pas vers la mise à jour de candidats afin d'amélioration la dégradabilité de paroi. Comme mentionné à plusieurs reprises, Ralph et al. (1994a) ont démontré que PC est exclusivement attaché à la position C-9 (ou γ) des monolignols et non à la position C-7 (ou α) des monolignols. L'attachement à la position C-7 exigerait simplement que l'acide soit présent pendant le processus de lignification et soit attaché spontanément sans préférence pour les alcools conifférylique ou sinapylique. Comme il n'y a pas de PC attaché au C-7 détectable, on peut éliminer la possibilité que du PC libre se

trouve dans la paroi cellulaire au cours de lignification. De plus, il y a une nette préférence lors de ce transfert pour l'alcool sinapylique plutôt que pour l'alcool conifé rylique en tant que molécule acceptrice (Grabber *et al.*, 1996a; Lu and Ralph, 1999). La préférence de l'alcool sinapylique comme site de fixation pour le PC soutient l'idée que nous sommes confrontés à un processus métabolique contrôlé. En fonction de tous ces résultats, l'étape enzymatique d'acylation des monolignols par l'acide *p*-coumarique dans le cytosol est cruciale pour le dépôt des PC dans la paroi.

Withers et al. (2012) ont récemment montré qu'une BAHD (pour benzylalcohol O-acetyltransferase, anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransferase, anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyl transferase, and deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase) acyltransferase de riz catalyse l'acylation des monolignols par l'acide *p*-coumarique sous sa forme *p*-coumaroyl-CoA. Il sera intéressant de rechercher un gène orthologue qui s'exprime chez maïs et de créer des mutants sur-expresseurs ou sous-expresseurs de ce gène. En parallèle, et pour le même objectif, il peut aussi être intéressant de doser l'activité des enzymes codées par ces gènes BAHD dans le matériel végétal sélectionné pour la première partie de ce projet, afin de relier le développement des parois secondaires au sein de ce matériel avec l'activité des enzymes acyltransférases. Une fois que ces gènes impliqués dans le développement des parois secondaires seront identifiés et clonés, une amélioration de la dégradabilité via leur sur/sous-expression sera envisageable.

4. Comment moduler les différentes cibles mises à jour dans cette étude et aller vers une amélioration de la dégradabilité des parois

L'objectif premier de mon travail était de mettre à jour des facteurs biochimiques et/ou histologiques permettant d'expliquer des variations de dégradabilité de paroi lorsque les variations de teneur en lignines sont limitées. J'ai ainsi mis en avant deux cibles majeures : la proportion d'unités β-O-4 dans les lignines et la *p*-coumaroylation de ces lignines. Avoir mis en évidence de la variabilité génétique pour ces caractères au sein des matériels étudiés est un point crucial, reste maintenant à voir par quels moyens nous pourrions moduler ces paramètres au sein des plantes pour aller vers une amélioration de leur dégradabilité.

En effet, il est relativement simple de diminuer la teneur en lignines et beaucoup d'études sur mutants et/ou transformants en font la démonstration dans diverses espèces, il est assez

possible d'envisager une modification des proportions d'unités S et G dans les lignines en jouant là encore sur un gène bien choisi de la voie de biosynthèse des lignines mais déjà beaucoup moins trivial de jouer d'une part sur la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère ou bien encore sur la proportion d'unités S portant un acide *p*-coumarique et d'autre part d'atteindre ces cibles sans pour autant diminuer de façon drastique la teneur en lignines en même temps.

La sélection de géniteurs biochimiquement adaptés dans des fonds élites pourrait certainement être une solution assez simple et tout à fait envisageable. L'étude approfondie de ces idéotypes pourrait d'ailleurs nous permettre de mieux appréhender les mécanismes qui permettent la formation d'une paroi dégradable assez lignifiée mais dont les lignines sont relativement pauvres en liaisons non condensées et dont la *p*-coumaroylation est également limitée et qui présentent une lignification épiderme versus moelle adéquate; génotype qui par ailleurs conservent de bonnes qualités agronomiques.

Si l'on veut essayer de « produire » ces génotypes en jouant nous même sur la plasticité pariétale et en même temps comprendre les mécanismes pariétaux qui conduisent à la formation de lignines riches en liaisons β-O-4 et fortement *p*-coumaroylées nous pouvons envisager d'autres approches.

4.1. Modulation de la proportion de liaisons β-O-4 au sein du polymère

Chez le maïs, les mutants bm1 et bm3 (Barrière et *al.*, 2004) présentent une diminution de la proportion des liaisons β-O-4. Parmi le mutants bm de maïs apparus récemment, le mutant bm5 présente d'excellente potentialité aussi bien en termes de dégradabilité de paroi qu'en termes de compréhension des mécanismes de lignification. Ce mutant présente une diminution de sa proportion de liaisons β-O-4 mais ses deux plus extravagantes modifications résident dans son S/G très élevé et dans ses faibles teneurs en PCest et en FAeth (résultats de l'équipe non publiés). C'est bien là le biais de ces mutants, qui sont perturbés sur l'ensemble de leur métabolisme pariétal et qui par conséquent ne nous permettent pas de répondre à notre question dans le cas présent. C'est d'ailleurs dans cette famille de mutants bm que Vermerris et al. (2010) ont testé jusqu'où nous pouvions pousser la plasticité pariétale. Le double mutant bm2bm4 semble être la limite au delà de laquelle la viabilité des plantes n'est plus assurée.

C'est pourquoi nous aimerions pouvoir toucher la biosynthèse des lignines « plus loin » dans la voie afin de ne pas modifier d'autres paramètres structuraux.

Dans des travaux récents de modélisation *in vitro* de la synthèse de lignines, Méchin et al. (2007) ont montré que la simple modification de la quantité de peroxidase disponible *in vitro* permettait de moduler la structure finale du polymère lignine synthétisé. Si l'on regarde, in planta, le pattern de distribution des peroxidases (Wi *et al.*, 2005) nous pensons que la forte activité peroxidase rencontrée dans la lamelle moyenne est partie prenante dans la présence de lignines très condensées dans cette région et que ce ne sont pas seulement des concentrations en monolignols, des types de monolignols, des effets de matrice (Wi et al., 2005) ou l'intervention de laccases (Sterjiades *et al.*, 1993; Donaldson, 2001b) qui expliquent cette structure particulière. Dans les phénomènes de stress, une forte expression des peroxidases a été mise en évidence en parallèle d'une production de lignines hautement condensées (Cabane *et al.*, 2004). Ces travaux, *in vitro* comme *in planta*, montrent que la disponibilité en peroxidase permet de modifier en partie les types de liaisons mises en place entre les monomères de lignine. Les peroxidases, comme les laccases sont potentiellement impliquées dans la lignification pour réaliser la formation de radicaux. Nous pourrions, dès lors que nous serons un peu plus avancés sur la caractérisation de ces enzymes appartenant à de grandes familles multigéniques, envisager de jouer sur leur disponibilité pour réussir à moduler la proportion de liaisons β-O-4 dans le polymère. Une production augmentée de ces enzymes dans l'ensemble de la plante ou dans certains tissus nous inviterait à diminuer la proportion de liaisons β-O-4.

Dans la suite de travaux de modélisation *in vitro* développés dans l'équipe, nous avons montré par un suivi cinétique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) et par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC) d'hétéropolymérisation (unités S + unités G, 50/50) que les unités S sont incorporées dans les lignines grâce au transfert de radical depuis les radicaux G (Demont-Caulet *et al.*, 2010). C'est également l'une des « fonction » qui est accordée au PC porté par les sous unités S. En effet, le PC transférerait son radical aux sous-unités S permettant ainsi leur incorporation dans le polymère (Hatfield et *al.*, 2008). Dans ce travail, Demont-Caulet et al. (2010) ont surtout montré que les premières réactions de dimérisation sont très rapides et donnent lieu à des liaisons condensées. Dès lors que les dimères sont formés, l'apparition et la disparition des autres espèces oligomériques se fait beaucoup plus lentement et le dimère syringarésinol est prioritairement allongé. Tous les oligomères de degré de polymérisation > 2 comportent au

moins une liaison β-O-4. Un mécanisme réactionnel de type bulk favorisent la formation de liaison C-C dans les lignines contrairement aux mécanismes de type endwise (Brunow *et al.*, 1998). Ce mode de polymérisation bulk est favorisé dès lors que de nombreux radicaux phénoxy sont en présence. Ainsi, lorsque nous avons une disponibilité forte en monomères de lignines, nous avons une plus forte proportion de liaisons condensées (comme cela est également le cas lors de la synthèse de lignines de stress). Une autre voie pour moduler l'incorporation de liaisons β-O-4 dans les lignines pourrait résider dans les mécanismes d'export à la paroi des monolignols. Lors de l'étude protéomique du mutant bm2 en comparaison avec son isogénique normal (résultats non publiés) nous avons montré dans l'équipe que seuls 5 spots protéiques varient en intensité. Trois de ces 5 spots ont pu etre identifiés. Parmi ces identifications, une β-glucosidase aggregating factor (BGAF) a été identifiée. La BGAF est une protéine spécifique des graminées qui agrège et précipite les β-glucosidases (Kittur *et al.*, 2007). Les β-glucosidases sont ainsi protégées des protéases et maintenues actives sur leur site d'action où elles peuvent décrocher le sucre greffé sur l'alcool dans le cytosol préalablement au transport de celui-ci à la paroi. Nous pourrions imaginer qu'un controle fin de ces β-glucosidases pourrait permettre de libérer plus ou moins vite les alcools G et/ou S après leur transport pour qu'ils entrent en polymérisation. Les deux autres spots identifiés correspondent à des monodehydroascorbates (MDA) réductases qui sont impliquées, entre autres choses, dans la régénération de phénols à partir de leurs radicaux (Sakihama *et al.*, 2000). On pourrait ainsi envisager de moduler l'incorporation des différents monomères et par là même la structure du polymère en jouant sur cet équilibre radicalaire.

C'est cette partie terminale de la voie de biosynthèse, qu'il s'agissent des oxydases ou des enzymes intervenant dans le transport/libération et utilisation de radicaux des sous unités S et G dans la paroi, que nous aimerions cibler pour pouvoir modifier les liaisons mises en place au sein des lignines sans bouleverser le reste de la paroi. Nous sommes conscients qu'il s'agit également d'une partie mal connue de cette voie de biosynthèse.

Comme Vermerris et Boon (2001) le suggéraient, un facteur de transcription pourrait, chez bm2, être responsable du chamboulement pariétal. Depuis, un travail de thèse dédié à l'identification du gène *BM2 (Tang, 2011)* a montré qu'il s'agirait à priori d'une methylenetetrahydrofolate reductase qui génère du 5-CH_3-THF dont le groupement méthyl est utilisé pour produire de la Met à partir de hCys. La Met peut alors être utilisée pour produire de la SAM, donneur de groupement méthyl connu pour son implication dans les étapes de méthylation qui ont lieu lors de la synthèse des monolignols et/ou dans la synthèse des

flavonoïdes, comme celles catalysées par la cOMT. Il n'en reste pas moins, que l'impact d'un facteur de transcription sur le métabolisme pariétal pourrait être intéressant à tester pour évaluer les modifications en termes de proportion de liaisons β-O-4.

Enfin, depuis les travaux de Davin LB et Lewis HG à la fin des années 1990 (Davin *et al.*, 1997) et au début des années 2000 sur la potentielle implication de protéines dirigentes dans la polymérisation des lignines pour moduler les processus de couplages radical-radical, un débat assez hostile et décevant au sein de notre communauté à remplacer cette question passionnante. De ce fait, la preuve n'a pas été faite que des protéines dirigentes pourraient intervenir de concert avec les oxydases pour orienter le patterning des liaisons recrutées lors de la formation du polymère. Cette voie reste cependant très séduisante et nous n'excluons pas qu'il soit possible un jour de jouer de cette façon-là sur la proportion de liaisons β-O-4 dans les lignines.

4.2. Modulation de la *p*-coumaroylation

Comme nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises tout au long de ce manuscrit, cette *p*-coumaroylation est une spécificité forte des lignines de graminées et touche principalement les sous unités S. Ces sous unités S sont ainsi, via transfert de radical depuis le radical *p*-coumarate, incorporées avec beaucoup plus de facilité dans le polymère (Hatfield et al., 2008).

Nous avons montré qu'une teneur réduite en PC permet une meilleure dégradabilité de paroi. Cette diminution de la *p*-coumaroylation des sous unités S des lignines devrait également jouer sur leur incorporation dans le polymère et comme nous avons montré que ces sous unités *p*-coumaroylées se retrouvaient plus dans la lignine non condensée nous pouvons penser que la baisse de la *p*-coumaroylation pourrait conduire à une amélioration directe de la dégradabilité et indirecte via une baisse de la proportion de liaisons β-O-4 dans les lignines.

La cible S-PC semble donc particulièrement intéressante. On peut envisager pour diminuer la quantité présente jouer ou bien sur une baisse de la synthèse de sous unités S ou bien sur la production de PC ou bien encore sur l'enzyme qui permet l'accrochage de PC sur les sous unités S. Le mutant bm3 peut ainsi apparaître comme un excellent modèle. Il affiche une forte diminution de ses sous-unités S et également une baisse de teneur en PC. Cependant si nous estimons le pourcentage d'unités S acylé par PC chez les mutants bm (Figure V-3, travaux

non publiés réalisés dans l'équipe) il s'avère que le mutant bm3 présente un taux beaucoup plus élevé que ses autres isogéniques.

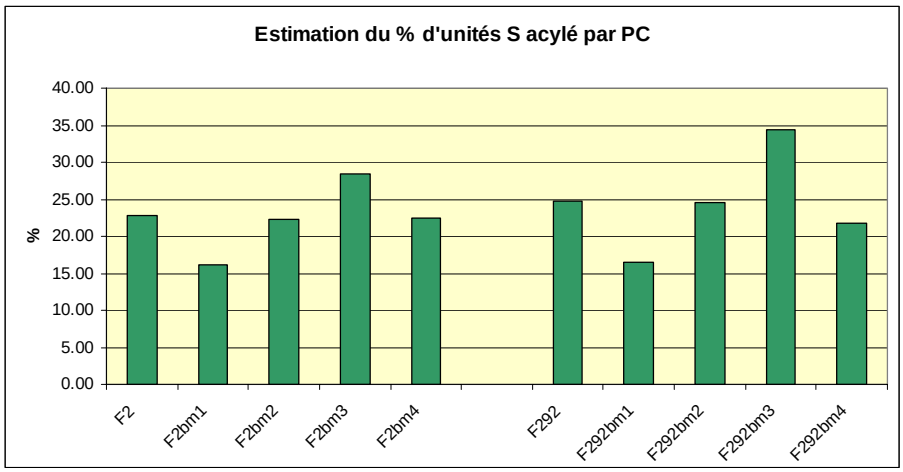


Figure V-3. Pourcentage d'unité S acylé par *p*-coumarate (%S-PC) dans deux familles isogéniques bm (fonds génétiques F2 et F292).

Il est peut être plus judicieux de ce fait d'intervenir directement sur l'étape qui permet le greffage du PC sur les sous unités S. Nous pensons donc que les enzymes qui permettent ce greffage sont de bonnes cibles en termes de transformations, de mutations ou encore de choix d'allèles dans la variabilité naturelle pour améliorer la dégradabilité des parois.

Hatfield et al. (2009) ont montré que chez le maïs, la *p*-coumaroylation est réalisée à partir de monolignols et de *p*-coumaroyl-CoA. Cette même équipe a récemment identifié et caractérisé une enzyme du riz, spécifique des graminées, qui réalise l'acylation des monolignols par l'acide *p*-coumarique (Withers *et al.*, 2012). Cette BADH acyltransférase exprimée chez *E. Coli* catalyse bien le transfert attendu avec une forte affinité pour le *p*-coumaroyl-CoA. Afin de pouvoir conclure totalement sur la fonction de cette enzyme des mutants KO et des plantes qui sur-expriment cette BADH acyltransférase chez les graminées sont maintenant indispensables.

Nous pourrions tirer profit de la collection de mutants tillés de Brachypodium *distachyon* développée par R. Sibout à l'IJPB de Versailles pour rechercher puis étudier chez cette graminée modèle les gènes orthologues de ceux mis à jour chez le riz. De telles plantes

seraient idéales pour étudier la modification de *p*-coumaroylation si elle a bien lieu et par la suite l'impact de cette modification sur les propriétés d'usage de ces parois. Les collections publiques de mutants de maïs devront aussi être interrogées pour voir si de tels mutants pourraient être disponibles chez le maïs. Des transformations peuvent aussi être envisagées.

Dans le même esprit que la stratégie utilisée par Jung et Phillips (2010) autour de la féruloylation, nous aimerions pouvoir screener par NIRS une collection mu (transposon tagging) de maïs sur la caractère teneur en acide *p*-coumarique estérifié. Les plantes retenues sur la base de ce phénotype auraient en plus l'énorme avantage de pouvoir nous renseigner sur le(s) gène(s) impactés. Dans le cadre de différents projets notre équipe a eu l'occasion a plusieurs reprises de travailler avec Biogemma sur leur collection de mutants mu de maïs et une nouvelle collaboration pourrait être envisagée autour de cette question relative à la p-coumaroylation. Dans ce travail nous pourrions rechercher des plantes avec de faibles à très faibles teneurs en PC mais aussi des plantes avec de fortes teneurs en PC. Cela peut sembler contraire à ce que nos résultats montrent mais comme l'ont proposé Jung et al. (2012) les *p*-coumarates liés aux lignines pouvaient agir comme des groupes terminaux et de ce fait limiter la taille des lignines. Par conséquent, les polymères « lignines » plus petits pourraient être moins couvrants pour les polysaccharides et limiteraient moins l'accès des enzymes aux polysaccharides. L'utilisation de plantes adaptées à nos questions sur l'impact de la *p*-coumaroylation pourrait nous permettre de trancher sur ces questions. Nous pourrions ainsi peut être envisager soit l'utilisation de plantes à très fortes teneurs en PC et par conséquent à réseau ligneux très morcelé ou bien au contraire de plantes à teneur limitée en PC et par conséquent à réseau ligneux faiblement *p*-coumaroylé et moins inhibiteur.

4.3. Distribution ciblée de la lignification au sein des différents tissus

Nous l'avons vu, la plasticité pariétale est large mais il ne faut pas oublier en la poussant à son maximum qu'il faut aussi assurer l'intégrité de la plante et lui permettre d'atteindre des performances agronomiques dignes de ce nom. Nous avons montré dans notre travail que cela était tout à fait concevable dès lors que l'on prenait en compte ces qualités agronomiques en même temps que celles liées à la qualité des parois.

Une autre façon de maintenir les propriétés mécaniques et les performances agronomiques des plantes tout en améliorant la dégradabilité pourrait résider dans une régulation spatiale plus

fine de la lignification/*p*-coumaroylation des parois. Dans notre étude, nous avons montré que nous pouvions suivre la lignification au niveau du parenchyme médullaire et de l'épiderme. Ce suivi fin devra être étendu à un set de lignées plus large afin de gagner en puissance d'analyse pour étudier les relations entre dégradabilité et taux de lignification dans différentes zones d'une tige de maïs. Ces approches, grâce à l'analyse d'image automatique, pourront être étendues à des populations de lignées recombinantes afin d'étudier le déterminisme génétique pour ces caractères.

En parallèle des travaux d'immunocytochimie devront être développés pour aller plus loin dans notre compréhension de la lignification à l'échelle de la tige. Des marquages anticorps spécifiques de l'acide *p*-coumarique couplés aux sous unités S, de l'acide férulique pontant hémicelluloses et lignines ainsi que des dimères féruliques seront une étape supplémentaire vers cette compréhension qui pourra nous ouvrir de nouvelles pistes d'amélioration quant aux zones et aux tissus dont la lignification garantit de bonnes performances agronomiques sans pour autant limiter la dégradabilité des parois. Une bonne connaissance de la mise en place de la lignification/feruloylation/*p*-coumaroylation à l'échelle des tissus et avec une dynamique temporelle nous permettra d'envisager la sélection d'idéotypes particulièrement adaptés en qualité de paroi, en potentiel agronomique et nous pourrons même étendre la question à des résistances à des stress biotiques et/ou abiotiques et notamment à la tolérance à la sécheresse.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La teneur en lignines apparaît inlassablement comme le premier facteur explicatif des variations de dégradabilité de paroi quelle que soit l'espèce végétale considérée. Cependant, une diminution drastique de cette teneur en lignines ne permet plus à la plante d'assurer des performances agronomiques respectables et la rend sensible aux agressions biotiques et abiotiques. Dans le cadre de ce travail, nous avons souhaité rechercher quels facteurs biochimiques et/ou anatomiques pouvaient permettre, pour une teneur fixée en lignines, d'expliquer des variations importantes de dégradabilité de paroi.

Sur le plan méthodologique, nous avons comparé et rediscuté les relations entre l'estimation de la teneur en lignines par la méthode Klason ou par la méthode Van Soest. Ce travail est une partie de l'article publié dans JAFC (Zhang *et al.*, 2011). Nous avons conclu que, chez les graminées, la lignine Klason était représentative de la lignine totale de la paroi alors que la lignine ADL Van Soest était plutôt représentative de la lignine de cœur plus fortement condensée.

Nous avons également développé une méthode d'analyse d'image automatique de coupes de maïs colorées au Fasga. Ce travail est soumis pour publication dans JAFC (Zhang *et al.*, soumis). Cette méthode nous permet dorénavant de suivre le profil de lignification tout au long de la coupe. Cette analyse spatiale de la distribution des lignines nous a permis de définir deux zones clés de lignification : la zone épidermique et la zone médullaire. Un suivi de taux de lignification au cours du développement des plantes a ainsi été réalisé dans ces deux régions.

Dans la première partie de mon travail de thèse, j'ai travaillé sur 10 génotypes choisis au sein d'une population de lignées recombinantes pour leur teneur en lignine comparable alors qu'ils couvraient une gamme importante de variation en termes de dégradabilité de paroi. Il y a trois ans, nous avons commencé ce travail avec un très fort a priori. Nous étions assez convaincus que dans un tel matériel, les différences de dégradabilité de paroi allaient être expliquées par les pontages féruliques entre lignines et hémicelluloses. Les conclusions de notre étude sont toutes autres, la proportion de liaisons β-O-4 au sein des lignines ainsi que la *p*-coumaroylation sont les deux facteurs majeurs qui expliquent les variations de dégradabilité de paroi. Ce travail fait l'objet d'une publication dans JAFC (Zhang *et al.*, 2011).

Dans la seconde partie de ma thèse j'ai étudié la mise en place des parois d'un point de vue biochimique et histologique en comparant trois lignées de maïs de dégradabilités de paroi différentes et de teneurs en lignines comparables. Nous avons mis en évidence trois étapes majeures au cours du développement : 1) une première étape de dépôt rapide des parois primaires associée à la mise en place des amorces féruliques, 2) une deuxième étape de dépôt de rapide des parois secondaires associée au dépôt de lignines riches en liaisons C-C et 3) une troisième étape caractérisée par l'allongement lent des lignines existantes avec une incorporation principale de liaisons β-O-4 et une forte proportion d'unités S et d'acide *p*-coumarique.

D'un point de vue spatial au sein de la coupe d'entrenœud de maïs, nous avons mis en évidence un co-dépôt dans la moelle et dans l'épiderme des parois lignifiées aux stades jeunes puis dès la fin de l'allongement de l'entrenœud une lignification qui continue à se faire principalement dans l'épiderme.

Grace à l'ensemble des résultats obtenus, nous avons pu proposer des cibles privilégiées à viser pour améliorer la dégradabilité des parois sans pour autant diminuer la teneur en lignines et par là même toucher rapidement l'intégrité de la plante. Nous avons également considéré ces résultats en regard de la possibilité d'améliorer conjointement les performances en termes de qualité de paroi mais aussi en termes agronomiques. En gardant à l'esprit cette dualité, nous avons montré qu'il était tout à fait envisageable avec les cibles que nous proposons, proportion de liaisons β-O-4 au sein des lignines et teneur en acide *p*-coumarique, d'atteindre ce double objectif.

Enfin, nous avons terminé ce manuscrit en discutant de diverses possibilités envisageables en termes de sélection/amélioration du matériel végétal existant.

REFERENCES

Achyuthan KE, Achyuthan AM, Adams PD, Dirk SM, Harper JC, Simmons BA, Singh AK. 2010. Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. *Molecules* **15**, 8641-8688.

Akin DE. 1993. Perspectives of Cell Wall Biodegradation—Session Synopsis. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 73-82.

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

Argillier O, Barriere Y. 1996. Taking feeding value into account for the registration of silage maize cultivars in official lists in Europe. *Fourrages*, 131-140.

Argillier O, Barriere Y, Hebert Y. 1995. Genetic variation and selection criterion for digestibility traits of forage maize. *Euphytica* **82**, 175-184.

Argillier O, Barriere Y, Lila M, Jeanneteau F, Gelinet K, Menanteau V. 1996. Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. *Agronomie* **16**, 123-130.

Barriere Y, Argillier O. 1993. Brown-midrib genes of maize: a review. *Agronomie* **13**, 865-876.

Barriere Y, Gallais A, Berthet H. 1988. Breeding maize for silage use with the brewn-midrib-3 .2. recurrent breeding of synthetics. *Agronomie* **8**, 625-631.

Barriere Y, Guillet C, Goffner D, Pichon M. 2003. Genetic variation and breeding strategies for improved cell wall digestibility in annual forage crops. A review. *Animal Research* **52**, 193-228.

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

Barriere Y, Traineau R, Emile JC, Hebert Y. 1991. Variation and covariation of silage maize digestibility estimated from digestion trials with sheep. *Euphytica* **59**, 61-72.

Barros-Rios J, Santiago R, Malvar RA, Jung H-JG. 2012. Chemical composition and cell wall polysaccharide degradability of pith and rind tissues from mature maize internodes. *Animal Feed Science and Technology* **172**, 226-236.

Baskin TI. 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 21, 203-222.

Baucher M, Bernard-Vailhe MA, Chabbert B, Besle JM, Opsomer C, Van Montagu M, Botterman J. 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Molecular Biology* **39**, 437-447.

Baumont R, Aufrère J, Meschy F. 2009. La valeur alimentaire des fourrages : rôle des pratiques de culture, de récolte et de conservation. *Fourrages*, 153-173.

Beaugrand J, Croner D, Debeire P, Chabbert B. 2004. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *Journal of Cereal Science* **40**, 223-230.

Bernard-Vailhe MA, Cornu A, Robert D, Maillot MP, Besle JM. 1996. Cell wall degradability of transgenic tobacco stems in relation to their chemical extraction and lignin quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1164-1169.

Bernard-Vailhe MA, Provan GJ, Scobbie L, Chesson A, Maillot MP, Cornu A, Besle JM. 2000. Effect of phenolic structures on the degradability of cell walls isolated from newly extended apical internode of tall fescue (Festuca arundinacea Schreb.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 618-623.

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

Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 519-546.

Bonawitz ND, Chapple C. 2010. The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. In: Campbell A, Lichten M, Schupbach G, eds. *Annual Review of Genetics*, Vol. 44, 337-363.

Boon E, Engels FM, Struik PC, Cone JW. 2005. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. II. Relation between in vitro rumen fermentation characteristics and anatomical and chemical features within a single internode. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **53**, 87-109.

Boon EJMC, Struik PC, Engels FM, Cone JW. 2012. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. IV. Changes during the growing season in anatomy and chemical composition in relation to fermentation characteristics of a lower internode. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **59**, 13-23.

Boon EJMC, Struik PC, Tamminga S, Engels FM, Cone JW. 2008. Stem characteristics of two forage maize (Zea mays L.) cultivars varying in whole plant digestibility. III. Intra-stern variability in anatomy, chemical composition and in vitro rumen fermentation. *Njas-Wageningen Journal of Life Sciences* **56**, 101-122.

Boudet AM. 1998. A new view of lignification. *Trends in Plant Science* **3**, 67-71.

Boudet AM, Lapierre C, Grimapettenati J. 1995. Tansley review No. 80. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist* **129**, 203-236.

Bowes PC, Thomas PH. 1966. Ignition and extinction phenomena accompanying oxygen-dependent self-heating of porous bodies. *Combustion and Flame* **10**, 221-230.

Brett CT. 2000. Cellulose microfibrils in plants: Biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. In: Jeon KW, ed. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol. 199. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 161-199.

Brett CT, Waldron KW. 1996. The molecular components of the wall. *In:* Physiology and biochemistry of plant cell walls (eds M. Black & B. Charlwood). *Chapman & Hall, London*, pp. 4-43.

Brown RM. 1996. The biosynthesis of cellulose. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **33**, 1345-1373.

Brown RM. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **42**, 487-495.

Browning B. 1967. Methods of Wood Chemistry. *Vols. I and II. John Wiley and Sons. New York.*

Brunow G, Kilpelainen I, Sipila J, Syrjanen K, Karhunen P, Setala H, Rummakko P. 1998. Oxidative Coupling of Phenols and the Biosynthesis of Lignin. *In* Lignin and Lignan Biosynthesis. American Chemical Society, Washington, DC. 131-147.

Bunzel M, Ralph J, Funk C, Steinhart H. 2005. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* **46**, 5845-5850.

Bunzel M, Ralph J, Marita JM, Hatfield RD, Steinhart H. 2001. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 653-660.

Buxton DR, Russell JR. 1988. Lignin Constituents and Cell-Wall Digestibility of Grass and Legume Stems. *Crop Science* **28**, 553-558.

Cabane M, Pireaux JC, Leger E, Weber E, Dizengremel P, Pollet B, Lapierre C. 2004. Condensed lignins are synthesized in poplar leaves exposed to ozone. *Plant Physiology* **134**, 586-594.

Canbolat O. 2012. Comparison of in vitro Gas Production, Organic Matter Digestibility, Relative Feed Value and Metabolizable Energy Contents of Some Cereal Forages. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* **18**, 571-577.

Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* **3**, 1-30.

Casler MD. 2005. Agricultural fitness of smooth bromegrass populations selected for divergent fiber concentration. *Crop Science* **45**, 36-43.

Casler MD, Buxton DR, Vogel KP. 2002. Genetic modification of lignin concentration affects fitness of perennial herbaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 127-131.

Casler MD, Jung HG, Coblentz WK. 2008. Clonal selection for lignin, and etherified ferulates in three perennial grasses. *Crop Science* **48**, 424-433.

Casler MD, Jung HJG. 1999. Selection and evaluation of smooth bromegrass clones with divergent lignin or etherified ferulic acid concentration. *Crop Science* **39**, 1866-1873.

Casler MD, Jung HJG. 2006. Relationships of fibre, lignin, and phenolics to in vitro fibre digestibility in three perennial grasses. *Animal Feed Science and Technology* **125**, 151-161.

Chabbert B, Tollier MT, Monties B, Barriere Y, Argillier O. 1994a. Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm2 mutation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**, 455-460.

Chabbert B, Tollier MT, Monties B, Barriere Y, Argillier O. 1994b. Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm3 mutation in three maize cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**, 349-355.

Chen F, Dixon RA. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* **25**, 759-761.

Chen L, Auh C, Chen F, Cheng XF, Aljoe H, Dixon RA, Wang ZY. 2002. Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 5558-5565.

Cherney JH, Cherney DJR, Akin DE, Axtell JD. 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advances in Agronomy* **46**, 157-198.

Chesson A. 1993. Mechanistic Models of Forage Cell Wall Degradation. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 347-376.

Chesson A, Provan GJ, Russell W, Scobbie L, Chabbert B, Monties B. 1997. Characterisation of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**, 10-16.

Chomet PS. 1994. Transposon tagging with Mutator. *In M. Freeling and V. Walbot (ed.) The maize handbook. Springer, New York.*, 243–249.

Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 850-861.

Culhaoglu T, Zheng D, Mechin V, Baumberger S. 2011. Adaptation of the Carrez procedure for the purification of ferulic and p-coumaric acids released from lignocellulosic biomass prior to LC/MS analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **879**, 3017-3022.

Davin LB, Wang HB, Crowell AL, Bedgar DL, Martin DM, Sarkanen S, Lewis NG. 1997. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362-366.

Demont-Caulet N, Lapierre C, Jouanin L, Baumberger S, Mechin V. 2010. Arabidopsis peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: kinetics of an endwise process. *Phytochemistry* **71**, 1673-1683.

Dence C, Lin SY. 1992. The Determination of Lignin. In Methods in Lignin Chemistry. *Springer: Berlin*, 33-61.

Devaux M-F, Bouchet B, Legland D, Guillon F, Lahaye M. 2008. Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biology and Technology* **47**, 199-209.

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

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

Ehlke NJ, Casler MD. 1985. Anatomical characteristics of smooth bromegrass clones selected for in vitro dry matter digestibility. *Crop Science* **25**, 513-517.

Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P. 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*.

Fontaine AS, Bout S, Barriere Y, Vermerris W. 2003. Variation in cell wall composition among forage maize (Zea mays L.) inbred lines and its impact on digestibility: Analysis of neutral detergent fiber composition by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 8080-8087.

Ford CW, Hartley RD. 1989. GC/MS characterisation of cyclodimers from p-coumaric and ferulic acids by photo- dimerisation—A possible factor influencing cell wall biodegradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **46**, 301-310.

Fornale S, Shi X, Chai C, Encina A, Irar S, Capellades M, Fuguet E, Torres J-L, Rovira P, Puigdomenech P, Rigau J, Grotewold E, Gray J, Caparros-Ruiz D. 2010. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant Journal* **64**, 633-644.

Fukuda H. 1992. Tracheary Element Formation as a Model System of Cell Differentiation. *International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology* **136**, 289-332.

Fukushima RS, Hatfield RD. 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3713-3720.

Gierlinger N, Schwanninger M. 2007. The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research. *Spectroscopy-an International Journal* **21**, 69-89.

Goering HK, Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *USDA ARS Agricultural Handbook no. 379 US Government Printing Office, Washington, DC*.

Gou J-Y, Park S, Yu X-H, Miller LM, Liu C-J. 2008. Compositional characterization and imaging of "wall-bound" acylesters of Populus trichocarpa reveal differential accumulation of acyl molecules in normal and reactive woods. *Planta* **229**, 15-24.

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

Grabber JH. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* **45**, 820-831.

Grabber JH, Hatfield RD, Ralph J. 1998a. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 193-200.

Grabber JH, Hatfield RD, Ralph J. 2003. Apoplastic pH and monolignol addition rate effects on lignin formation and cell wall degradability in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4984-4989.

Grabber JH, Jung GA, Abrams SM, Howard DB. 1992. Digestion kinetics of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from orchardgrass and switchgrass. *Crop Science* **32**, 806-810.

Grabber JH, Lu F. 2010. Copolymerization of sinapyl p-coumarate with sinapyl alcohol: impact on syringyl lignin formation and fermentability of maize cell walls. *Biotechnology for Fuels Chemicals Symposium Proceedings, Clearwater Beach, FL, USA*, p. 72.

Grabber JH, Mertens DR, Kim H, Funk C, Lu F, Ralph J. 2009. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 122-129.

Grabber JH, Quideau S, Ralph J. 1996a. p-coumaroylated syringyl units in maize lignin: Implications for beta-ether cleavage by thioacidolysis. *Phytochemistry* **43**, 1189-1194.

Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD. 1998b. Ferulate cross-links limit the enzymatic degradation of synthetically lignified primary walls of maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2609-2614.

Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD, Quideau S, Kuster T, Pell AN. 1996b. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1453-1459.

Grabber JH, Schatz PF, Kim H, Lu F, Ralph J. 2010. Identifying new lignin bioengineering targets: 1. Monolignol-substitute impacts on lignin formation and cell wall fermentability. *Bmc Plant Biology* **10**, p.114.

Gressel J, Vered Y, Barlev S, Milstein O, Flowers HM. 1983. Partial suppression of cellulase action by artificial lignification of cellulose. *Plant Science Letters* **32**, 349-353.

Guerriero G, Fugelstad J, Bulone V. 2010. What Do We Really Know about Cellulose Biosynthesis in Higher Plants? *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 161-175.

Guines F, Julier B, Ecalle C, Huyghe C. 2003. Among and within-cultivar variability for histological traits of lucerne (Medicago sativa L.) stem. *Euphytica* **130**, 293-301.

Haigler CH, Brown RM. 1986. Transport of rosettes from the golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells ofZinnia elegans during differentiation to tracheary elements in suspension culture. *Protoplasma* **134**, 111-120.

Hartley RD. 1972. p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **23**, 1347-1354.

Hatfield R, Fukushima RS. 2005. Can lignin be accurately measured? *Crop Science* **45**, 832-839.

Hatfield RD, Chaptman AK. 2009. Comparing-Corn Types for Differences in Cell Wall Characteristics and p-Coumaroylation of Lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4243-4249.

Hatfield RD, Jung HJG, Ralph J, Buxton DR, Weimer PJ. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **65**, 51-58.

Hatfield RD, Marita JM. 2010. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls. *Phytochemistry Reviews* **9**, 35-45.

Hatfield RD, Marita JM, Frost K. 2008. Characterization of p-coumarate accumulation, p-coumaroyl transferase, and cell wall changes during the development of corn stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 2529-2537.

Hatfield RD, Marita JM, Frost K, Grabber J, Ralph J, Lu F, Kim H. 2009. Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. *Planta* **229**, 1253-1267.

Heiss-Blanquet S, Zheng D, Lopes Ferreira N, Lapierre C, Baumberger S. 2011. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresource Technology* **102**, 5938-5946.

Ishii T. 1991. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell-walls. *Carbohydrate Research* **219**, 15-22.

Ishii T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**, 111-127.

Jackson LA, Shadle GL, Zhou R, Nakashima J, Chen F, Dixon RA. 2008. Improving Saccharification Efficiency of Alfalfa Stems Through Modification of the Terminal Stages of Monolignol Biosynthesis. *Bioenergy Research* **1**, 180-192.

Jacquet G. 1997. Structure et réactivité des lignines de graminées et des acides phénoliques associés: développement des méthodologies d'investigation. Sous la direction de Lapierre Catherine - Thèse de doctorat de l'université d'Aix-Marseille III. *Thèse doctorat : Biochimie: Aix-marseilles: 1997: AIX3 0061*, p.200.

Jacquet G, Pollet B, Lapierre C. 1995. New Ether-Linked Ferulic Acid-Coniferyl Alcohol Dimers Identified in Grass Straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2746-2751.

Jouanin L, Berthet S, Lapierre C, Guiderdoni E, Bouchabke-Coussa O, Sibout R, Leple J-C. 2010. Production of Plants with Reduced Lignin Content

Jung H-JG, Samac DA, Sarath G. 2012. Modifying crops to increase cell wall digestibility. *Plant Science* **185**, 65-77.

Jung HG, Casler MD. 2006a. Maize stem tissues: Cell wall concentration and composition during development. *Crop Science* **46**, 1793-1800.

Jung HG, Casler MD. 2006b. Maize stem tissues: Impact of development on cell wall degradability. *Crop Science* **46**, 1801-1809.

Jung HG, Deetz DA. 1993. Cell Wall Lignification and Degradability. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 315-346.

Jung HG, Engels FM. 2002. Alfalfa stem tissues: Cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Science* **42**, 524-534.

Jung HG, Mertens DR, Payne AJ. 1997. Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. *Journal of Dairy Science* **80**, 1622-1628.

Jung HG, Phillips RL. 2010. Putative Seedling Ferulate Ester (sfe) Maize Mutant: Morphology, Biomass Yield, and Stover Cell Wall Composition and Rumen Degradability. *Crop Science* **50**, 403-418.

Jung HG, Vogel KP. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *J Anim Sci* **62**, 1703-1712.

Jung HJG. 2003. Maize stem tissues: ferulate deposition in developing internode cell walls. *Phytochemistry* **63**, 543-549.

Jung HJG, Buxton DR. 1994. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in-vitro degradability for stem internodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **66**, 313-322.

Jung HJG, Jorgensen MA, Linn JG, Engels FM. 2000. Impact of accessibility and chemical composition on cell wall polysaccharide degradability of maize and lucerne stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 419-427.

Jung HJG, Ni WT, Chapple CCS, Meyer K. 1999. Impact of lignin composition on cell-wall degradability in an Arabidopsis mutant. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 922-928.

Jung HJG, Shalitajones SC. 1990. Variation in the Extractability of Esterified p-Coumaric and Ferulic. Acids from Forage Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 397-402.

Jurasek L. 1998. Experimenting with virtual lignins. *American Chemical Society* **697**, 276-293.

Ke J, Laskar DD, Singh D, Chen SL. 2011. In-situ lignocellulosic unlocking mechanism in termite for carbohydrate hydrolysis in termites: critical lignin modification. *Biotechnology for Biofuels* **4**, p.17.

Kittur FS, Lalgondar M, Yu HY, Bevan DR, Esen A. 2007. Maize beta-glucosidase-aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for beta-glucosidase aggregation. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 7299-7311.

Kondo T, Mizuno K, Kato T. 1990. Cell wall-bound p-coumaric and ferulic acids in Italian ryegrass. *Canadian Journal of Plant Science* **70**, 495-499.

Kondo T, Watanabe T, Ohshita T, Kyuma T. 1998. Physico-chemical characteristics of soluble lignin fractions released from forage grasses by ruminant digestion. *Japan Agric. Res. Quart.* **32**, p. 187-195.

Kutschera U, Nikas KJ. 2007. The epidermal-growth-control theory of stem elongation: An old and a new perspective. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1395-1409.

Lam TB, Iiyama K, Stone BA. 2003. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass Phalaris aquatica and Lolium perenne and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochemistry* **64**, 603-607.

Lam TBT, Iiyama K, Stone BA. 1992. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and. Phalaris internodes. *Phytochemistry* **31**, 1179-1183.

Lapierre C, Monties B, Rolando C. 1986. Preparative Thioacidolysis of Spruce Lignin: Isolation and Identification of Main Monomeric Products. *Holzforschung* **40**, 47-50.

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

Lapierre C, Pollet B, Rolando C. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates* **21**, 397-412.

Lapierre C, Tollier MT, Monties B. 1988. Occurrence of additional monomeric units in the lignins from internodes of a brown-midrib mutant of maize bm3. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **307**, 723-728.

Li M-F, Fan Y-M, Sun R-C, Xu F. 2010. Characterization of extracted lignin of bamboo (Neosinocalamus affinis) pretreated with sodium Hydroxide/urea solution at low temperature. *Bioresources* **5**, 1762-1778.

Lloyd C, Chan J. 2004. Microtubules and the shape of plants to come. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 13-22.

Lu FC, Ralph J. 1999. Detection and determination of p-coumaroylated units in lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1988-1992.

MacAdam JW, Grabber JH. 2002. Relationship of growth cessation with the formation of diferulate cross-links and p-coumaroylated lignins in tall fescue leaf blades. *Planta* **215**, 785-793.

Marga F, Grandbois M, Cosgrove DJ, Baskin TI. 2005. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Plant Journal* **43**, 181-190.
Mechin V. 2000. Etude de facteurs biochimique et génétiques explicatifs de la variabilité pour la valeur alimentaire du maïs fourrage. Sous la direction de Yves Barriere - Thèse de doctorat de l'institut national agronomique parois-grignon. *Thèse doctorat : INA-PG: 2000*, p.205.
Mechin V, Argillier O, Barriere Y, Menanteau V. 1998. Genetic variation in stems of normal and brown-midrib 3 maize inbred lines. Towards similarity for in vitro digestibility and cell wall composition. *Maydica* **43**, 205-210.
Mechin V, Argillier O, Menanteau V, Barriere Y, Mila I, Pollet B, Lapierre C. 2000. Relationship of cell wall composition to in vitro cell wall digestibility of maize inbred line stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 574-580.
Mechin V, Baumberger S, Pollet B, Lapierre C. 2007. Peroxidase activity can dictate the in vitro lignin dehydrogenative polymer structure. *Phytochemistry* **68**, 571-579.
Meyer K, Kohler A, Kauss H. 1991. Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *Febs Letters* **290**, 209-212.
Milioni D, Sado PE, Stacey NJ, Domingo C, Roberts K, McCann MC. 2001. Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the Zinnia mesophyll cell system. *Plant Molecular Biology* **47**, 221-238.
Mitchell RAC, Dupree P, Shewry PR. 2007. A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan. *Plant Physiology* **144**, 43-53.
Morot-Gaudry JF. 2010. Lignines (les). *in Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* **96**, 67-84.
Morrison TA, Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD. 1998. Cell-wall composition of maize internodes of varying maturity. *Crop Science* **38**, 455-460.
Morrison TA, Kessler JR, Hatfield RD, Buxton DR. 1994. Activity of two lignin biosynthesis enzymes during development of a maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **65**, 133-139.
Morrison WH, Akin DE, Himmelsbach DS, Gamble GR. 1993. Investigation of the ester- and ether-linked phenolic constituents of cell wall types of normal and brown midrib pearl millet using chemical isolation, microspectrophotometry and 13C NMR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **63**, 329-337.
Mueller SC, Brown RM, Jr. 1980. Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J Cell Biol* **84**, 315-326.
Myton KE, Fry SC. 1994. Intraprotoplasmic feruloylation of arabinoxylans in Festuca arundinacea cell cultures. *Planta* **193**, 326-330.
Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW, Chapple C. 2004. The Arabidopsis thaliana REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 544-554.
Nakashima J, Chen F, Jackson L, Shadle G, Dixon RA. 2008. Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (Medicago sativa): effects on lignin composition in specific cell types. *New Phytologist* **179**, 738-750.
Novo-Uzal E, Taboada A, Rivera A, Flores G, Ros Barcelo A, Masa A, Pomar F. 2011. Relationship between hydroxycinnamic acid content, lignin composition and digestibility of maize silages in sheep. *Archives of Animal Nutrition* **65**, 108-122.
Novo Uzal E, Ros LVG, Pomar F, Bernal MA, Paradela A, Albar JP, Ros Barcelo A. 2009. The presence of sinapyl lignin in Ginkgo biloba cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **135**, 196-213.

Obel N, Porchia AC, Scheller HV. 2003. Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: evidence for feruloyl-glucose as precursor. *Planta* **216**, 620-629.
Onnerud H, Zhang L, Gellerstedt G, Henriksson G. 2002. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell* **14**, 1953-1962.
Papineau P, Sire A, Devaux MF, Bansard S. 2008. Système de prise d'image macroscopique. *Journées de la mesure et de la métrologie, Biarritz, 6-9 octobre 2008*.
Pedersen JF, Vogel KP, Funnell DL. 2005. Impact of reduced lignin on plant fitness. *Crop Science* **45**, 812-819.
Peltier G, Tauzia P, Saubadu M, Pujos J, Puig M, Lacazedieu A, Isidore M, Hiquet P, Grabowski D, Devaux N, Clertan D. 2010. Maïs et développement durable - Une approche pluridisciplinaire à vocations culturelle, scientifique et pédagogique. *ARVALIS*, p.128.
Piston F, Uauy C, Fu L, Langston J, Labavitch J, Dubcovsky J. 2010. Down-regulation of four putative arabinoxylan feruloyl transferase genes from family PF02458 reduces ester-linked ferulate content in rice cell walls. *Planta* **231**, 677-691.
Pouzet D. 2011. Production durable de biomasse *in La lignocellulose des poacées*.
Ralph J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* **9**, 65-83.
Ralph J, Bunzel M, Marita J, Hatfield R, Lu F, Kim H, Schatz P, Grabber J, Steinhart H. 2004. Peroxidase-dependent cross-linking reactions of p-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem Revs* **3**, 79-96.
Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD. 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* **275**, 167-178.
Ralph J, Hatfield RD, Piquemal J, Yahiaoui N, Pean M, Lapierre C, Boudet AM. 1998. NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl-alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12803-12808.
Ralph J, Hatfield RD, Quideau S, Helm RF, Grabber JH, Jung HJG. 1994a. Pathway of p-Coumaric Acid Incorporation into Maize Lignin. As Revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 9448-9456.
Ralph J, Helm RF. 1993. Lignin/Hydroxycinnamic Acid/Polysaccharide Complexes: Synthetic Models for Regiochemical Characterization. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, p. 201-246.
Ralph J, Lapierre C, Marita JM, Kim H, Lu FC, Hatfield RD, Ralph S, Chapple C, Franke R, Hemm MR, Van Doorsselaere J, Sederoff RR, O'Malley DM, Scott JT, MacKay JJ, Yahiaoui N, Boudet AM, Pean M, Pilate G, Jouanin L, Boerjan W. 2001. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* **57**, 993-1003.
Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD. 1994b. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **23**, 3485-3498.
Reddy MSS, Chen F, Shadle G, Jackson L, Aljoe H, Dixon RA. 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (Medicago sativa L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16573-16578.
Riboulet C, Lefevre B, Denoue D, Barriere Y. 2008. Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, p-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. *Maydica* **53**, 11-19.

Ronsin T. 1990. Use of NIR predictor of digestibility in a breeding program for silage maize. *15th Congr of Maize and Sorghum Section of EUCARPIA. Baden, Austria*, p.277–288.
Ruel K, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Pollet B, Thevenin J, Lapierre C, Jouanin L, Joseleau J-P. 2009a. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **184**, 99-113.
Ruel K, Berrio-Sierra J, Derikvand MM, Pollet B, Thevenin J, Lapierre C, Jouanin L, Joseleau JP. 2009b. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* **184**, 99-113.
Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H. 2000. Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 949-954.
Samuels AL, Rensing KH, Douglas CJ, Mansfield SD, Dharmawardhana DP, Ellis BE. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in Pinus contorta var. latifolia. *Planta* **216**, 72-82.
Santos MB, Nader GA, Robinson PH, Kiran D, Krishnamoorthy U, Gomes MJ. 2010. Impact of simulated field drying on in vitro gas production and voluntary dry matter intake of rice straw. *Animal Feed Science and Technology* **159**, 96-104.
Santos RB, Treasure T, Gonzalez R, Phillips R, Lee JM, Jameel H, Chang H-m. 2012. Impact of hardwood species on production cost of second generation ethanol. *Bioresource Technology* **117**, 193-200.
Sarath G, Akin DE, Mitchell RB, Vogel KP. 2008. Cell-wall composition and accessibility to hydrolytic enzymes is differentially altered in divergently bred switchgrass (Panicum virgatum L.) genotypes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **150**, 1-14.
Sarath G, Vogel KP, Mitchell R, Baird LM. 2005. Stem anatomy of switchgrass plants developed by divergent breeding cycles for tiller digestibility. *In F.P. O'Mara et al (ed.) Proc. XX Int. Grassland Congress, Dublin, Ireland 26 June-2 July 2005. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.*, p. 115.
SAS. SAS/STAT User's Guide. *SAS Institute, Cary, NC, 1989*.
Schatz PF, Ralph J, Lu F, Guzei IA, Bunzel M. 2006. Synthesis and identification of 2,5-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-tetrahydrofuran-3,4-dicarboxylic acid, an unanticipated ferulate 8-8-coupling product acylating cereal plant cell walls. *Organic & Biomolecular Chemistry* **4**, 2801-2806.
Scheller HV, Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. In: Merchant SBWROD, ed. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 61, 263-289.
Schubiger FX, Lehmann J, Daccord R, Arrigo Y, Jeangros B, Scehovic J. 2001. Nutritive value of grassland plants. 5. Digestibility of the organic matter. *Revue Suisse d'Agriculture* **33**, 275-279.
Scobbie L, Russell W, Provan GJ, Chesson A. 1993. The Newly Extended Maize Internode: A. Model for the Study of Secondary Cell Wall. Formation and Consequences for Digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **61**, 217-225.
Sewalt VJH, Glasser WG, Fontenot JP, Allen VG. 1996. Lignin impact on fibre degradation .1. Quinone methide intermediates formed from lignin during in vitro fermentation of corn stover. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **71**, 195-203.
Shi C, Koch G, Ouzunova M, Wenzel G, Zein I, Lubberstedt T. 2006. Comparison of maize brown-midrib isogenic lines by cellular UV-microspectrophotometry and comparative transcript profiling. *Plant Molecular Biology* **62**, 697-714.
Somerville C. 2006. Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 22, 53-78.

Sterjiades R, Dean JFD, Gamble G, Himmelsbach DS, Eriksson KEL. 1993. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (Acer pseudoplatanus) cell-suspension cultures: reactions with monolignols and lignin model compounds. Planta. 1993. 190, 50 ref.

Struik PC. 1985. Digestibility of plant fractions from different genotypes and the predictability of quality of forage maize in northwest. Europe. *Netherlands Journal of Agricultural Science* **33**, 56-59.

Struik PC, Dolstra O. 1991. Some remarks on session III on nutritive value of forage maize. *Proceedings of the 15th Congress of the Maize and Sorghum Section of EUCARPIA, Baden*, p. 333–336.

Syrjanen K, Brunow G. 2000. Regioselectivity in lignin biosynthesis. The influence of dimerization and cross-coupling. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 183-187.

Taboada A, Novo-Uzal E, Flores G, Loureda M, Ros Barcelo A, Masa A, Pomar F. 2010. Digestibility of silages in relation to their hydroxycinnamic acid content and lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 1155-1162.

Takahama U, Oniki T, Shimokawa H. 1996. A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidasedependent reactions in the apoplast: Enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast. . *Plant Cell Physiol* **37**, 499-504.

Tang HM. 2011. The brown midrib 2 (bm2) gene of maize encodes methylenetetrahydrofolate reductase.-A thesis ubmitted to the graduate faculty in partial fulfillment of the requirements for the degree of MASTER OF SCIENCE-Iowa State University. *These master : UMI: 1512238*, p.69.

Taylor NG. 2008. Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytologist* **178**, 239-252.

Terashima N, Fukushima K, He L-F, Takabe K. 1993. Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 247-270.

Van Parijs FRD, Morreel K, Ralph J, Boerjan W, Merks RMH. 2010. Modeling Lignin Polymerization. I. Simulation Model of Dehydrogenation Polymers. *Plant Physiology* **153**, 1332-1344.

Van Soest PJ. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. *(second ed.)Cornell University, Ithaca, NY*, p. 528.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153**, 895-905.

Vanholme R, Morreel K, Darrah C, Oyarce P, Grabber JH, Ralph J, Boerjan W. 2012. Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol* **4**, 1469-8137.

Vermerris W, Boon JJ. 2001. Tissue-specific patterns of lignification are disturbed in the brown midrib2 mutant of maize (Zea mays L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 721-728.

Vermerris W, Sherman DM, McIntyre LM. 2010. Phenotypic plasticity in cell walls of maize brown midrib mutants is limited by lignin composition. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2479-2490.

Vignau-Loustau L, Huyghe C. 2008. Stratégies fourragères *Ed La France agricole*, 336p.

Wang H, Avci U, Nakashima J, Hahn MG, Chen F, Dixon RA. 2010. Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22338-22343.

Wang HZ, Xue YX, Chen YJ, Li RF, Wei JH. 2012. Lignin modification improves the biofuel production potential in transgenic Populus tomentosa. *Industrial Crops and Products* **37**, 170-177.
Wende G, Fry SC. 1997. 2-O-beta-D-xylopyranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochemistry* **44**, 1019-1030.
Whetten R, Sederoff R. 1991. Genetic engineering of wood. *Forest Ecology and Management* **43**, 301-316.
Wi SG, Singh AP, Lee KH, Kim YS. 2005. The pattern of distribution of pectin, peroxidase and lignin in the middle lamella of secondary xylem fibres in alfalfa (Medicago sativa). *Annals of Botany* **95**, 863-868.
Wightman R, Turner S. 2010. Trafficking of the plant cellulose synthase complex. *Plant Physiol* **153**, 427-432.
Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox JP. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* **47**, 9-27.
Wilson JR. 1993. Organization of Forage Plant Tissues. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* **acsesspublicati**, 1-32.
Wilson JR, Hatfield RD. 1997. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**, 165-180.
Wilson JR, Mertens DR. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science* **35**, 251-259.
Withers S, Lu F, Kim H, Zhu Y, Ralph J, Wilkerson CG. 2012. Identification of grass-specific enzyme that acylates monolignols with p-coumarate. *J Biol Chem* **287**, 8347-8355.
Wolf DP, Coors JG, Albrecht KA, Undersander DJ, Carter PR. 1993. Agronomic evaluations of maize genotypes selected for extreme fiber concentrations. *Crop Science* **33**, 1359-1365.
Wong Quai Lam Nöel MS. 2011. Assemblage et dégradation des parois de maïs : de la plante entière à l'échelle cellulaire. Sous la diraction de Goffner Déborah et Pichon Magalie - Thèse de doctorat de Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries (SEVAB). *Thèse doctorat : Biosciences végétales : Toulouse III: 2011*, p. 312.
Yamamoto E, Bokelman GH, Lewis NG. 1989. Phenylpropanoid Metabolism in Cell Walls. An Overview. *Acs Symposium Series* **399**, 68-88.
Yoshida-Shimokawa T, Yoshida S, Kakegawa K, Ishii T. 2001. Enzymic feruloylation of arabinoxylan-trisaccharide by feruloyl-CoA:arabinoxylan-trisaccharide O-hydroxycinnamoyl transferase from Oryza sativa. *Planta* **212**, 470-474.
Zhang A, Lu F, Sun R, Ralph J. 2009. Ferulate-coniferyl alcohol cross-coupled products formed by radical coupling reactions. *Planta* **229**, 1099-1108.
Zhang Y, Culhaoglu T, Pollet B, Melin C, Denoue D, Barriere Y, Baumberger S, Mechin V. 2011. Impact of Lignin Structure and Cell Wall Reticulation on Maize Cell Wall Degradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 10129-10135.

ABSTRACT

Maize potential value, as well as animal feed or as bioenergetics resources, is limited by the lignification of the cell wall and by the cross-linking between cell wall components. Improvement of cell wall enzymatic degradability is an important goal. In the present work we focused on the study of cell wall lignification including its establishment and the biochemical or anatomical cell wall related factors in order to investigate the impact of all these characteristics on cell wall degradability.

In the first part of my work, 8 maize recombinant inbred lines were selected on the basis of their comparable lignin content and their contrasted cell wall degradability in order to assess the impact of biochemical traits on both the cell wall degradability and the plant agronomic performances independently of the main "lignin content" factor. These recombinant inbred lines and their parents were analyzed for esterified and etherified *p*-hydroxycinnamic acid content, for lignin content, composition and structure and for *in vitro* cell wall degradability. Lignin structure and esterified *p*-coumaric acid content were highly and significantly correlated with *in vitro* cell wall degradability. A multiple regression analysis showed that more than 80 % of cell wall degradability variations were explained by a regression model including two main explanatory factors: the lignin content and the estimated proportion of S lignin units esterified by *p*-coumaric acid. The morphological study showed that the biochemical factors limiting cell wall degradability were on the contrary favorable for ensuring agronomic performances.

In the second part of my work, we studied the cell wall developmental pattern during maize internode growth. We compared the developmental pattern of 3 maize lines which presented quite similar lignin content but very different cell wall degradability at silage stage. We first characterized biochemically internodes sampled throughout plant development. Subsequently, we developed a method to quantify the variation of lignin spatial distribution within the whole stem section. At last, we completed our study of cell wall establishment by an anatomical characterization. From a temporal point of view, the different wall components were incorporated gradually during the development and three major steps were identified. From a spatial point of view, in the internode, the development of cell wall is different according to the considered region. Clearly genetic variations were observed for developmental pattern in both the two axes and were found to be associated with the variation of cell wall degradability.

The results of this work were discussed firstly in terms of contribution to the understanding of cell wall lignification and of relationships between biochemical and anatomical factors with cell wall degradability variations and secondly in terms of application to propose solutions to improve cell wall quality.

Key words: maize, cell wall, cell wall degradability, development, lignification, β-O-4 bonds, spatial lignin distribution, *p*-hydroxycinnamic acids, lignin acylation.

RESUME

Le potentiel de valorisation, aussi bien pour l'alimentation animale que pour la production bioénergétique, du maïs est limité par la lignification et la réticulation des parois. L'amélioration de la dégradabilité enzymatique des lignocelluloses est un objectif important. Nous nous sommes attachés dans ce travail à l'étude approfondie de la mise en place de la lignification dans la paroi chez le maïs ainsi qu'aux facteurs biochimiques et anatomiques pariétaux qui peuvent avoir un impact sur la dégradabilité des parois.

Dans la première partie de ma thèse, 8 lignées recombinantes de maïs ont été sélectionnées sur la base d'une teneur en lignines comparable pour évaluer l'impact des facteurs biochimiques sur la dégradabilité des parois et sur les performances agronomiques des maïs. Ces lignées recombinantes et leurs parents ont été analysés biochimiquement de façon approfondie. Le rendement β-O-4 au sein des lignines et la teneur en acide *p*-coumarique estérifié sont les deux facteurs les plus corrélés négativement et significativement à la dégradabilité des parois. Une analyse par régression multiple a montré que plus de 80% des variations de la dégradabilité de paroi, dans ces dix lignées, sont expliqués par un modèle retenant comme meilleurs régresseurs la teneur en lignines combinée au pourcentage d'unités S acylées par l'acide *p*-coumarique. L'étude morphologique que nous avons réalisée nous a montré que les facteurs biochimiques limitant la dégradabilité de paroi peuvent par contre s'avérer favorables pour assurer la performance agronomique de la plante via des mécanismes de plasticité pariétale. Cependant et de façon très encourageante, nous avons aussi montré qu'il était tout à fait possible de retenir du matériel amélioré en termes de qualité de paroi et qui conservait de bonnes performances agronomiques.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons étudié le schéma de mise en place des parois au cours du développement des plantes pour des lignées présentant des teneurs en lignines comparables au stade ensilage mais des dégradabilités de parois contrastées. Nous avons caractérisé biochimiquement les entrenœuds au cours du développement. En parallèle, nous avons développé une méthode de quantification de la variation de distribution spatiale des lignines au long de la coupe afin de compléter notre étude au cours du développement par une caractérisation histologique détaillée. D'un point de vue temporel, les différentes composantes pariétales sont incorporées graduellement, en fonction du stade de développement. Trois étapes majeures de développement ont été identifiées. D'un point de vue spatial, au sein de l'entrenœud, le développement des parois est différent selon les régions. Une importante variabilité génétique a été observée pour le développement sur ces deux axes et ces variations sont associées à la variation de la dégradabilité de paroi.

L'ensemble des résultats de ce travail est discuté d'une part en termes de contribution à la compréhension de la lignification des parois ainsi qu'à l'impact des différents facteurs biochimiques et histologiques sur la dégradabilité et d'autre part en termes d'application afin de proposer des solutions pour améliorer de la qualité des parois.

Mots clés : maïs, paroi cellulaire, dégradabilité de paroi, développement, lignification, liaison β-O-4, répartition spatiale des lignines, acides *p*-hydroxycinnamiques, acylation des lignines.