



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



**ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE
DU VIVANT**

Institut National de la Recherche Agronomique

THÈSE présentée par :

Fernanda T. P. GUEDES

soutenue le : **18 décembre 2013**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétales**

**Vers l'identification des acteurs moléculaires
responsables des propriétés mécaniques du bois de
tension de peuplier**

THÈSE dirigée par :

Gilles PILATE

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

RAPPORTEURS :

Fabienne GUILLON Directeur de Recherche, INRA Angers-Nantes

Azeddine DRIOUICH Professeur, Université de Rouen

JURY:

Eric LAINE

Professeur, Université d'Orléans – Président du Jury

Fabienne GUILLON

Directeur de Recherche, INRA Angers-Nantes

Azeddine DRIOUICH Professeur, Université de Rouen

Nicole BRUNEL

Ingénieur de Recherche, Univ. Blaise Pascal, UMR PIAF

Bruno CLAIR

Chargé de Recherche, CNRS, UMR EcoFoG

Gilles PILATE

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



***ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE
DU VIVANT***

Institut National de la Recherche Agronomique

THÈSE présentée par :

Fernanda T. P. GUEDES

soutenue le : **18 décembre 2013**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétales**

**Vers l'identification des acteurs moléculaires
responsables des propriétés mécaniques du bois de
tension de peuplier**

THÈSE dirigée par :

Gilles PILATE

Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

RAPPORTEURS :

Fabienne GUILLON Directeur de Recherche, INRA Angers-Nantes

Azeddine DRIOUICH Professeur, Université de Rouen

JURY:

Eric LAINE Professeur, Université d'Orléans – Président du Jury

Fabienne GUILLON Directeur de Recherche, INRA Angers-Nantes

Azeddine DRIOUICH Professeur, Université de Rouen

Nicole BRUNEL Ingénieur de Recherche, Univ. Blaise Pascal, UMR PIAF

Bruno CLAIR Chargé de Recherche, CNRS, UMR EcoFoG

Gilles PILATE Directeur de Recherche, INRA Val de Loire

Remerciements

Ce projet de thèse a bénéficié d'une allocation de recherche de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) sur le projet « Stress in trees » et d'une bourse d'étude financé par le Ministère de l'Education Brésilien (CAPES).

Merci aux membres du jury

Merci à Madame **Fabienne Guillon** et Monsieur **Azeddine Driouich** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci également à Madame **Nicole Brunel**, Messieurs **Bruno Clair** et **Eric Laine** pour avoir accepté d'être examinateurs.

Merci à mon encadrant

Je remercie sincèrement **Gilles Pilate** pour tous le savoir qu'il a pu me transmettre le long des ces 3 années de thèse. Je le remercie surtout pour m'avoir accueilli au sein de son équipe qui m'a très bien accueilli.

Merci à mon tuteur

Je remercie également et sincèrement mon tuteur de thèse **Mario Tomazello Filho** (Université de Sao Paulo-Brésil) pour ses enseignements depuis le tout début de ma formation académique, pour toujours m'encourager (même de l'autre mer) et surtout je le remercie pour la confiance déposé en mon travail.

Merci à ceux qui ont directement contribué au travail de thèse

Je remercie énormément l'équipe qui m'a accueilli, pour leur énorme implication dans mon travail de thèse, la patience avec les mots mal prononcé et les phrases parfois mal faites et pas très claires, pour leur amitié et énorme gentillesse. Je remercie énormément **Françoise Laurans** avec qui j'ai travaillé la plupart du temps, pour sa franchise, ses enseignements, les discussions toujours enrichissantes, son perfectionisme, son bon sens d'organisation lors des expériences et merci pour l'amitié et les encouragements dans les moments pas très faciles de fin de thèse. Merci à **Nathalie Boizot** pour son implication dans mon travail, pour son sens de la logistique lors des prélèvements, pour son sourire même pendant les manipulations de dernière minute. Merci à **Marie-Claude Lesage-Descauses** également pour son implication dans mon travail de thèse, pour toujours essayer quand tout semblait impossible et merci pour

tous les encouragements. Merci à **Nadège Millet** pour s'en occuper toujours avec implication des mes petites arbres en serre et même avant, pour les faux rires, pour les discussion et amitié. Merci à **Véronique Laine-Prade**, que tout juste arrive à l'équipe s'est impliquée beaucoup dans mon travail de thèse et pour être toujours si gentille et aimable, merci pour tes encouragements dans les moments difficiles et pour les rires dans les moments drôles.

Merci également à **Annabelle Déjardin**, pour ses conseils scientifiques mais aussi pour son énorme generosité et bienveillance. Merci à **Jean-Charles Leplé** pour ses conseils scientifiques et les discussions les heures des pauses.

Merci aux membres de l'INRA et prinicpalement **Karine Robineaut** et **Franck Rogeon** pour toujours me maintenir informé et **Jean-Leandre Hatton** pour sa disponibilité et habilité informatique.

Je remercie également l'équipe avec laquelle j'ai travaille un peu plus de loin **Carole Assor**, **Bernard Quemener**, **Jacqueline Vigouroux** pour leur implication dans les analyses biochimiques des couches G isolées et pour leur disponibilité et celle de **Marc Lahaye** pour répondre à mes questions et m'aider dans la compreension de toute cette partie.

Merci aussi à **Estelle Bonin**, **Marie-Christine Ralet**, **Marc Lahaye**, **Brigitte Bouchet** que j'ai pas encore eu la chance de rencontrer mais, qui m'ont donné de très bons conseils lors des prè-traitements des coupes de bois avant immunomarquage.

Merci à l'equipe de mécaniciens **Bruno Clair**, **Tancrede Alméras**, **Olivier Arnaud**, **Joseph Grill** pour les discussions très enrichissantes. Merci à la collègue **Shanshan Chang**, pour les moments d'isolation de couche G partagé et pour son amitié.

Merci à tous ce qui ont fait de mes jours de thèse un bon moment

Merci à tous ce qui j'ai pu rencontrer pendant la realisation de ma thèse, qui n'ont peut-être pas contribué directement à mon travaille mais, qui on fait de ce moment très important de ma formation professionnelle, un moment très agréable à vivre. Merci notamment à **Redouane**, **Odile**, **Marie et Fred**, **Caroline**, **Philippe Rozenberg**, **Philippe Label**, **Sabine**, **Jean Paul** et **Olivier**. Merci aussi aux collègues doctorants et pos-doctorants : **Alexandre Morel**, **Amra Secerovic**, **Maxime Nardin**, **Wassim Lakal**, **Justine Guet**, **Jonathan**, **Delphine** et **Nicolas** et principalement **France Dardeau** avec qui j'ai partagé des longs et agréables moments histologiques.

Merci à mes amis...

Aux amis venus de loin, que comme moi sont venus à la découverte de la France, un pays qui fait rêver (et qui fait BEAUCOUP de fromage aussi) : ***Christelle, Teresa, Catarina, Maja, Priscila, Marion, Manuella...***

A ***Patoux, Alex, Enzo, Clem, Tony, Marise, Blanche, Capu, Christine*** et ***Laeti*** : des amis que j'ai fait et que je garderait pour toujours. Merci d'avoir participé à ma vie, pour être là pour rire et pour pleurer. Ce moment n'aurait pas pu être le même sans vous, c'était sOUper !

Enfin...

Merci à tous ce que m'ont fait peu-à-peu découvrir ce pays merveilleux qui est la France: "Ah bah dit donc, qu'est-ce qu'il est beau ! Oh! La la !!" Même si je n'ai toujours pas compris pourquoi on dit parC et pas porC...bof !

Dedicace

À ma famille, surtout mes parents (João et Regina) et mes soeurs (Ana Carolina et Mariana) qui m'ont toujours soutenu et qu'ont toujours tout fait pour que je puisse en arrive là, même si cela a impliqué une grande distance (physique) entre nous. À mon amour et ami, Igor, pour m'avoir toujours encouragé et soutenu avec beaucoup de tendresse et de patience pendant toutes ces années.

SOMMAIRE

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	11
--	----

AVANT-PROPOS	13
--------------------	----

INTRODUCTION

ETAT DES CONNAISSANCES	17
------------------------------	----

1. Le bois dans l'arbre	17
-------------------------------	----

1.1 Le bois reflet de l'histoire de l'arbre et de son adaptation au milieu	17
--	----

1.2 Formation du bois	19
-----------------------------	----

1.2.1 Division cellulaire	19
---------------------------------	----

1.2.2 Expansion cellulaire	20
----------------------------------	----

1.2.3 Dépôt de la paroi secondaire	20
--	----

1.2.4 Lignification et mort cellulaire	20
--	----

2. Les parois cellulaires	21
---------------------------------	----

2.1 Structure de la paroi	21
---------------------------------	----

2.1.1 Lamelle moyenne	21
-----------------------------	----

2.1.2 Paroi primaire	21
----------------------------	----

2.1.3 La paroi secondaire	22
---------------------------------	----

2.2 Les contraintes de maturation	23
---	----

2.3 Composition chimique	23
--------------------------------	----

2.3.1 Lignines	27
----------------------	----

2.3.2 Cellulose	27
-----------------------	----

2.3.3 Hémicellulose	29
---------------------------	----

2.3.3.1 Xyloglucanes	29
----------------------------	----

2.3.3.2 Xylanes	30
-----------------------	----

2.3.3.3 Mannanes	32
------------------------	----

2.3.4 Pectines	33
----------------------	----

2.3.4.1 Homogalacturonanes	33
----------------------------------	----

2.3.4.2 Rhamnogalacturonane de type I	34
---	----

2.3.4.3 Rhamnogalacturonane de type II	35
--	----

2.3.5 Protéines	36
2.3.5.1 Protéines fonctionnelles.....	36
2.3.5.1.1 Enzymes	37
2.3.5.1.2 Expansines	37
2.3.5.2 Protéines structurales	38
2.3.5.2.1 Protéines glycosilées riches en hydroxy-proline.....	38
2.3.5.2.1.1 Protéines à arabinogalactane	38
2.3.5.2.1.2 Extensines.....	41
2.3.5.2.2 Protéines riches en proline	41
2.3.5.2.3 Protéines riches en glycine.....	41
3. Bois de tension, mécanisme d'adaptation	42
3.1 Les caractéristiques anatomiques.....	43
3.1.1 Les fibre-G	43
3.1.2 La couche G	45
3.2 Les caractéristiques chimiques	46
3.3 Les caractéristiques mécaniques	48
3.3.1 La couche G à l'origine de la tension.....	49
3.3.1.1 L'expansion latérale de la couche G.....	50
3.3.2 Les microfibrilles de cellulose sont sous tension	51
3.3.2.2 Effet des variations des taux d'humidité dans la couche G	57
3.3.2.2 Une structure de type gel	57
PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET STRATEGIE	61

CHAPITRE 1 Analyse de la distribution des polysaccharides non-cellulosiques dans les fibres de bois de tension et de bois opposé chez le peuplier : abondance de rhamnogalacturonane de type I et absence de xyloglucane dans la couche G

1. Présentation synthétique de l'article	65
2. Contribution au travail	67
<u>Article</u> : Evaluation of non-cellulosic polysaccharide distribution in differentiating and mature poplar tension wood fibres: abondance of rhamnogalacturonan I and absence of xyloglucan in the G-layer	
3. Résultats complémentaires	116

CHAPITRE 2 Alteration de l'expression d'une protéine à arabinogalactane avec domaine fascicline (FLA) entraîne des effets pleiotropiques chez un peuplier transgénique

1. Présentation synthétique de l'article	131
--	-----

Article : Alteration of the expression of a tension wood specific fasciclin-like arabinogalactan protein (FLA) results in pleiotropic effects in transgenic aspen.

2. Contribution au travail	132
----------------------------------	-----

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE	181
---------------------------	-----

MODELE	189
--------------	-----

PERSPECTIVES	201
--------------------	-----

REFERENCES	203
-------------------------	-----

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

aa : aminoacides

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique
complémentaire

ADN-T : ADN de transfert

AGP : Arabinogalactan-proteins

ANR : Agence National de la Recherche

AMF: Angle des Microfibrilles

Ara : Arabinose

ARN : Acide ribonucléique

BO : Bois opposé

BSA : Albumine sérique bovine

BT : Bois de tension

CCRC-M : Complex Carbohydrate
Research Center-Monoclonal

FLA : Fasciclin-like arabinogalactan
protein

GM : Genetically modified

HG : homogalacturonane

INRA : Institut National de la Recherche
Agronomique

JIM : John Innes Monoclonal

LM : Leeds Monoclonal

mAb: Anticorps monoclonal

MAC: Monoclonal Antibody Centre

MFC: Microfibrille de Cellulose

PCR : Polymerase Chain reaction

PVP : Polyvinyl pyrrolidone

qPCR : quantitative Polymerase Chain
reaction

RG-I : rhamnogalacturonan type I

RG-II : rhamnogalacturonan type II

Rha : rhamnose

rpm : Rotation Par Minute

RT-PCR : Real Time-Polymerase Chain
reaction

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

TBS: Solution saline de Tris-HCl et de
NaCl

WB : Western Blot

X: xylane

XG : Xyloglucane

ZC : Zone Cambiale

6His : 6 Histidines

AVANT-PROPOS

La grande taille des arbres implique la formation de tiges épaisses qui supportent la canopée. Cette structure constitue un défi pour le maintien de l'équilibre gravitationnel et pour assurer que les lourdes branches soient exposées de façon optimale à la lumière. Ainsi les arbres ont développé une stratégie pour répondre aux sollicitations du milieu, le bois de réaction. Ce type particulier de bois leur permet de réorienter leurs axes et aussi de résister au vent. Cependant, conifères et angiospermes ont développé des stratégies différentes, les deux impliquant une croissance asymétrique de la tige ou de la branche. Chez les conifères, le bois de réaction est connu sous le nom de bois de compression et est produit à la face inférieure de l'axe qui est incliné et le réoriente en le «poussant». Tandis que chez les angiospermes, il s'agit d'une force de tension qui est environ 10 fois plus importante que dans le bois normal et qui réoriente les axes en les «tirant». Ce bois est appelé bois de tension et est produit à la face supérieure de l'axe qui est incliné. Sur le côté inférieur de la tige, se forme un bois appelé bois opposé.

L'effet de cette stratégie est observé au niveau macroscopique par la réorientation des axes de l'arbre. Cela est possible grâce à différentes modifications au niveau anatomique et biochimique qui confère au bois de réaction des propriétés mécaniques spécifiques. Ces propriétés mécaniques se traduisent par la mise en place de forces plus importantes que dans le bois normal et qui permettent le redressement des axes de l'arbre. Le bois de tension est l'objet de nombreuses études et malgré tout, il n'est pas encore bien compris, probablement dû à sa complexité. Ainsi, la compréhension de ce phénomène nécessite une approche multi-échelle et multidisciplinaire. Mon travail de thèse, démarrée en 2010 s'inscrit dans un des axes de recherche de l'Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (UR0588) qui vise à identifier les bases physiologiques et moléculaires de la formation du bois. Ce programme, initié en 1998 utilise le bois de tension de peuplier comme modèle d'étude et repose sur une démarche de génomique fonctionnelle classique incluant : (i) l'identification en masse de gènes par des méthodes de séquençage systématique (EST) ; (ii) l'analyse à haut débit d'expression de gènes d'intérêt (puces ADN) ; (iii) la localisation dans le xylème de protéines et de composants de la paroi aux niveaux cellulaire et subcellulaire par des méthodes d'immunolocalisation et ; (iv) la validation fonctionnelle des gènes identifiés par génétique inverse (transgénèse). L'objectif de ce programme est d'identifier les mécanismes qui déterminent les propriétés du bois observées à l'échelle macroscopique. En complément,

une collaboration avec une équipe de biomécaniciens du CNRS de Montpellier a été mise en place depuis de nombreuses années et s'est concrétisée par le montage du projet ANR Blanc « Stress in trees ». Le projet propose une stratégie innovante qui regroupe des équipes multidisciplinaires, i. e., des physiologistes et des biomécaniciens. En effet l'objectif est d'identifier d'une part les agents moléculaires présents dans les parois du bois de tension et de comprendre comment ils agissent dans l'organisation et la polymérisation des composants structuraux de la paroi cellulaire. D'autre part, il s'agit de découvrir comment ces composants interagissent pour générer un stress mécanique de grande ampleur dirigé le long de l'axe de la fibre et qui permet la réorientation de la tige.

Dans ce cadre, à mon arrivée au laboratoire, nous avons choisi d'étudier en détail la composition en polysaccharide de la couche G. Cela visait principalement la recherche de molécules responsables de la création de la tension chez les fibres de bois de peuplier.

Les résultats de mon travail de thèse sont présentés dans ce manuscrit qui est structuré de la façon suivante. D'abord, une revue bibliographique qui précède les parties expérimentales et est composée de trois sous-chapitres. Le premier traite du bois dans l'arbre son importance, sa complexité et sa formation. Dans le deuxième sous-chapitre sont présentées les connaissances actuelles sur la structure et la composition chimique des parois végétales. Enfin, le troisième sous-chapitre qui clôture les présentations de l'état de l'art sur le sujet, présente le bois de tension en tant que mécanisme d'adaptation des arbres. Dans cette dernière partie, les caractéristiques anatomiques, chimiques et mécaniques concernant le bois de tension sont décrites ainsi que les modèles les plus récents qui traitent de la génération de la tension dans ce type particulier de bois.

L'introduction bibliographique est suivie de la présentation des principaux objectifs de mon travail de thèse, puis d'une partie « résultats » composée de deux chapitres. Le premier chapitre concerne l'étude de la composition et de la distribution des polysaccharides dans les différentes sous-couches de la paroi des fibres le long du gradient de différenciations (article 1). Des résultats complémentaires sur la composition en polysaccharides des sous-couches de la paroi des fibres dans une zone de transition entre bois de tension et bois opposé sont également présentés dans ce chapitre. Le deuxième chapitre est focalisé sur la caractérisation d'un peuplier modifié génétiquement pour l'expression d'une protéine à arabinogalactane (projet d'article 2). Enfin, une discussion générale clôt ce manuscrit ayant pour conclusion la proposition d'un modèle explicatif de la génération de la tension dans le bois de tension de peuplier.

INTRODUCTION

ETAT DES CONNAISSANCES

1. Le bois dans l'arbre

1.1 Le bois reflet de l'histoire de l'arbre et de son adaptation au milieu

Le bois, également appelé xylème est un ensemble de tissus d'origine secondaire ayant pour fonction la conduction de la sève brute (des racines vers la cime), le support de l'arbre et la résistance mécanique de la tige. Dans le bois ces différentes fonctions sont assurées par des types différents de cellules (Laurans et al., 2006). Il existe beaucoup de variations entre les types de bois, entre les différentes espèces, entre génotypes dans une même espèce et aussi dans un même arbre : bois juvénile et bois mature, bois de printemps et bois d'été, bois de tension et bois opposé (Fig. 1). Cette variabilité résulte en partie des différences au niveau des cellules qui composent chaque type de bois, i. e., des caractéristiques anatomiques tels que la proportion de fibres, rayons parenchymes, vaisseaux et d'autre part, par les différences dans la structure des cellules, leurs dimensions, l'épaisseur de leurs parois, leur composition chimique et leurs propriétés mécaniques (Du and Yamamoto, 2007; Dejardin et al., 2010). Cette diversité est due en partie au patrimoine génétique des arbres mais aussi à leur plasticité face aux contraintes environnementales. De plus, les arbres ayant un cycle de vie assez long, le bois produit au cours des ans peut être considéré comme un enregistrement des variations de l'environnement.

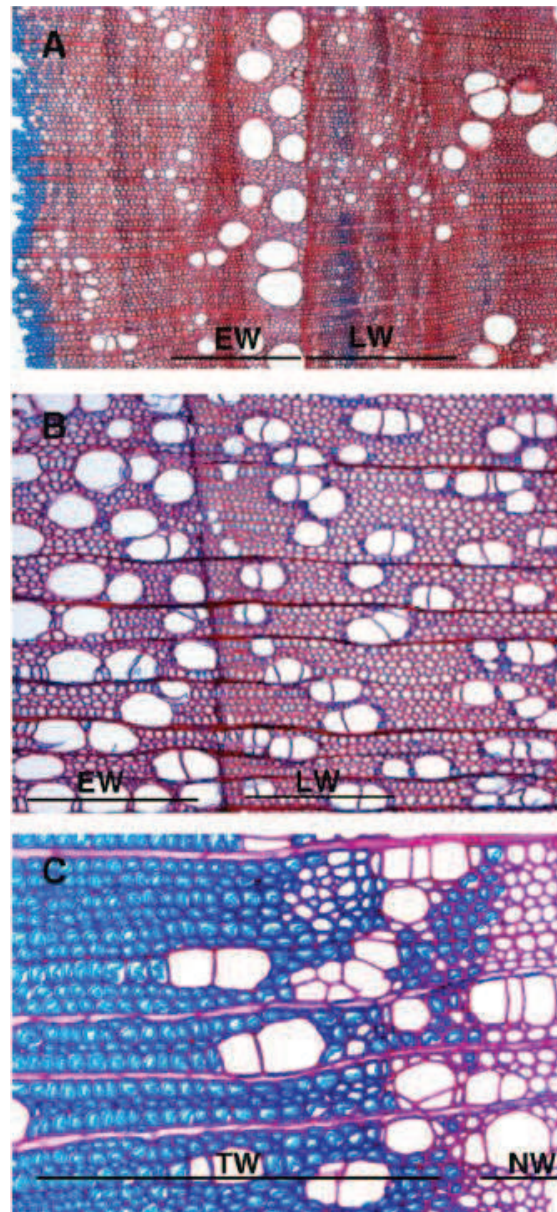


Figure 1. Section transversale de châtaigner (A) et peuplier (B, C) coloré au bleu astra et safranine, montrant des différences entre la taille et quantité de vaisseaux, taille des fibres et différences entre la paroi des fibres entre le bois d'été (LW) et le bois de printemps (EW), le bois normal (NW) et le bois de tension (TW) (Dejardin et al., 2010).

Malgré sa diversité, le bois peut être classé en deux groupes principaux: le bois homoxylé et le bois hétéroxylé. Le bois du type homoxylé est produit chez les gymnospermes et est constitué principalement par des trachéides qui constituent environ 90% de ce bois et jouent à la fois un rôle de soutien mécanique et de conduction de la sève (Laurans et al., 2006). Chez les angiospermes, le bois produit est dit hétéroxylé : il s'agit d'un bois plus complexe que celui des gymnospermes. Le bois hétéroxylé est composé par différentes types cellulaires

chacun jouant un rôle différent : les fibres qui ont un rôle de soutien, les vaisseaux qui assurent la conduction de sève et les rayons parenchymes qui servent de réserve et au transport radial des nutriments (Laurans et al., 2006).

1.2 Formation du bois

Les cellules du bois sont produites par une assise génératrice appelé cambium, qui donne naissance à des cellules méristématiques. Ces cellules se différencient, en passant par une succession d'étapes de développement jusqu'à leur maturité, où elles présentent les caractéristiques nécessaires à leur fonction. C'est pendant leur différenciation que sont déterminées leurs dimensions, leur structure et leur composition dans un processus complexe nécessitant l'expression d'un grand nombre de gènes (Hertzberg et al., 2001; Dejardin et al., 2004; Paux et al., 2005). En plus d'être sous un fort contrôle génétique, la différenciation des cellules du bois est également influencée par les conditions environnementales (Du and Yamamoto, 2007).

Une meilleure compréhension la différenciation des cellules de bois est importante pour mieux appréhender certains mécanismes tels que le redressement de tiges face à des contraintes gravitationnelles et/ou mécaniques (Jourez, 1997, Clair et al., 2011).

Le processus de formation du bois peut être divisé en 4 principales étapes : division, expansion cellulaire, dépôt de la paroi secondaire, lignification et mort cellulaire.

1.2.1 Division cellulaire

Les cellules du cambium se divisent et produisent deux types de cellules-mères selon les tissus auxquels elles appartiennent : phloème ou xylème. Les premières cellules formées par le cambium sont les initiales fusiformes, de forme allongée et les initiales radiales isodiamétriques (Laurans et al., 2006). Les initiales fusiformes se différencient en fibres ou vaisseaux par différenciation centripète du côté xylème et du côté phloème elles donnent origine aux tubes criblés par différenciation centrifuge (Laurans et al., 2006).

Au tout début de leur différenciation, dans la zone proche du cambium, les cellules s'allongent mais gardent leur dimension transversale relativement réduite (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Laurans et al., 2006). A ce stade de la différenciation, les cellules présentent des parois primaires fines, non lignifiées et sont alignées de façon régulière dans le plant transversal (Laurans et al., 2006). Par la suite, les cellules vont augmenter leur diamètre,

épaissir leur paroi, i. e. acquérir structure et composition qui leur permettra d'assurer leur fonction (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Dejardin et al., 2010).

1.2.2 Expansion cellulaire

Une fois formées, les cellules passent par un processus d'expansion qui est différent selon le type cellulaire. Les fibres s'allongent d'abord dans la direction axiale et par intrusion des extrémités, laquelle nécessite la dissolution de la lamelle moyenne des cellules voisines (Mellerowicz et al., 2001). Les vaisseaux ont une expansion axiale plus limitée que celles de fibres, en contraste ils présentent une importante expansion tangentielle qui les rend assez distincts des fibres du fait de leur fort diamètre (Mellerowicz et al., 2001; Dejardin et al., 2010). Les cellules de rayons ont leur plus forte expansion dans la direction radiale (Mellerowicz et al., 2001).

1.2.3 Dépôt de la paroi secondaire

Une fois que l'expansion cellulaire est complétée, i. e., les cellules ont atteint leur dimension définitive, une épaisse paroi secondaire commence à être déposée. Cette paroi, est généralement composé par trois différentes sous-couches : S1, S2 et S3 (S pour secondaire, Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al. 2001; Dejardin et al., 2010) et est la plus importante en ce que concerne les aspects mécaniques (Gorshkova et al., 2010).

1.2.4 Lignification et mort cellulaire

La lignification est une des étapes finales de la différenciation des cellules du xylème et semble être fortement contrôlée génétiquement (Donaldson, 2001). En ce qui concernent les types cellulaires, la lignification commence dans les vaisseaux tandis que les fibres sont lignifiées après. Dans chaque cellule, la lignine est déposée d'abord dans la lamelle moyenne et les jonctions cellulaires et progresse vers le lumen (Mellerowicz et al., 2001). La lignification confère rigidité et imperméabilité et donc les cellules xylémiennes aptes à leur fonction de conduction ou de soutien (Laurans et al., 2006; Dejardin et al., 2010). Cependant, la lignification n'est pas directement connectée à la mort cellulaire, car certaines cellules comme les rayons parenchymes ont leur paroi lignifiée et restent vivantes pendant un certain temps (Dejardin et al., 2010). Le processus de différenciation cellulaire se termine par la mort cellulaire programmée qui se traduit par l'hydrolyse du protoplasme (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001; Laurans et al., 2006; Dejardin et al., 2010).

2. Les parois cellulaires

2.1 Structure de la paroi

Le bois est constitué principalement de cellules mortes donc de leurs parois cellulaires. Les parois définissent le format des cellules et des organes et elles fonctionnent comme des barrières contre des pathogènes, fournissent des signaux qui dirigent la croissance et le développement, et fournissent la force et la flexibilité qui permettent aux plantes de se développer et de répondre aux variations de conditions environnementales (Freshour et al., 2003; Somerville et al., 2004; Wolf et al., 2012).

La paroi cellulaire des cellules du bois peut être comparée à un matériel composite : elles sont constituées de différents composants dont la combinaison donne origine à un matériel avec une caractéristique différente de celles des composants d'origine (Kerstens et al., 2001).

Les cellules du bois présentent une paroi cellulaire composée de différentes couches : lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire qui est composé par trois sous-couches la S1, la S2 et la S3 (Fig. 2). La composition et les interactions entre les différents composants est particulière à chacune de ces couches.

2.1.1 Lamelle moyenne

La lamelle moyenne est la première couche développée après la division cellulaire qui assure à la fois la séparation et l'adhésion entre les cellules. La lamelle moyenne est principalement composée par des substances pectiques et par des lignines (Plomion et al., 2001).

2.1.2 Paroi primaire

La paroi primaire est formée en début de différenciation cellulaire et est attachée à la lamelle moyenne. En général, il s'agit d'une paroi fine, souple et avec des structures hautement hydratée. Elle est composée par plusieurs couches de microfibrilles de cellulose disposées aléatoirement (Mellerowicz et al., 2001; Plomion et al., 2001). Entre ces microfibrilles de cellulose se déposent principalement des polysaccharides pectiques mais aussi des xyloglucanes, de très faibles quantités de xylanes, des protéines de structure (Cosgrove and Jarvis, 2012) et des lignines (Plomion et al., 2001). Il s'agit d'une paroi qui est assez forte pour supporter la pression de turgescence et qui est aussi flexible pour permettre l'expansion et l'élargissement des cellules (Cosgrove and Jarvis, 2012).

2.1.3 La paroi secondaire

Dans le bois, toutes les cellules produisent une paroi secondaire qui, en termes de résistance mécanique, peut être considérée comme la plus importante (Gorshkova et al., 2010). Elle est structurée en trois différentes sous-couches dénommées S1, S2 et S3 à l'intérieur desquelles les microfibrilles de cellulose sont disposées parallèlement et entre lesquelles on retrouve des hémicelluloses et des lignines (Plomion et al., 2001). Selon Gorshkova et al. (2010), les méthodologies utilisées jusqu'à présent ne permettent pas de différencier suffisamment les différentes sous-couches et de déterminer la composition spécifique de chacune d'entre elles. Cependant, ces trois différentes sous-couches peuvent être différenciées par rapport à l'angle des microfibrilles de cellulose :

S1 : les microfibrilles de cellulose sont disposées presque perpendiculaire à l'axe longitudinal des fibres, ce qui limite l'expansion radial. Sa faible épaisseur est comparable à celle de la paroi primaire.

S2 : plus développé que la S1 et avec des microfibrilles de cellulose présentant un angle faible par rapport à l'axe de la fibre.

S3 : comme pour la couche S1, l'angle des microfibrilles est presque perpendiculaire à l'axe longitudinal.

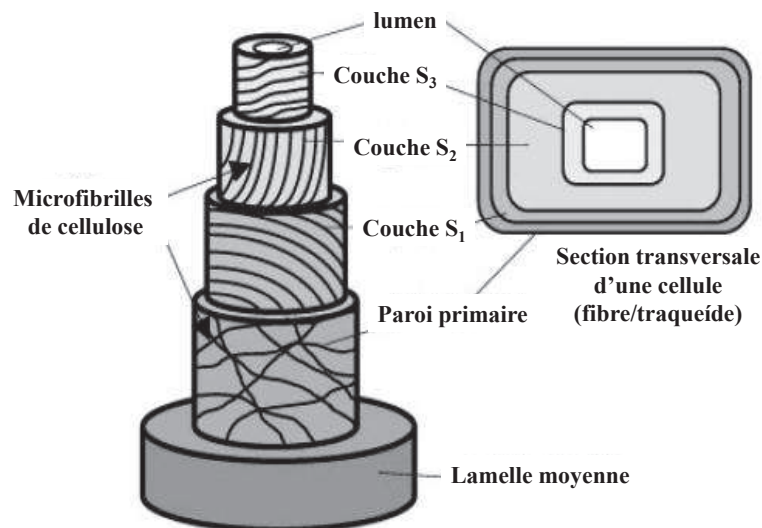


Figure 2. Structure tridimensionnelle de la paroi d'une cellule de xylème, fibre ou trachéide. La paroi de la cellule est divisée en différentes couches, chaque couche ayant sa propre disposition particulière des microfibrilles de cellulose, qui déterminent les propriétés mécaniques et physiques du bois dans cette cellule. Ces microfibrilles de cellulose peuvent être alignées irrégulièrement (comme dans la paroi cellulaire primaire), ou avec un certain angle par rapport l'axe de la cellule (comme dans les couches S1, S2 et S3). La lamelle moyenne assure l'adhésion entre les cellules (D'après Plomion et al., 2001).

2.2 LES CONTRAINTES DE MATURATION

Durant sa vie, l'arbre est soumis à un ensemble de forces internes qui va précontraindre son bois. Ces contraintes sont en partie dues à des déformations de maturation qui apparaissent à la fin de la différenciation des cellules du xylème (Fournier et al., 1994). Si les cellules étaient isolées, elles subiraient une contraction longitudinale et une expansion transversale (Plomion et al., 2001). Mais, le fait d'adhérer aux couches de cellules plus anciennes les empêchent de subir ces déformations et elles sont sous tension longitudinale et sous compression transversale (Fig. 3, Plomion et al., 2001). D'autre part, le poids de l'arbre et la pression de l'écorce sur le cambium contribuent à la génération de contraintes mécaniques internes dans la tige (Plomion et al., 2001).

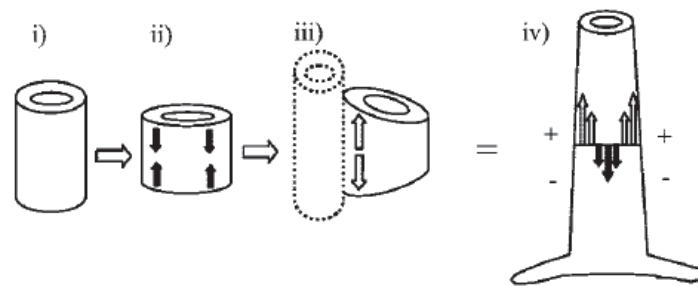


Figure 3. La nouvelle cellule de bois (i) commence à se différencier et (ii) lors du dépôt des lignines et de la cellulose dans la paroi secondaire, la cellule a la tendance à s'étirer latéralement, ce qui induit un rétrécissement longitudinal (flèches noires). Mais comme cette cellule est attachée aux cellules précédemment formées, (iii) cela engendre un stress mécanique dans la cellule (flèches vides). Dans le bois normal (NW), cela se traduit en stress de contraction, donc, le bois à la surface extérieure de l'arbre (iv) est mis sous tension (+ et flèches vides). Cependant, comme la formation de nouveau bois se cumule années après années, chaque nouvelle couche exerce une force tangentielle dans le bois déjà présent, et ainsi le bois qui est à l'intérieur de l'arbre se retrouve en compression (- et flèches noires) (d'après Plomion et al., 2001)

2.3 COMPOSITION CHIMIQUE

Les parois cellulaires possèdent une structure complexe en général multicouche et il est par conséquent difficile de déterminer la composition précise de chacune de ces couches (Gorshkova et al., 2010). Cependant, les parois végétales sont généralement composées de polysaccharides, protéines, lignines, eau, cutine et subérine et des composants inorganiques (Carpita et Gibeau 1993; Showalter, 1993) dans des structures et des proportions variables. Dans le cas des polysaccharides, par exemple, cette diversité peut être due à des associations entre les monosaccharides qui forment leur squelette et les éventuelles ramifications (Fig. 4, (Hamman, 2008).

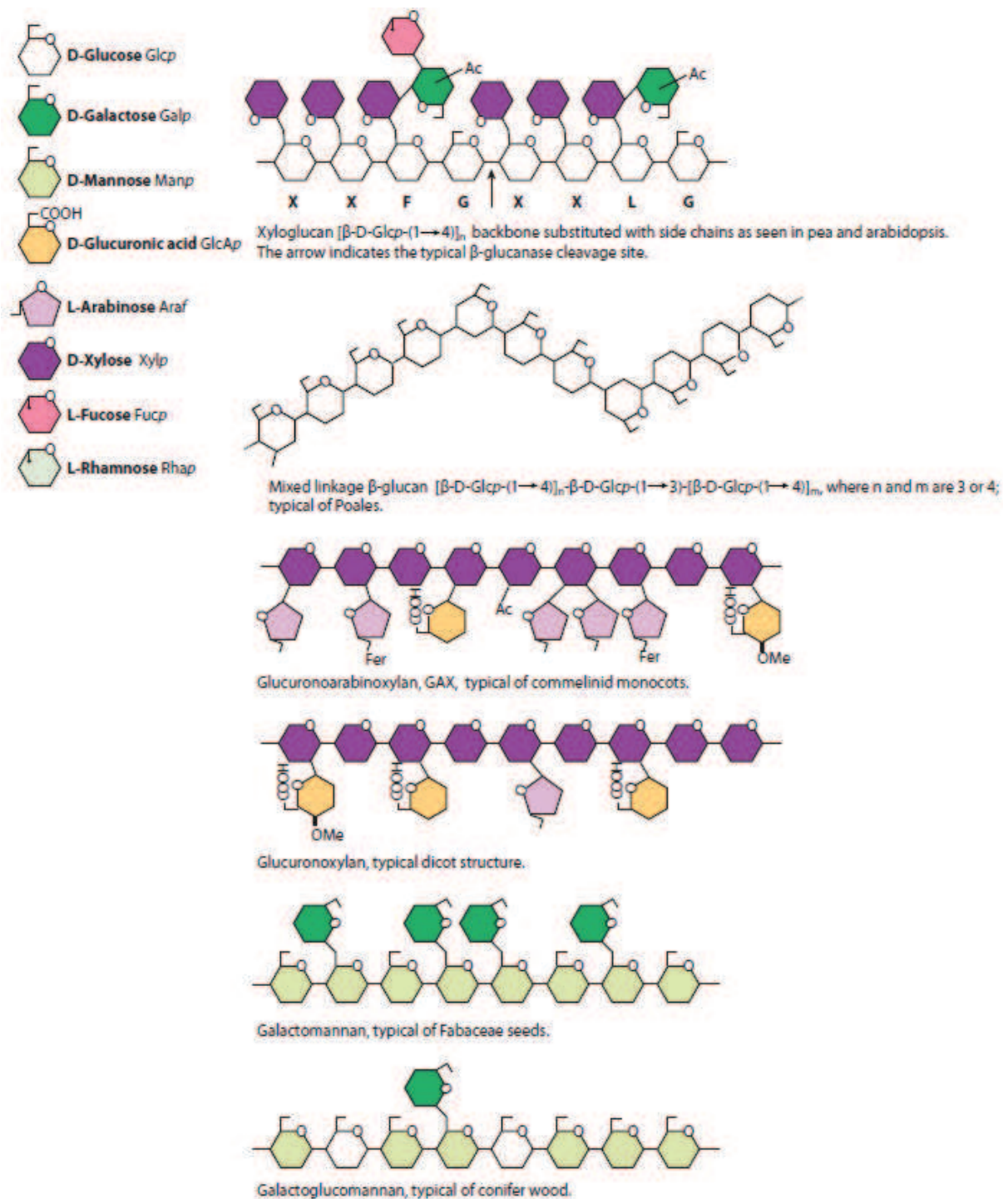


Figure 4. Illustration schématique des quelques types d'hémicellulose retrouvés dans la paroi cellulaire des plantes. Les lettres en bas des molécules de xyloglucanes (XG) illustrent les symboles utilisés pour les chaînes latérales les plus courantes. La structure des hémicelluloses varie considérablement entre différentes espèces et différents tissus. « Fer » représente une estérification avec l'acide férulique (acide 3-methoxy-4-hydroxycinnamic), qui est caractéristique des xylanes des monocotylédones commelinides (d'après Scheller and Ulvskov, 2010).

A cette multiplicité de composés, s'ajoute la diversité des interactions entre les différents composants, interactions qui de plus peuvent évoluer pendant la différenciation cellulaire (Wang et al., 2012). Par exemple, certains épitopes de xyloglucanes sont régulés pendant le développement du tamarin et sont masqués par des pectines (Marcus et al., 2008) ou encore certains épitopes de mannanes ne sont pas détectés à certaines étapes de la différenciation du xylème de peuplier du fait de leur acétylation (Wang et al., 2012).

Les modifications de composition de parois intervenant au cours de la différenciation cellulaire ont été également mises en évidence par des études d'expression de gènes. Ainsi, des études de génomique ont révélé une grande quantité de gènes associée à la xylogénèse et impliquée dans la biosynthèse de différents composants (Boerjan et al., 2003; Mellerowicz and Sundberg, 2008) et dont l'expression dépend de leur différenciation cellulaire (Fig. 5, (Hertzberg et al., 2001; Dejardin et al., 2004). Par exemple, certaines protéines riches en arabinogalactanes possédant un domaine de type fascicline ne sont exprimées dans le bois de peuplier que lors du dépôt des parois secondaires (Dejardin et al., 2004; Lafarguette et al., 2004).

Les composants plus fréquemment trouvés dans la paroi cellulaire végétale seront brièvement présentés ci après avec un regard préférentiel sur les parois des cellules du bois, focus de ce travail de thèse.

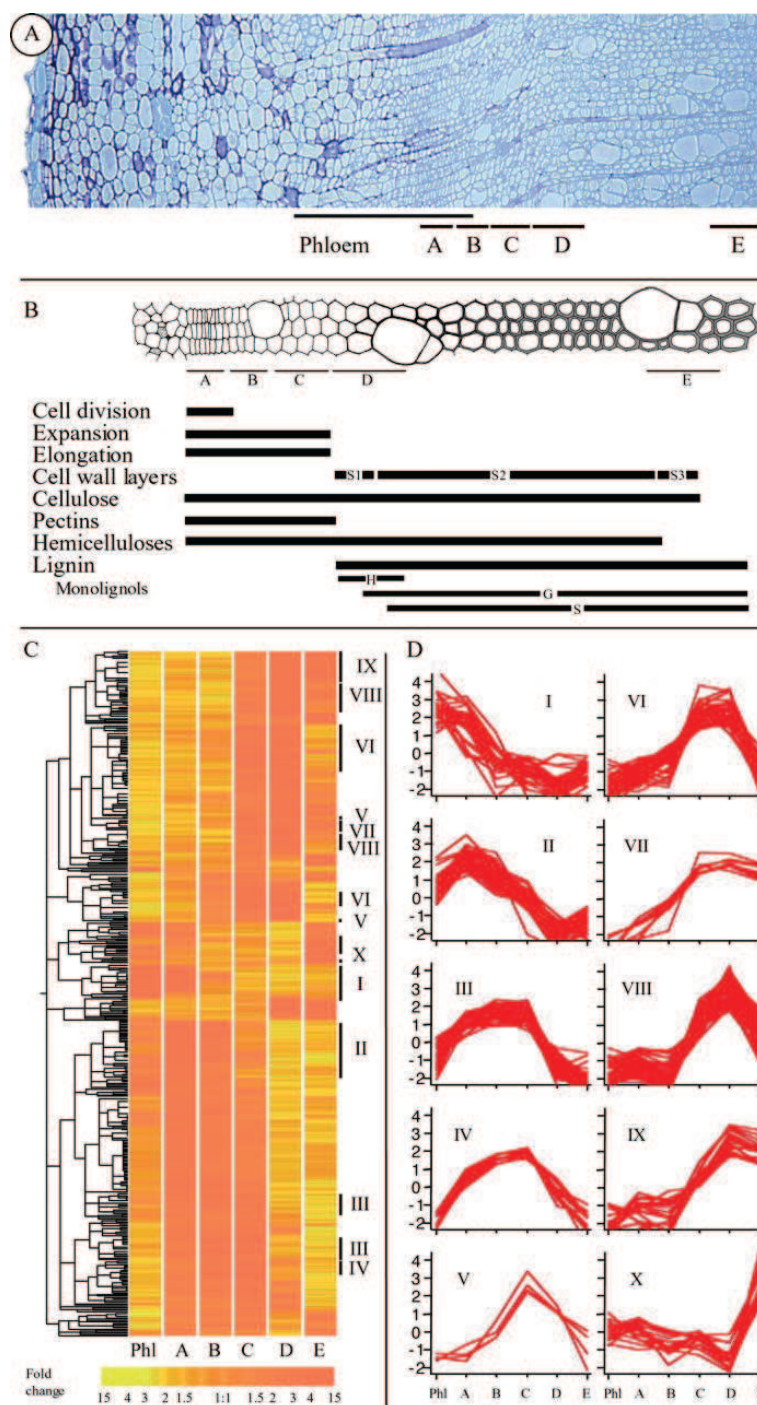


Figure 5. (A) Coupe transversale de bois d'un peuplier hybride colorée au bleu de toluidine. Les barres noires indiquent la position de l'échantillon de tissu. Des échantillons de phloème ont été également considérés pour donner une idée de l'expression des gènes dans un autre tissu d'origine cambiale. (B) Représentation schématique de différents types de cellules à différents stades de développement. Les barres représentent le moment et la durée des différents stades de développement et l'apparition des principaux composants de la paroi cellulaire. (C) Classification hiérarchique de 1791 gènes sélectionnés avec des niveaux d'expression différenciés dans les échantillons de différents tissus. L'échelle de couleur en bas représente les facteurs de variation entre les échantillons. (D) Groupes de gènes présentant des profils d'expression différentiels, les taux d'expression étant présentés en échelle $\log_2$. Les échantillons sont indiqués en bas de figure (d'après Hertzberg et al., 2001).

2.3.1 Lignines

La lignine est un hétéropolymère hydrophobe du métabolisme secondaire provenant de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et classiquement composé de trois sous unités : p-hydroxyphényl (H), guayacil (G) et syringil (S) (Boerjan et al., 2003). Elle est spécifique aux plantes et il s'agit d'un des plus abondants composés de la paroi végétale et il est le plus abondant bio-polymère de la planète, après la cellulose (Boudet, 2000; Boerjan et al., 2003).

La lignine a une composition très variable en fonction des espèces, des contraintes environnementales, de l'âge, des types cellulaires et même entre les différentes couches de la paroi d'une même cellule (Donaldson, 2001). Par exemple, les parois des gymnospermes sont composées principalement de sous-unités guayacils tandis que les parois des angiospermes présentent des sous-unités guayacils et syringils en proportions variables selon le type de cellule (Donaldson, 2001).

La lignine se dépose entre les polysaccharides et confère résistance aux parois, réduit leur porosité et augmente leur hydrophobicité. Grâce à ses propriétés, la lignine joue un rôle important dans le soutien mécanique de l'arbre mais aussi dans le transport de la sève en imperméabilisant les parois des cellules conductrices (Boudet et al., 2000; Laurans et al., 2006) et participe aux mécanismes de défense de la plante (Boudet, 2000).

2.3.2 Cellulose

En termes de biomasse, la cellulose est le polymère le plus abondant à l'échelle de la planète et est le principal composant des parois cellulaires végétales (Lindeboom et al. 2007; Joshi et al., 2011). Il s'agit d'une molécule stable, insoluble et qui se présente dans la paroi cellulaire sous forme de longues microfibrilles de cellulose (MFCs) qui s'enroulent autour des cellules.

Les microfibrilles sont synthétisées dans la membrane plasmique par des complexes enzymatiques appelés rosettes, constituées par groupe de six sous-unités (Carpita, 2011). Chaque sous-unité produit potentiellement entre quatre et six chaînes de glucose liées en β -1,4, qui seront ensuite assemblées pour former une microfibrille fonctionnelle (Fig. 6, Doblin et al., 2002; Cosgrove, 2005; Carpita, 2011). Ces microfibrilles constituent un réseau cristallin possédant une forte résistance mécanique et les rends également potentiellement résistantes aux attaques enzymatiques (Cosgrove, 2005).

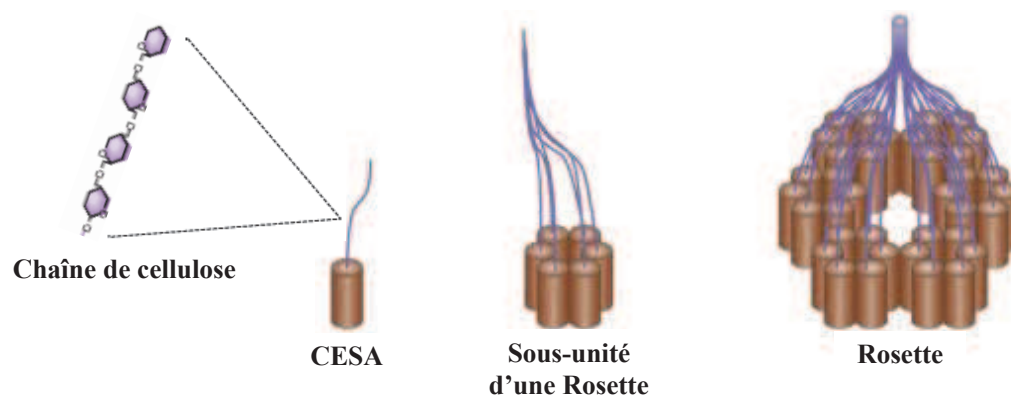


Figure 6. Modélisation de la synthèse des microfibrilles de cellulose par le complexe CESA. Chacune des chaînes de cellulose est composée de glucanes liées en β -(1,4) et est synthétisée par une protéine CESA. La cellulose est formée comme une bande cristalline qui se compose d'un grand nombre de ces glucanes. Dans ce modèle, 36 chaînes de cellulose sont formées par une rosette qui est composée par un hexamère de CESA hexamères (d'après Cosgrove, 2005).

Les microfibrilles de cellulose (MFCs) sont déposées sous un angle déterminé par rapport à l'axe longitudinal de la cellule, ce qui est important dans la détermination de la croissance cellulaire et des propriétés mécaniques de la paroi cellulaire (Barnett and Bonham, 2004; Lindeboom et al., 2008). Il est possible d'illustrer cela avec le cas des trachéides et fibres qui sont produits à différents stades de développement de l'arbre : quand l'arbre est encore jeune, l'angle des microfibrilles (AMF) est faible ce qui maintient de l'élasticité aux parois et permet à l'arbre de s'incliner sans se casser (Barnett and Bonham, 2004). Cependant, lorsque l'arbre grandit et supporte une charge croissante, l'AMF augmente dans la paroi cellulaire ce qui lui confère la résistance nécessaire pour supporter son propre poids (Barnett and Bonham, 2004). Les mécanismes qui contrôlent l'angle sous lequel les microfibrilles sont déposées ne sont pas encore élucidés mais, il existe une forte corrélation entre l'orientation des microtubules et la déposition des MFCs (Lindeboom et al., 2007; Yoneda et al., 2010) ainsi qu'entre les protéines à arabinogalactane à domaine fascicline (MacMillan et al., 2010). Contrairement à la synthèse et aux mécanismes de contrôle du dépôt de la cellulose dans la paroi cellulaire végétale, le rôle de la cellulose en tant que polysaccharide structural semble être assez clair.

2.3.3 Hémicellulose

Les hémicelluloses sont des polysaccharides complexes des parois cellulaires qui possèdent un squelette qui peut être constitué de xylose, de mannose et/ou de glucose liées en β -D-1,4 (Scheller and Ulvskov, 2010). Les hémicelluloses sont très diversifiées et peuvent se présenter sous différentes structures selon les espèces, les différents types cellulaires d'une même plante et entre les différentes couches qui constituent une même paroi cellulaire (Tableau 1, Scheller and Ulvskov, 2010).

Tableau 1. Présence des hémicelluloses dans les parois cellulaires végétales (d'après Scheller and Ulvskov, 2010).

Amount of polysaccharide in wall (% w/w) ^a						
Polysaccharide	Dicot walls		Grass walls		Conifer walls	
	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 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)-glucan	Absent	Absent	2-15	Minor	Absent	Absent

^aNumbers are typical values; actual values vary between different species and tissue types. Numbers are obtained from several different sources (31, 17, 37, 59, 72, 101, 135, 143, 147, 156; C. Manisseri and H. V. Scheller, unpublished data).

^b—, absent or minor; +, present but quantitative data not available.

Les hémicelluloses le plus souvent décrites dans les parois cellulaires végétales sont les xyloglucanes, les xylanes et les mannanes (Cosgrove, 2005; Scheller and Ulvskov, 2010) et seront présentées par la suite.

2.3.3.1 Xyloglucanes

Les xyloglucanes ont été trouvés dans toutes les espèces de plantes terrestres (Scheller and Ulvskov, 2010) et chez les dicotylédones, ce sont les hémicelluloses les plus abondantes dans la paroi primaire (Bourquin et al., 2002; Scheller and Ulvskov, 2010).

Les xyloglucanes sont composés d'un squelette identique à celui de la cellulose formé des résidus de glucose liés en β -1,4 auquel se greffent des résidus xylose, galactose et fucose (Carpita and Gibeaut, 1993; Somerville et al. 2004; Cosgrove 2005; Hoffman et al., 2005; Scheller and Ulvskov, 2010). Vu la grande diversité de chaînes latérales qui peuvent être présentes sur le squelette des xyloglucanes, une nomenclature simplifiée a été proposée, représentée par une seule lettre, par exemple, X pour xylose, L pour galactose, F pour fucose (Fry et al., 1993). Un exemple de fixation des chaînes latérales sur le squelette des xyloglucanes est présenté figure 7.

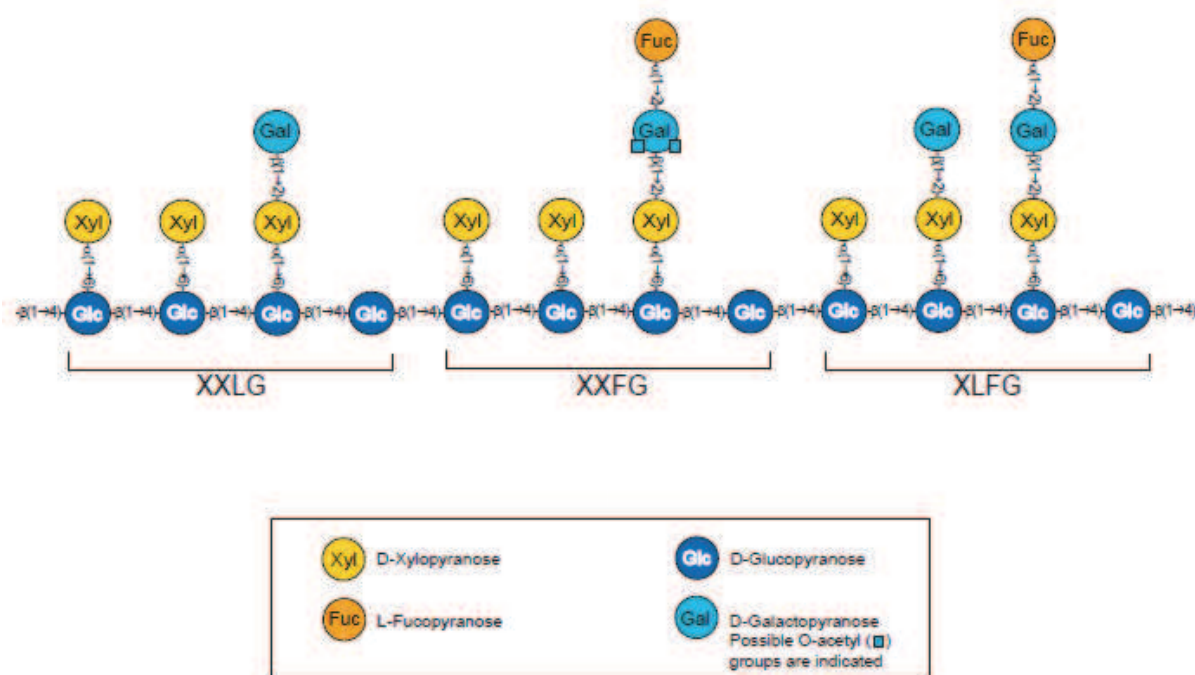


Figure 7. Xyloglucanes (d'après Somerville et al., 2004).

Les xyloglucanes peuvent avoir un rôle de polysaccharides structuraux ou de réserve (Cosgrove, 2005). En tant que polysaccharides structuraux, les xyloglucanes peuvent se lier fortement à la surface des MFCs et en fonction de la nature de son squelette et la nature des chaînes latérales peuvent former des liaisons covalentes entre les MFCs et ainsi contribuer à la rigidité de la paroi (Fry, 1989; Somerville et al., 2004; Hayashi et al., 2010; Park and Cosgrove, 2012). Il est possible également que la présence de fucose dans la chaîne latérale des XG améliore leur capacité d'adhésion à la surface des MFCs (Wu et al., 2010). Les xyloglucanes peuvent aussi être des polysaccharides de réserve, principalement dans les graines (Fry 1993; Scheller and Ulvskov, 2010).

2.3.3.2 Xylanes

Les xylanes sont les composants majoritaires de la paroi secondaire des plantes terrestres et sont nécessaires à leur croissance et à leur développement normal (York and O'Neill, 2008; Gorshkova et al., 2010). Il s'agit d'une famille de polysaccharides bien diversifiée composée par des xyloses liés en β -1,4 et qui peuvent être classifiées en deux groupes : les homoxylanes et les hétéroxylanes (York and O'Neill, 2008). Les homoxylanes sont rares et dans la plupart des cas les parois secondaires sont constituées par des hétéroxylanes où le squelette est

substitué, à des degrés variables, avec des mono- ou di-saccharides (York and O'Neill, 2008). Les substitutions les plus courantes chez les xylanes sont des glucoses (glucuronoxylanes, GX), des arabinoses (arabinoxylanes, AX) ou une combinaison de sucres acides et neutres (glucuronoarabinoxylan, GAX) (York and O'Neill, 2008; Scheller and Ulvskov, 2010). De plus, les hétéroxylanes sont souvent acétylées chez les plantes supérieures (Ebringerova and Heinze, 2000).

La distribution des substituants chez les xylanes ne semble pas être aléatoire et peuvent expliquer en partie la diversité fonctionnelle des xylanes chez les plantes (Ebringerova and Heinze, 2000). Certains types de structures sont plus courants chez certaines familles de plantes comme, par exemple les glucuronoxylanes chez le bois des angiospermes, les glucuronoarabinoxylanes chez les gymnospermes et les tissus de réserve des monocotylédones et les arabinoxylanes dans l'endosperme des graines de céréales (Fig. 8, (Ebringerova and Heinze, 2000).

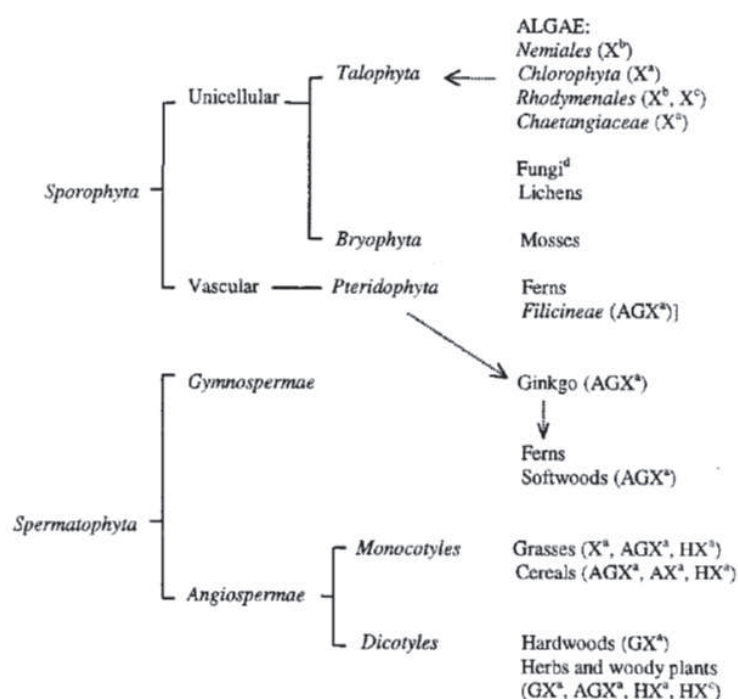


Figure 8. Présence de polysaccharides du type xylane dans le règne végétal ^{a)} β -(1,4)-D-Xylp backbone, ^{b)} β -(1,3)-D-Xylp backbone, ^{c)} β -(1,3 et 1,4)-D-Xylp backbone, ^{d)} pentosanes ou polysaccharides contenant xylose ; X=Xylane, GX=glucuronoxylanes, AGX=glucuronoarabinoxylanes, AX=arabinoxylanes et HX=hétéroxylanes (d'après Ebringerova and Heinze, 2000).

Les xylanes peuvent être encore sous-divisés en deux groupes en fonction du type d'interaction avec la cellulose : les xylanes qui se lient avec la cellulose immédiatement pendant la formation des microfibrilles et celles qui sont déposées plus tard au cours de la

différenciation cellulaire (Gorshkova et al., 2010). Il est possible que les xylanes du premier groupe soient distribués en fines couches le long des microfibrilles de cellulose tandis que celles du deuxième groupe interagissent principalement avec la lignine (Gorshkova et al., 2010).

Les xylanes sont très importants dans le renforcement de la paroi secondaire (Scheller and Ulvskov, 2010), mais leur rôle exact n'est pas encore connu (Persson et al., 2007). Dans la paroi secondaire, les xylanes pourraient agir en enrobant les microfibrilles de cellulose pour empêcher leur agrégation en macrofibrilles (Reis and Vian 2004).

2.3.3.3 Mannanes

Les mannanes constituent une importante classe d'hémicellulose qui peut être classifié en 4 sous-familles : mannanes linéaires, glucomannane, galactomannane et galactoglucomannane (Moreira and Filho, 2008; Scheller and Ulvskov, 2010).

Les mannanes sont linéaires avec un squelette constitué de mannose liés en β -1,4 (Moreira and Filho, 2008; Scheller and Ulvskov, 2010). En ce qui concerne leur fonction, les mannanes sont très connus en tant que composant de réserve dans les graines (Marcus et al., 2010; Scheller and Ulvskov, 2010), et peuvent également être impliqués dans les liaisons avec la cellulose par des liaisons covalentes comparables à celles des xyloglucanes et des xylanes (Liepman et al., 2007; Marcus et al., 2010). Il est également possible que les mannanes aient un rôle de signalisation dans le développement de la plante (Liepman et al., 2007). En effet, les mannanes semblent être bien régulés pendant les différentes étapes de croissance de la plante (Wang et al., 2012).

Les galactomannanes sont des mannoses liés en β -1,4, mais décorés avec des galactoses liés en β -1,6 à la chaîne principale (Moreira and Filho, 2008). Les chaînes de galactose constituent la partie hydrophile de la molécule et sa solubilité augmente proportionnellement à celle des branchements galactanes (Moreira and Filho, 2008). Les galactomannanes sont principalement retrouvés dans l'endosperme des semences, où elles ont un rôle de prévention de la déshydratation et surtout de la dénaturation des protéines et des enzymes indispensables à la germination (Moreira and Filho, 2008).

Les glucomannanes contiennent des chaînes de glucose liés en β -1,4 avec des mannoses liés également en β -1,4 distribués aléatoirement avec une proportion glucose et mannose de 3:1, chez les gymnospermes et de 1:1,5-2 chez les angiospermes, où elles sont présentes en forte association avec la cellulose et les xylanes (Moreira and Filho, 2008) et sont trouvées orientées

de façon parallèle aux MFCs (Olsson et al., 2011). Les glucomannanes sont souvent acétylés (Scheller and Ulvskov, 2010) et, sous cette forme, sont responsables de l'épaississement et des propriétés mucilagineuses du gel d'Aloe vera (Hamman, 2008).

Les galactoglucomannanes sont des polysaccharides contenant mannose, glucose et galactose dans une proportion de 3:1:1 où les galactoses sont présents en tant que branchement terminal liés en α -1,6 aux mannose et glucose (Moreira and Filho, 2008). En ce que concerne leur fonction, les galactoglucomannanes pourraient agir en tant que molécules de signalisation pendant le processus de différenciation cellulaire (Benova-Kakosova et al., 2006).

2.3.4 Pectines

Les pectines forment une famille de polysaccharides riches en acide galacturonique (GalA) avec des caractéristiques communes, mais extrêmement diverses dans leur structure (Willats et al., 2001). Les pectines peuvent être composées de plus de 17 monosaccharides différents, contenir plus de 20 types de liaisons différentes et être estérifiées par des groupes méthyl, acétyl et féruloyl (Willats et al., 2001; Jolie et al., 2010; Ralet et al., 2010). En outre, la structure des pectines semble changer au cours du développement cellulaire au sein d'une même paroi, changements qui seraient liés à une évolution progressive de leur fonction (Willats et al., 2001).

Les pectines possèdent de nombreuses fonctions chez les plantes, elles peuvent intervenir dans la croissance, le développement, la morphogénèse, la porosité de la paroi, l'hydratation. Elles participent également à l'adhésion entre cellules et sont impliquées dans les mécanismes de défense et de signalisation cellulaire (Mohnen, 2008).

Cinq classes de polysaccharides pectiques existent et peuvent être détectées dans les parois cellulaires végétales. Trois d'entre elles sont plus courantes : les homogalacturonanes (HG), les rhamnogalacturonanes de type I (RGI) et les rhamnogalacturonanes de type II (RGII) (Mohnen, 2008; Wolf et al., 2009; Harholt et al., 2010; Joshi et al., 2011).

2.3.4.1 Homogalacturonanes

Les homogalacturonanes (HG) sont considérés comme les polysaccharides pectiques les plus abondants de la paroi cellulaire végétale et représente plus de 60% du total des pectines pariétales (Mohnen, 2008; Wolf et al., 2009). Les HG sont des polymères linéaires avec un squelette composé d'acides galacturonique liés en α -1,4 (Fig. 9, Willats et al., 2001) et plus ou

moins méthyl-estérifiés (Somerville et al., 2004), cette méthyl-estérification pouvant atteindre 90% (Willats et al., 2001).

La méthyl-estérification affecte les propriétés rhéologiques des pectines, leur capacité d'adhésion et de résistance à la dégradation enzymatique et aussi leurs propriétés gélifiantes (Mohnen, 2008; Wolf et al., 2009). La régulation du degré de méthyl-estérification semble être contrôlée dans la paroi par des enzymes de type méthyl-estérases, les HG étant insérés dans la paroi cellulaire sous forme fortement méthylé (Mohnen, 2008). La dé-méthyl-estérification a été associée avec la présence d'ions positivement chargés de la paroi en plus d'une association entre les HG via des liaisons Ca^{2+} (Mohnen, 2008). Cette association entre HG via des ions Ca^{2+} est bien connu pour lui conférer des propriétés gélifiantes (Willats et al., 2001; Mohnen, 2008).

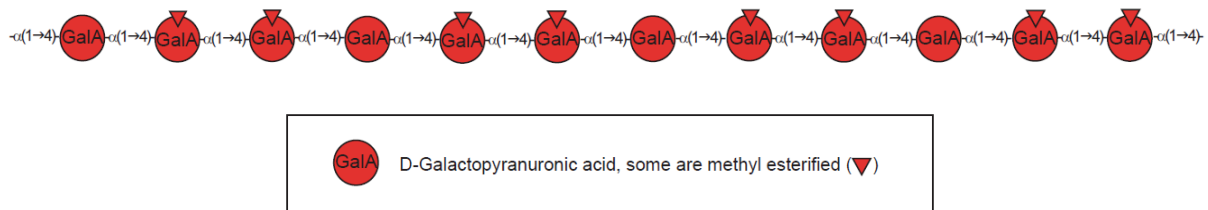


Figure 9. Homogalacturonane (HG) (d'après Somerville et al., 2004).

2.3.4.2 Rhamnogalacturonane de type I

Les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) représentent 20 à 35% des composés pectiques des parois. Les RGI possèdent une chaîne principale constituée par la répétition d'un motif disaccharides de rhamnoses liés en α -1,2 et d'acide galacturonique liés en α -1,4 (Mohnen, 2008; Harholt et al., 2010). Sur cette chaîne principale, peuvent se lier des chaînes latérales composées principalement de galactanes liés en β -1,4 et d'arabinanes liés en α -1,4, i. e., des arabinogalactanes du type I (Mohnen, 2008). Il existe une grande diversité de chaînes latérales et les plus courantes sont constituées de galactanes, d'arabinanes et d'arabinogalactanes mais d'autres branchements peuvent être présents tels que des fucoses, glucoses, acides glucuroniques (Mohnen, 2008). La présence et la disposition des chaînes latérales semblent être fortement contrôlées pendant la différenciation cellulaire et peuvent être en lien avec les propriétés mécaniques de la paroi (Willats et al., 1999; Willats et al., 2001).

Un exemple d'une structure possible de RG-I est présenté figure 10.

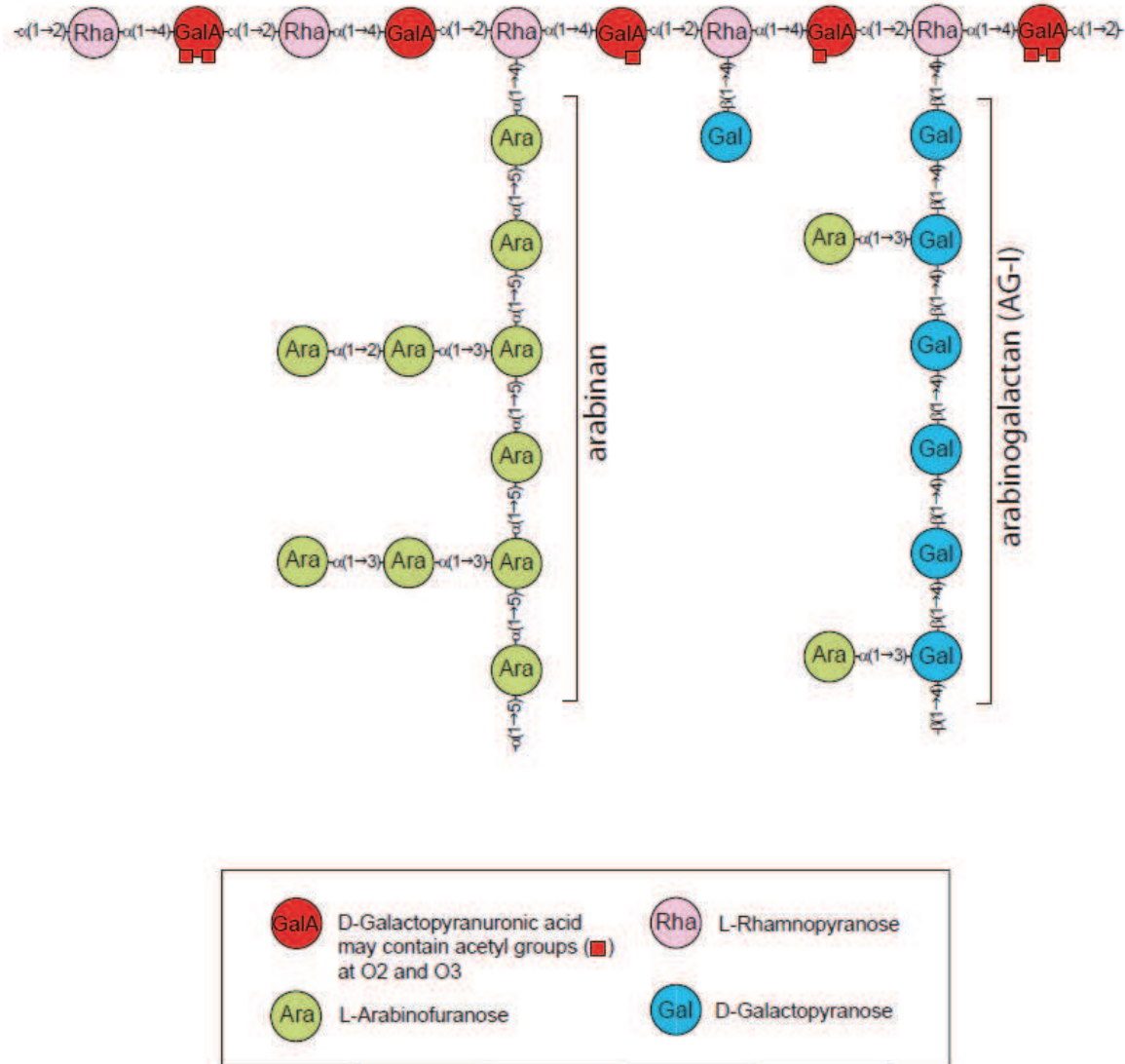


Figure 10. Rhamnogalacturonane type I (RG-I) (d'après Somerville et al., 2004).

2.3.4.3 Rhamnogalacturonane de type II

Les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II) représentent environ 10% des pectines (Mohnen, 2008). Il s'agit d'une classe de pectine structuralement complexe mais hautement conservée dans des nombreuses espèces de plantes (Willats et al., 2001).

La dénomination RG-II (RG-II) porte à confusion puisqu'ils possèdent un squelette constitué de résidus d'acides galacturonique identique à celui des HG, sur lequel viennent se greffer des chaînes latérales complexes (Fig. 11, Willats et al., 2001; Guillon et al., 2008; Mohnen, 2008; Liwanag et al., 2012).

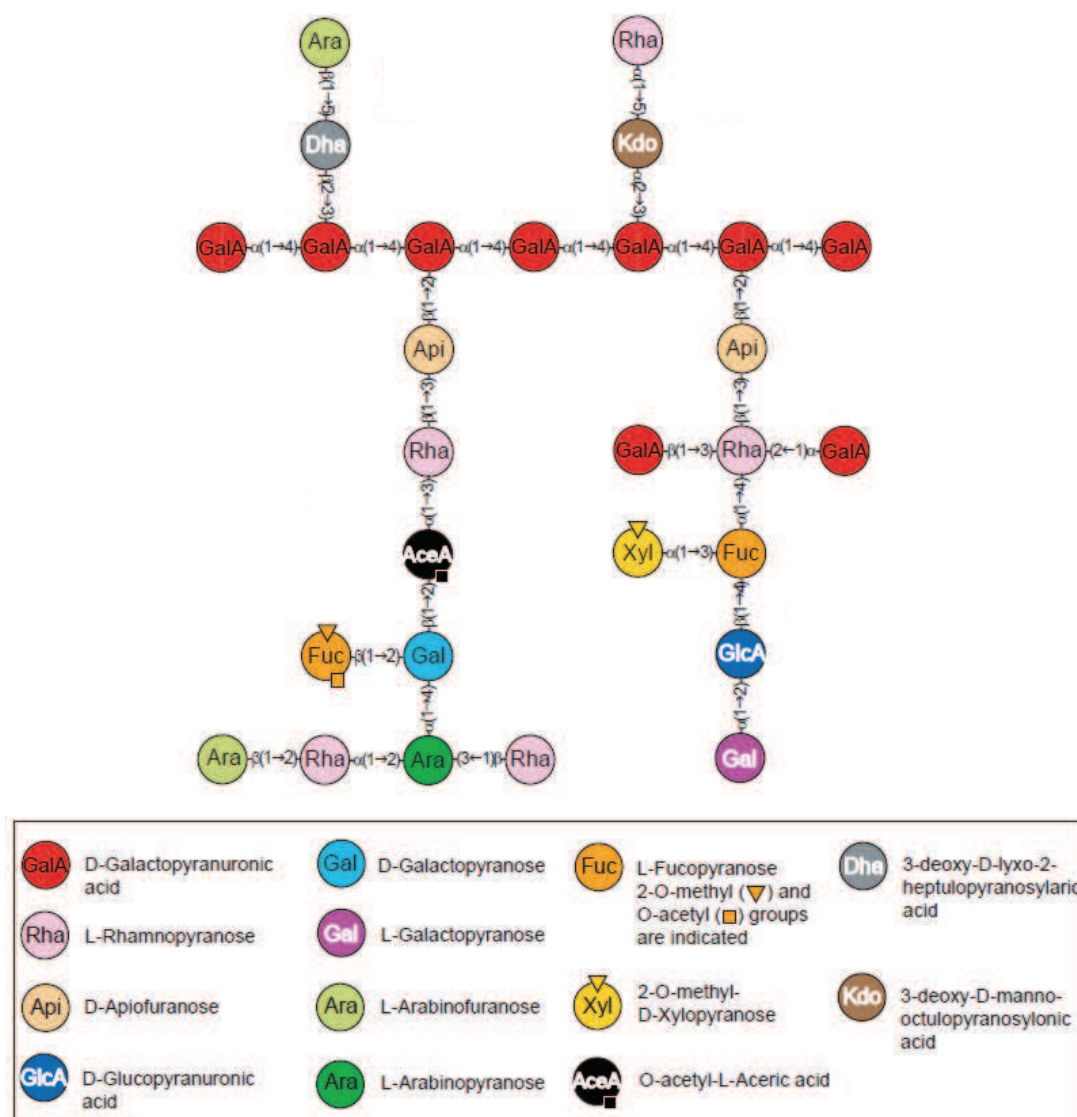


Figure 11. Rhamnogalacturonane type II (RG-II) (d'après Somerville et al., 2004).

2.3.5 Protéines

Les parois cellulaires des plantes supérieures renferment environ 5% de protéines (Albenne et al., 2009). Ces protéines peuvent être impliquées dans la modification des composants de la paroi cellulaire, dans la structure de la paroi, dans la signalisation et les interactions avec la membrane plasmique (Jamet et al., 2006; Albenne et al., 2009).

2.3.5.1 Protéines fonctionnelles

Les protéines fonctionnelles sont importantes dans les processus de modifications des composants pariétaux (Fry, 1995), la croissance, la signalisation et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Albenne et al., 2009). Elles sont principalement des enzymes et des expansines.

2.3.5.1.1 Enzymes

Ils existent nombre d'évidences pour la présence d'enzymes dans la paroi cellulaire, notamment leur détection par des anticorps spécifiques (Fry, 1995; Nishikubo et al., 2007). Ces enzymes sont responsables pour quatre larges classes de réactions dans la paroi cellulaire : transglycosylation, hydrolyse, transacylation et réactions d'oxydoréduction. Les deux dernières réactions ne seront pas abordées ici car, selon Fry (1995) il n'existe pas d'évidence pour l'existence de ces réactions *in muro*.

La paroi cellulaire est composée principalement de polysaccharides formés par des combinaisons variables de 14 monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques. Les liaisons glycosidiques sont créées 7108 par l'action de glycosylsynthases, qui relient des sucres provenant d'un donneur approprié à un substrat accepteur (Fry, 1995; Scheible and Pauly, 2004). Au contraire des glycosylsynthases, les hydrolases agissent de façon à rompre les liaisons glycosidiques (Fry, 1995).

2.3.5.1.2 Expansines

Les expansines forment une famille de protéines non-enzymatiques, étroitement apparentées entre elles, qui ont la capacité d'induire la relaxation des tensions et l'extension des parois des cellules végétales (Cosgrove, 2000). Les expansines agissent par rupture des liaisons hydrogènes entre hémicellulose et microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire des cellules végétales en expansion (Fig. 12, Cosgrove, 2000; Gray-Mitsumune et al., 2004).

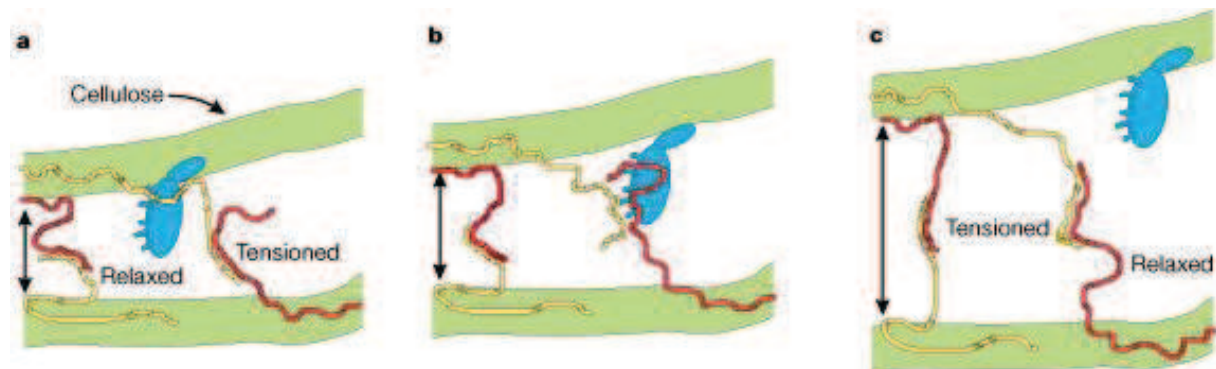


Figure 12. Un modèle de l'action des expansines sur le relâchement de la paroi. Les microfibrilles de cellulose sont connectés les unes avec les autres par des glycanes (traits rouge et traits jaunes) qui peuvent coller à la surface des microfibrilles et entre elles. L'expansine (bleu) est supposée intervenir dans la liaison des glycanes à la surface des microfibrilles (a) ou entre elles (b). Sous la contrainte mécanique résultant de la turgescence, l'action des expansines résulte en un déplacement des polymères pariétaux (c) et un glissement dans les points d'adhésion avec les polymères (comparer b et c) (d'après Cosgrove, 2000).

2.3.5.2 Protéines structurales

Les protéines de la paroi cellulaire végétale sont principalement des protéines structurales (Bao et al., 1992) qui renforcent les interactions dans les réseaux polysaccharidiques de la paroi (Albenne et al., 2009). Nous décrirons brièvement les protéines riches en hydroxyproline, les protéines riches en proline et les protéines riches en glycine.

2.3.5.2.1 Protéines glycosilées riches en hydroxy-proline

Le terme protéines glycosilées riches en hydroxy-proline (HRGPs) est utilisé de façon générique pour désigner les molécules qui sont riches en Hyp/Pro, généralement plus de 5% (Sommer-Knudsen et al., 1998). Les HRGPs peuvent être classées en quatre groupes principaux : AGPs, extensines, P/HRGPs (ou PRPs) et lécithines des solanacées (Cassab, 1998; Sommer-Knudsen et al., 1998). Seuls les trois premiers groupes seront abordés dans le cadre de ce travail.

2.3.5.2.1.1 Protéines à arabinogalactane

Les protéines à arabinogalactanes (AGPs) sont des HRGPs (Gaspar et al., 2001; Showalter, 2001; Tan et al., 2004). Les AGPs présentent un squelette protéique de taille très variable (Seifert and Roberts, 2007) qui représente environ 2 à 10% de leur structure (Sommer-Knudsen et al., 1998). Sur ce squelette protéique viennent se brancher des sucres en quantités importantes qui peuvent atteindre 90-95% de sa composition (Tan et al., 2004; Seifert et Roberts, 2007), ce qui les différencie des autres HRGPs (Gaspar et al., 2001). Du fait de cette forte glycosylation, ces protéines sont souvent décrites comme des protéoglycanes (Sommer-Knudsen et al., 1998). Le plus souvent, les chaînes latérales des AGPs sont composées d'arabinogalactanes du type II constitués d'une chaîne principale de galactanes liés en β -1,3 (Yates et al., 1996), mais des rhamnoses et acides glucuroniques peuvent être également incorporés dans ses chaînes latérales (Fig. 13, Tan et al., 2004).

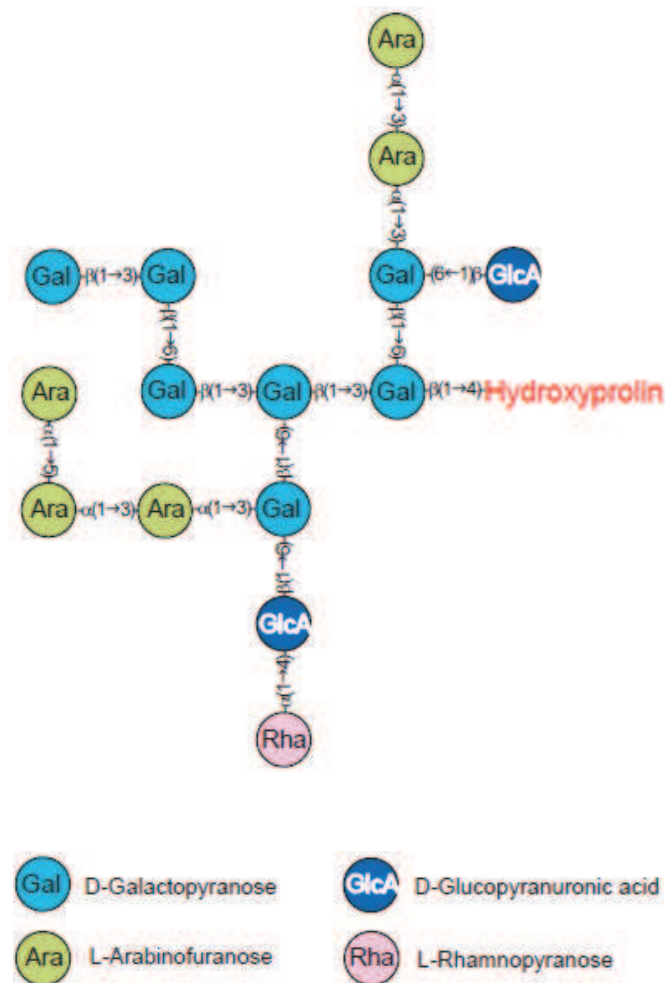


Figure 13. Protéines à arabinogalactane (AGP) (d'après Somerville et al., 2004).

En ce qui concerne la composition du squelette protéique, les AGPs présentent une énorme diversité qui a été illustrée récemment par des études de la séquence des génomes complets de certaines plantes (Yates et al., 1996; Ellis et al., 2010). Les AGPs sont divisées en deux classes selon la composition de leur squelette protéique : les AGPs « classiques » et les AGPs « atypiques » (Schultz et al., 1998; Showalter, 2001; Ellis et al., 2010). Le squelette polypeptidique des AGPs classiques contient majoritairement les aminoacides Hyp mais aussi des Ala, Ser, Thr et Gly tandis que les AGPs atypiques sont très variables dans leur composition (Showalter, 2001; Tryfona et al., 2012). Les AGPs classiques possèdent dans leur partie N-terminale, un signal de sécrétion et une partie C-terminale hydrophobe (Schultz et al. 1998, Ellis et al., 2010). Pendant le processus de synthèse, la partie C-terminale est clivée et un site d'ancrage glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) est éventuellement ajouté à la protéine (Schultz et al., 1998; Schultz et al., 2002), leur permettant potentiellement d'établir des interactions entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

Une autre classe d'AGPs sont les protéines à arabinogalactanes possédant un domaine fascicline-like (FLAs) qui peuvent également avoir un site d'ancrage GPI (Johnson et al., 2003; Seifert and Roberts et al., 2007). Un schéma de la structure d'une FLA est présenté fig. 14. Les FLAs constituent une classe d'AGPs chimériques qui contiennent entre un et quatre domaines fascicline (Johnson et al., 2003). Le domaine fascicline est composé par 110 à 150 amino-acides avec des séquences de faible similarité, mais avec deux domaines très conservés entre elles (Johnson et al., 2003). Les protéines avec des domaines fascicline dans d'autres organismes que les plantes, sont connus comme des molécules ayant une fonction d'adhésion (Johnson et al., 2003).

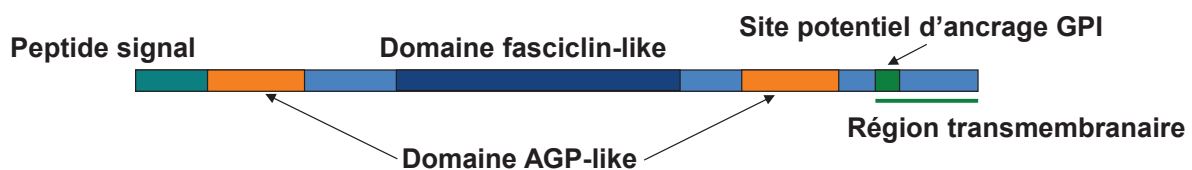


Figure 14. Représentation schématique d'une AGP avec un domaine fascicline (FLA).

L'hétérogénéité structurale tant de la fraction polysaccharidique que du squelette protéique rendent l'étude des AGPs très difficile (Knox, 1997). Ainsi, dans l'état l'actuel des connaissances, la fonction de ces molécules n'est pas encore claire (Tan et al., 2004). Il est possible que la fonction des AGPs réside dans le squelette protéique, dans les épitopes de polysaccharides ou bien dans les deux (Ellis et al., 2010).

Plusieurs propriétés et fonctions sont attribuées aux AGPs : faible viscosité à des grandes concentrations, capacité d'agir en tant qu'agent émulsifiant, capacité de retenir l'eau (Showalter, 2001; Ellis et al., 2010), propriétés d'adhésion (Schultz et al., 1998; Showalter 2001; Ellis et al., 2010), fonction structurale et d'organisation physique de la paroi cellulaire (Showalter, 2001), capacité d'interagir avec des composants du réseau de signalisation (Schultz et al., 1998). Les AGPs peuvent être impliquées dans différentes étapes de différenciation cellulaire telles que le dépôt de la paroi secondaire et la mort cellulaire (Showalter, 2001). Chez le peuplier, par exemple, les FLAs semblent être spécifiquement associés au dépôt de la paroi secondaire (Dejardin et al., 2004; Lafarguette et al., 2004).

Les AGPs peuvent interagir entre elles ou avec d'autres composants de la paroi cellulaire et ainsi contribuer à son épaissement (Showalter, 2001). Des exemples de cette possible interaction ont été observés entre AGPs et cellulose dans la fibre de lin (Seifert and Roberts,

2007) et chez l'eucalyptus (MacMillan et al., 2010) et le peuplier (Dejardin et al., 2004; Lafarguette et al., 2004), où elles ont été associées à l'orientation de l'angle des microfibrilles de cellulose.

2.3.5.2.1.2 Extensines

Les extensines sont des glycoprotéines riches en Hyp et Ser (Cassab, 1998; Sommer-Knudsen et al., 1998) avec des branchements arabinanes et galactanes (Sommer-Knudsen et al., 1998). La glycosylation des extensines semble être la conformation de son squelette protéique et serait déterminant pour sa fonction dans la paroi cellulaire (Sommer-Knudsen et al., 1998).

Les extensines semblent être régulées selon le tissu, le stade de développement et avoir des fonctions différentes selon le type cellulaire, (Sommer-Knudsen et al., 1998). De plus, il est possible que différents types d'extensines soient trouvées dans un même type cellulaire (Sommer-Knudsen et al., 1998). Les extensines peuvent interagir avec des pectines (RG-I) par des liaisons covalentes et également avec des microfibrilles de cellulose (Cassab, 1998; Sommer-Knudsen et al., 1998).

2.3.5.2.2 Protéines riches en proline

Les protéines riches en proline sont caractérisées par la répétition de la séquence Pro-Pro intercalée entre une variété d'autres unités répétitives (Showalter, 1993), par exemple, Pro-Pro-X-Y-Lys, où X et Y peuvent être valine, tyrosine, histidine ou acide glutamique (Showalter, 1993). Les PRPs sont également caractérisées par l'absence de serine et par le fait qu'elles sont faiblement glycosylées (Cassab, 1998).

L'expression des PRPs présentent des spécificités tissulaires et cellulaires et semblent être impliquées dans différents aspects du développement (Cassab, 1998). Les PRPs peuvent interagir avec d'autres composants de la paroi et il est possible que, comme les extensines, elles soient impliquées dans le processus de lignification (Showalter, 1993; Cassab, 1998).

2.3.5.2.3 Protéines riches en glycine

Les protéines riches en glycine (GRPs) sont des protéines caractérisées par une structure primaire qui contient environ 70% de glycine (Showalter 1993; Cassab 1998; Ringli et al. 2001). La séquence des GRPs est souvent organisée selon le motif (Gly-X)_n où X est souvent une glycine mais, cette position peut également être occupée par d'autres aminoacides tels que Ala, Ser, Val, His, Phe, Tyr et Glu (Ringli et al., 2001).

Ils existent au moins deux classes de GRPs : une que l'on trouve dans la paroi cellulaire et qui est régulée pendant le développement et l'autre que l'on trouve dans le cytoplasme (Showalter, 1993). Ces deux groupes de GRPs auraient des séquences bien conservées probablement importantes pour leur fonction (Sachetto-Martins et al., 2000).

Les GRPs peuvent présenter une grande diversité de localisation et de fonction (Sachetto-Martins et al., 2000). Les GRPs peuvent être impliquées dans le développement des tissus vasculaires, la floraison, la résistance au froid (Cassab, 1998), la lignification des parois (Showalter, 1993), et l'adhésion entre cellules, grâce à leur capacité d'interagir avec des polysaccharides (Ringli et al., 2001).

3. Bois de tension, mécanisme d'adaptation

Les arbres ont une grande taille et quelques fois la tension créée par les contraintes de maturation ne sont pas suffisantes pour que l'arbre puisse gérer et stabiliser son poids. Dans ce cas, un type particulier de bois est mis en place, le bois de réaction (Du and Yamamoto, 2007). Le bois de réaction est un mécanisme remarquable d'adaptation en réponse aux contraintes environnementales.

La formation du bois de tension est généralement associée à une asymétrie de la moelle et selon Jacobs (1945) le développement asymétrique de la tige entraînerait une distribution asymétrique des contraintes de maturation, qui serait à l'origine des mouvements d'orientation de la tige et des branches. Cet auteur avait déjà démontré qu'un niveau élevé de contraintes correspondait à une zone riche en bois de tension, ce qui a été également observé par d'autres (par exemple, Fang et al., 2008). Du côté diamétralement opposé du bois de réaction se forme un bois appelé opposé.

La présence de bois de réaction dans une bille de bois est souvent considérée comme un défaut technologique dévalorisant de façon importante la valeur marchande du bois. Ainsi, la présence de bois de réaction peut entraîner l'apparition de fentes à l'abattage et de l'aspect pelucheux à la surface des planches (Jourez, 1997; Plomion et al., 2001). Cependant, le bois de réaction pourrait être un facteur favorable pour la production d'éthanol cellulosique (Munoz et al., 2011).

Chez les gymnospermes, le bois de réaction est nommé bois de compression et se forme à la face inférieure des tiges inclinées. Chez les angiospermes, comme le peuplier, le bois de réaction est appelé bois de tension et se forme à la face supérieure des tiges inclinées.

Seul le savoir sur le bois de tension sera traité dans ce manuscrit pour ses caractéristiques anatomiques, chimiques et mécaniques.

3.1 Les caractéristiques anatomiques

Anatomiquement, le bois de tension diffère du bois opposé principalement au niveau des fibres. En effet, la proportion de fibres par rapport aux vaisseaux et rayons est plus importante que dans le bois opposé (Fig. 15). De plus, les fibres du bois de tension présentent des modifications structurales et chimiques qui lui confèrent des propriétés mécaniques particulières.

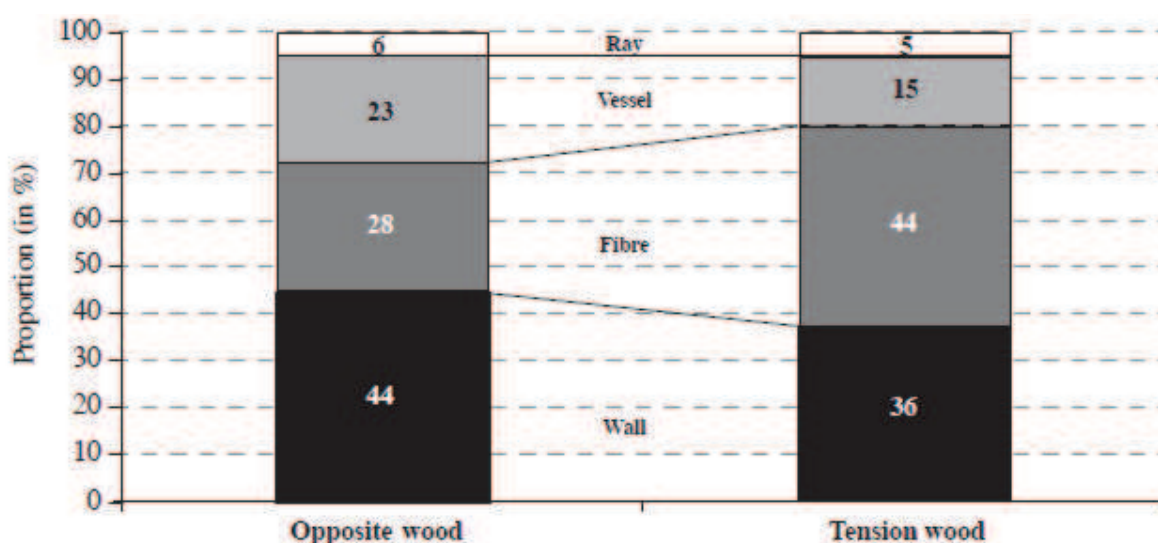


Figure 15. Proportion de différents éléments par type de bois mesuré par analyse d'image de la section transversale (d'après Jourez et al., 2001).

3.1.1 Les fibre-G

Les fibres jouent un rôle mécanique fondamental chez les angiospermes (Gorshkova et al., 2010). Dans le bois différencié, les fibres sont des cellules mortes, i. e., qui ont perdu leur protoplasme pendant le processus de mort cellulaire. Ces fibres sont longues, avec des extrémités effilées et une paroi secondaire épaisse qui leur confère un rôle important dans les propriétés mécaniques de ce bois (Gorshkova et al., 2010).

D'une façon générale, la fonction des fibres dépend de leur longueur et des caractéristiques de leur paroi secondaire organisée en trois sous-couches S1, S2 et S3 qui diffèrent entre elles par leur composition chimique et par l'orientation de l'angle des microfibrilles de cellulose (Gorshkova et al., 2010).

Les fibres peuvent être séparées en deux groupes selon le type de paroi secondaire : fibres du type xylane (fibres-S) ou fibres du type galactane (Gorshkova et al., 2010). Les fibres du type xylane reçoivent cette dénomination car les xylanes sont les polysaccharides les plus abondants dans leur paroi secondaire, après la cellulose (Gorshkova et al., 2010). Les fibres de type galactanes englobent les fibres gélatineuses ou fibres G du bois de tension. Celles ci sont connues sous ce nom, car elles présentent une couche surnuméraire d'aspect gélatineux (la couche G) qui est déposée après la couche S2. En effet, des études ont montré que le dépôt d'une couche S (secondaire) précède toujours celui de la couche G, (Gorshkova et al., 2010). Un schéma comparatif entre ces deux types de fibres est présenté dans la figure 16.

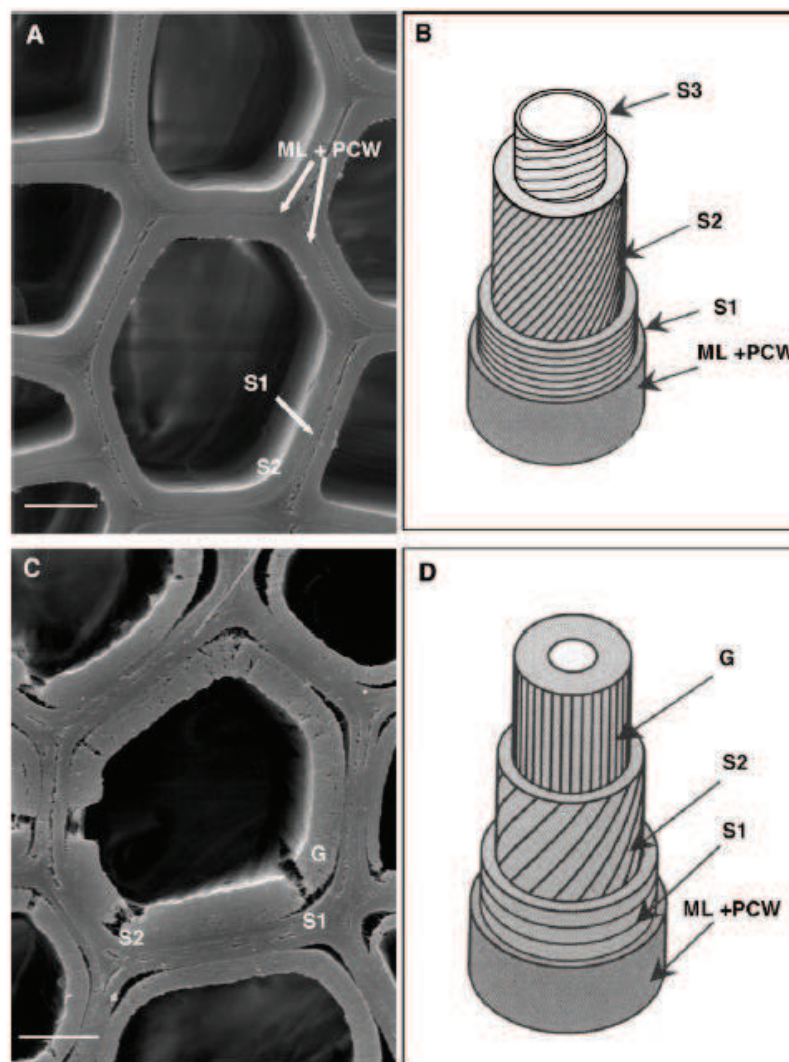


Figure 16. Différence entre une fibre - S et une fibre – G chez le peuplier (d'après Dejardin et al., 2010).

Les fibres du bois de tension sont apparemment plus longues que celles du bois opposé (Jourez et al., 2001) et présentent une couche supplémentaire déposée à la face interne de la S2 chez environ 50 % des espèces étudiées (Clair et al., 2006).

Il est vrai que pour certaines espèces, le bois de tension ne comporte pas de fibres G tout en exhibant de fortes contraintes de maturation comparables à des bois de tension à couche G (Clair et al., 2006) et leur permettant de réorienter leurs axes. Cependant, nous ne détaillerons par la suite que les connaissances portant sur le bois de tension à couche G tel celui du peuplier, espèce choisie comme modèle d'étude dans ce projet de thèse.

3.1.2 La couche G

La couche G (Fig. 17) a reçu cette dénomination du fait de son aspect gélatineux (Gorshkova et al., 2012), ce qui a été récemment vérifié expérimentalement (Clair et al., 2008; Chang et al., 2009).

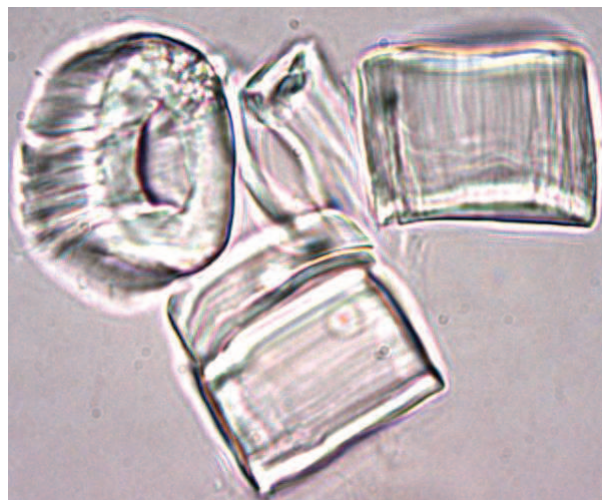


Figure 17. Vue en détail des couches G isolées par sonication à partir du bois de tension d'un peuplier (Photo Françoise Laurans, INRA Orléans).

Plusieurs espèces produisent des parois gélatineuses, c'est par exemple le cas des fibres périphloémiennes du lin, du chanvre et du ramie, mais les fibres-G pour lesquelles ils existent plus d'informations sont celles présentes dans le bois de tension (Gorshkova et al., 2012).

Selon (Gorshkova et al., 2010; 2012), il y aurait des traits communs aux couches G formées chez ces différentes espèces : grande quantité de cellulose très cristalline, microfibrilles de cellulose orientés axialement, épaisseur, absence de xylanes et de lignines. Ces deux derniers points peuvent présenter des exceptions car récemment des xylanes et des lignines ont été

détectés dans les fibres de bois de tension chez le peuplier, respectivement par Kim and Daniel (2012) et Joseleau et al. (2004).

3.2 Les caractéristiques chimiques

En plus des aspects anatomiques, le bois de tension diffère du bois normal par des caractéristiques biochimiques. En ce que concerne la composition chimique (Timell, 1969) (Tableau 2) a montré pour différentes espèces que le bois de tension a moins de lignines, moins de mannose et de xylose, la teneur en cellulose (déduite de la teneur en glucose) et en galactose sont plus importantes.

Tableau 2. Composition en polysaccharides du bois de tension et du bois opposé pour différentes espèces (d'après Timell, 1969).

	Lignin		Galactose		Glucose		Mannose		Arabinose		Xylose	
	NW	TW	NW	TW	NW	TW	NW	TW	NW	TW	NW	TW
<i>Acer rubrum</i>	25,4	17,5	1	1,6	42,3	59,2	3,3	1,8	1	1,3	18,1	12,2
<i>Betula papyrifera</i>	22	16,1	1,3	5,4	40,3	51,3	2	1,3	0,5	0,5	23,9	17,5
<i>Fagus grandifolia</i>	23,5	17	0,8	3	40,4	54,7	1,8	1,2	0,9	0,8	21,7	13,3
<i>Populus tremuloides</i>	20,9	16,8	1,1	1,4	44,4	54,5	3,5	1,3	0,9	0,8	21,2	17,1
<i>Prunus pensylvanica</i>	17,4	15,6	1,4	2,8	43,4	53,5	2,6	1,5	0,7	0,8	24,9	18,1
<i>Robinia pseudoacacia</i>	30,1	25,2	0,8	1,4	42	51,2	2,2	1,2	0,4	0,3	16,7	14,2
<i>Ulmus americana</i>	21,7	20,2	0,9	1,4	50,2	54,3	3,4	1,5	0,4	0,5	15,1	13,2

Généralement les analyses de la composition chimique faites sur le bois de tension ne prennent pas en compte les différences de composition chimique qui peuvent exister entre chaque type cellulaire ni par rapport à chacune des couches qui constitue ces cellules. Ainsi, (Norberg and Meier, 1966) ont mis au point une technique pour isoler les couches G à partir du bois de tension de peuplier, par sonication de coupes transversales de bois de tension et ont ainsi pu analyser leur composition spécifique. Leurs analyses ont montré que les couches G était composées presque uniquement de cellulose. De plus, la cellulose est très cristalline, et organisée en microfibrilles orientées parallèlement à l'axe de la fibre, ce qui pourrait être déterminant pour les propriétés mécaniques des fibres G.

Or, aujourd'hui nous savons que les couches G sont bien composées majoritairement de cellulose, mais comporteraient également d'autres molécules : AGPs (Lafarguette et al., 2004; Bowling and Vaughn, 2008), lignines (Joseleau et al., 2004) xyloglucanes (Nishikubo et al., 2007; Baba et al., 2009; Kaku et al., 2009), galactanes (Arend, 2008; Bowling and Vaughn, 2008), RG-I (Bowling and Vaughn, 2008), mannanes et xylanes (Kim and Daniel, 2012). Mellerowicz et al. (2008) propose un modèle pour différencier structuralement et chimiquement les deux types de couches S et G prenant en compte la composition de la couche G et proposant une possible interaction entre ses constituants (Fig. 18)

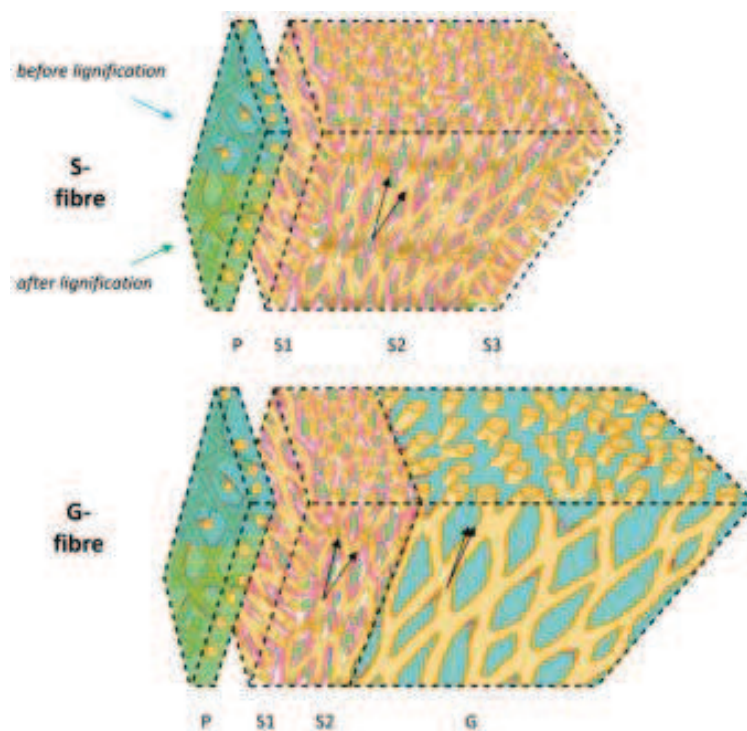


Figure 18. Deux types d'organisation de la paroi dans une fibre normale fibre-S et une fibre-G. La différence frappante entre la composition et la structure des parois primaires (P), secondaires (S) et la couche G (G) est représentée. La paroi primaire est initialement une paroi non lignifiée et la seule paroi présente pendant l'élongation des fibres. Elles sont composées de pectines fortement hydratées (bleu), microfibrilles de cellulose (beige) et chaînes des xyloglucanes (rouge) et se lignifie (vert) après le dépôt de la paroi secondaire. Les microfibrilles de cellulose suivent un même modèle dans une paroi, mais ce modèle change entre les parois. L'angle des microfibrilles (AMFs) dans la couche S2 et dans la couche G est indiqué par des longues flèches. Les fibrilles consistent des microfibrilles et ses agrégats (macrofibrille), qui forment un agrégat en format de « honeycomb ». La paroi secondaire est composée de cellulose, de xylanes (pink), et de lignines avec des faibles proportions de mannanes (bleu foncé). La couche G est composée principalement de larges microfibrilles de cellulose, avec une porosité importante. Les pores sont probablement remplis avec des pectines hydratées et des protéines à arabinogalactanes. Des chaînes de xyloglucanes (rouge) sont présentes dans la paroi primaire et dans la couche G et également entre les différentes couches de la paroi cellulaire (d'après Mellerowicz et al., 2011).

3.3 Les caractéristiques mécaniques

Dans le bois de tension, les contraintes de maturation sont environ dix fois plus importantes par rapport au bois normal (Clair et al., 2006; Du and Yamamoto, 2007; Mellerowicz and Sundberg, 2008), engendrant une force qui permet à l'arbre de maintenir son équilibre et même de redresser la tige des jeunes arbres (Fig. 19, Coutand et al., 2004).

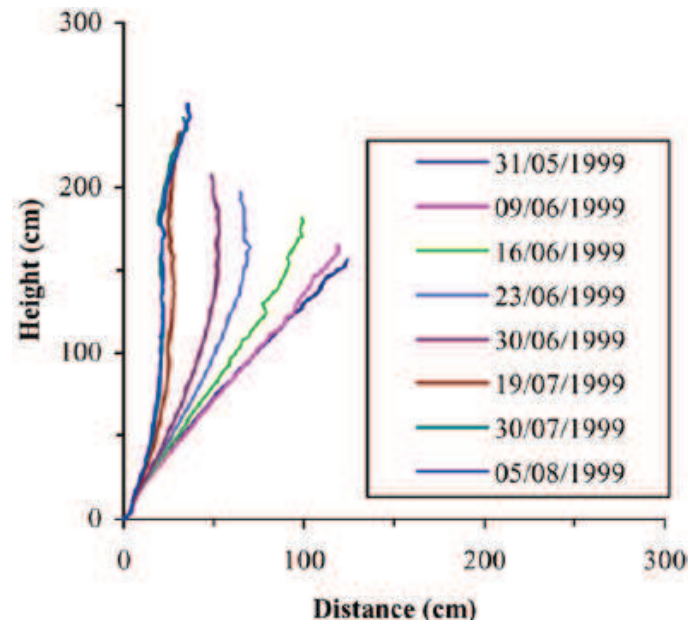


Figure 19. Formes successives d'un tronc de peuplier pendant le processus de redressement. Chaque ligne correspond à la forme du tronc, reconstruite à partir des données obtenues par numérisation. La ligne bleu foncé représente la forme de l'arbre juste après inclinaison (d'après Coutand et al., 2004).

Les mécanismes de contrôle moléculaire de la formation de bois de tension en réponse à un stress mécanique sont encore très peu connus (Paux et al., 2005) ainsi que le mécanisme à l'origine de cette tension.

Les premières théories proposées pour expliquer la tension dans le bois de tension sont basées sur le fait que pendant la maturation des fibres, leurs parois s'épaississent, gonflent et subissent une contraction longitudinale. Ce gonflement serait dû soit au dépôt de lignines et d'hémicelluloses dans la matrice (Boyd, 1972), soit à la cristallisation de la cellulose dans la paroi (Bamber, 1987). En 1956, Wardrop à partir de ses expériences sur des eucalyptus, propose également que la contraction des fibres serait due à la cristallisation de la cellulose durant la différenciation et que ceci pourrait être facilitée par le manque de lignine.

D'autres auteurs suggèrent également que la présence et la quantité de lignines n'est pas ou très peu corrélée avec la tension (Fig. 20, Okuyama et al., 1994). Par ailleurs, l'implication de la lignine dans la création de la tension semblerait encore plus difficile à expliquer pour les

espèces qui présentent un bois de tension composé par des fibres G car ces couches seraient dépourvues ou presque de lignines (Okuyama et al., 1994).

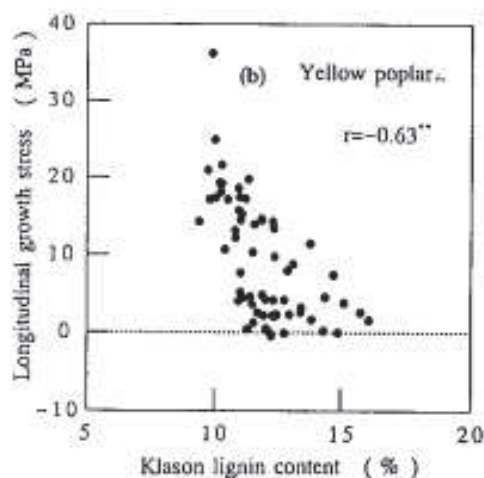


Figure 20. Rapport entre le stress de croissance longitudinal et le contenu de lignines Klason en 3 tronc de tulipier de virginie inclinés (d'après Okuyama et al., 1994).

3.3.1 La couche G à l'origine de la tension

Plus récemment quelques auteurs proposent que la tension serait spécifiquement créée au niveau des couches G, pour les espèces qui en produisent (Pilate et al., 2004; Bowling and Vaughn, 2008; Fang et al., 2008; Goswami et al., 2008; Mellerowicz et al., 2008; Clair et al., 2011). Pour étayer cela, (Fang et al., 2008), montrent que la contrainte de croissance est positivement corrélée avec la quantité et l'épaisseur de la couche G et propose que la quantité de couche G contrôlerait la création de la tension (Fig. 21).

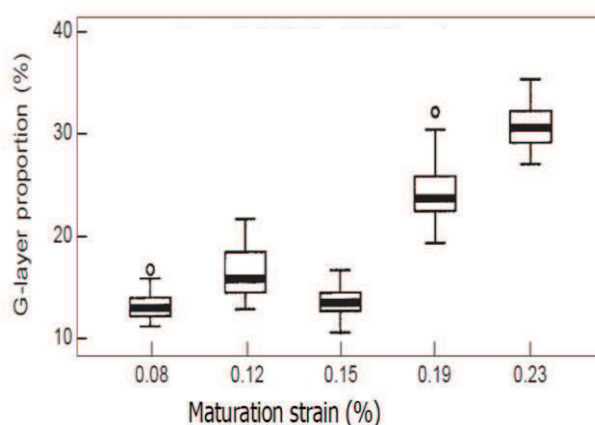


Figure 21. Rapport entre le ratio d'area de couche G (GLR_T , %) et contraintes de croissance (GS, %) (d'après Fang et al., 2008).

3.3.1.1 L'expansion latérale de la couche G

Ces auteurs ont observé sur des coupes de bois de tension soumises à un traitement enzymatique avec une cellulase que les fibres dépourvues de couche G suite à ce traitement s'allonge axialement et se contracte radialement (Fig. 22). Cette forte élévation dans la direction longitudinale après élimination de la couche G leur permet de conclure que la couche G est activement impliquée dans la contraction de la fibre de bois de tension comme résultat du stress produit pendant la maturation.

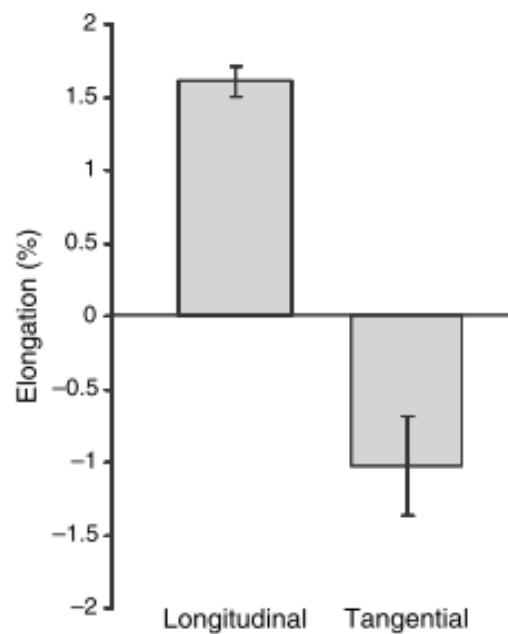


Figure 22. Changement des dimensions dans la direction longitudinale et tangentielle dans des coupes de bois de tension calculé à partir de la longueur avant et après la dégradation de la couche G due à des traitements enzymatiques. les histogrammes montrent des moyennes arithmétiques $\pm$ SD (n=10) (Goswami et al., 2008).

De plus, les frottements entre la couche G et la S2, ainsi que l'orientation de la cellulose dans la couche G indiqueraient une forte capacité d'expansion latérale de la couche G. Et, dès lors que la couche G est hydratée, la tension peut être générée et elle est rompue dès qu'une baisse de l'hydratation est observée (Goswami et al., 2008).

La couche G elle-même est très rigide dans la direction axiale à cause de l'orientation axiale des MFA et ne peut pas expliquer la contraction longitudinale. Mais, la capacité de gonflement de la couche G est plus forte dans la direction radiale, perpendiculaire aux microfibrilles de cellulose et produit une pression interne sur les autres parois cellulaires (Fig. 23). La pression exercée par le gonflement de la couche G sur la S2 est convertie en

contraction longitudinale grâce au fait que dans la S2, l'angle des microfibrilles de cellulose est plus fort (environ 36°) et plus facilement contracté (Goswami et al., 2008).



Figure 23. Modèle pour la génération d'une contrainte de traction dans une cellule de bois de tension. (a) La pression p générée par le gonflement de la couche G est converti en une contrainte de traction annulaire circonférentielle σ_r au sein de la paroi cellulaire. (b) Le stress circonférentiel est converti en stress de traction axial σ_a au sein de la paroi cellulaire. (c) Le ratio σ_a et σ_r (facteur de rehaussement de la contrainte, F) est gouverné par la direction des fibrilles de cellulose rigides au sein de la paroi. L'angle des microfibrilles est schématiquement indiqué par des lignes inclinées dans la paroi cellulaire (Goswami et al. 2008).

3.3.2 Les microfibrilles de cellulose sont sous tension

Cependant, la théorie proposée par Goswami et al. (2008) ne prend pas en compte le fait que la tension dans la couche G résulte de la mise en tension des MFCs, comme récemment mis en évidence par (Clair et al., 2011).

En ce qui concerne le rôle de la cellulose dans la création de la tension, (Okuyama et al., 1994) ont mis en évidence une corrélation négative entre le MFA et les contraintes de maturation pour une espèce dont le bois de tension ne produit pas de fibres G (Fig. 24). Pour Kerstens et al., (2001) et Pilate et al. (2004) cela serait aussi le cas pour les espèces avec un bois de tension composé par des fibres G, i. e., le MFA dans la couche G étant toujours parallèle à l'axe longitudinal des fibres, cela contribue probablement aux propriétés mécaniques spécifiques du bois de tension.

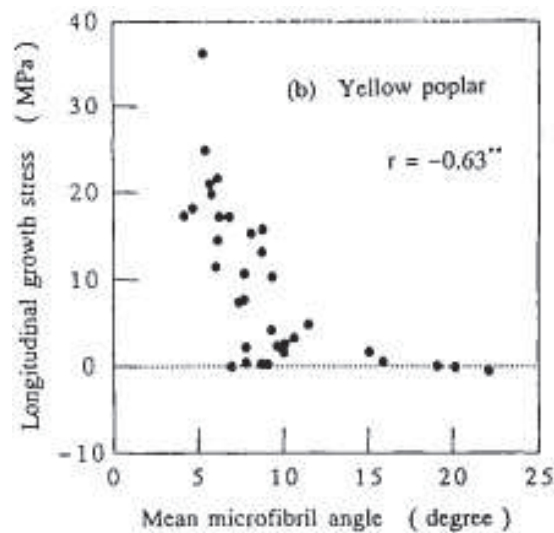


Figure 24. Rapport entre le stress de croissance longitudinal et la moyenne de l'angle des microfibrilles dans 3 troncs inclinés de tulipier de virginie (*Liriodendron tulipifera* L), dont le bois de tension ne produit pas de fibres avec la couche G (d'après Okuyama et al., 1994).

Okuyama et al. (1994) dans leur étude montrent également qu'il existe une corrélation positive entre la quantité de α -cellulose et la cristallinité de la cellulose avec le stress, i. e., plus la cellulose est cristalline, plus forte sont les contraintes de croissances (Fig. 25).

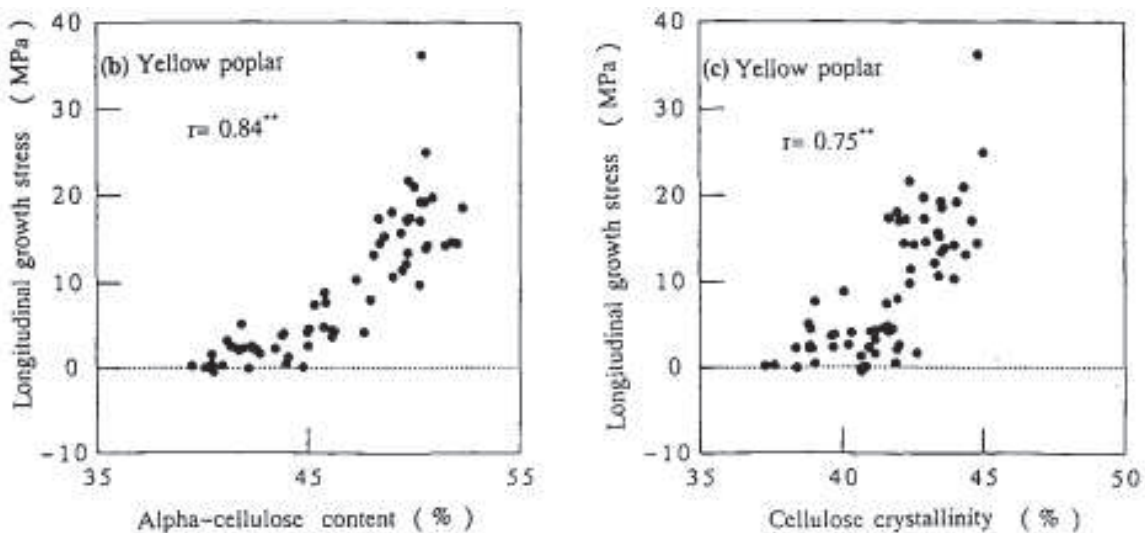


Figure 25. Rapport entre le stress de croissance longitudinal et le contenu en α -cellulose et la cristallinité de la cellulose en 3 troncs de tulipier de Virginie (Okuyama et al., 1994).

De plus, les microfibrilles de cellulose semblent supporter le stress de tension, et dans ce cas elles doivent être retrouvées dans un état tendu. Sous cette hypothèse, le développement progressif de la contrainte de maturation pendant la formation de la paroi cellulaire doit

s'accompagner par une augmentation de la taille du cellobiose (Clair et al., 2006). Des expérimentations en diffraction des rayons-X ont permis à (Clair et al., 2006) de mettre en évidence la mise en tension de la cellulose en mesurant la variation de la taille de l'unité élémentaire de cellulose avant et après la libération de la tension dans une tige de bois de peuplier. Ils ont montré qu'avant la libération du stress, la cellulose était en état de tension car la taille mesurée diminuait après la libération de la tension.

Clair et al. (2011) montrent que les MFCs sont mises en tension pendant la maturation de la couche G et ce qui n'est pas le cas dans la S2 de la fibre G ou des fibres de bois normal (Fig. 26). Ils montrent également que la couche G est mise en tension juste après avoir été déposée dans la paroi cellulaire et que l'amplitude de cette tension est proche de la tension macroscopique observée par Fang et al. (2008) chez le peuplier.

Également d'après Fang et al. (2008) la tension serait supportée par les microfibrilles. La mise en tension des MFCs pourraient résulter de changements physicochimiques dans la matrice, tels que le changement du taux d'humidité dû à la présence de polysaccharides hydrophiles également proposé par Bowling and Vaughn (2008) ou de l'augmentation de la taille de nanopores dont la présence a été mise en évidence par Clair et al. (2008) et Chang et al. (2009).

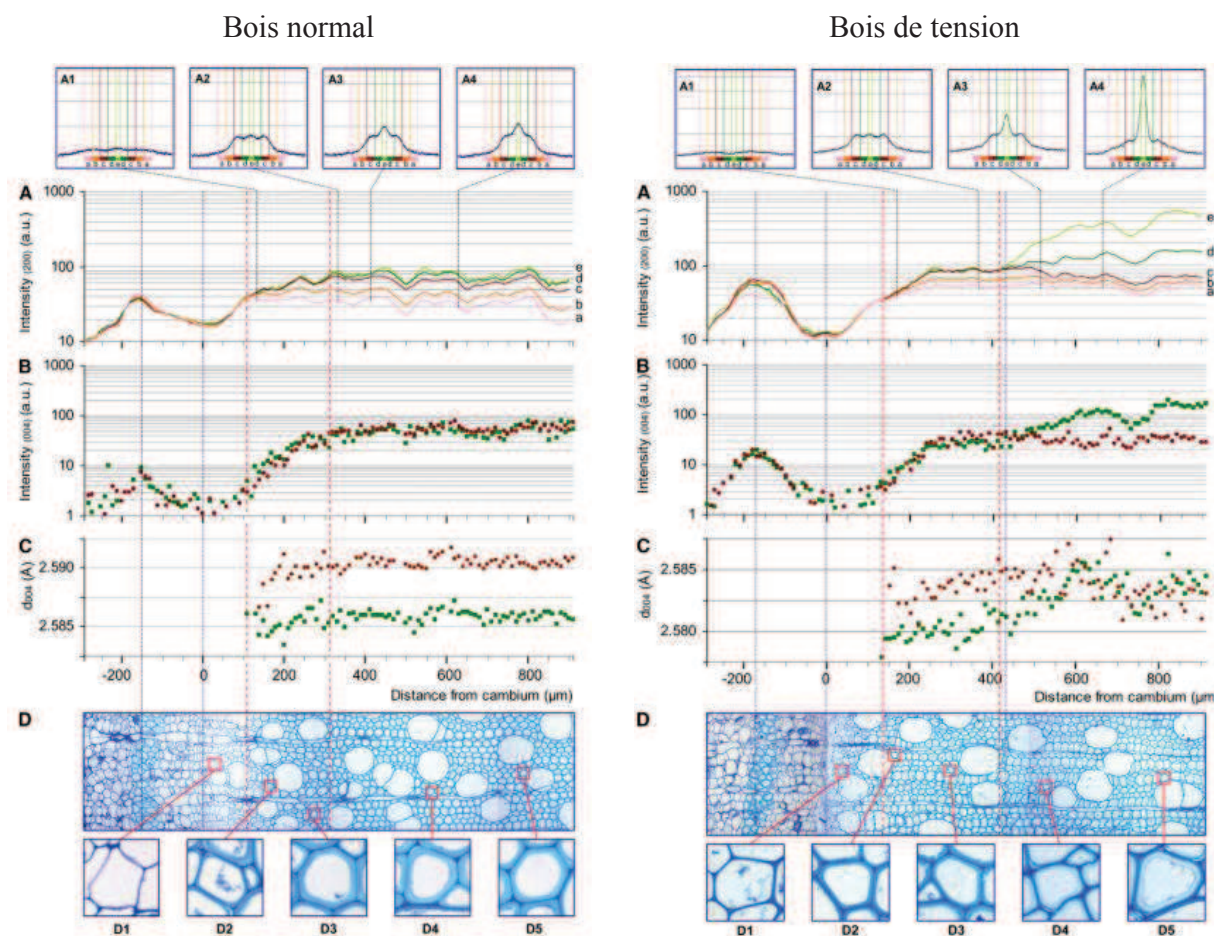


Figure 26. Profils de 200 et 004 intensités de réflexion et d004 distance entre les mailles de cellulose au long de la séquence de différenciation du bois normal (figure à gauche) et du bois de tension (figure à droite) avec l'échantillon d'anatomie correspondant. A, intensité dans une échelle log de la diffraction 200 pour cinq gammes d'angle d'azimut : a, 40° à 52° ; b, 28° à 40° ; c, 16° à 28° ; d, 4° à 16° ; e, 0° à 4°. A1 à A4 illustre tous les patterns de la diffraction 200 à différentes distances du cambium (140, 330, 410 et 630 μm , respectivement). B, intensité en échelle log de la diffraction 004. C, distance entre les mailles de cellulose (d_{004}). B et C sont présentés avec distinction entre la contribution de microfibrilles orientées avec de fort angles (plus grande que 16° ; cercles rouges) et faible angle (moins de 16° ; carrés verts). D, section transversale de la portion de tissu traversé par le faisceau des fibres periphloémiques au bois mature. D1 à D5 montrent détails des fibres au long de la séquence de développement (d'après Clair et al., 2011).

En conséquence, il semblerait bien qu'il existe effectivement un rapport entre les MFCs et plus spécifiquement le fait qu'elles soient sous tension dans la création de la forte tension observée dans le bois de tension. Comment pourraient-elles être mises sous tension? Pour les espèces dont le bois de tension est composé par des fibres G, il est possible qu'une force de traction soit induite dans les microfibrilles au cours du processus de maturation dans la matrice de polysaccharides qui les entourent. Toutefois, les mécanismes responsables de la

création de cette tension sont encore sujets de controverse et les théories proposées récemment sont présentées ci-dessous.

3.3.2.1 L'emprisonnement de polysaccharide par les MFCs à l'origine de la tension

Dans les fibres de plusieurs espèces, différents polysaccharides pourraient être capturés par des microfibrilles de cellulose pendant la cristallisation (Gorshkova et al., 2010). La présence de ces polysaccharides piégés entre les microfibrilles de cellulose limiterait leur interaction et résulterait en la création d'une tension, qui pourrait expliquer certaines propriétés mécaniques des fibres gélativeuse (Gorshkova et al., 2010).

En 2007, Nishikubo et al., après une analyse biochimique des couches G isolées, ont proposé la présence de xyloglucanes fucosylés dans le bois de tension qui seraient, les polysaccharides non-cellulosiques les plus abondants dans la couche G. Dans cette étude, des xyloglucanes fucosylés ont été détectés par immunolocalisation à l'aide de l'anticorps monoclonal CCRC-M1 à l'interface entre la S2 et la couche G (Fig. 27).

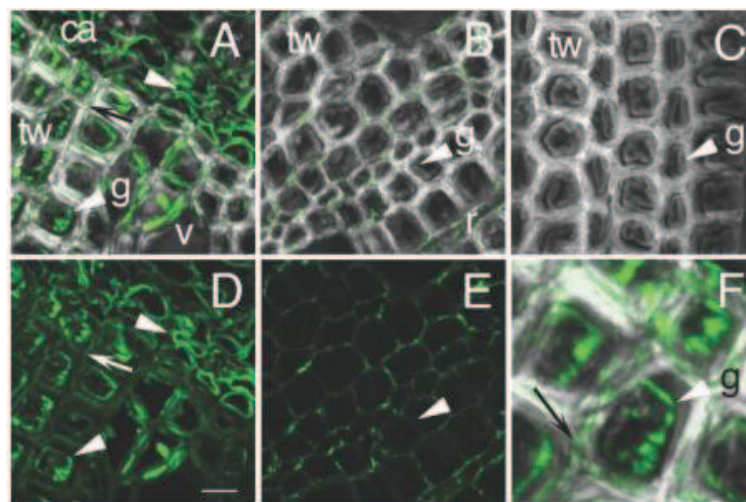


Figure 27. Localisation de xyloglucanes avec l'anticorps CCRC-M1 dans les fibres G en différenciation (A, D) et dans les fibres G matures (B, E) de *P. tremula* cultivé en champs. F : le signal du CCRC-M1 (vert) superposé à l'image faite en transmission ; D et E montrent que le signal. Le contrôle négatif marqué juste avec l'anticorps secondaire (C) ne montre pas de signal. Dans les fibres G jeunes montrées en A et D, avec un plus fort grossissement en F, le marquage est évident dans la couche G (g) avec une apparence irrégulière contrairement au marquage uniforme observé dans la paroi primaire des cellules cambiales (ca). Un léger marquage est détecté dans la lamelle moyenne (flèches). Dans les fibres matures (B, E), le marquage est seulement détecté dans la lamelle moyenne et il n'y a pas de signal dans la couche G (flèche). Barre = 10µm (A-E) (d'après (Nishikubo et al., 2007)).

Suite aux observations de (Nishikubo et al., 2007) et aux propriétés de ce polysaccharide, (Mellerowicz et al., 2008) proposent que quand les microfibrilles de cellulose cristallisent en macrofibrilles, entraînant une agrégation quatre microfibrilles adjacentes orientées verticalement, à l'intérieur desquels des xyloglucanes seraient emprisonnées (Fig. 28) ce qui induirait une déformation des microfibrilles (Fig. 28) et, en conséquence, le développement de la contrainte de tension longitudinale dans la cellulose comme observé expérimentalement par Clair et al. (2006).

Pour (Mellerowicz et al., 2008), la tension présente dans les microfibrilles toutes unies et orientées axialement serait transmises à tout le bois par un rétrécissement uniforme de celle-ci et que la tension créée serait transmise à la couche S2 grâce aux liaisons avec la couche G par des xyloglucanes.

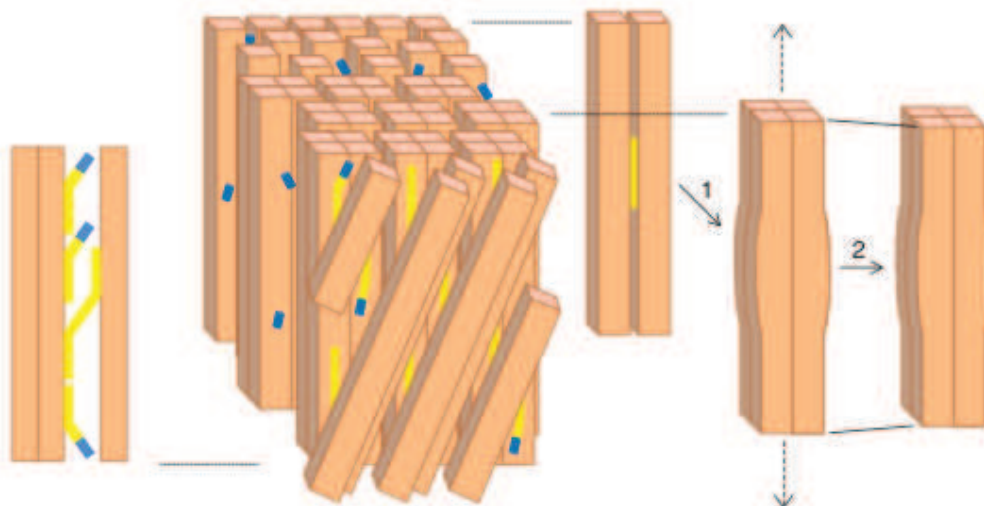


Figure 28. Modèle de l'attachement de la couche G à la couche S2 proposant le rôle des XGs (en jaune), des XTHs (en bleu) et des fibrilles de cellulose (en beige) dans le développement des forces élastiques au cours de la formation du bois de tension, la couche S2 correspond aux microfibrilles inclinées. La couche G correspond quant à elles aux fibrilles agencées en agrégats de 4 microfibrilles orientées verticalement et piégeant des XGs (1). Cela induit des stress élastiques longitudinaux conduisant au raccourcissement des microfibrilles (2). Les XGs lient de plus S2 et G (à gauche au schéma), et les XTHsaturent ce polysaccharide pour lui permettre de se reconnecter rapidement aux microfibrilles lors de ruptures mécaniques. Par transglycosylation, les XTH induisent la réparation des liaisons entre XGs et microfibrilles (d'après Mellerowicz et al., 2008).

3.3.2.2 Effet des variations des taux d'humidité dans la couche G

Bowling and Vaughn (2008) dans leur étude sur la composition de la couche G de deux espèces différentes ont détecté la présence de polysaccharides qui sont fortement hydrophiles RG-I/AG/AGP et qui seraient les éléments de sensibilité à l'humidité dans la couche G. Quand le niveau d'hydratation de la couche G diminue, ces composants se contracteraient et exerceraient en conséquence une force de traction sur les microfibrilles de cellulose qui se traduirait par la génération d'un stress longitudinal. Pour eux, ces composants hydrophiles seraient la force motrice de la tension.

Yamamoto et al. (2010) proposent un mécanisme similaire qui se produirait également dans les parois lignifiées. Cependant, dans les parois cellulaires lignifiées, il n'y aurait pas une contraction des microfibrilles de cellulose car les lignines agiraient comme un squelette rigide qui empêcherait la contraction.

3.3.2.2 Une structure de type gel

Un gel peut être défini comme un système formé par une phase solide dispersée dans un volume vide qui est occupé par de l'eau dans un système humide : c'est donc un système formé par l'interpénétration des phases solides et fluides. Ce système est susceptible de s'effondrer quand l'eau s'évapore, ce qui se traduit par une réduction de la porosité. Par la production d'un aérogel, processus qui permet d'enlever le liquide du gel sans pour autant endommager la structure. Clair et al. (2008) ont pu observer que les microfibrilles de cellulose sont organisées en agrégats de cellulose qui sont parallèles à l'axe de la fibre. Dans certaines zones, entre ces agrégats il est possible d'identifier des filaments avec une morphologie normalement observée dans d'autres gels de polysaccharides amorphes (Fig. 29, Clair et al. (2008), une structure qui ressemble à une éponge (flèche rouge)).

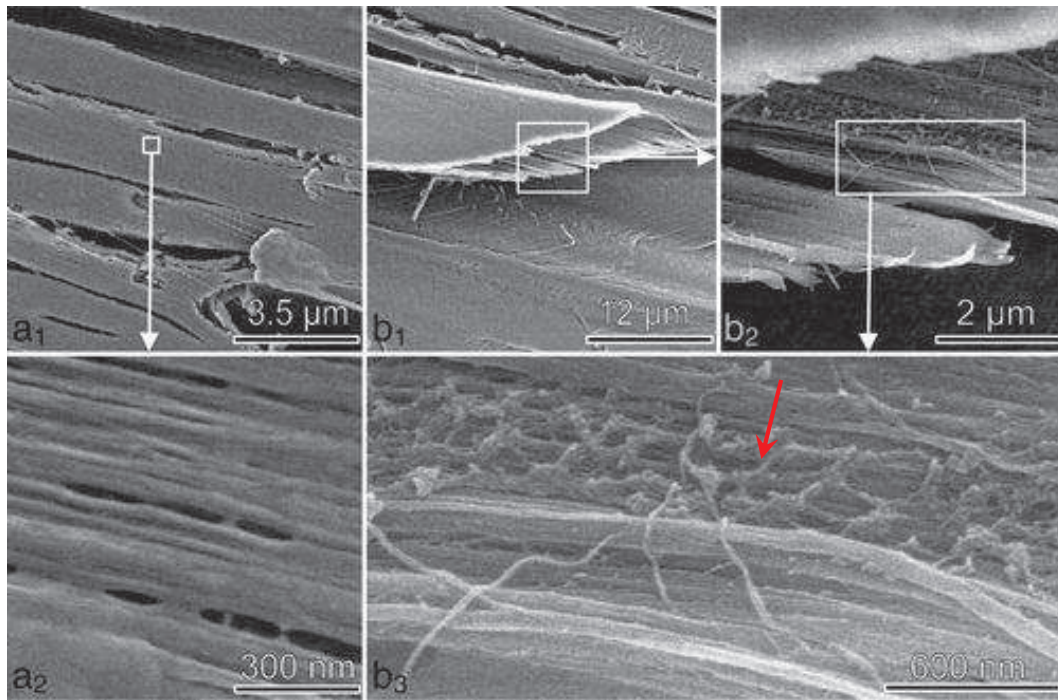


Figure 29. Observations du bois de tension de peuplier au SEM après le point de séchage critique. (a₂) est en détail de (a₁) qui montre des agrégats de cellulose séparés par des espaces vides. (b₁₋₃) Entre les microfibrilles de cellulose bien orientées au long de la fibre, on peut observer un réseau de fibrilles typique d'une structure d'aérogel formé par des polysaccharides (d'après Clair et al., 2008).

Ainsi, Clair et al. (2008) ont mis en évidence dans la couche G une structure de type gel, caractérisée par une porosité très élevée, près de 30 fois plus forte que dans le bois normal (Fig. 30). De même, suivant une étude portant sur 6 espèces tropicales, le bois de tension présentant d'épaisses couches G possèdent une forte mésoporosité comparée à ceux avec une fine couche G, tandis que les bois sans couche G montrent une mésoporosité environ égale à celle du bois normal (Chang et al., 2009).

Le fait que les MFCs soient orientés dans la direction axiale, associé à l'absence d'une couche S3 qui renforcerait la face interne de la couche G ne permettrait pas aux microfibrilles de contenir la rétraction induite par le séchage du gel et le collapse ainsi généré créerait une tension dans la couche G (Clair et al., 2008). La tension serait ensuite transmise à toute la fibre du fait de l'adhésion qui existe entre les deux couches, i. e., la S2 et la couche G ce qui résulterait en une contraction macroscopique parfois supérieure à 1% dans le bois de tension (Clair et al., 2005).

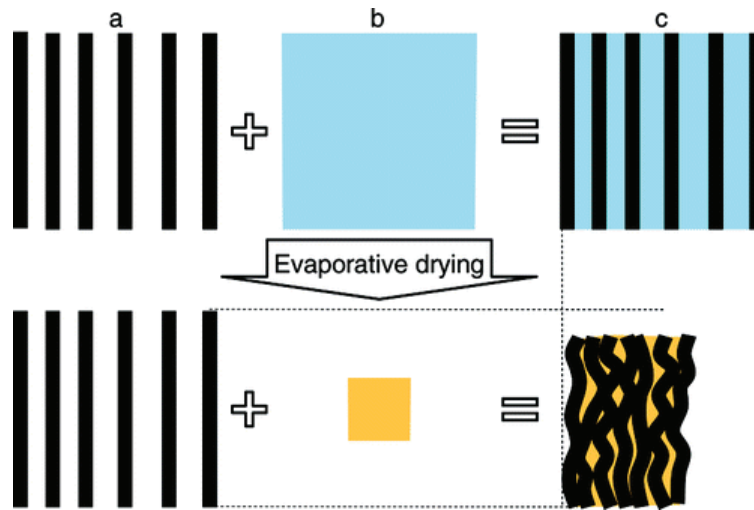


Figure 30. Modèle schématique du séchage par évaporation des constituants de la couche G (a, réseau de cellulose ; b, phase gel) entraînant le rétrécissement de la couche G (c). La proportion des constituants et l'échelle sont arbitraires (d'après Clair et al., 2008).

PROBLEMATIQUE, OBJECTIFS ET STRATEGIE

Dans le chapitre précédent nous avons vu que le bois de tension chez le peuplier se distingue fortement du bois dit « normal ». Il se caractérise par des fibres particulières qui comportent une couche supplémentaire, la couche G. Différentes études menées sur cette couche ont révélé qu'il s'agit d'une couche gélatineuse, composée principalement de cellulose très cristalline et dépourvue de lignine. De plus, les MFCs orientées parallèlement à l'axe de la fibre, sont sous tension et immergées dans une matrice de polysaccharides avec des propriétés gélifiantes. La composition de cette matrice, l'évolution de sa composition le long du gradient de différenciation ainsi qu'une potentielle corrélation avec la mise en tension du bois ne sont pas encore connus. Cependant, ils existent plusieurs évidences en faveur d'une implication de cette matrice dans la mise en tension des microfibrilles de cellulose. *In fine*, cela se traduirait par la génération d'une force très importante observable au niveau macroscopique par une réorientation des axes de l'arbre.

Pour mieux comprendre ce phénomène remarquable d'adaptation des arbres aux contraintes de l'environnement, nous avons choisi le bois de tension produit chez le peuplier comme modèle d'étude. Ce choix est basé principalement sur l'expérience de l'équipe au sein de laquelle mon travail de thèse s'est effectué et également sur certaines des caractéristiques de cet arbre. En effet, le peuplier en tant que modèle d'étude pour les arbres présente plusieurs points forts : génome de petite taille, transformation génétique et régénération faciles pour créer des peupliers transgéniques, croissance rapide, grande variabilité génétique dans les populations naturelles, facilité de propagation et de l'hybridation interspécifique, clonage facile. Une autre caractéristique intéressante chez les peupliers est la quasi-inexistence de barrière entre espèce ce qui facilite l'hybridation interspécifique qui est à l'origine de la populiculture et constitue le principal moteur des programmes de création et de sélection variétale. Mais avant tout, le peuplier apparaît comme un modèle pour étudier un vaste répertoire de processus biologiques comme la formation et le fonctionnement du cambium ainsi que le développement du xylème secondaire.

En ce qui concerne l'étude de la formation du bois de tension des avantages se présentent tels que la facilité d'être repéré par des observations anatomiques et des colorations histochimiques, il est exclusivement formé chez les arbres et est facilement inductible par inclinaison de la tige.

Des études menées sur le bois de tension pourront améliorer les connaissances à propos de la formation du bois ainsi qu'aider dans la compréhension du mécanisme qui permet aux arbres de réorienter ses axes. De plus, dévoiler la composition et les possibles interactions entre les composants du bois de tension, surtout en ce que concerne la couche G, se montre économiquement intéressant. La composition chimique assez particulière de la couche G, comme la haute teneur en cellulose et la quasi absence de lignine semble être favorable à son utilisation en tant que biomasse pour la transformation chimique comme pour la production d'éthanol (Muñoz et al., 2011).

Dans ce contexte, j'ai développé différentes approches complémentaires au cours de ma thèse : i) approches biochimiques : les couches G ont été isolées des fibres du bois de tension d'un hybride de peuplier, le clone INRA 717-1B4 (*Populus tremula* × *P. alba*). Ces couches G isolées ont été analysées par la composition et structure des polysaccharides. ii) approche histochimique pour étudier la distribution des principaux polysaccharides pariétaux dans les différentes sous-couches de la paroi des fibres du bois de tension et du bois opposé le long du gradient de différenciation. Cela a été fait par immunolocalisation en utilisant environ 180 anticorps monoclonaux. Et, finalement, iii) une approche de génétique inverse par l'altération du niveau d'expression d'un gène codant pour une PopFLA.

Cette démarche nous a permis de répondre à plusieurs questions qui sont répondus dans les chapitre 1 et chapitre 2 :

- Quels sont les composants polysaccharidiques de la couche G et comment sont ils distribués dans cette couche ?
- Existent-ils des composants qui sont exclusivement présents dans la couche G ?
- La composition en polysaccharide est-elle constante le long du gradient de différenciation cellulaire ?
- La composition en polysaccharides de la couche G est-elle constante entre les individus de la même espèce et entre individus d'espèces différentes ?
- Y a-t-il un rapport entre la distribution en polysaccharides de la couche G et la mise en tension des microfibrilles de cellulose ?
- La protéine PopFLA1 est-elle impliquée exclusivement dans la formation du bois de tension ?
- Quel est l'effet de ce gène sur la génération de la tension dans le bois de tension ?

CHAPITRE 1

Analyse de la distribution des polysaccharides non-cellulosiques dans les fibres de bois de tension et de bois opposé chez le peuplier : abondance de rhamnogalacturonane de type I et absence de xyloglucane la couche G

Analyse de la distribution des polysaccharides non-cellulosiques dans les fibres de bois de tension et de bois opposé chez le peuplier : abondance de rhamnogalacturonane de type I et absence de xyloglucane na couche G

Guedes F T P, Laurans F, Quemener B, Assor C, Boizot N, Vigouroux J, Lesage-Descauses M-C, Leplé J-C, Déjardin A, Pilate G

Cet Article doit être soumis à la revue Plant Physiology

1. PRESENTATION SYNTHETIQUE DE L'ARTICLE

Contexte. Le bois de tension est un type particulier de bois formé à la face supérieure des axes de l'arbre incliné. Il s'agit d'un bois ayant des caractéristiques particulières, comme une plus forte proportion de fibres par rapport aux vaisseaux et rayons que dans le bois opposé, qui lui se forme à la face inférieure de ces axes. Ce bois présente également des modifications dans sa composition chimique. Une des modifications les plus importantes est l'apparition chez certaines espèces d'une couche surnuméraire dans les fibres de bois de tension, la couche G. Cette couche présente des propriétés typiques des structures du type gel et ont des microfibrilles de cellulose (MFCs) très cristallines et orientées parallèlement à l'axe des fibres. Dans cette couche une tension est créé qui est 10× plus importante que dans le bois normal, force qui permet à l'arbre de réorienter ses axes. Différentes théories ont été proposées pour expliquer le mécanisme à l'origine de la tension, mais il s'agit d'un sujet encore controversé. Il est connu que les MFCs sont en tension dans la couche G mais, le mécanisme par lequel les MFCs sont mise sous tension n'est pas encore déterminé. Mais, il est fortement probable que cela soit dû à un gonflement de la matrice où ces MFCs sont insérés.

Objectifs. Les objectifs généraux de cette étude étaient : i) de caractériser la composition en polysaccharides des couches G isolée des fibres du bois de tension chez un hybride de peuplier, le clone INRA 717-1B4 (*Populus tremula* × *Populus alba*) ; ii) évaluer l'évolution de la composition des parois des fibres de bois de tension ainsi que de bois opposé au cours de leur différenciation et ; iii) déterminer les relations entre composition en polysaccharides et création de la tension dans le bois de tension.

Stratégie. L'étude a été réalisée sur des jeunes peupliers qui ont poussé en conditions contrôlées en serre. Ces plants ont été inclinés afin d'induire de manière artificielle la formation de bois de tension. Ensuite, des couches G ont été isolées à partir du bois de tension et leur composition a été analysée par une combinaison de chromatographie par échange d'anions à haute performances (HPAEC) et spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS). L'évolution spatiale et temporelle de la composition en polysaccharides des différentes parois qui composent les fibres a été étudiée à l'aide de 178 anticorps monoclonaux, par immunolocalisation. La composition de la paroi des fibres de bois de tension a été comparée à celles des fibres de bois opposé. Basé sur les résultats obtenus dans ce premier test, nous avons également évalué la répétabilité des résultats sur un deuxième arbre et aussi sur un deuxième clone, Ogy. Cela nous a permis de conclure que cette composition devrait être commune à différentes espèces de peuplier.

Résultats. L'utilisation de ces deux analyses complémentaires nous a fourni des résultats consistant à propos de la composition en polysaccharides et l'évolution de cette composition au cours de la différenciation des fibres. Nous avons mis en évidence que les pectines du type RG-I sont les polysaccharides non-cellulosiques les plus abondants dans la couche G isolée et qu'au moins une partie des RG-I perdent leurs chaînes latérales du type β -1,4-galactane pendant le processus de différenciation des fibres G. Certaines structures d'AGPs sont détectées seulement au phase initiale de la différenciation ou encore, à la face interne en début de différenciation et quand les couches G sont matures elles se trouvent distribuées de manière homogène dans toute l'épaisseur de la couche G. Contrairement à ce qui a été antérieurement montrés par différents auteurs (Nishikubo et al., 2007; Baba et al. 2009; Sandquist et al., 2010), des xyloglucanes n'ont pas été détectés dans la couche G en aucune des phases de différenciation. Mis à part les xyloglucanes, la composition de la couche G est très similaire à celle de la paroi primaire. Cette étude met également en évidence l'existence d'une différence par rapport à la paroi secondaire du bois de tension et du bois opposé, qui jusqu'à présent n'était pas encore considéré. Cependant, des différences entre les fibres de bois de tension et de bois opposé au niveau de la paroi primaire n'ont pas été détectées et leur composition semble constante entre ces deux types de bois et le long du gradient de différenciation.

Conclusions. Dans cette étude nous avons mis en évidence que la composition de la couche G évolue au cours de la différenciation et paraît être conservée entre les différentes espèces de peuplier. Les principaux résultats concernent l'absence de détection des xyloglucanes dans la couche G et la présence des RG-I en tant que polysaccharide non-cellulosique le plus

abondant dans la couche G. Basé sur les propriétés hydrophiles des RG-I, nous pouvons supposer que ces molécules seraient impliquées dans la formation d'un gel. Cependant, à ce stade il n'est pas encore possible d'établir un lien entre les observations de la composition des parois du bois de tension et surtout de la couche G par rapport au mécanisme de création de la tension.

2. CONTRIBUTION AU TRAVAIL

- Analyses d'immunolocalisation ;
- Compilation des résultats obtenus en immunolocalisation et participation à leur interprétation ;
- Mise-au-point du protocole d'isolation des couches G en fonction des équipements disponibles dans le laboratoire ;
- Isolation des couches G ;
- Participation à l'interprétation des résultats des analyses biochimiques des couches G isolées ;
- Participation à la rédaction de l'article.

Evaluation of non-cellulosic polysaccharide distribution in differentiating and mature poplar tension wood fibres: abundance of rhamnogalacturonan I and absence of xyloglucan in the G-layer

Guedes F T P¹, Laurans F¹, Quemener B², Assor C², Boizot N¹, Vigouroux J², Lesage-Descauses M-C¹, Leplé J-C¹, Déjardin A¹, Pilate G^{1*}

¹ INRA, UR0588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, F-45075 Orléans cedex 2, France

²UR 1268, PVPP, INRA, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes, France

*Author to whom correspondence should be sent:

Gilles Pilate

Phone: +33 (0)2 38 41 78 38

Fax: +33 (0)2 38 41 78 79

Email: gilles.pilate@orleans.inra.fr

Abstract

Background

Tension wood (TW) is produced by temperate hardwood trees in order to support their ever increasing load, orient their axes and cope with environmental cues such as wind. TW fibres often harbour a supplemental layer, the G-layer, rich in crystalline cellulose, containing matrix polysaccharides but no lignin. The tensile force responsible for the specific TW properties originates from the G-layer and is transmitted to cellulose microfibrils soon after their deposition during G-fibre maturation. This force is potentially generated from physical changes in the high porosity hydrogel recently identified in the G-layer.

Purpose

The distribution of the different classes of non-cellulosic polysaccharides was evaluated to determine which molecules are involved in the formation of this hydrogel.

Methods

This was done by immunolocalization during xylem fibre differentiation both in TW and in opposite wood (OW), a wood devoid of G-fibres. In parallel, differentiating G-layers were isolated in order to determine their polysaccharide composition.

Results

These complementary approaches provided us with data on the evolution of non-cellulosic polysaccharides during G-fibre differentiation: we did not find any evidence for the presence of xyloglucans in poplar G-layers as previously reported. On the contrary, evidence was found for an abundance of rhamnogalacturonan type I pectins (RG-I) in the G-fibre, with an apparent progressive loss of RG-I side chains during G-layer maturation. Likewise, our results suggest that glucomannan deacetylation seems to take place during G-layer maturation. Both RG-I and deacetylated glucomannans may be involved in the formation of a gel.

Conclusion

These novel results are discussed in the light of previous studies on the subject.

Key words: poplar, tension wood, pectins, polysaccharides

INTRODUCTION

The cell walls of xylem cells mainly result from the assembly of cellulose in a matrix of lignin and non-cellulosic polysaccharides (hemicelluloses and pectins). Cell wall composition varies according to the tree species, the type of wood, the cell type or the cell layer (Mellerowicz and Sundberg, 2008). Most likely, the variations in non-cellulosic polysaccharide composition may influence cell wall assembly, and modify important cell wall features such as cellulose microfibril angle or lignification (Donaldson and Knox, 2012), consequently affecting wood properties. This is the case in reaction woods, which exhibit specific mechanical properties that make possible for the tree i) to orientate its axes in response to gravity (Scurfield, 1973) and light signals (Matsuzaki *et al.*, 2007), ii) to withstand its own weight (Almeras and Fournier, 2009), and iii) to acquire an increased stem resistance against prevailing wind (Bonser and Ennos, 1998).

Tension wood (TW), the reaction wood typical of hardwood species, is able to generate a large tensile maturation stress, much higher than what is found in normal wood (Clair *et al.*, 2006). TW substantially differs in composition from the so-called normal wood; TW contains more galactose and glucose but less lignin, mannose and xylose (Timell, 1969). In poplar, as in most temperate tree species, TW fibres are characterized by the presence of a specific layer, named G-layer, with cellulose microfibrils oriented parallel to the fibre axis (Fujita *et al.*, 1974) in a matrix devoid of lignin (Pilate *et al.*, 2004). For a long time, G-layer was believed to be made of almost pure crystalline cellulose (Norberg and Meier, 1966), but recent studies evidenced that G-layer possess a matrix made of different non-cellulosic polysaccharides and glycosylated proteins (Lafarguette *et al.*, 2004; Nishikubo *et al.*, 2007; Arend, 2008; Bowling and Vaughn, 2008; Kaku *et al.*, 2009; Kim and Daniel, 2012). Interestingly, TW presents striking similarities with other specialized cells involved in the bending of axes, such as tendrils, twinning vines and bast fibres (Meloche *et al.*, 2007; Bowling and Vaughn, 2009; Mikshina *et al.*, 2013). The mechanism responsible of tensile maturation stress in these specialized structures is still a matter of controversy. It has been recently demonstrated that the tensile force present in poplar TW originated in the G-layer and was transmitted to cellulose microfibrils soon after their deposition, during G-fibre maturation (Clair *et al.*, 2011). It remains to establish how this force is created, *i.e.*, how cellulose microfibrils are put under tension, and how this tension is transmitted to the other cell layers. Several different models have been proposed to explain the origin of TW maturation stress, but, so far, none of them has been definitely validated.

The first theories were based on cell wall swelling during fibre maturation, that translated into longitudinal stress: this swelling was supposed to be the result either of a stiffening due to lignin deposition (Boyd, 1972) or cellulose crystallization (Bamber, 1987). Lately, a number of other mechanisms have been proposed to explain for the important stress occurring in the G-fibre, such as the contraction of amorphous zones within G-layer cellulose microfibrils (Yamamoto, 2004) or the involvement of xyloglucans in microfibril aggregation (Nishikubo *et al.*, 2007; Mellerowicz *et al.*, 2008). According to Bowling and Vaughn (2008), a highly hydrophilic material made of RG-I or/and arabinogalactan proteins (AGP) present in the mature G-layer would shrink when the moisture level decreases, and in consequence exert a pulling force that extend cellulose microfibrils, generating *in fine* TW longitudinal stress. Goswami *et al.* (2008) proposed that the tensile stress is generated by a lateral swelling of the G-layer that forces the surrounding secondary cell wall to contract in the axial direction. Lately, the comparison of nitrogen adsorption–desorption isotherms applied on super-critically dried TW and normal wood samples revealed that TW cell walls exhibit a gel-like structure, a hydrogel, characterized by a porosity much higher than what can be found in normal wood (Clair *et al.*, 2008). The swelling or shrinkage in this gel, in response to water content variations or ion concentration changes, has been proposed as being responsible for growth stress generation in TW (Chang *et al.*, 2009).

Whatever the mechanism, the modifications in cell wall composition and assembly mostly occur during G-fibre differentiation. Therefore, in this study, we evaluated the distribution of the different classes of non-cellulosic polysaccharides during TW xylem fibre differentiation. In parallel, we isolated G-layers in order to determine their polysaccharide composition using enzymatic hydrolysis and high-resolution analytical techniques. These complementary approaches gave us consistent results on the evolution pattern of non-cellulosic polysaccharides during G-fibre differentiation. We provide here evidence for a major involvement of RG-I pectins in the G-fibre with an apparent progressive loss of RG-I side chains when the G-layer matured. Likewise, the glucomannans present in the differentiating G-layer seemed to decrease their level of acetylation during its maturation. On the contrary, despite extensive investigation, we did not find any evidence on the presence of xyloglucans in poplar G-layers as previously reported. These novel results are discussed in light of previous studies on the subject.

Material and Methods

Plant material and sampling

Poplar micropropagated shoots were transferred into the greenhouse, potted in compost and individually supplied with water and fertilizers using a drip system. At the onset of cambial growth in early spring plants were artificially tilted at 45°.

Immunolocalisation analyses were carried out on two different poplar materials: 1) tree 1 and tree 2, two ramets of the *Populus tremula* × *Populus alba* hybrid INRA 717-1B4 clone; 2) tree 3, the *Populus deltoides* × *Populus nigra* hybrid, the Ogy cultivar. Two months after inclination, 717-1B4 plants (tree 1 and tree 2) were rotated by half a turn (180°) so that the previously lower part of the stem reached the upper position, and sample collection took place one month later. Samples were collected at the base of the stem of Ogy plants (tree 3) 15 months after inclination. For all trees, samples were collected in TW and opposite wood (OW), a wood devoid of G-fibre, located respectively at the upper and lower side of the stem. Polysaccharide analyses were carried out on TW G-layers isolated from INRA 717-1B4 poplar plants grown under greenhouse-controlled conditions for two months, then tilted and finally sampled three months later.

Sample preparation

Sections of *circa* 3 mm were excised from TW and OW samples and fixed for 4 h in a solution of 2.5% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M McIlvaine citrate-phosphate buffer, pH 7.0. After dehydration in a graded series of ethanol, samples were embedded in medium grade LR White resin (London Resin Company Ltd, UK). Semi-thin sections (0.8 µm) were collected with a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) installed on an ultracut R microtome (Leica, Rueil-Malmaison, France). These sections were laid on silanized slides (Dako Cytomation, Trappes, France) and fixed by heating at 55°C.

Antibodies

One-hundred seventy-eight monoclonal antibodies (mAbs) were purchased from either Carbosource, Complex Carbohydrate Research Center (University of Georgia, Athens, Georgia, USA) or Plant probes (Leeds, UK), whereas AX1 and RG1 antibodies were kindly provided by Dr Fabienne Guillon (INRA, Nantes, France). In all immunolabelling experiments, control sections were submitted to the same treatment but without addition of the primary antibody to evaluate any non-specific binding of the secondary antibody. For each

experiment, a technical control was consistently realized using the monoclonal antibody LM5 (1:30), known to give a strong signal in the G-layer, to verify that the experimental conditions were suitable for a good immunolabelling.

Immunogold labelling

To prevent liquid evaporation, all incubations were conducted in a moist chamber. Sections were firstly incubated for 1 h with a droplet of blocking solution containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% Tween-20 in 10 mM Tris Buffered Saline (TBS), pH 7.5, and then for 10 min in droplets of dilution buffer (0.3% BSA and 0.01% Tween-20 in 10 mM TBS, pH 7.5) at room temperature. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted ten times for CCRC, JIM, LM and MAC series, three times for RG1 and twenty times for AX1 in the same buffer. Sections were then washed three times in TBS buffer before incubation with 20 nm gold-conjugated secondary antibody in the dilution buffer (1:50) (BB International, British-Biocell, Cardiff, UK). Immunogold labelling was enhanced six min by the Silver Enhancing kit (British Biocell International, Cardiff, UK) according to the manufacturer's instructions. Sections were subsequently post-stained with a mix of methylene blue/Azur II (Richardson *et al.*, 1960) and examined under light microscope (DMR, Leica Microsystems).

Immunofluorescent labelling

After incubation with the primary antibody, sections were incubated with Alexa 633 or Alexa 488 antibodies (Invitrogen, Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) in the dilution buffer (1:500). Sections were examined under a Zeiss LSM700 confocal laser scanning microscope using excitation 488 nm, emission >490 nm for detection of the Alexa 488 signal and using excitation 630 nm, emission > 640 for detection of the Alexa 633 signal. All fluorescence detection settings were kept at the same level for the sets of samples being compared. All images are shown at maximum intensity projections.

Immunolabelling localization under transmission electron microscope

Hundred nanometers ultrathin transverse sections were cut from samples embedded in LR White resin using an ultramicrotome (Leica Ultracut R, Leica Microsystems, Vienne Austria) with a diamond knife. The sections were harvested on 400 mesh uncoated nickel grids for immunocytochemical localization. The grids were floated for 1 h in a blocking solution

containing 3% BSA and 0,1 % Tween 20 in 50 mM TBS, pH 7.5 and then twice for 5 min in a dilution buffer containing 0,3% BSA and 0,1 % Tween 20 in 50 mM TBS, pH 7.5. The primary antibody reaction was achieved by floating the grids on drops of dilution buffer containing the monoclonal antibody. The grids were then washed in TBS and incubated with 20 nm gold conjugated secondary antibody in the dilution buffer (1:50) (British Biocell International, Cardiff, UK). Control sections were obtained by omitting the primary antibody. Grids were subsequently floated for 20 min in 3% aqueous uranyl acetate solution for additional contrast. Sections were observed using a transmission electron microscope (JEOL JEM-1230) operating at 1200 KV.

Treatment of poplar stem sections with pectinase

Stem sections were sequentially treated for 3 h at 30 °C with pectinase (1 mg ml⁻¹) in sodium phosphate buffer at pH 4; Sigma-Aldrich from *Aspergillus niger*), then washed once.

G-layer isolation

G-layers were isolated from TW transverse sections mainly according to Norberg and Meier (1966). Twenty-five µm thick transverse sections prepared from TW blocks of poplar debarked stems were sonicated for 10 min in ethanol (Fisher Scientific FB15050). Isolated G-layers were separated from the remaining of the sections by filtration (40 µm Millipore filter). Their purity was checked under microscope after Lugol staining for starch granule detection.

Chemical cell wall composition of isolated G-layers

Identification and quantification of neutral sugars were performed by gas-liquid chromatography after sulfuric acid degradation (Hoebler *et al.*, 1989). Briefly, isolated G-layers were lyophilized, grinded and dispersed in 13 M sulfuric acid for 30 min at 25 °C and then hydrolyzed in 1 M sulfuric acid (2 h, 100 °C). Sugars were converted to alditol acetates (Blakeney *et al.*, 1983) and chromatographed on a DB 225 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) at 205 °C, using H₂ as gas carrier. Standard sugar solutions were used for calibration and inositol as internal standard. Glucose originating from cellulose was estimated by the difference of glucose amounts obtained with and without acid sulfuric pre-hydrolysis. Uronic acids in hydrolyzates were quantified using the methoxydiphenyl colorimetric acid method (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973).

Enzymatic degradations

Extracted G-layers were degraded by endo-1,4- β -glucanase, endo-1,4- β -xylanase (M2) both from *Trichoderma longibrachiatum* and endo-1,4- β -galactanase from *A. niger* (Megazyme Bray, Ireland). The released oligosaccharides were analyzed by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD) and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Five mg samples were suspended in 1 mL deionized water containing either 10 U of β -glucanase or endo-1,4- β -galactanase, or 13 U of endo-1,4- β -xylanase under slow agitation during 17 h at 40 °C. To ensure the presence of the characteristic oligomeric structures of xylans, galactans or glucans, hydrolysis were also carried out using milder reaction conditions, such as a 10 times or 100 times reduced amount of enzymes and a shorter incubation period (30 min). After centrifugation (15200 g, 10 min at 20 °C), enzymes present in the supernatant were inactivated by 10 min boiling and then the solutions were passed through a 0.45 μ m filter prior to HPAEC-PAD and MALDI-TOF MS analysis. The standard oligosaccharides used were commercial cellodextrins (cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose), a commercial mixture of xyloglucans oligomers or XGOS (XXXG, XLXG, XXLXG, XLLG), glucose, galactose and galactobiose from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and a commercial pectic galactan (potato, Gal:Ara:Rha:GalA=82:6:3:9) both from Megazyme (Bray, Ireland). This pectic galactan (1.26 mg) was incubated using mild conditions for 30 min with endo-1,4- β -galactanase (0.2 U).

HPAEC-PAD chromatography

Enzymatic digests were analyzed by HPAEC-PAD chromatography using an ICS-3000 pump (Dionex, Sunnyvale, USA) fitted with an AS 3500 auto-sampler (Thermo Separation Products, USA) and an ED 50A electrochemical detector (Dionex, Sunnyvale, USA) working in amperometric mode. After appropriate dilution, an aliquot of 20 μ L of the different enzymatic digests was injected on an analytical CarboPac PA-200 column (3 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, USA) maintained at 25 °C using the Croco-cil (Cil Cluzeau Info Labo, France) and equipped with a Dionex CarboPac PA-200 guard column (3 x 50 mm). Released oligosaccharides were separated in 200 mM NaOH at 0.40 mL min⁻¹ with a linear gradient of sodium acetate ranging from 0 to 142 mM for the first 25 min followed by a re-equilibration period of 25 min with 200 mM NaOH. Undigested G-layer extract and enzymes were also

injected in the same conditions for comparative purposes. Chromatograph control and data processing were done using the Dionex Chromeleon chromatography software.

MALDI-TOF MS

Endo-1,4- β -glucanase, endo-1,4- β -xylanase and endo-1,4- β -galactanase hydrolyzates (10 μ L) were mixed with 10 μ L Super DHB matrix (Karas *et al.*, 1993). This matrix consisted of a mix (90:10, v:v) of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) at 10 mg mL⁻¹ in water with 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid at 10 mg mL⁻¹ in pure methanol. Finally, 4 μ L of this mixture were deposited on the target and left to dry overnight at room temperature. Three replicates were realized for each hydrolyzate.

MALDI-TOF MS analysis was performed in the positive ion mode using an Autoflex III MALDI-TOF/TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam laser (355 nm, 200 Hz). Analyses were carried out in the reflector mode using an accelerating voltage of 19 kV. Spectra were recorded in the mass range m/z 600–2000. A low mass gate value of m/z 300 or 600 was selected for analysis in order to avoid saturation of the detector. The instrument was externally calibrated using the monoisotopic masses of main oligosaccharides ionized under sodium adducts form ($[M+Na]^+$ ions) and released from apple xyloglucans after endo-1,4- β -glucanase degradation (XXG: 791.263 Da, XXXG: 1085.358 Da, XXFGa1: 1435.478 Da, XLFGa1: 1597.531 Da).

RESULTS

Sugar composition of isolated G-layers

G-layers were isolated from TW cross sections (Fig. 1A) by sonication (Fig. 1B) and their purity was verified by microscopic observation (Fig. 1C). TW samples collected during the resting period were not suitable for G-layer isolation as they co-purified with starch granules stored in high amounts in ray parenchyma cells (Fig. 1D-E). In contrast, G-layers isolated from TW samples collected during the growing season were devoid of any starch granule (Fig. 1F-G). These samples were used for further polysaccharide analyses.

The total sugar content represented 62% of the dry mass of ethanol-extracted G-layers. Glucose constituted the main neutral sugar amounting 71.5 mol % of all neutral sugars (Table I), mostly originating from cellulose, with only 12 % of the glucose content were issued from non-cellulosic polysaccharides, as estimated from G-layer samples extracted without sulfuric acid pretreatment. The second most abundant sugar is galactose, which represented 20.1 % of

neutral sugars, followed by xylose (4.7 %), arabinose (1.2 %), mannose (1.1 %), rhamnose (1.0 %) and finally by fucose which represents only 0.4 % of the neutral sugars (Table I). Uronic acids represent 5.0 % of the total sugars present in G-layers.

Structural analysis of polysaccharides

The structure of the oligosaccharides released after G-layer treatment with endo-1,4- β -glucanase, endo-1,4- β -xylanase and endo-1,4- β -galactanase were characterized by HPAEC-PAD (Fig. 2) and MALDI-TOF (Fig. 3) analysis.

When comparing the HPAEC-PAD chromatograms of untreated (Fig. 2A) and endo-1,4- β -glucanase treated G-layers (Fig. 2B) to a commercial cellodextrin chromatogram (Fig. 2C), the main cellulose oligomers released after endo-1,4- β -glucanase treatment are glucose (Glc1), cellobiose (Glc2) and cellotriose (Glc3). Several unknown minor peaks eluted at 3.8, 4.7, 7.5, and 16.2 min are visible both in glucanase-treated and untreated G-layer HPAEC-PAD chromatograms (Fig. 2A-B), indicative of the presence of unknown impurities. The comparison of the chromatogram from endo-1,4- β -glucanase (Fig. 2B) to the chromatogram of a commercial mixture of xyloglucan oligomers (Fig. 2D) unambiguously indicates that the analyzed G-layers did not contain any xyloglucan oligomers. Likewise, MALDI-TOF MS analysis carried out on glucanase-treated G-layers did not reveal any XGOS, whereas the presence of acetylated oligomeric structures such as H4a1, H4a2, H5a2, H5a3 containing only hexosyl units, are indicative of the presence of acetylated glucomannans (Fig. 3A, Table S1). Unexpectedly, two glucuronoxylan oligomers, namely X4u1m1a1 and X5u1m1a1, were also detected (Fig. 3A). As these compounds are also present in the MALDI-TOF spectrum of the xylanase-treated G-layer sample (Fig. 3B), their presence most likely resulted from a contaminant xylanase activity in the commercial endo-1,4- β glucanase used in this study, as previously established by others (Lahaye *et al.*, 2012). Overall, these complementary analyses indicated that the non-cellulosic glucose from the G-layers mostly originated from glucomannans but not from xyloglucans.

In agreement with MALDI-TOF analysis (Fig. 3B), the HPAEC chromatogram of xylanase-treated G-layers does not reveal any peak corresponding to linear xylan oligomers (Fig. 2E-F). This suggests that the G-layers analyzed contained only small amounts of glucuronoxylans as hemicelluloses of the xylan type. Therefore, polysaccharide analyses after endo-1,4- β -glucanase and endo-1,4- β -xylanase treatments allow concluding on the absence of xyloglucan in the G-layers analyzed, while they contain glucuronoxylans and acetylated glucomannans.

HPAEC-PAD chromatograms of the G-layer after endo-1,4- β -galactanase degradation evidence beside galactose a mix of galactan oligomers, mainly galactobiose (Gal2), galactotriose (Gal3) and galactotetraose (Gal4) (Figure 2G). These oligomers seem to be alike those obtained from a commercial pectic galactan (Fig. 2H). The main peaks from the MALDI-TOF spectrum of galactanase degradation products correspond to sodium and potassium adducts of dimers (at m/z 365.0 and 381.0), trimers (at m/z 527.1 and 543.1) and tetramers of hexose at 689.2 and 705.2, respectively (Fig. 3C, Table S1). In accordance with HPAEC-PAD analysis, the MALDI-TOF spectrum confirmed that Gal 2, Gal 3 and Gal 4 are the major galactan oligomers. These observations strongly suggest that the high level of galactose found in the G-layers mainly originated from RG-I. In addition, the elevated Gal/Rha molar ratio (17.6) deduced from G-layer sugar composition (Table I), leads to conclude on the presence of RG-I molecules with long β -1,4-Gal side-chains with regards to its backbone. The presence of AGPs, RG-II (rhamnogalacturonan type II pectin) or HG (HG pectin) are not excluded but they may be present just as minor components.

Localization of polysaccharides in TW and OW

When observing sections spanning from the cambium toward the pith, we get an insight on the evolution of anatomical features during xylem cell differentiation (Fig. 4). Interestingly, while at first, the S2 layer gradually thickened both in TW and OW, the S2 stopped to thicken as soon as the G-layer appeared in TW. On the reverse, no G-layer was ever observed in OW and in fully differentiated fibres, the S2 layer appeared often thicker in OW (OW2, Fig. 4) than in TW (TW3, Fig. 4).

The distribution of polysaccharide epitopes was evaluated at first on samples collected from 717-1B4 tree1 using 178 antibodies that recognize a wide range of glycostructures covering the major cell wall polysaccharides: xyloglucans, xylans, mannans, arabinogalactans (AG), pectins (RG-I and HG), proteins (AGPs and extensins) as classified by Tan *et al.*, 2013 (Table S2). As a first wide screen, the labelling obtained after immunogold-silver staining was observed under optical microscope both in TW and OW samples. This technique has a limited resolution and does not allow distinguishing each cell wall layer. However, it was possible to differentiate a labelling in the primary cell wall or middle lamella including cell wall corners (noted PCW/ML) from a labelling in S1 or S2 layer (noted S1/S2), or in G-layer (Table II). For the most interesting antibodies, we carried out additional immunolocalization studies using more resolute techniques, either fluorescent labelling

and confocal microscope observation or gold labelling and TEM analysis. It should be pointed out that we have never been able to observe S3 layer on all the observed material.

From the results observed on tree1, a sub-set of 26 antibodies was selected and tested on TW and OW samples from tree2 (same genotype as tree1) and tree3 (the Ogy poplar hybrid). The observations realized on these other plant materials gave consistent results (data not show) with the labeling pattern observed on the first tree analyzed.

Hemicelluloses

The labelling pattern of 78 antibodies directed against xyloglucan, xylan and mannan epitopes were determined. Among 29 antibodies directed against fucosylated or non-fucosylated xyloglucan epitopes, 19 gave a specific labelling in PCW/ML of both TW and OW differentiating and mature fibres (see for an example Fig. 5), but none of them labelled the secondary cell wall (Table II). In order to check if xyloglucan epitopes could be masked by pectins, we pretreated sections with pectinase, before detection using CCRC-M1 antibody (Marcus *et al.*, 2008). The pectinase treatment effectively removed HG (data not shown) and galactans from both PCW/ML and G-layers as revealed by a reduction of LM5 labelling (Fig. 9), but it had no obvious effect on CCRC-M1 epitope recognition as observed in labelling with non-treated samples (Fig. 5 A-F and Fig.5 I-J) and in pre-treated samples (Fig. 5G-H).

The distribution of xylans, the most abundant polysaccharide in angiosperm secondary cell wall, was analyzed using 36 antibodies directed against different xylan epitopes and classified in 7 different groups according to their ability to recognize a series of standard samples (Tan *et al.*, 2013). It must be pointed out that most of these antibodies have not been extensively characterized with some notable exceptions though, such as AX1 directed against arabinoxylan moieties (Guillon *et al.*, 2004) and the antibodies from the xylan-6 and xylan-5 groups that react with both arabinoxylans and methylglucuronoxylans according to the WallMabDB plant cell wall monoclonal antibody database (<http://www.wallmabdb.net>).

While most of the 23 tested antibodies directed against xylan epitopes were able to label fibres, 16 of them belonging to either of 3 groups (xylan-4, xylan-6 and xylan-7) labelled exclusively the S1/S2 layers of both TW and OW (Table II) as an exemple the labelling with CCRC-M151 (Fig. 6). Seven antibodies labelled the G-layer with different patterns: CCRC-M119 from xylan-2 group labelled only the inner face of differentiating G-layer (Fig. 7). CCRC-M120, from xylan-3 group, strongly labelled the whole thickness of differentiating G-layers and slightly labelled the inner face of mature G-layers (Fig. 7). Finally, all the

antibodies from xylan-5 group labelled the inner face of the S2 layer in OW and the inner face of G-layer in TW fibres as the CCRC-M146 (Fig. 6). This class of antibodies **may** recognize methyl-glucuronoxylan epitopes according to WallMabDB.

CCRC-M169 and CCRC-M170 antibodies, known to recognize acetylated mannans were both detected in S1/S2 of OW fibres and in the differentiating G-layer of TW fibres (Fig. 6). Both of them label the whole thickness of differentiating G-layers with a decreased labelling when fibres get mature. These observations are in accordance with the MALDI-TOF MS analysis where acetylated glucomannans were detected from isolated G-layers after glucanase digestion (Fig. 3A). Among the 7 tested anti-galactomannan antibodies, only one, CCRC-M168 from the galactomannan-2 group labelled PCW/ML and S1/S2 during fibre differentiation.

Arabinogalactans

Galactan was shown to be the second most abundant non-cellulosic polysaccharide in the G-layer (Table I). Galactan can decorate either pectins or glycosylated proteins (such as AGPs and extensins). Sixty antibodies directed against RG-I or AGP arabinogalactan epitopes were tested. The epitopes recognized by these antibodies have not yet been identified. According to (Tan *et al.*, 2013), these antibodies were classified into 5 groups: arabinogalactan-1, arabinogalactan-2, arabinogalactan-3, arabinogalactan-4 and arabinogalactans as rhamnogalacturonan I side chains. Giving strength to this classification, the antibodies belonging to any of these 5 groups gave consistent labelling profiles on poplar xylem sections. Almost all antibodies were detected in the secondary cell wall, either in the G-layer on TW side or in the S2 on OW side. From the 60 tested antibodies, 40 labelled the G-layer with 26 of them specific to the G-layer (Table III).

While none of the antibodies from the arabinogalactan-1 group were able to label wood, all antibodies from arabinogalactan-2 group were detected in the G-layer, but with different labelling patterns. LM5 that recognized a β 1-4 Gal epitope, gave a strong signal in the whole thickness of differentiating G-layers (TW1), while when G-fibres were more mature (TW2), the labelling was at first restricted to both the outer and inner edges of the G-layer, and then only to the outer edge of mature G-layers (TW3), while the PCW/ML was only slightly labelled (Fig. 8). JIM14, directed against an AGP epitope, gave a strong signal at the inner face of G-layers and a light signal in PCW/ML. Two other antibodies from this group labelled the differentiating G-layer: LM6, directed against RG-I arabinan side chains that labelled the

whole G-layer thickness and JIM19, directed against an extensin epitope (Knox, 1997), gave a specific signal at the inner face of G-layers.

Two of the antibodies from the arabinogalactan-3 group were known to recognize AGPs (JIM8 and JIM15, Knox *et al.*, 1991; Knox, 1997; Showalter, 2001; Dolan *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2013). These 2 antibodies labelled the inner face of differentiating G-layers as well as the inner face of differentiating S2 of OW fibres. Only JIM8 also labelled the whole thickness of mature G-layer. All the other antibodies were detected in the whole thickness of differentiating G-layers, while CCRC-M85 labelling was also detected at the inner face of the S2 layers from differentiating OW fibres.

Most of the antibodies from arabinogalactan-4 groups specifically labelled the G-layer with different patterns. CCRC-M91 and CCRC-M92 only labelled the inner face of differentiating G-layer. The AGP epitope recognized by MAC207 (Knox, 1997; Showalter, 2001; Gaspar *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2013; Yates *et al.*, 1996; Pennel *et al.*, 1989) was detected at the inner face of both differentiating and mature G-layers. JIM133 and CCRC-M78 were detected in the whole thickness of G-layer throughout fibre differentiation, but in addition CCRC-M78 labelled the inner face of the S2 from OW fibres.

Most (23/31) of the antibodies from the RG-I/AG group were either detected specifically in the G-layer (15) or both in the G-layer and the PCW/ML (8). Most of them labelled the inner face of the G-layer (CCRC-M7, CCRC-M44, CCRC-M8, CCRC-M79, CCRC-M80 and CCRC-M60). However, CCRC-M7 (Fig. 9) and CCRC-M44 were detected only in differentiating G-layers, while CCRC-M8 labelled both the inner face of differentiating G-layers and the whole thickness of mature G-layers. On the reverse, CCRC-M60 labelled the whole thickness of differentiating G-layers and only the inner face of mature G-layers. CCRC-M24 and CCRC-M32 labelled only the whole thickness of differentiating G-layers. Interestingly, CCRC-M21 labelled both the inner side of S2 in OW and the inner side of differentiating G-layer in TW. Finally, 2 antibodies specifically labelled the PCW/ML (Table S2).

When considering the 9 antibodies directed against AG epitopes from glycosylated proteins side chains, 6 of them labelled the G-layer (Table S3). Among them, JIM16 and MAC207 were detected only in the G-layer while JIM8 and JIM15 were detected both at the inner side of TW G-layer and OW S2. On the contrary, JIM4, JIM13 and LM2 antibodies known to recognize AGPs epitopes were not detected in any wood fibres.

Other pectin epitopes

Among the 43 antibodies raised against RG-I and HG epitopes, 13 labelled the PCW/ML, while only three labelled the G-layer and none the S1/S2 (Table S2).

Between the 20 antibodies directed against motifs present in RG-I, 4 labelled the PCW/ML and 2 the cell wall corners throughout the gradient of cell wall differentiation. We also tested 7 antibodies specifically directed against RG-I backbone. Two of them, RG-I and CCRC-M14, specifically labelled the mature G-layer: RG-I only labelled the inner face of the G-layer, while CCRC-M14 was detected through its entire thickness (Fig. 10).

HG distribution was investigated using 12 antibodies directed against HG epitopes with different degrees of methylesterification. Six of these antibodies exclusively labelled the cell wall corners throughout xylem cell differentiation in both TW and OW fibres, while one was detected both in PCW/ML and cell wall corners. Only, JIM7 directed against highly methylated HG was detected in both G-layer and PCW/ML throughout the gradient of differentiation (Table III).

DISCUSSION

In this study, we identified the non-cellulosic polysaccharides present in poplar wood, particularly during tension wood formation. This identification was initially based, on one hand, on the determination of the oligosaccharide composition of isolated G-layers using a protocol generating highly pure G-layers, combined with powerful biochemical techniques (MALDI-TOF MS and HPAEC analyses). On the other hand, epitopes specific to different classes of non-cellulosic polysaccharides were detected *in situ* detected to give an overview on of their localization in fibre cell walls both in tension wood and opposite wood. In addition, we took advantage of the existing developmental gradient in stem sections to monitor the evolution of epitope labelling during fibre differentiation: obviously, such evolution may result either from variations in epitope level or from the presence of other cell wall components that may hinder antibody binding to their epitopes. In order to get consolidated results, immunolocalisation studies were realized on samples collected from three individual trees, two INRA 717-1B4 trees, a *P. tremula* × *P. alba* clone, and a third Ogy tree, a *P. deltoides* × *P. nigra* cultivar. The labelling observed on these materials of different genetic background was always very consistent for all the antibodies tested suggesting that our results are of general meaning.

Certainly, to fully exploit the results of this study, a better knowledge on the epitopes recognized by most of the tested antibodies would be definitely needed. In the meantime, we will focus the discussion on one hand, on the results obtained with antibodies directed against characterized epitopes, and on the other hand, on global labelling patterns obtained with antibody groups directed against specific polysaccharide families (as defined by Tan , 2013). Finally, in situ epitope detection appeared to be in most cases in good accordance with the biochemical analysis of the G-layer, enlightening some new interesting features that will be discussed here.

Differences between TW and OW fibres are mostly restricted to the G-layer

The comparison of polysaccharides distribution between TW and OW indicated that a lot of epitopes from diverse polysaccharides structures were specific to TW, whereas none of all the antibodies tested appeared specific to OW (Table II). It is also worth noting that among the large number of tested antibodies, the labelling of both PCW/ML and S1/S2 layers was remarkably similar between TW and OW fibres. The PCW/ML were mostly labelled by a number of antibodies directed against xyloglucan epitopes that appeared to be the only polysaccharide group exclusively detected in PCW/ML, and also by antibodies labelling different RG-I and HG epitopes. Likewise, in accordance with the preponderance of xylans in angiosperm S2 layer (Gorshkova *et al.*, 2010), a number of antibodies directed against xylan epitopes strongly and specifically labelled the S1/S2 layers from both TW and OW fibres, as previously shown by Decou *et al.* (2009) with the AX1 antibody. However, we have been able to identify a few antibodies that labelled the inner face of the most internal layer of the cell wall, which is the G-layer in TW and the S2 layer in OW: this is the case, for example, of CCRC-M146 directed against a substituted xylan (Fig.6 E-H). We may speculate that more than revealing differences in polysaccharide composition between TW and OW S1/S2 layers, this labelling pattern may be indicative of cell wall components that were initially bound to the plasma membrane when the fibres were still alive and stayed there after xylem cell death.

The G-layer contains mainly cellulose, RG-I, AGP, glucuronoxylans and acetylated glucomannans, but no xyloglucans

The non-cellulosic polysaccharide composition of the G-layer is rather complex and very different from other cell wall layers: almost 30% of all the antibodies tested labelled the G-layer, with nearly 40% of them being specific to the G-layer (Table II.). Pioneer studies of

isolated G-layers assumed that it was composed of almost pure cellulose due to the detection of very high amount of glucose with low amount of xylose (Norberg and Meier, 1966). Since then, the complexity in polysaccharide and proteoglycan composition has been evidenced with different approaches with the presence in the G-layer of AGPs (Lafarguette *et al.*, 2004; Bowling and Vaughn, 2008), xyloglucans (Nishikubo *et al.*, 2007; Baba *et al.*, 2009; Kaku *et al.*, 2009), RG-I (Arend, 2008, Bowling and Vaughn, 2008), mannans and xylans (Kim *et al.*, 2012).

In this study, G-layers prepared from the hybrid *P. tremula* x *P. alba* clone showed a rather low sugar content (62% DW): it would be very pertinent to determine what the remaining constituents of the G-layer are. Lignin is not a good candidate as it is generally accepted that the G-layer is completely devoid of lignin or, at the most, contains only trace amounts of it (Pilate *et al.*, 2004); the best candidates may be proteins and mineral ions.

Surprisingly, second after glucose, galactose represents more than 20% of the neutral sugar content, which is by far the most abundant non-cellulosic monosaccharide in the G-layer (Table I). More than 80% of this galactose appears to originate from highly branched RG-I, as deduced from both the analyses of endo-1,4 β -galactanase digested fraction (Fig. 2 and 3) and the high galactose/rhamnose ratio (Table I). These biochemical results are in accordance with immunolocalisation studies, where 70% of the antibodies directed against RG-I labelled the G-layer, with 50% of them specifically labelling it. Likewise, among the antibodies likely to be directed against AGP epitopes, 75% of them were able to label the G-layer and more than half of them were specific of it, with most of them giving a signal localized at the inner face of the G-layer (Table III). Previous transcriptomic studies on tension wood revealed the high level of AGP transcripts expressed during tension wood formation: this was the case for 10 genes encoding fasciclin-like arabinagalactan proteins (FLA) specifically and very highly expressed in TW during secondary cell wall formation, whereas 5 other *FLA* genes were more generally expressed in xylem cells differentiating their secondary cell wall (Déjardin *et al.*, 2004; Lafarguette *et al.*, 2004; Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006). At the moment, we are not able to link these molecular data with our results of localization with anti AGP antibodies, as we have no information on their ability to specifically recognize FLA among the other AGP and have not assayed anti-FLA specific antibodies.

MALDI-TOF MS analyses of isolated G-layers also gave strong evidences for the presence of acetylated glucomannans; this was confirmed by the strong labelling observed in the differentiating G-layer using CCRC-M169 and CCRC-M170 antibodies, both directed against

acetylated mannan epitopes. Lately, the occurrence of glucomannans in the G-layers has been reported (Nishikubo *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012), but the biological significance of their presence remains to be determined. We may hypothesize that the observed absence of labelling in the mature G-layer may result from glucomannan deacetylation reaction: interestingly, it has been shown on Konjack glucomannan that the acetyl substituted residues on the glucomannan backbone is responsible for its water solubility, while its deacetylation is a crucial step leading to its gelation (Maekaji, 1974).

In accordance with previous studies (e.g. Decou *et al.*, 2006), most of the anti-xylan antibodies did not label the G-layer and appeared specific to the S1/S2 layers. However, biochemical analyses revealed that G-layers contain glucuronoxylans as sole hemicelluloses of the xylan type and six (20 %) of the tested anti-xylan antibodies labelled the G-layer, with only one being specific to it. It remains to more clearly define the epitopes recognized by these antibodies in order to determine more precisely the structure of these glucuronoxylans.

Both biochemical analyses and imunolocalization studies reported here clearly indicate that there is no xyloglucan in the G-layer. Firstly, the oligosaccharides released after digestion of extracted G-layers by endo-1,4- β - glucanase or endo-1,4- β -xylanase unambiguously indicated that the glucose originated from cellulose and glucomannans, while the xylose originates from substituted xylans, mostly glucuronoxylans, with no trace of xyloglucans. Secondly, all the 29 tested antibodies directed against xyloglucan epitopes did not revealed any labelling in the G-layer, even after a pectinase treatment aiming at giving access to xyloglucan epitopes that might be masked by RG-I, present in high amount in G-layers. Indeed, the pectinase treatment induced a decrease in LM5 labelling (Fig. 8) showing that it has efficiently digested RG-I side chains, without concomitant appearance of xyloglucan specific labelling (Fig. 5). Furthermore, from the 29 tested antibodies, 70% labelled the PCW/ML, indicating the absence of labelling in the G-layer was not a technical artefact.

Biochemical analyses and immunolocalization studies gave a consistent picture of the polysaccharide composition of the G-layer, which appeared very rich in RG-I but deprived of xyloglucans. This is different from previously published work (Nishikubo *et al.*, 2007). One reason for this discrepancy may be linked to the time of sampling: indeed, we had to isolate G-layers from actively growing trees, as G-layers co-purified with ray-cell stored starch granules when TW samples were collected from resting trees (Fig. 1). Their potential occurrence in the isolated G-layer extract is likely to modify the results of the carbohydrate analysis. Another reason may be related to the young age of the sampled trees, likely to

contain an important proportion of G-fibres still under differentiation: indeed, as revealed by the results of immunolocalization, the polysaccharide composition is likely to evolve during G-layer formation, and in particular the galactose content may decrease in mature G-layers (see below): thus, it may be worth to determine if the high galactose proportion measured in our study is really influenced by the presence of differentiating fibres. Likewise, the rather low total sugar content measured in our sample may also be explained by the fact that differentiating G-layer may contain far more proteins than mature G-layers: certainly, it would be worth to perform protein analyses on differentiating G-layers. Finally, we may not have been able to get any labelling using CCRC-M1 as our samples were collected on actively growing plant material, whereas Nishikubo *et al.* (2007) detected a labelling with the same antibody on wood sections from trees collected late in the fall, just when cambium stops its activity while the newly formed xylem cells still build their secondary cell walls (E Mellerowicz, personal communication).

The G-layer polysaccharide composition changes during G-fibre differentiation

For a selected number of antibodies, we followed the evolution of epitope labelling during G-fibre differentiation, from the cambium toward the pith (TW1, TW2 and TW3 as shown on Fig. 4). These differences were particularly important for a number of antibodies, most of them being directed against RG-I and AGP epitopes. Most of the time, a strong labelling over the whole thickness of the G-layer is observed in young differentiating fibres, and then this labelling fades away and sometimes vanishes or remains only in restricted areas, either the inner or the outer side of the G-layer. This is the case for LM5 specific to RG-I 1,4- β -galactan side chains: a strong labelling is detected at first all over the newly formed G-layer (TW1) then the label remains strong only at both the outer and inner sides of the G-layer (TW2), then, in mature fibre, the labelling is restricted to the outer side of the G-layer (TW3) (see Fig. 8 A1-A3). Only this last pattern was reported by Arend *et al.* (2008), who realized observations on sections with mature wood. Likewise, LM6 that recognizes 1,5- α -L-arabinan (also specific to RG-I side chain) exhibits a strong signal at the inner face of differentiating G-layer and no signal in the mature G-layer. CCRC-M7 directed against an arabinosylated 1,6)- β -D-galactan epitope present on RG-I and AGP (Steffan *et al.*, 1995, Gens *et al.*, 2000) specifically labelled the PCW/ML and the inner side of the G-layer in differentiating TW fibres, while this labelling is completely absent in the mature G-layers (Fig. 9). This is also the case for a number of other antibodies directed against epitopes specific to different RG-I,

AGP, substituted xylans and acetylated mannans (Fig. 7). From the sugar analysis, we may anticipate that the substituted xylans are glucuronoxylans and the acetylated mannans are acetylated glucomannans. On the reverse, JIM19 that recognized an epitope specific to extensine (Knox, 1997), labelled specifically the inner face of the G-layer in differentiating TW fibres, while the whole thickness of the G-layer was labelled in mature fibres.

Likewise, two antibodies (RG1 and CCRCM14) that recognized RG-I backbone (Ralet *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013), only label the cell wall corner of differentiating TW fibres, whereas mature G-fibres exhibit a strong labelling at both the PCW/ML and the inner face of G-fibres. Even more interestingly, this labelling at the inner face of the G-layer may be detected earlier during G-layer differentiation but only at the tips of TW fibres (Fig 10). When putting together the labelling patterns of these anti-RG-I backbone antibodies and those of LM5 and LM6 antibodies directed against RG-I side chains, we may hypothesize that during G-layer formation, the RG-I side chains are progressively eliminated making accessible the RG-I backbone to the antibodies, this phenomenon being initiated at the tips of TW fibres. This may be the result from an enzymatic removal of RG-I galactan side chains catalyzed by a specific β -galactosidase as already reported in flax fibres (Roach *et al.*, 2011). However, we failed to identify any β -galactosidase transcript over-expressed in TW database (Déjardin *et al.*, 2004).

Toward a link between the evolution of polysaccharides in the G- layer and the generation of a tensile stress

In conclusion, we demonstrated here that the composition of non-cellulosic polysaccharide strongly changes during G-layer differentiation. Firstly, despite extensive experiments, we failed to evidence the presence of xyloglucans in the G-layer that makes questionable the theory on the involvement of these polysaccharides in the generation of tensile stress in tension wood (Mellerowicz *et al.*, 2008). Secondly, we observed that a number of antibodies known to recognize antibodies directed against AGP specific epitopes labelled both the PCW/ML and the G-layer (e.g. JIM14), or even appear specific to the G-layer (e.g. JIM8 and MAC207): this confirms the involvement of these proteins in the function of the G-layer in tensile stress generation. AGP have been postulated to interact with the scaffold between microtubule and cellulose microfibrils potentially responsible for their orientation (Driouich and Baskin, 2008). Others have proposed that AGPs bulky glycan may provide contact surface for interaction with other matrix molecules (Seifert and Roberts 2007, Ellis *et al.*,

2010) and may act as matrix plasticizers by decreasing pectin cross-linking and increasing pectin porosity as proposed by Lamport and Kieliszewski (2005). Certainly, more in-depth studies are needed to unravel the precise function of AGP in the building of functional G-layers. Thirdly, our observations suggest important evolutions in pectins of the RG-I type during G-layer differentiation. These changes may affect the crystalline properties of the cellulose microfibrils and their further aggregation into macrofibrils as it is known that during cellulose synthesis, matrix polymers such as pectin interact with the nascent glucan chains (Ding and Himmel, 2006). It has been shown that pectic side chains displayed significant in vitro binding capacity to cellulose, whereas pectic backbone domains exhibited only slight adsorption to cellulose microfibrils (Zykwinska *et al.*, 2007a): therefore, it may be possible that in the differentiating G-layer cellulose microfibrils are tethered by different pectic side chains belonging to a same pectic macromolecule (Zykwinska *et al.*, 2007b). Further, Thimm and colleagues demonstrated that cellulose microfibril aggregation may be increased by modulation of the hydration status of the matrix polymers (Thimm *et al.*, 2000) or/and via the post-synthetic removal of matrix polymers, including pectins (Thimm *et al.*, 2009). De-branched RG-I pectins are also known to be able to swell in water as demonstrated in seed coat mucilage (Macquet *et al.*, 2007). Therefore, such changes in the cell wall matrix during G-layer differentiation may be directly related to the hygroscopic status of the G-layer and to the gel-like structure evidenced by Clair *et al.* (2008). In this case, it remains to determine the mechanism that links the observed changes in the G-layer matrix to the micromechanical stress induced in cellulose microfibrils during G-layer formation as observed by Clair *et al.* (2011).

Acknowledgments

This work was partly supported by the ANR Blanc project “Stress in Trees” and Guedes F T P was funded by CAPES (Ministry of Education, Brazil). We also want to thank Tancrede Alméras for critical reading of the manuscript and Pierre-Ivan Raynal (Electron Microscopy Facility, François Rabelais University and University Hospital of Tours, France) for their technical support on MET observations.

References

- Almeras T, Fournier M** (2009) Biomechanical design and long-term stability of trees: Morphological and wood traits involved in the balance between weight increase and the gravitropic reaction. *Journal of Theoretical Biology* **256**: 370-381
- Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B** (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant Journal* **45**: 144-165
- Arend M** (2008) Immunolocalization of (1,4)-beta-galactan in tension wood fibers of poplar. *Tree Physiology* **28**: 1263-1267
- Baba K, Park YW, Kaku T, Kaida R, Takeuchi M, Yoshida M, Hosoo Y, Ojio Y, Okuyama T, Taniguchi T, Ohmiya Y, Kondo T, Shani Z, Shoseyov O, Awano T, Serada S, Norioka N, Norioka S, Hayashi T** (2009) Xyloglucan for Generating Tensile Stress to Bend Tree Stem. *Molecular Plant* **2**: 893-903
- Bamber RK** (1987) The origin of growth stresses: a rebuttal. *IAWA Bulletin* **8**: 80-84
- Blakeney AB, Harris PJ, Henry RJ, Stone BA** (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* **113**: 291-299
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G** (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**: 484-489
- Bonser RHC, Ennos AR** (1998) Measurement of prestrain in trees: implications for the determination of safety factors. *Functional Ecology* **12**: 971-974
- Bowling AJ, Vaughn KC** (2008) Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. *American Journal of Botany* **95**: 655-663
- Bowling AJ, Vaughn KC** (2009) GELATINOUS FIBERS ARE WIDESPREAD IN COILING TENDRILS AND TWINING VINES. *American Journal of Botany* **96**: 719-727
- Boyd JD** (1972) Tree growth stresses — Part V: Evidence of an origin in differentiation and lignification. *Wood Science and Technology* **6**: 251-262
- Casero P J, Casimiro I, Knox J P** (1998) Occurrence of cell surface arabinogalactan-protein and extensin epitopes in relation to pericycle and vascular tissue development in the root apex of four species. *Planta* **204**: 252-259
- Chang SS, Clair B, Ruelle J, Beauchene J, Di Renzo F, Quignard F, Zhao GJ, Yamamoto H, Gril J** (2009) Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3023-3030

- Clair B, Almeras T, Pilate G, Jullien D, Sugiyama J, Riekel C** (2011) Maturation Stress Generation in Poplar Tension Wood Studied by Synchrotron Radiation Microdiffraction. *Plant Physiology* **155**: 562-570
- Clair B, Almeras T, Sugiyama J** (2006) Compression stress in opposite wood of angiosperms: observations in chestnut, mani and poplar. *Annals of Forest Science* **63**: 507-510
- Clair B, Gril J, Di Renzo F, Yamamoto H, Quignard F** (2008) Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood. *Biomacromolecules* **9**: 494-498
- Costa M, Pereira A M, Rudall P J, Coímbra S** (2013) Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). *Annals of Botany* **111**: 183-190
- Decou R, Lhernould S, Laurans F, Sulpice E, Leple JC, Dejardin A, Pilate G, Costa G** (2009) Cloning and expression analysis of a wood-associated xylosidase gene (PtaBXL1) in poplar tension wood. *Phytochemistry* **70**: 163-172
- Dejardin A, Leple JC, Lesage-Descauses MC, Costa G, Pilate G** (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues - A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biology* **6**: 55-64
- Ding SY, Himmel ME** (2006) The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 597-606
- Dolan L, Linstead P, Roberts K** (1995) An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. *Protoplasma* **189**: 149-155
- Donaldson LA, Knox JP** (2012) Localization of Cell Wall Polysaccharides in Normal and Compression Wood of Radiata Pine: Relationships with Lignification and Microfibril Orientation. *Plant Physiology* **158**: 642-653
- Fujita M, Saiki H, Harada H** (1974) Electron microscopy of microtubules and cellulose microfibrils in secondary wall formation of poplar tension wood fibers. *Mokuzai Gakkaishi* **20**: 147-156
- Gaspar Y, Johnson K L, McKenna J A, Bacic A, Schultz C J** (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology* **47**: 161-176
- Gens JS, Fujiki M, Pickard BG** (2000) Arabinogalactan protein and wall-associated kinase in a plasmalemmal reticulum with specialized vertices. *Protoplasma* **212**: 115-134
- Gorshkova TA, Gurjanov OP, Mikshina PV, Ibragimova NN, Mokshina NE, Salnikov VV, Ageeva MV, Amenitskii SI, Chernova TE, Chemikosova SB** (2010) Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**: 328-341
- Goswami L, Dunlop JWC, Jungnikl K, Eder M, Gierlinger N, Coutand C, Jeronimidis G, Fratzl P, Burgert I** (2008) Stress generation in the tension wood of poplar is based on the lateral swelling power of the G-layer. *Plant Journal* **56**: 531-538

- Guillon F, Tranquet O, Quillien L, Utile JP, Ortiz JJO, Saulnier L** (2004) Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *Journal of Cereal Science* **40**: 167-182
- Hoebler C, Barry JL, David A, Delort-Laval J** (1989) Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**: 360-367
- Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T** (2009) Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. *Journal of Wood Science* **55**: 250-257
- Karas M, Ehring H, Nordhoff E, Stahl B, Strupat K, Hillenkamp F, Grehl M, Krebs B** (1993) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Organic Mass Spectrometry* **28**: 1476-1481
- Kim JS, Daniel G** (2012) Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. *Planta* **236**: 35-50
- Knox J P, Linstead J, Peart J, Cooper C, Roberts K** (1991) Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *The plant Journal* **1**: 317-326
- Knox JP** (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *In* KW Jeon, ed, *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 171, Vol 171, pp 79-120
- Lafarguette F, Leple JC, Dejardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses MC, Pilate G** (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* **164**: 107-121
- Lahaye M, Quemener B, Causse M, Seymour GB** (2012) Hemicellulose fine structure is affected differently during ripening of tomato lines with contrasted texture. *International Journal of Biological Macromolecules* **51**: 462-470
- Lamport D T A, Kieliszewski M J** (2005) Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins. *Plant Biosystems* **139**: 60-64.
- Macquet A, Ralet MC, Loudet O, Kronenberger J, Mouille G, Marion-Poll A, North HM** (2007) A naturally occurring mutation in an Arabidopsis accession affects a beta-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage. *Plant Cell* **19**: 3990-4006
- Maekaji K** (1974) The mechanism of gelation of konjac mannan. *Agricultural An Biological Chemistry* **38**: 315-321
- Marcus SE, Verhertbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WGT, Knox JP** (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *Bmc Plant Biology* **8**:60

- Matsuzaki J, Masumori M, Tange T** (2007) Phototropic bending of non-elongating and radially growing woody stems results from asymmetrical xylem formation. *Plant Cell and Environment* **30**: 646-653
- Mellerowicz EJ, Immerzeel P, Hayashi T** (2008) Xyloglucan: The Molecular Muscle of Trees. *Annals of Botany* **102**: 659-665
- Mellerowicz EJ, Sundberg B** (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 293-300
- Meloche CG, Knox JP, Vaughn KC** (2007) A cortical band of gelatinous fibers causes the coiling of redvine tendrils: a model based upon cytochemical and immunocytochemical studies. *Planta* **225**: 485-498
- Mikshina P, Chernova T, Chemikosova S, Ibragimova N, Mokshina N, Gorshkova T** (2013) Cellulosic Fibers: Role of Matrix Polysaccharides in Structure and Function.
- Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ** (2007) Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar - A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant and Cell Physiology* **48**: 843-855
- Norberg PH, Meier H** (1966) Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* **20**: 174-178
- Pennel R I, Knox J P, Scofield G N, Selvendran R R, Roberts K** (1989) A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *The journal of Cell Biology* **108**: 1967-1977
- Pilate G, Dejardin A, Laurans F, Leple JC** (2004) Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytologist* **164**: 63-72
- Ralet MC, Tranquet O, Poulain D, Moise A, Guillon F** (2010) Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta* **231**: 1373-1383
- Richardson K C, Jarett L, Finke E H** (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Biotechnic and Histochemistry* **35**: 313-323
- Roach MJ, Mokshina NY, Badhan A, Snegireva AV, Hobson N, Deyholos MK, Gorshkova TA** (2011) Development of Cellulosic Secondary Walls in Flax Fibers Requires beta-Galactosidase. *Plant Physiology* **156**: 1351-1363
- Scurfield G** (1973) Reaction wood: its structure and function. *Science* **179**: 647-655
- Showalter A M** (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1399-1417
- Steffan W, Kovac P, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG** (1995) Characterization of a monoclonal-antibody that recognizes an arabinosylated (1-6)-beta-D-galactan epitope in plant-complex carbohydrates *Carbohydrate Research* **275**: 295-307

- Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J, Yuan CH, Hao ZY, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D** (2013) An Arabidopsis Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *Plant Cell* **25**: 270-287
- Thimm JC, Burritt DJ, Ducker WA, Melton LD** (2000) Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy: effect of dehydration on cellulose microfibrils. *Planta* **212**: 25-32
- Thimm JC, Burritt DJ, Ducker WA, Melton LD** (2009) Pectins influence microfibril aggregation in celery cell walls: An atomic force microscopy study. *Journal of Structural Biology* **168**: 337-344
- Timell TE** (1969) The chemical composition of tension wood. *Svensk Papperstidning* **72**: 173-181
- van Hengel A J, Roberts K** (2002) Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in Arabidopsis. *The Plant Journal* **32**: 105-113
- Yamamoto H** (2004) Role of the gelatinous layer on the origin of the physical properties of the tension wood. *Journal of Wood Science* **50**: 197-208
- Yates E A, Valdor J F, Haslam S M, Morris H R, Dell A, Mackie W, Knox J P** (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**: 131-139
- Zykwinska A, Gaillard C, Buleon A, Pontoire B, Garnier C, Thibault JF, Ralet MC** (2007) Assessment of in vitro binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods. *Biomacromolecules* **8**: 223-232
- Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC** (2007) Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1795-1802

TABLES

Table I. Quantification of neutral sugars of G-layers isolated from TW cross sections by sonication in ethanol

Rhamnose	Fucose	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
% mol						
1.0	0.4	1.2	4.7	1.1	20.1	71.5

Table II. Quantity of primary antibodies tested per group of polysaccharide: detection and distribution in fibers through the gradient of differentiation

Group	Probes	Labeling	PCW/ML	SCW		PCW and S1/S2	PCW and G-layer	S1/S2 and G-layer
				S1/S2	G-layer			
Non-fucosylated XG-1	2	2	2	.	.	.	.	.
Non-fucosylated XG-2	5	5	5	.	.	.	.	.
Non-fucosylated XG-3	3	3	3	.	.	.	.	.
Non-fucosylated XG-4	5	1	1	.	.	.	.	.
Non-fucosylated XG-5	7	3	3	.	.	.	.	.
Non-fucosylated XG-6	2	.	.	.	.	.	.	.
Fucosylated XG	5	5	5	.	.	.	.	.
Xylan-1	3	.	.	.	.	.	.	.
Xylan-2	4	1	.	.	1	.	.	.
Xylan-3	6	1	.	.	.	.	1	.
Xylan-4	2	1	.	1	.	.	.	.
Xylan-5	5	5	.	.	.	.	.	5 ^A
Xylan-6	12	11	.	11	.	.	.	.
Xylan-7	4	4	.	4	.	.	.	.
Galactomannan-1	3	.	.	.	.	.	.	.
Galactomannan-2	7	1	.	.	.	1	.	.
Acetylated mannan	2	2	.	.	.	.	.	2 ^B
Arabinogalactan-1	5	.	.	.	.	.	.	.
Arabinogalactan-2	7	6	.	.	4	.	2	.
Arabinogalactan-3	10	4	.	.	2	.	.	2 ^C
Arabinogalactan-4	7	5	.	.	4	.	.	1 ^C
RGI/AG	31	26	2	.	15	.	8	1 ^C
<i>RGI</i>	1	1	.	.	1	.	.	.
RGI Backbone	6	1	.	.	1	.	.	.
RGI-a	2	.	.	.	.	.	.	.
RGI-b	5	2	2	.	.	.	.	.
RGI-c	6	2	2	.	.	.	.	.
Linsed Mucilage RGI	5	.	.	.	.	.	.	.
<i>Physcomitrella pectin</i>	4	1	1	.	.	.	.	.
<i>HG</i>	1	.	.	.	.	.	.	.
HG backbone-1	7	6	6	.	.	.	.	.
HG backbone-2	4	2	.	.	.	.	2	.

Notes: ML= middle lamella; PCW= primary cell wall; SCW= secondary cell wall; S1= secondary cell wall layer 1; S2= secondary cell wall layer 2; XG= xyloglucan; RGI= rhamnogalacturonan type I; AG= arabinogalactans; HG=Homogalacturonan; point (.) = not detected. ^A detected in the inner face of S2 in differentiating and mature OW fibers and in the inner face of differentiating and mature G-layers; ^B detected in the S1/S2 layers of differentiating and mature OW fibers, in the S1/S2 of mature G-fibers and in differentiating G-layers; ^C detected in the inner face of S2 in differentiating OW fibers and in the inner face of differentiating G-layers. *RGI* and *HG* contain antibodies not-classified in <http://www.wallmabdb.net>.

Table III. Detection of different structures of polysaccharides in G-layer and its distribution through the gradient of differentiation

Group	Probes	Differentiating G-layer			Mature G-layer			S1/S2	PCW
		Whole thickness	Inner face	Outer face	Whole thickness	Inner face	Outer face		
Xylan-2	CCRC-M119	.	x	.	.	.	.	.	.
Xylan-3	CCRC-M120	x	.	.	.	x	.	.	x
Xylan-5	CCRC-M143, CCRC-M144, CCRC-M145, CCRC-M146, CCRC-M155	.	x	.	.	x	.	x ^A	.
Acetylated mannan	CCRC-M169, CCRC-M170	x	.	.	.	.	.	x ^B	.
Arabinogalactan-2	LM6	.	x	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M133	.	.	.	x	.	.	.	.
	JIM19	.	x	.	x	.	.	.	.
	LM5	x	.	.	.	.	x	.	x
	CCRC-M107	x	.	.	.	.	x	.	.
	JIM14	.	x	.	.	x	.	.	x
Arabinogalactan-3	CCRC-M85	x	.	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M81	x	.	.	.	.	.	x ^C	.
	JIM8	.	x	.	x	.	.	.	.
	JIM15	.	x	.	.	.	.	x ^C	.
Arabinogalactan-4	CCRC-M91, CCRC-M92	.	x	.	.	.	.	.	.
	MAC207	.	x	.	x	.	.	.	.
	JIM133	x	.	.	x	.	.	.	.
	CCRC-M78	x	.	.	x	.	.	x ^C	.
RGI/AG	CCRC-M33	x	.	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M21, CCRC-M77, CCRC-M122, CCRC-M123, CCRC-M125, CCRC-M126, JIM1, JIM16, JIM131	.	x	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M12, CCRC-M13, CCRC-M22	.	x	.	.	x	.	.	.
	CCRC-M9	x	.	.	x	.	.	.	.
	CCRC-M134	x	.	.	.	x	.	.	.
	CCRC-M121	.	x	.	.	.	.	x ^C	.
	CCRC-M7, CCRC-M44	.	x	.	.	.	.	.	x
	CCRC-M24, CCRC-M32	x	.	.	.	.	.	.	x
	CCRC-M8	.	x	.	x	.	.	.	x
	CCRC-M79, CCRC-M80	.	x	.	.	x	.	.	x
	CCRC-M60	x	.	.	x	.	.	.	x
<i>RGI</i>	<i>RGI</i>	.	.	.	.	x	.	.	.
RGI backbone	CCRC-M14	.	.	.	.	x	.	.	.
HG backbone 2	JIM7	x	.	.	x	.	.	.	x

Notes: ML= middle lamella; PCW= primary cell wall; SCW= secondary cell wall; S1= secondary cell wall layer 1; S2= secondary cell wall layer 2; XG= xyloglucan; RGI= rhamnogalacturonan type I; AG= arabinogalactans; HG=Homogalacturonan; point (.)= not detected; x = label; ^A detected in the inner face of S2 in differentiating and mature OW fibers and in the inner face of differentiating and mature G-layers; ^B detected in the S1/S2 layers of differentiating and mature OW fibers, in the S1/S2 of mature G-fibers and in differentiating G-layers; ^C detected in the inner face of S2 in differentiating OW fibers and in the inner face of differentiating G-layers. *RGI* contain an antibody that is not classified in <http://www.wallmabdb.net>.

FIGURES

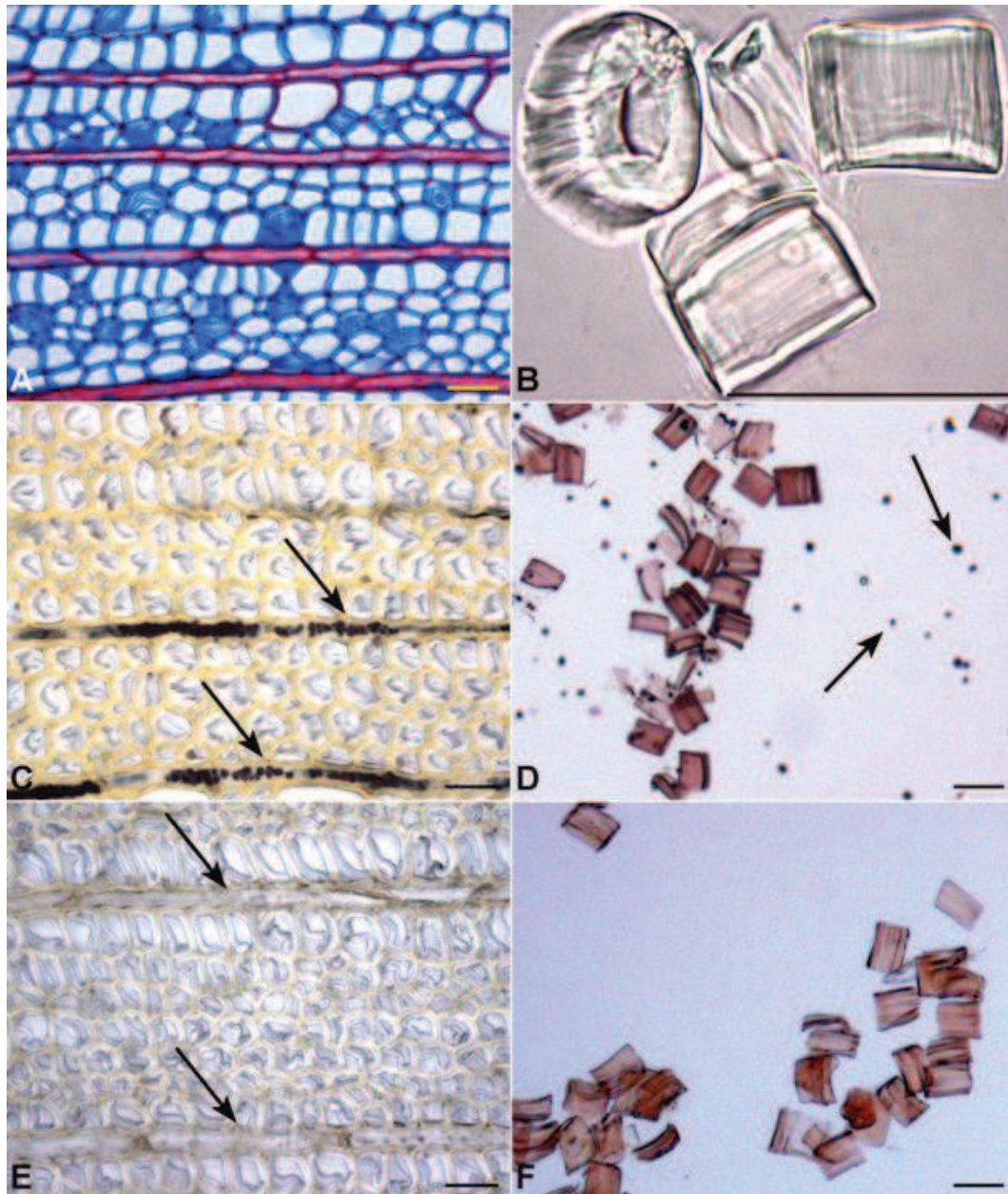


Figure 1. G-layer isolation. A, Safranin-Astra blue stained TW cross section before sonication showing TW fibers with G-layer (parenchyma rays stained red). B, Safranin-Astra blue stained TW cross section after sonication showing most TW fibers having lost their G-layer (parenchyma rays stained red). C, Pure and intact G-layers isolated by sonication of TW cross sections. D, Winter collected TW cross section stained with Lugol before sonication and showing parenchyma rays loaded with starch granules (arrows). E, Lugol-stained G-layers isolated by sonication of winter-collected TW: note the strong contamination by starch granules (arrows). F, Cross sections of TW collected during growing season stained with Lugol before sonication and showing parenchyma rays free of starch granules (arrows). G, Lugol-stained G-layers isolated by sonication of growing season TW: no starch granules detected. Bar=50 μm.

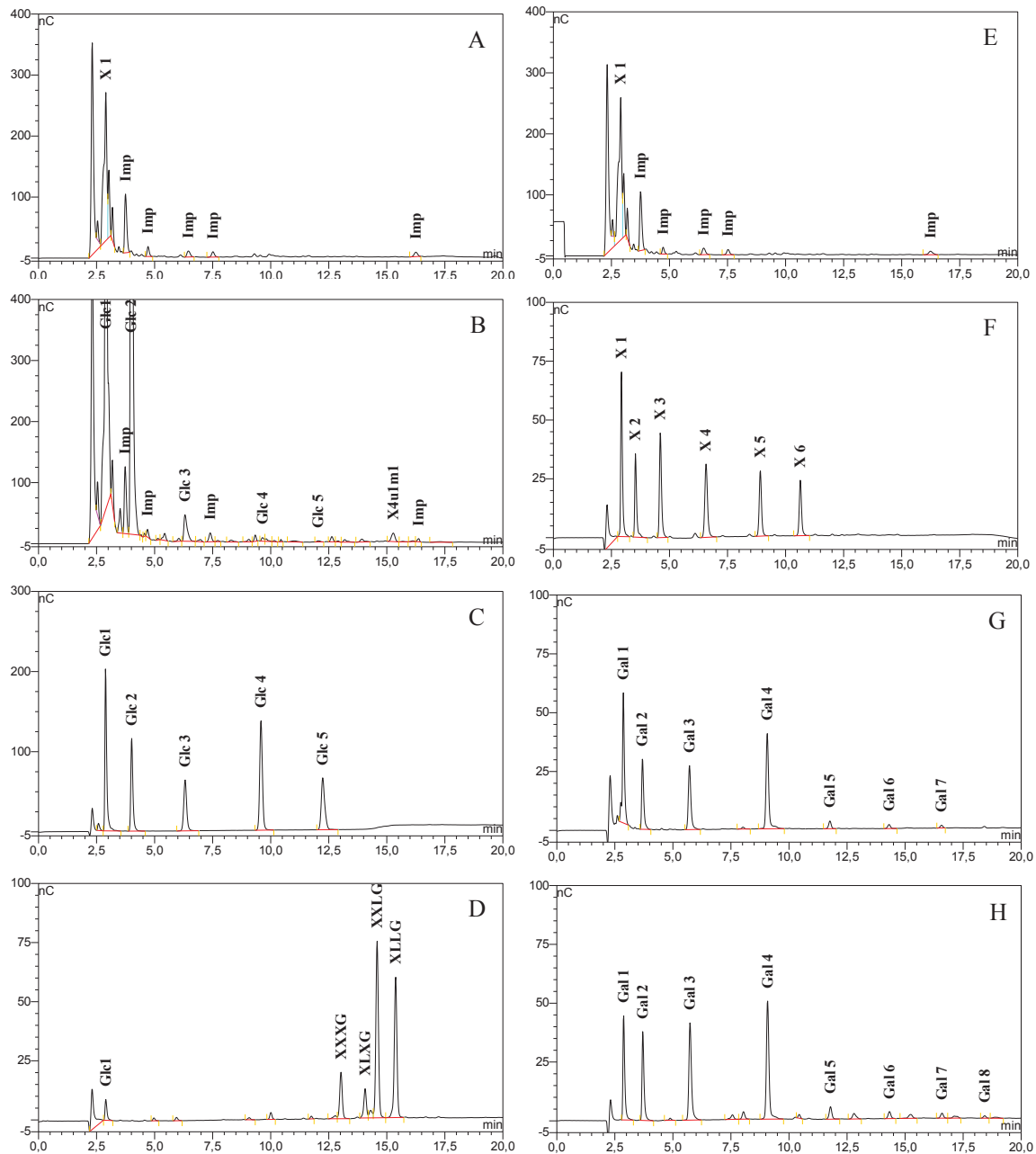


Figure 2. HPAEC-PAD chromatograms of A, untreated G-layer. B, endo-1,4-glucanase degradation products from the G-layer under mild conditions (30 min of hydrolysis). C, a commercial celloextrin. D, mixture of standard xyloglucans oligomers. E, endo-1,4- β -xylanase degradation products from the G-layer. F, mixture of standard xylo-oligomers and G, endo-1,4- β -galactanase degradation products under mild conditions (30 min of hydrolysis) from G-layer and from H, a commercial pectic galactans. Nomenclature is as follow: Hexose containing oligosaccharides attributed to glucomannans were noted H for Hexose. Pentose containing oligosaccharides recovered after xylanase degradation was noted X for Xylose. In all oligomer codes, extension with the letter u, m and a refers to substitution by an uronic acid, a methyl and acetyl group, respectively. The number following the letter codes denoted the number of building hexosyl or xylosyl units and the number of methyl or acetyl groups in the oligosaccharides (i.e. H3a1 corresponds to 3 hexosyl units and 1 acetyl group).

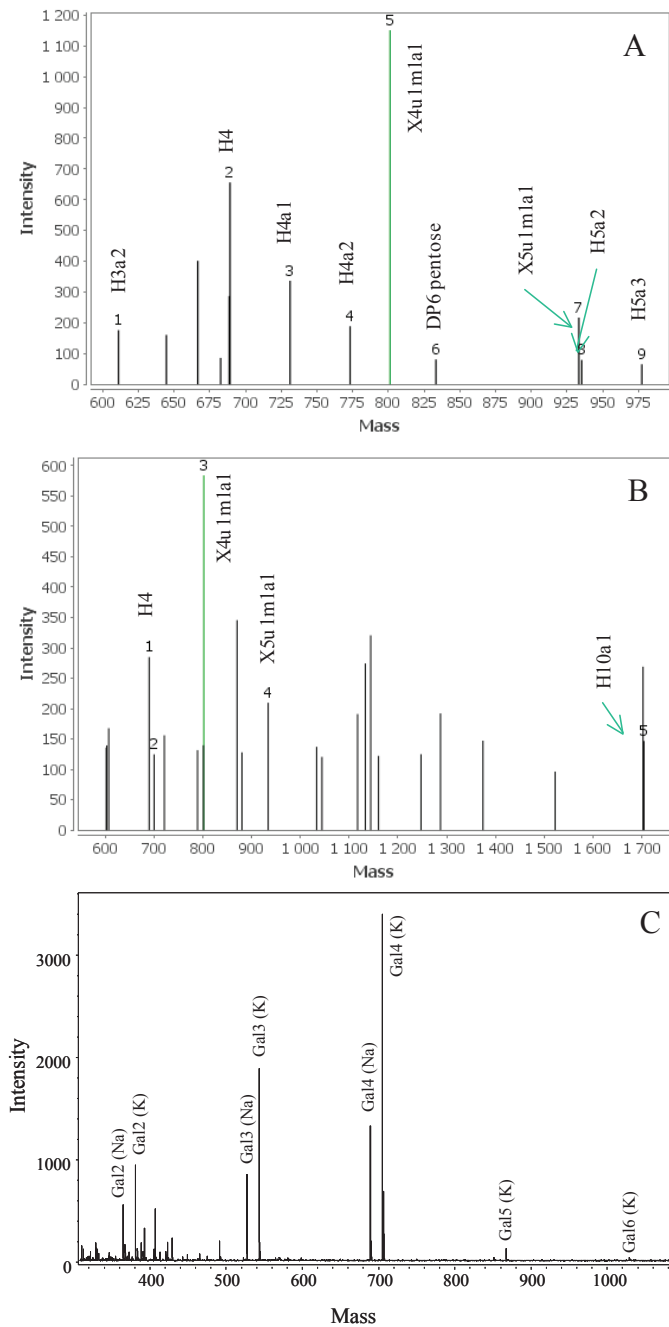


Figure 3. MALDI-TOF MS spectrum of the degradation products of isolated G-layers with A, endo-1,4- β -glucanase, B, endo-1,4- β -xylanase and C, endo-1,4- β -galactanase. Nomenclature is as follow: Hexose containing oligosaccharides attributed to glucomannans were noted H for Hexose. Pentose containing oligosaccharides recovered after xylanase degradation was noted X for Xylose. In all oligomer codes, extension with the letter u, m and a refers to substitution by an uronic acid, a methyl and acetyl group, respectively. The number following the letter codes denoted the number of building hexosyl or xylosyl units and the number of methyl or acetyl groups in the oligosaccharides (i.e. H3a1 corresponds to 3 hexosyl units and 1 acetyl group).

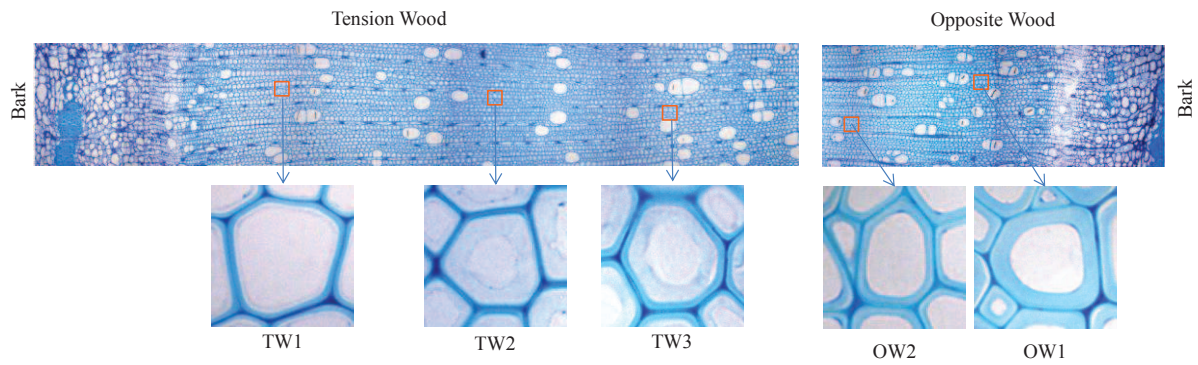


Figure 4. Cross sections profiles. A, Cross section profile corresponding to sample collected in the upper side of the bent stem, TW1 to TW3 show in details TW fibers through the gradient of differentiation. B, Cross section profile corresponding to sample collected in the lower side of the bent stem, OW1 to OW2 show in details OW fibers through the gradient of differentiation.

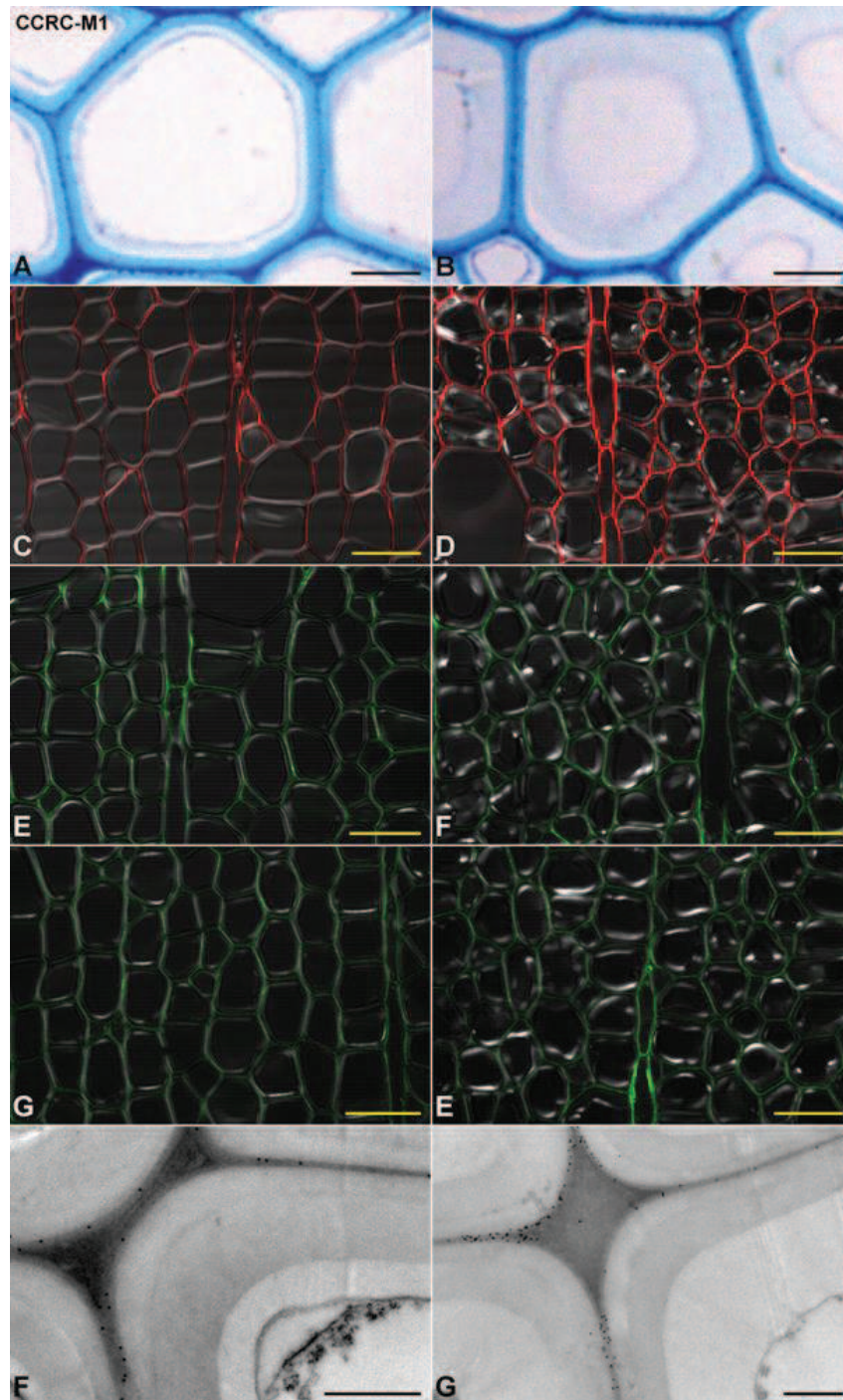


Figure 5. Detection of xyloglucans in PCW/ML of G-fibers by immunolabeling using the CCRC-M1 antibody. In the left column differentiating G-fibers are presented and mature G-fibers are presented on the right column. A-B, Immunogold labeling analyzed under optical microscope. Bar= 5 μ m. C-D, Immunofluorescence labeling using a secondary antibody labeled with Alexafluor-633 under confocal microscope observation. Bar= 20 μ m. E-F, Immunofluorescence labeling using a secondary antibody labeled with Alexafluor-488 under confocal microscope observation. Bar= 20 μ m. G-H, Immunofluorescence labeling using a secondary antibody labeled with Alexafluor-488 under confocal microscope observation after a pectinase pre-treatment and I-J, Immunogold labeling under TEM analyses. Bar = 1 μ m.

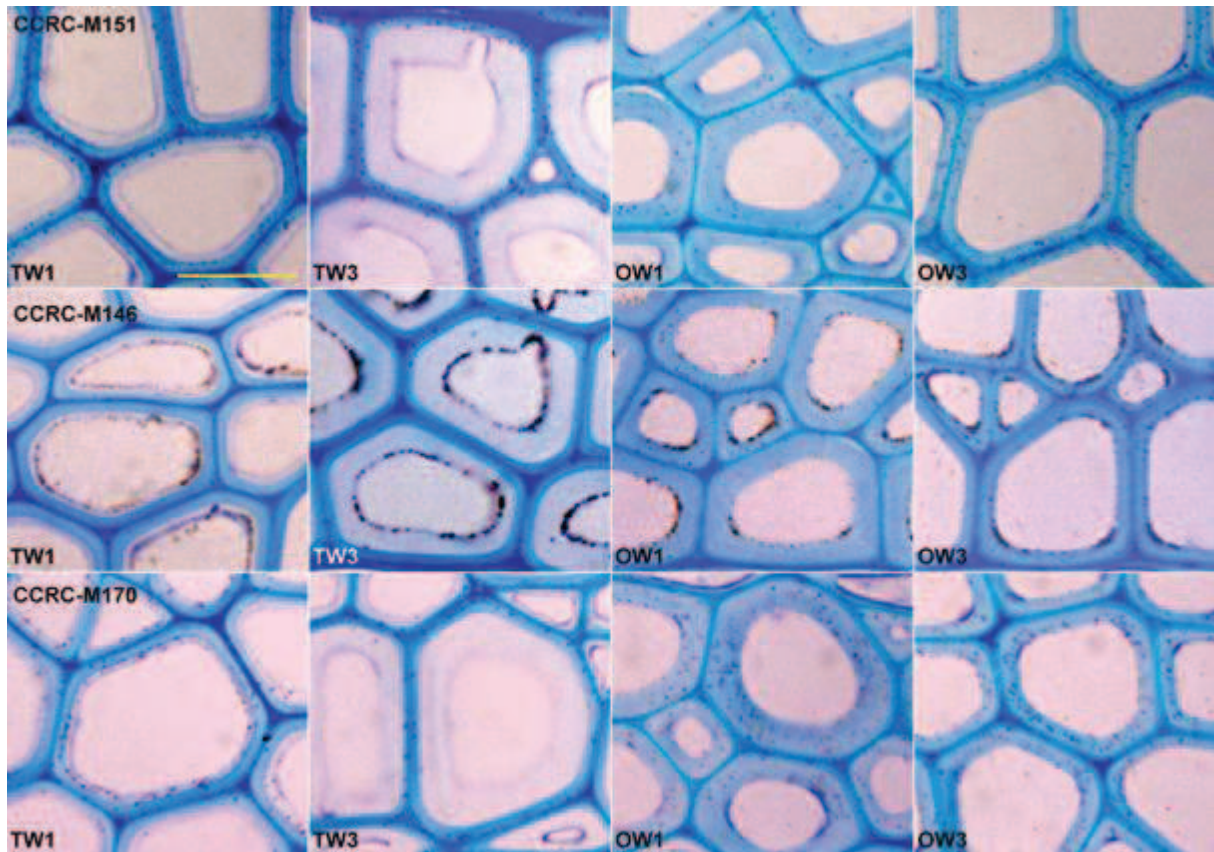


Figure 6. Different pattern of labeling in SCW by antibodies directed against xylans and mannans through the gradient of differentiation of TW and OW fibres. Line 1, Immunolabeling with CCRC-M151 which recognizes may recognize a methyl-glucuronoxylan and is always detected in S1/S2 layers of TW and OW fibers. Line 2, Immunolabeling with CCRC-M146 antibody which recognizes may recognize a substituted xylan and that was detected in the inner face of S2 layer of differentiating and mature OW fibers and in the inner face of G-layer of differentiating and mature TW fibers. Line 3, Immunolabeling with CCRC-M170 antibody raised against which may recognize acetylated mannans and this antibody was detected in differentiating the G-layers, in S1/S2 layers of mature TW fibers, in S1/S2 of differentiating and mature OW fibers. Bar= 10 μ m.

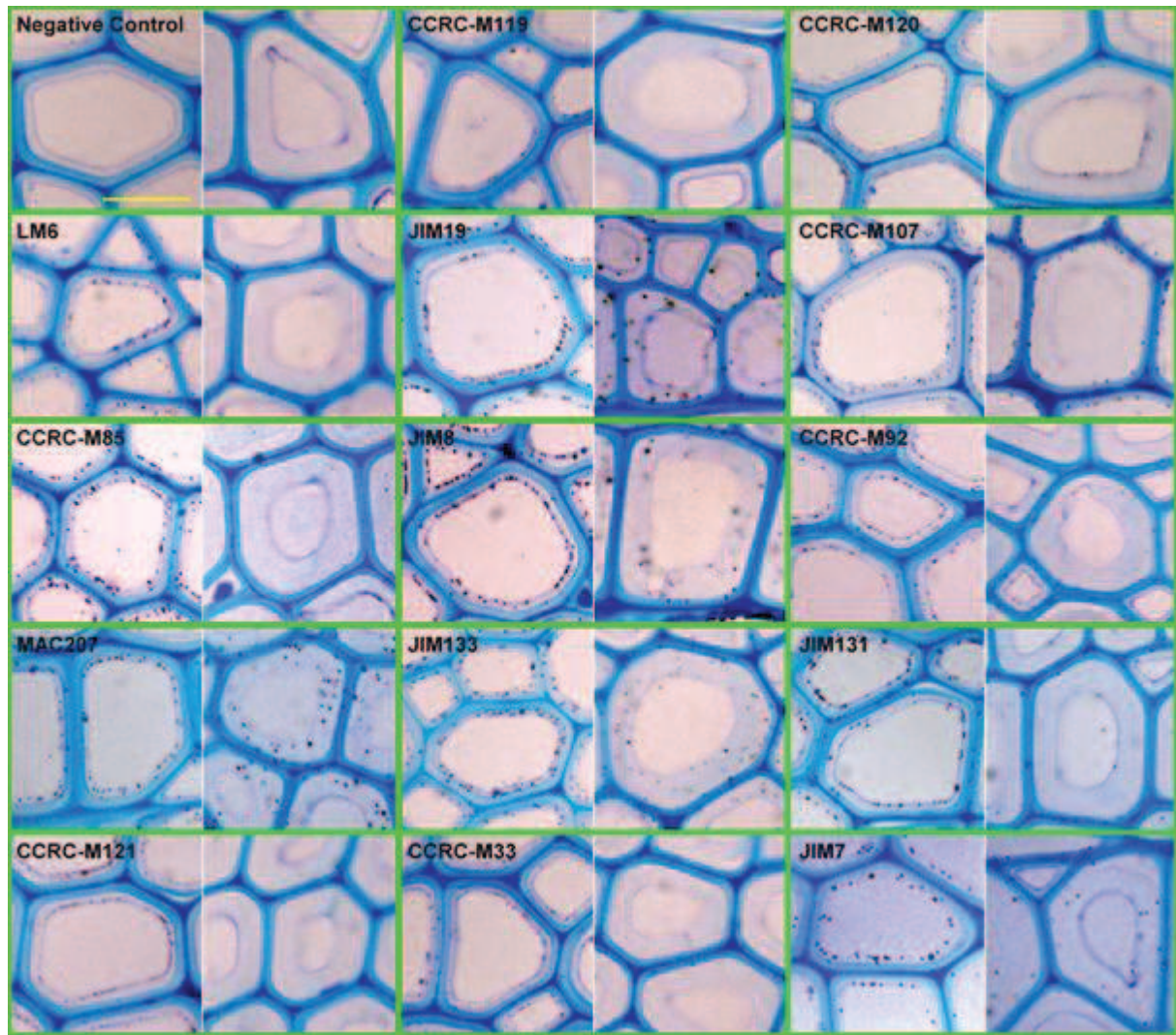


Figure 7. Immunolabelling of G-layers with different antibodies directed against different polysaccharides identified by hierarchical clustering of ELISA data (Pattathil et al, 2010). Labelling are presented for differentiating G-layers and mature G-layers. This two phases of G-layer differentiation are present in tandem: differentiating G-layers are presented on the left and mature G-layers on the right. The first tandem correspond to a negative control, i. e., no primary antibody used. The antibodies CCRC-M119 and CCRC-M120 belongs, respectively to xylan-2 and xylan-3 group; LM6 recognizes a α -1,5-arabinan and with JIM19 and CCRC-M107 belongs to arabinogalactan- 2 group; CCRC-M85 and JIM8 belongs to arabinogalactan-3 group; CCRC-M92, MAC207, JIM133 belongs to arabinogalactan-4 group; JIM131, CCRC-M121, CCRC-M33 belongs to RGI/AG groups and finally JIM7 may recognize a methyl-esterified homogalacturonan pectin. Description of labeling is presented in Table III. Bar = 10 μ m.

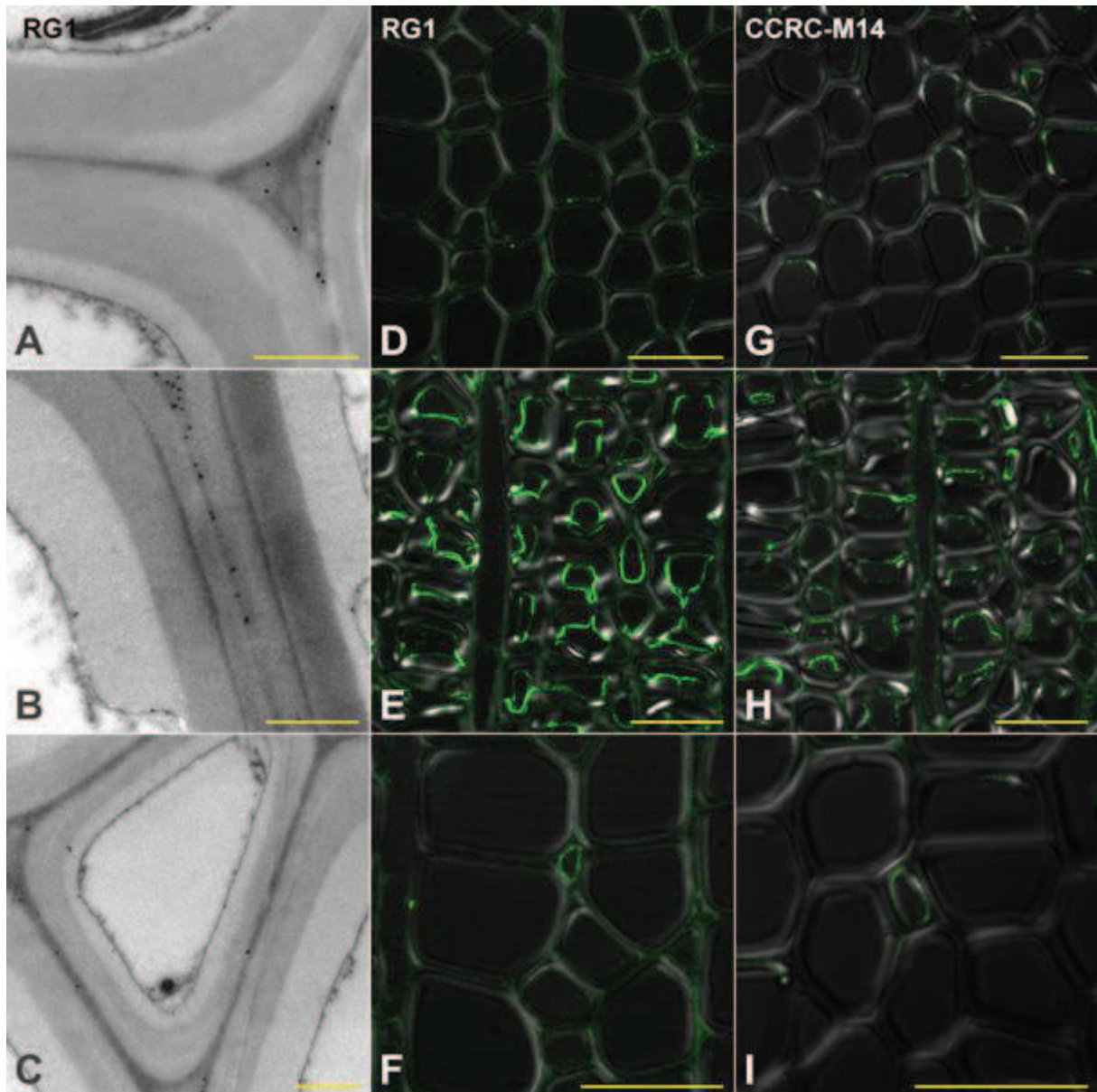


Figure 8. Immunofluorescence labeling with the antibody LM5 which recognize β -1,4-linked galactans in RG-I side chains. Line 1, show the difference in the pattern of label of differentiating to mature G-fibers. TW1, Differentiating G-layers are labelled in the whole thickness; TW2, G-layers more developed is labelled most strongly in the outer and inner face and; TW3, Mature G-layers are only labeled in the outer face. Line 2, Immunolabeling with LM5 after a pre-treatment with pectinase showing a reduction of fluorescence level. Bar=20 μ m.

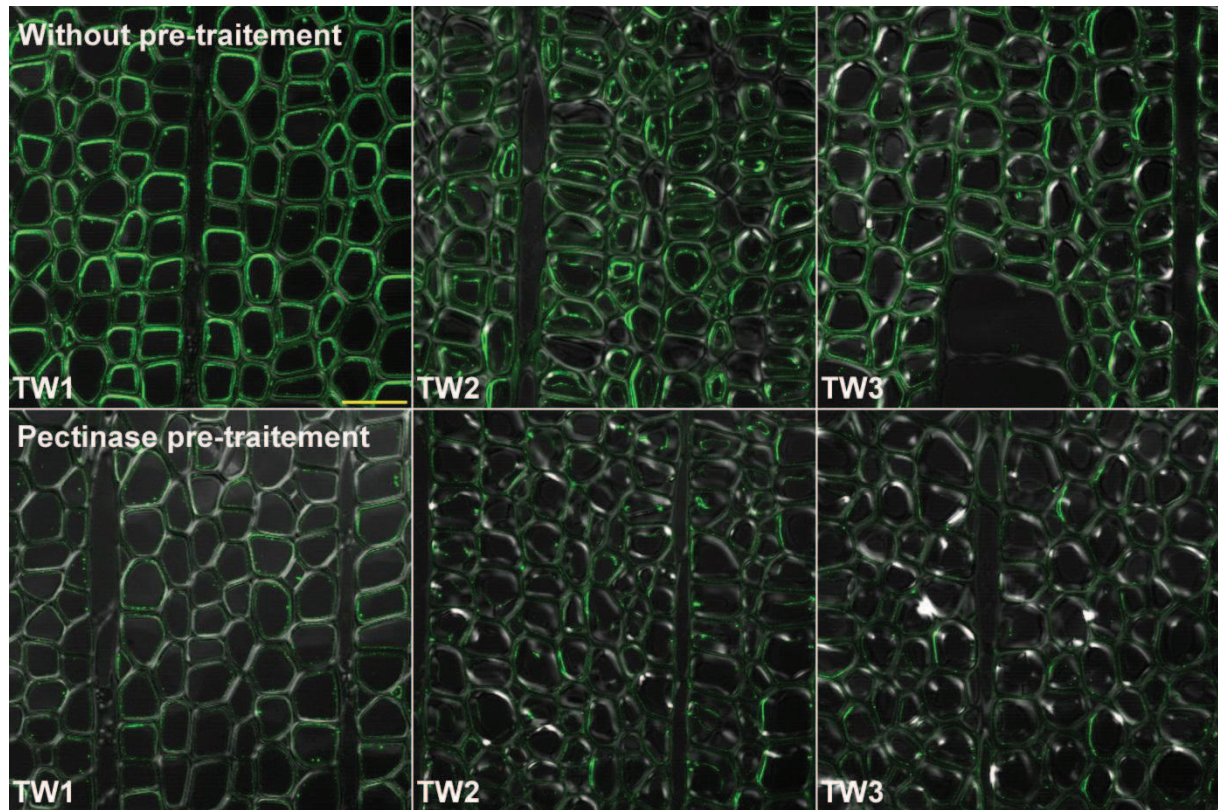


Figure 9. Labelling of the inner face of differentiating G-layers and PCW/ML with the CCRC-M7 antibody which may recognize an AGP in the inner face of differentiating G-layers and PCW/ML. A-B, Immunogold labeling observed under optical microscope. Bar= 10µm. C-D, Alexa 488 signal observed under confocal microscope. Bar=20µm. E-F, Immunogold labeling analyzed by TEM. Bar=1µm.

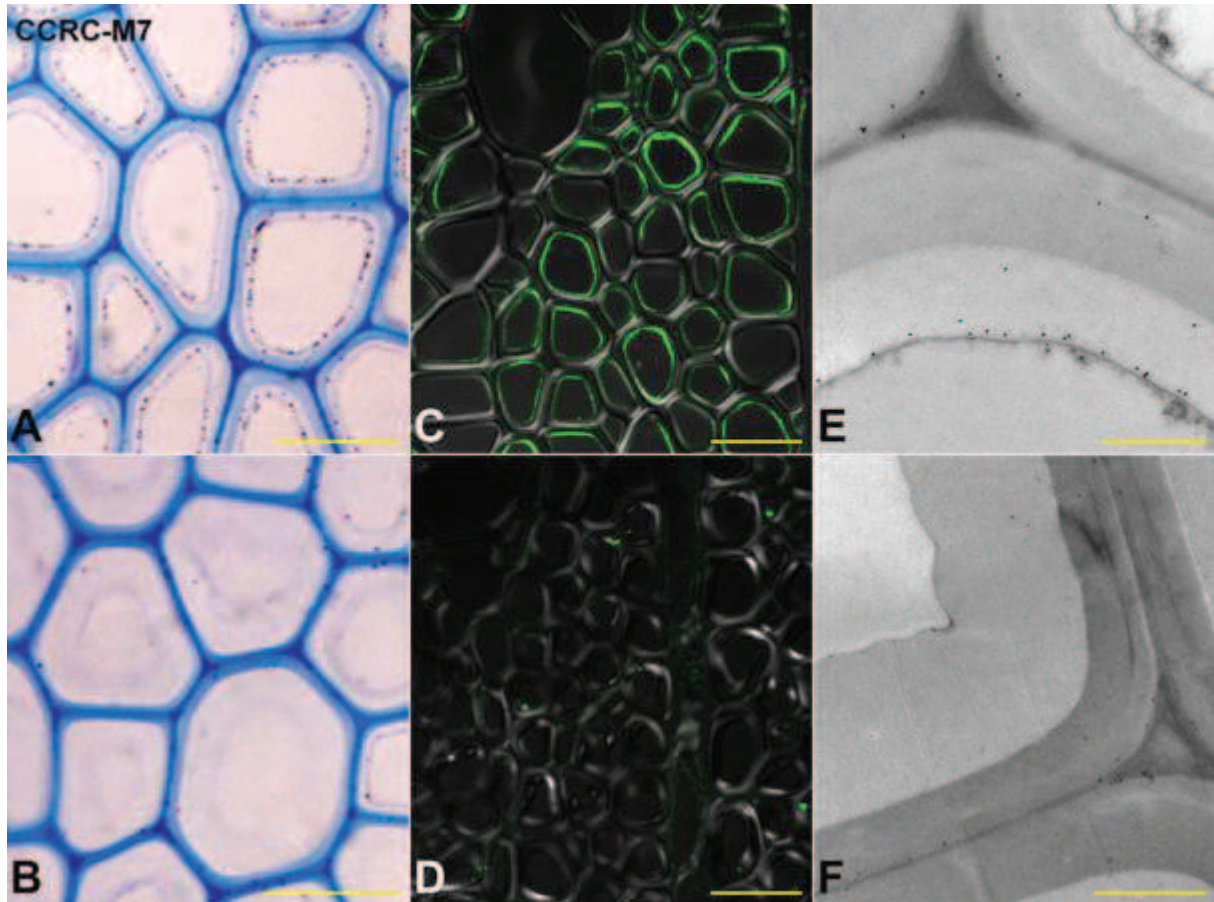


Figure 10. Detection of RG-I backbone in mature TW fibers using the RG1 and CCRC-M14 antibodies. RG1 immunolabeling: A-C, observation by TEM of immunogold labeling Bar=1 μ m. A, cell wall corner of differentiating G-fibers; B, PCW/ML and inner face of mature G-layers; C, of the PCW/ML of differentiating G-fibers and of the G-layers in the tip of the G-fibers. D-F, Correspond to the same pattern of labeling view by immunofluorescence under confocal laser scanning microscope. Bar=20 μ m. G-I, CCRC-M14 immunofluorescence labeling showing the same pattern of labeling that RG1. Bar=20 μ m.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1: MALDI-TOF MS ions observed from the glucanase, xylanase and galactanase hydrolysates products

Measured m/z ^a	Deduced composition ^b	Enzyme used	Deduced structure ^c
527.1	H3	Galactanase	Gal3 (Na adduct)
543.1	H3	Galactanase	Gal3 (K adduct)
689.2	H4	Galactanase	Gal4 (Na adduct)
689.2	H4	Glucanase	GMos
705.2	H4	Galactanase	Gal4 (K adduct)
731.2	H4a1	Glucanase	GMos
773.2	H4a2	Glucanase	GMos
801.2	P4u1m1a1	Xylanase/Glucanase	X4u1m1a1
815.2	H4a3	Glucanase	GMos
833.2	P2H3a1	Glucanase	XXGal
851.3	H5	Galactanase	Gal5 (Na adduct)
867.3	H5	Galactanase	Gal5 (K adduct)
893.4	H5a1	Glucanase	GMos
933.3	P5u1m1a1	Xylanase/Glucanase	X5u1m1a1
935.3	H5a2	Glucanase	GMos
977.3	H5a3	Glucanase	GMos
1029.3	H6	Galactanase	Gal6 (K adduct)

Notes: ^a m/z of the [M+Na]⁺ or [M+K]⁺ ion ; ^b H=Hexose, P=Pentose, X=Xylose, u = glucuronic acid, m= methyl, a=acetyl; ^c GMos: Glucomanno- oligosaccharides.

Table S2: Primary antibodies tested in this study

178 monoclonal antibodies and one Carbohydrate Binding Module (CBM) were grouped mostly according to WallMabDB (<http://www.wallmabdb.net>) that provides detailed descriptions of the majority of each antibody, including immunogen, antibody isotype, epitope structure (to the extent known), supplier information, and related literature citations. Antibodies were re-grouped within glycans groups according with its pattern of label. Antibodies name followed by asterisk (*) were tested in different poplar plant material.

Glycans	Probes	Labeling
Non-fucosylated XG-1	CCRC-M95, CCRC-M101	PCW/ML
Non-fucosylated XG-2	CCRC-M87, CCRC-M88, CCRC-M89, CCRC-M93, CCRC-M104	PCW/ML
Non-fucosylated XG-3	CCRC-M100, CCRC-M103, LM15	PCW/ML
Non-fucosylated XG-4	CCRC-M52, CCRC-M55, CCRC-M58, CCRC-M86	not detected
	CCRC-M99	PCW/ML
Non-fucosylated XG-5	CCRC-M48, CCRC-M51, CCRC-M54	PCW/ML/CC
	CCRC-M49, CCRC-M50, CCRC-M53, CCRC-M96	not detected
Non-fucosylated XG-6	CCRC-M57, CCRC-M90	not detected
Fucosylated XG	CCRC-M1*	PCW/ML
	CCRC-M39, CCRC-M84, CCRC-M102, CCRC-M106	PCW/ML/CC
	CCRC-M108, CCRC-M109, CCRC-M111	not detected
	CCRC-M105, CCRC-M110, CCRC-M115	not detected
Xylan-1	CCRC-M119*	G
Xylan-2	CCRC-M113, CCRC-M114, CCRC-M116, CCRC-M117, CCRC-M118	not detected
	CCRC-M120	PCW/ML/G
Xylan-3	CCRC-M150	not detected
	CCRC-M154	S1/S2
Xylan-4	CCRC-M143, CCRC-M144, CCRC-M145, CCRC-M146* , CCRC-M155	S1/S2/G ^A
Xylan-5	AX1* , CCRC-M138, CCRC-M139, CCRC-M147, CCRC-M148, CCRC-M151, CCRC-M153, CCRC-M156, CCRC-M157, CCRC-M158, CCRC-M159	S1/S2
	CCRC-M140	not detected
Xylan-6	CCRC-M137, CCRC-M149, CCRC-M152, CCRC-M160	S1/S2
Xylan-7	CCRC-M70, CCRC-M74, CCRC-M75	not detected
Galactomannan-1		not detected

Galactomannan-2	CCRC-M166, CCRC-M167, CCRC-M172, CCRC-M173, CCRC-M174, CCRC-M175	not detected
	CCRC-M168	PCW/ML/S1/S2
Acetylated mannan	CCRC-M169, CCRC-M170	S1/S2/ G ^B
Arabinogalactan-1	JIM11, JIM20, JIM93, JIM94, MAC204	not detected
Arabinogalactan-2	LM5* , JIM14*	PCW/ML/ G
	LM6, CCRC-M107* , CCRC-M133, JIM19*	G
Arabinogalactan-2	JIM12	not detected
Arabinogalactan-3	CCRC-M26, CCRC-M31, JIM4* , JIM17, MAC266, LM1	not detected
	CCRC-M81, JIM15	S1/S2/ G ^C
Arabinogalactan-4	CCRC-M85* , JIM8*	G
	CCRC-M78	S1/S2/ G ^C
	CCRC-M91, CCRC-M92* , JIM133* , MAC207*	G
	JIM13* , LM2	not detected
RGI/AG	CCRC-M7* , CCRC-M60, CCRC-M79, CCRC-M80	PCW/ML/CC/ G
	CCRC-M8, CCRC-M24, CCRC-M32, CCRC-M44	PCW/ML/ G
	CCRC-M9, CCRC-M12* , CCRC-M13, CCRC-M21, CCRC-M22, CCRC-M33, CCRC-M77* , CCRC-M122, CCRC-M123, CCRC-M125, CCRC-M126, CCRC-M134, JIM1, JIM16, JIM131	G
	CCRC-M15, CCRC-M25, CCRC-M112, CCRC-M128, JIM132	not detected
	CCRC-M41* , CCRC-M42	PCW/ML
	CCRC-M121	S1/S2/ G ^C
	RG1*	G
RG-I backbone	CCRC-M14*	G
	CCRC-M35, CCRC-M36, CCRC-M69, CCRC-M72, CCRC-M129	not detected
RGI-a	CCRC-M2, CCRC-M5	not detected
RGI-b	CCRC-M30, CCRC-M61, JIM101	not detected
	CCRC-M135	PCW/ML/CC
RGI-c	JIM137	PCW/ML/CC
	CCRC-M16, CCRC-M17, CCRC-M19, CCRC-M23	not detected
	CCRC-M18, CCRC-M56	PCW/ML

Linsed mucilage RG-I	JIM3, CCRC-141, CCRC-M142, CCRC-M161, CCRC-M164	not detected
Physcomitrella pectin	CCRC-M94, CCRC-M97, MAC265	not detected
	CCRC-M98	PCW/ML
HG	2F4	not detected
HG backbone-1	PAM1	not detected
	JIM5, CCRC-M38, CCRC-M130, CCRC-M131, CCRC-M132, LM19	CC
HG backbone-2	LM7* , CCRCM136	not detected
	JIM7*	PCW/ML/G
	LM20	PCW/ML

Notes: ML= middle lamella; PCW= primary cell wall; SCW= secondary cell wall; S1= secondary cell wall layer 1; S2= secondary cell wall layer 2; XG= xyloglucan; RGI= rhamnogalacturonan type I; AG= arabinogalactans; HG=Homogalacturonan; ^A detected in the inner face of S2 in differentiating and mature OW fibers and in the inner face of differentiating and mature G-layers; ^B detected in the S1/S2 layers of differentiating and mature OW fibers, in the S1/S2 of mature G-fibers and in differentiating G-layers; ^C detected in the inner face of S2 in differentiating OW fibers and in the inner face of differentiating G-layers.

Table S3: Antibodies supposed to recognize arabinogalactans proteins (AGPs)

The 9 antibodies that potentially recognize AGPs distributed in different groups followed by the reference in where its ability to bind AGP is presented.

Glycans	Probes	Labeling	References
Arabinogalactan-2	JIM14	PCW/ML/G	van Hengel <i>et al.</i> , 2002; Showalter, 2001; Knox <i>et al.</i> , 1991
	JIM4	not detected	Knox, 1997; Showalter, 2001; Yates <i>et al.</i> , 1996; Casero <i>et al.</i> , 1998
	JIM8	S2/G ^A	Knox, 1997; Showalter, 2001; Dolan <i>et al.</i> , 1995; Costa <i>et al.</i> , 2013
	JIM15	S2/G ^A	Knox, 1997; Showalter, 2001; Knox <i>et al.</i> , 1991
Arabinogalactan-3	JIM13	not detected	Knox, 1997; van Hengel <i>et al.</i> , 2002; Showalter, 2001; Gaspar <i>et al.</i> , 2001; Costa <i>et al.</i> , 2013; Yates <i>et al.</i> , 1996; Casero <i>et al.</i> , 1998; Dolan <i>et al.</i> , 1995; Knox <i>et al.</i> , 1991
	MAC207	G	Knox, 1997; Showalter, 2001; Gaspar <i>et al.</i> , 2001; Costa <i>et al.</i> , 2013; Yates <i>et al.</i> , 1996; Pennel <i>et al.</i> , 1989
	LM2	not detected	Knox, 1997; Showalter, 2001; Smallwood <i>et al.</i> , 1996
RGI/AG	CCRC-M7	PCW/ML/CC/G	Gens <i>et al.</i> , 2000; Steffan <i>et al.</i> , 1995
	JIM16	G	Showalter, 2001; Knox <i>et al.</i> , 1991

Notes: ML= middle lamella; PCW= primary cell wall; S1= secondary cell wall layer 1; S2= secondary cell wall layer 2; RGI= rhamnogalacturonan type I; AG= arabinogalactans; ^A detected in the inner face of S2 in differentiating OW fibers and in the inner face of differentiating G-layers

3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Réorganisation de la formation des parois des fibres en différenciation en réponse à un changement d'inclinaison.

La totalité des résultats obtenus lors de notre étude n'a pu être intégrée dans le premier article. En plus des résultats présentés dans le chapitre précédent, nous avons également acquis des données exploratoires intéressantes concernant les zones de transition entre bois opposé et bois de tension. Ces zones d'intérêt jusqu'alors peu étudiées, permettent d'appréhender la façon dont une fibre (G ou S) en différenciation va réorienter la formation de ses parois après perception d'un déséquilibre induit par inclinaison.

Les jeunes plants de peupliers, au cours de leur première année de croissance, sont particulièrement sensibles aux déséquilibres, même de faible amplitude, créés par de simples mouvements d'air ou par le développement de nouvelles feuilles. Ils présentent de ce fait, une aptitude importante à produire des fibres G et des arcs de bois de tension. Par conséquent, il est difficile d'obtenir sur des plants non inclinés des échantillons exempts de bois de tension ce qui peut engendrer un biais dans les analyses moléculaires ou biochimiques réalisées après broyage. Le seul moyen d'obtenir avant inclinaison des zones de bois ne contenant aucune fibre G est d'incliner préalablement les plants dans le sens opposé.

Pour cette raison, les plants utilisés comme matériel dans l'article 1 (chapitre 1) ont subi deux inclinaisons successives. Ils ont été artificiellement inclinés à 30° par rapport à la verticale dès le début de leur croissance. Après 2 mois de croissance dans ces conditions, au temps T_0 de l'expérience, les plants ont subi une rotation d'un demi-tour (180°) de sorte que la partie de la tige précédemment en position inférieure s'est retrouvée en position supérieure (Fig. 1A). Ainsi sur les coupes obtenues à partir de l'échantillon prélevé à la face supérieure de la tige, on trouve une zone de BO produit en début de croissance suivi d'une zone de BT en différenciation au moment du prélèvement, tandis que l'échantillon prélevé à la face inférieure comporte une zone de BT produit en début de croissance associée à une zone de BO en différenciation au moment du prélèvement (Fig. 1B). Dans l'article 1, seuls ont été décrits et discutés les résultats obtenus sur les zones de BT et BO formées après la rotation. Toutefois, nous avons réalisés des observations intéressantes dans les zones de transitions

BT→BO et BO→BT, où se situent les fibres de bois qui étaient en cours de différenciation au moment de la rotation des pots au T_0 de l'expérience.

Tout d'abord, nous avons définis de chaque côté de la tige, 5 zones d'observation le long du gradient de différenciation notées respectivement A1 à A5 (Fig. 2A) côté tendu et B1 à B5 côté opposé (Fig. 2B).

Sur la face supérieure de la tige, il est possible d'observer le gradient de différenciation des fibres produites en réponse aux 2 inclinaisons successives. Dans la zone A1 proche du cambium, les fibres possèdent encore leur membrane plasmique, la paroi secondaire est en train de se mettre en place et la couche G n'est pas encore observable. Dans la zone A2, les cellules ont terminé leur paroi S1/S2 et ont commencé à déposer une couche G qui est encore peu épaisse. Au stade A3, le dépôt de la couche G est terminée et les cellules sont totalement différenciées. La zone A4 correspond à la zone de transition entre BO et BT qui formait des fibres du BO avant le changement d'orientation des tiges. Enfin, les cellules de la zone A5 correspondent à des fibres de bois opposé produites avant le retournement des arbres.

Les parois S1/S2 des fibres de la zone de transition (A4) présentent une épaisseur plus importante que celles des S1/S2 des fibres de la zone A3 mais quasi identique à celles des S1/S2 des fibres de la zone A5. En revanche les couches G observées dans la zone A4 sont environ deux fois moins épaisses que celles observées dans la région A3 et l'épaisseur totale des parois primaires, secondaires et couche G confondues apparaît comparable dans les fibres des zones A3 et A4.

Ces différentes observations, nous conduisent à supposer que les fibres de BO en cours de différenciation lors du retournement des plants (A4), bien qu'elles aient formé la quasi-totalité de leur S1/S2, ont perçu la modification de la position de la plante due au demi-tour. En réponse à cette modification, ces fibres se sont mises à former une couche G qui est venu se rajouter à leurs parois S2 afin de répondre rapidement au besoin de renfort mécanique. Cela suggère que la fibre est capable de réorienter très rapidement la machinerie biochimique impliquée dans la formation de leur paroi.

A la face inférieure des tiges, sous la zone cambiale, la différenciation des fibres de BO se traduit rapidement par la disparition de la membrane plasmique et du contenu cellulaire (B1) puis par l'épaississement progressif de la paroi secondaire (B2). Dans la zone B2, les parois secondaires des fibres sont complètement différenciées et a priori comparables à celles observées à la face supérieure dans la zone A5 correspondant au bois opposé formé avant rotation des plants.

Dans la zone de transition B3, les fibres en cours de différenciation au moment de la rotation ont finalisé leurs couches S1/S2, mais elles présentent des parois secondaires moins épaisses que dans la zone B2, mais équivalentes à celles observées pour les fibres G matures de la zone B5. Comment expliquer la différence d'épaisseur de parois secondaires des fibres observée entre B2 et B3 ? Les fibres de la zone B3 pourraient correspondre à des fibres G qui étaient en cours de différenciation au moment du retournement des plants. Dans cette hypothèse, ces fibres ont déposées la totalité de leur paroi secondaire (qui reste peu épaisse dans le cas des fibres G) mais en réponse au changement de déséquilibre n'ont pas formé de couche G. Par conséquent elles pourraient correspondre à des fibres intermédiaires entre fibre G et fibre « normale ».

Pour ce qui concerne les fibres de la zone B4, elles rappellent anatomiquement celles observées sur la face supérieure dans la zone A2, qui correspondent à des fibres G en différenciation. Pour mieux caractériser la composition de ces fibres dans les zones de transition, nous avons observé les résultats obtenus pour les 51 anticorps détectés dans la couche G (Tableau III, chapitre 1). Nous vérifions que, les polysaccharides détectés dans leurs parois par immunolocalisation sont pour certains caractéristiques des fibres G en différenciation (telle que les fibres de la zone A2) : c'est le cas notamment de l'épitope d'arabinogalactanes reconnu par l'anticorps CCRC-M7 et également des épitopes de mannanes reconnus par les anticorps CCRC-M169 et CCRC-M170, fig. 3). Mais d'autres épitopes apparaissent caractéristiques des couches G matures (telles que dans les fibres G de la zone A3) : c'est le cas des épitopes reconnaissant le backbone des RG-I reconnus par les anticorps RG1 et CCRC-M14 (Fig. 3). Ainsi, les fibres de la zone B4, vraisemblablement formées lors du retournement de l'arbre, ont sans doute stoppé la différenciation de leur couche G qui n'était alors plus nécessaire. Le signal d'inversion de l'inclinaison se traduit donc par un arrêt de la différenciation des couche G suite à la rotation des plants. Il est à noter que la zone de transition BT→BO semble plus étendue que la zone de transition BO→BT. Ainsi les fibres de bois auraient la capacité de rapidement modifier la construction de leur paroi secondaire en réponse aux changements liés à l'inversion de l'inclinaison des plants, du stress mécanique imposé à la tige et des besoins en renfort mécanique. Ce phénomène permettrait d'ajuster au mieux les contraintes mécaniques dans la tige ou encore, ces modifications correspondraient à une réponse face au changement de position dans l'arbre, par rapport à la gravité.

D'autre part, concernant les résultats d'immunolocalisation (Tableaux 1 et 2), pour 26 anticorps utilisés les profils de marquages des couches G sont identiques quelle que soit la zone de BT considérée, i. e., formée avant ou après la rotation de l'arbre (e.g. la structures reconnus par les anticorps CCRC-M7, CCRC-M146, CCRC-M170, JIM8, LM5 et MAC207, fig. 3). Si l'on considère des couches G d'épaisseur équivalente, i. e., les zones A2, A4 et B4, et les zone A3 et B5, ces 26 anticorps, dirigés contre des xylanes, des mannanes acétylés, arabinanes, AGP et des RGI, produisent des marquages similaires et ne permettent pas de mettre en évidence des caractéristiques spécifiques aux fibres de la zone de transition.

Néanmoins, pour les 25 autres anticorps, les marquages obtenus sur les couches G des zones de transition (A4 et B4) sont différents des marquages obtenus sur des couches G d'épaisseur équivalente en cours de différenciation situées sous le cambium (A2) et matures (A3). Ces résultats révèlent des compositions en polysaccharides différentes.

Ainsi par exemple, les anticorps CCRC-M33 et CCRC-M77 dirigés contre des épitopes d'arabinogalactanes marquent les couches G du BT en A2 mais ne marque pas les couches G d'épaisseur équivalente de la zone de transition BT→BO (B4, Fig. 3). De même plusieurs anticorps comme par exemple JIM7 dirigés contre des homogalacturonanes, CCRC-M12 dirigé contre des arabinogalactanes marquent également les couches G du BT mature en A3 et B5 mais ne marque pas les couches G de la zone de transition BO→BT (A4). Par conséquent, les couches G des zones de transition semblent inachevées, leur composition est incomplète puisqu'on ne détecte pas tous les polysaccharides présents dans les couches G de la zone de BT. D'autre part, pour ajouter un niveau de complexité, la composition des couches G n'est pas totalement identique dans la zone de transition entre BO→BT (A4) et la zone de transition entre BT→BO (B4).

Nous nous sommes également intéressés à la composition des parois S1/S2 des zones de transition. Dans la zone de transition BO→BT (A4) le marquage des S1/S2 est comparable à celui obtenu pour les fibres de la zone A5 et B2 qui correspondent à du bois opposé. Ce qui tendrait à prouver que les fibres de cette zone de transition sont des fibres de BO qui dans un deuxième temps après retournement des plants ont formé une couche G afin de répondre à un besoin soudain de renfort mécanique. Cela a pu être vérifié surtout grâce à la présence de mannanes acétylés identifiés à l'aide des anticorps CCRC-M169 et CCRC-M170 (Fig. 3). Ces résultats indiqueraient les mannanes acétylés comme des bons candidats pour déterminer la fin de la différenciation de la S1/S2, soit dans les fibres du BT, soit dans les fibres du BO.

Pour la zone de transition BT→BO, ces mêmes anticorps donnent un marquage dans la S1/S2 des fibres de bois opposé B2 et B3, tandis que le marquage est absent des S1/S2 des fibres G B4 et B5. Les fibres de la région B4 étaient en différenciation lors du retournement du plant. En réponse au changement d'inclinaison ces cellules ont stoppé la formation de la couche G mais elles ont été incapables de modifier leur S1/S2 par déposition de mannanes puisque celles-ci étaient terminées. En revanche, nous supposons, comme nous l'avons précédemment énoncé, que les fibres de la zone B3, également en différenciation lors du retournement du plant, n'avaient à cet instant pas achevées la formation de leur S1/S2. En réponse à la modification d'inclinaison, ces cellules n'ont pas formé de couche G qui n'était plus indispensable mécaniquement, mais ont, par contre, terminée la déposition de leur S1/S2 comme une fibre « classique » en déposant des mannanes. Concernant la zone de transition entre BO et BT (A4), les mannanes ont été détectées dans la S1/S2, comme dans A5, B2 et B3, tandis que dans A2 et A3 elles n'ont pas été détectées dans la S1/S2. En conclusion, les fibres G de la zone de transition BO→BT (A4) peuvent être comparées à des fibres de BO qui ont formé une couche G d'épaisseur incomplète. La couche G dans cette situation est moins épaisse puisqu'elle ne vient pas en remplacement d'une partie de la S1/S2 mais vient se rajouter à la S1/S2 totalement déposée.

Les fibres G de la zone BT→BO (B4) peuvent être présentées comme des fibres de BT qui ont stoppé la formation de leur couche G. Selon l'état de différenciation de la cellule lors du retournement, la couche G est soit absente soit inachevée.

Il serait intéressant de compléter ces observations par une étude plus poussée de ces zones de transition, car elles pourraient constituer de bons modèles pour étudier la cinétique de mise en place des différents composants des parois et leur implication dans la création de la tension. et de la modulation des contraintes mécaniques dans la tige.

TABLEAUX

Table 1. Détection de différentes structures de polysaccharides dans les parois des fibres le long du gradient de différenciation présenté dans la fig. 2A (A1 à A5).

Groupe	Anticorps	A2		A3		A4		A5
		S1/S2	Couche G	S1/S2	Couche G	S1/S2	Couche G	S1/S2
Xylane-2	CCRC-M119	.	x	.	.	.	.	.
Xylane-3	CCRC-M120	.	x	.	x	.	.	.
Xylane-5	CCRC-M143, CCRC-M144, CCRC-M145, CCRC-M146, CCRC-M155	.	x	.	x	.	x	x^A
Mannane acétylée	CCRC-M169, CCRC-M170	.	x	x	.	x	.	x^B
Arabinogalactane-2	LM6	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M133	.	.	.	x	.	.	.
	JIM19	.	x	.	x	.	.	.
	LM5	.	x	.	x	.	x	.
	CCRC-M107	.	x	.	x	.	x	.
	JIM14	.	x	.	x	.	?	.
Arabinogalactane-3	CCRC-M85	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M81	.	x	.	.	.	.	.
	JIM8	.	x	.	x	.	x	.
	JIM15	.	x	.	.	.	.	.
Arabinogalactane-4	CCRC-M91, CCRC-M92	.	x	.	.	.	.	.
	MAC207	.	x	.	x	.	x	.
	JIM133	.	x	.	x	.	x	.
	CCRC-M78	.	x	.	x	.	x	.
RG-I/AG	CCRC-M33	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M21, CCRC-M77, CCRC-M122, CCRC-M125	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M123, CCRC-M126, JIM131	.	x	.	.	.	.	.
	JIM1	.	x	.	.	.	.	.
	JIM16	.	x	.	.	.	x	.
	CCRC-M12	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M13, CCRC-M22	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M9	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M134	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M121	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M7, CCRC-M44	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M24, CCRC-M32	.	x	.	.	.	.	.
	CCRC-M8	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M79	.	x	.	x	.	x	.
	CCRC-M80	.	x	.	x	.	.	.
	CCRC-M60	.	x	.	x	.	.	.
RG-I	RG1	.	.	.	x	.	x	.
RG-I backbone	CCRC-M14	.	.	.	x	.	x	.
HG backbone 2	JIM7	.	x	.	x	.	.	.

Notes: S1= couche 1 de la paroi secondaire ; S2= couche 2 de la paroi secondaire ; RG-I= rhamnogalacturonane type I ; AG= arabinogalactanes ; HG=homogalacturonane ; point (.) = pas détecté ; x = label ; ^A détecté dans la face interne de la S2 des fibres du BO en différenciation et mature et dans la face interne des couches G en différenciation et mature ; ^B détecté dans les couches S1/S2 des fibres de BO en différenciation et mature, dans les couches S1/S2 des fibres de BT mature et dans les couches G matures ; ^C détecté dans la face interne de la S2 des fibres de BO en différenciation et dans la face interne des couches en différenciation. Le groupe RG-I est composé par un seul anticorps qui n'est pas classifié par <http://www.wallmabdb.net>

Table 2. Détection de différentes structures de polysaccharides dans les parois des fibres le long du gradient de différenciation présenté dans la fig. 2B (B1 à B5).

Groupe	Anticorps	B2	B3	B4		B5	
		S1/S2	S1/S2	S1/S2	Couche G	S1/S2	Couche G
Xylane-2	CCRC-M119	.	.	.	.	.	.
Xylane-3	CCRC-M120	.	.	.	X	.	X
Xylane-5	CCRC-M143, CCRC-M144, CCRC-M145, CCRC-M146, CCRC-M155	x ^A	x ^A	.	X	.	X
Mannane acétylée	CCRC-M169, CCRC-M170	x ^B	x ^B	.	X	X	.
Arabinogalactane-2	LM6	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M133	.	.	.	X	.	X
	JIM19	.	.	.	X	.	X
	LM5	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M107	.	.	.	X	.	X
	JIM14	.	.	.	X	.	X
Arabinogalactane-3	CCRC-M85	.	.	.	X	.	.
	CCRC-M81	x ^C	.	.	X	.	.
	JIM8	x ^C	.	.	X	.	X
	JIM15	x ^C	.	.	X	.	.
Arabinogalactane-4	CCRC-M91, CCRC-M92	.	.	.	.	.	.
	MAC207	.	.	.	X	.	X
	JIM133	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M78	x ^C	.	.	X	.	X
RG-I/AG	CCRC-M33	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M21, CCRC-M77, CCRC-M122, CCRC-M125	.	.	.	.	.	.
	CCRC-M123, CCRC-M126, JIM131	.	.	.	X	.	.
	JIM1	.	.	.	X	.	.
	JIM16	.	.	.	X	.	.
	CCRC-M12	.	.	.	.	.	X
	CCRC-M13, CCRC-M22	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M9	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M134	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M121	x ^C	.	.	X	.	.
	CCRC-M7, CCRC-M44	.	.	.	X	.	.
	CCRC-M24, CCRC-M32	.	.	.	X	.	.
	CCRC-M8	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M79	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M80	.	.	.	X	.	X
	CCRC-M60	.	.	.	X	.	X
RG-I	RG1	.	.	.	X	.	X
RG-I backbone	CCRC-M14	.	.	.	X	.	X
HG backbone 2	JIM7	.	.	.	X	.	X

Notes: S1= couche 1 de la paroi secondaire ; S2= couche 2 de la paroi secondaire ; RG-I= rhamnogalacturonane type I ; AG= arabinogalactanes ; HG=homogalacturonane ; point (.) = pas détecté ; x = label ; ^A détecté dans la face interne de la S2 des fibres du BO en différenciation et mature et dans la face interne des couches G en différenciation et mature ; ^B détecté dans les couches S1/S2 des fibres de BO en différenciation et mature, dans les couches S1/S2 des fibres de BT mature et dans les couches G matures ; ^C détecté dans la face interne de la S2 des fibres de BO en différenciation et dans la face interne des couches en différenciation. Le groupe RG-I est composé par un seul anticorps qui n'est pas classifié par <http://www.wallmabdb.net>

FIGURES

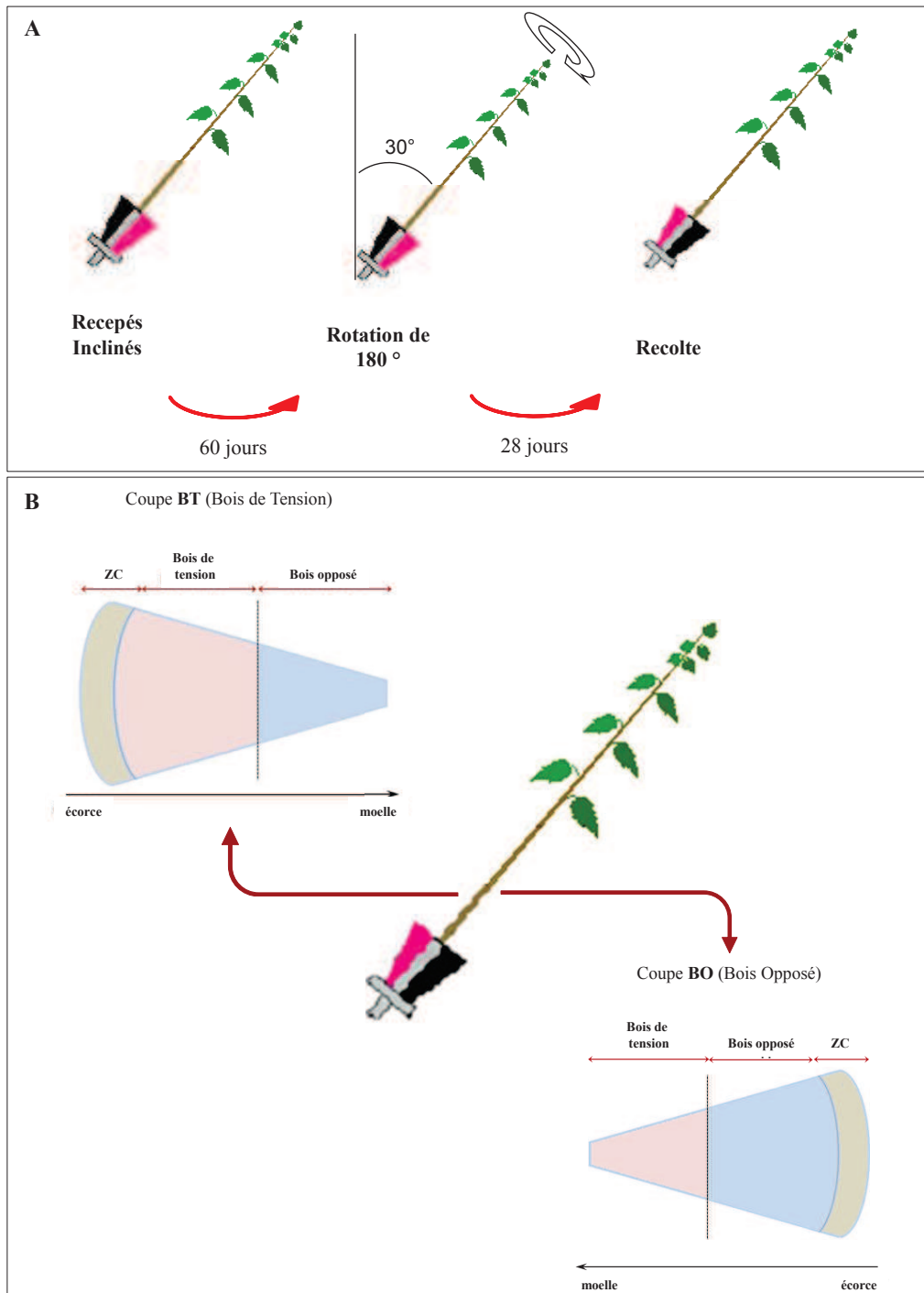


Figure 1. Induction de la production de bois de tension (BT) par inclinaison artificielle des plantes A. Schéma de l'expérience d'inclinaison des jeunes peupliers pour induction de la production de bois de tension : les peupliers ont été inclinés à 30° de l'axe vertical, position dans laquelle ils ont poussé pendant 60 jours et ensuite tournés à 180° et maintenu dans cette position pendant 28 jours, puis prélevés. B. Schéma des coupes histologiques des échantillons de bois prélevés de la face supérieur de la tige (haut à gauche) et de la face inférieur (bas à droite).

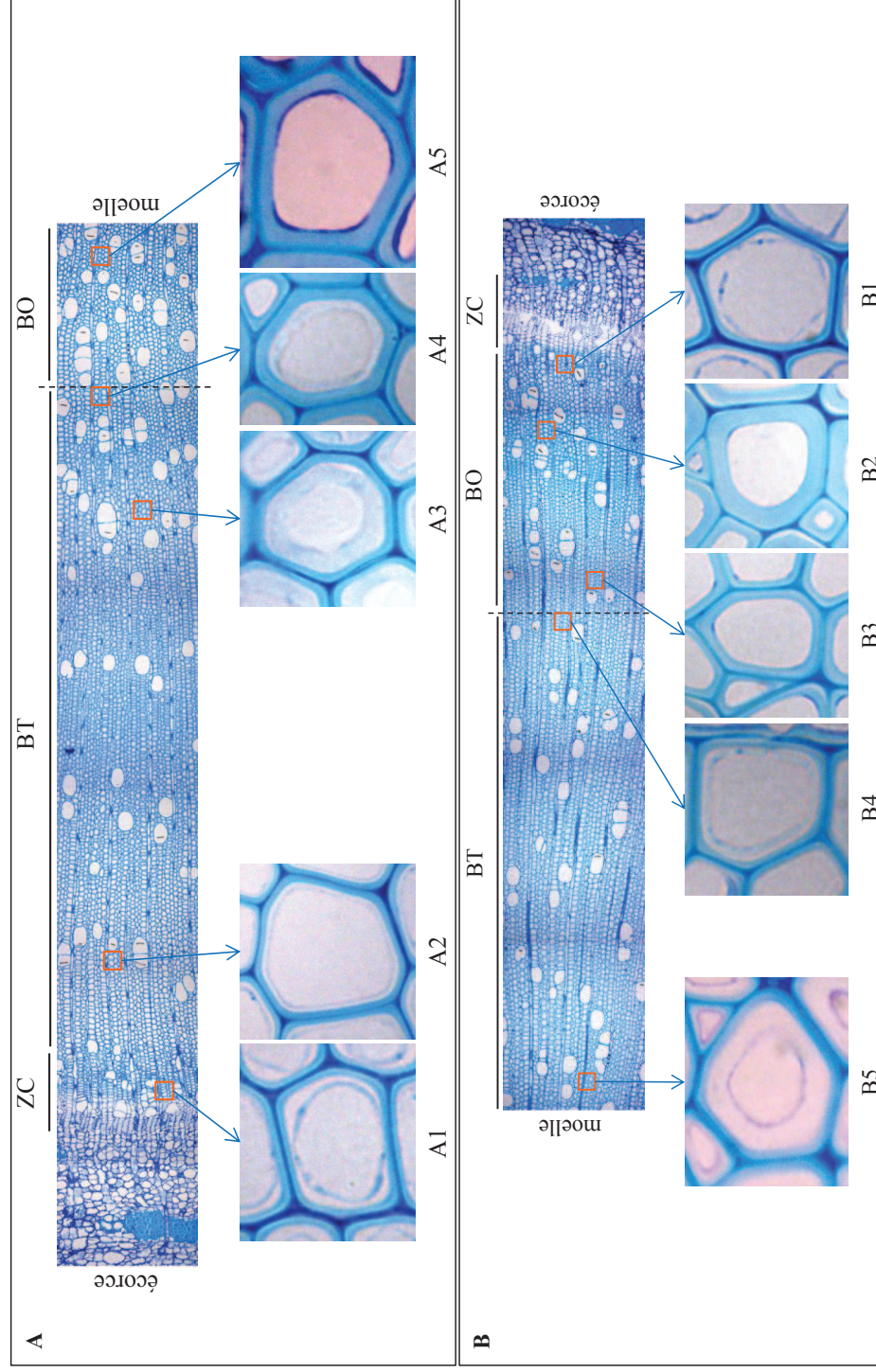


Figure 2. Coupes histologiques transversal de bois. A. Bois prélevé de la face supérieure de la tige de peuplier inclinée et A1 à A5 montrent les fibres en détail le long du gradient de différenciation. B. Bois prélevé de la face inférieure de la tige inclinée de peuplier et B1 à B5 montrent les fibres en détail le long du gradient de différenciation.

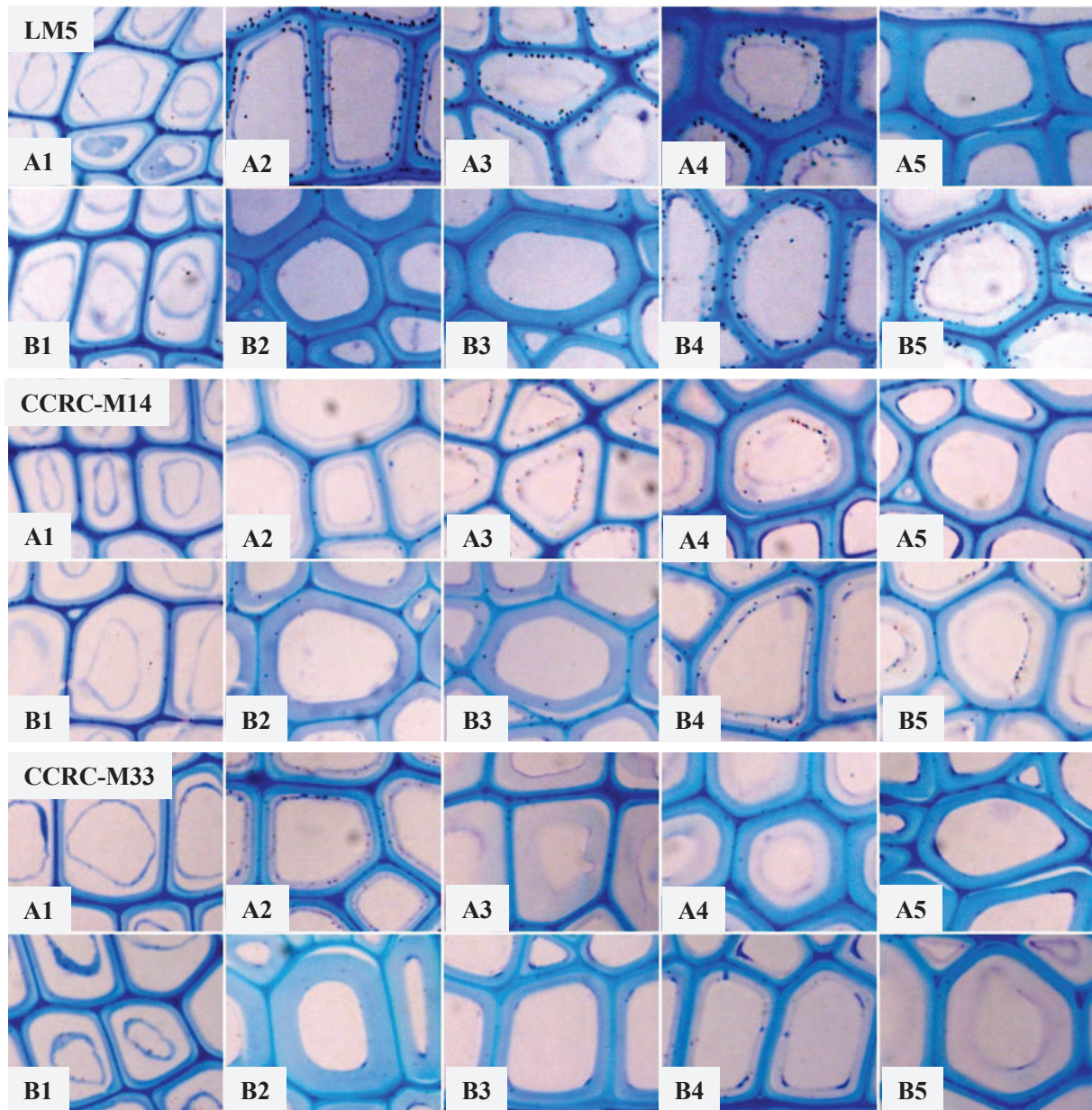


Figure 3. Localisation de polysaccharide dans la paroi des fibres du bois de peuplier avec des anticorps monoclonaux marqués en or. L'immunolocalisation a été faite à l'aide de différents anticorps dirigés contre plusieurs polysaccharides présents dans la paroi végétal soit, LM5 qui reconnaît des β -1,4-galactane ; CCRC-M14, qui peut reconnaître le backbone des RG-I ; CCRC-M33 et CCRC-M77 qui peuvent reconnaître des chaînes latérales des RG-I ; CCRC-M7, MAC207 et JIM8 qui peuvent reconnaître des AGPs ; CCRC-M146 qui peut reconnaître des glucuronoxylanes méthylés et CCRC-M170 qui peut reconnaître des glucomannanes acétylés. La description du marquage est présenté dans les tableaux 1 et 2 et les zones A1 à A5 ainsi que B1 à B5 sont détaillées dans la fig. 2.

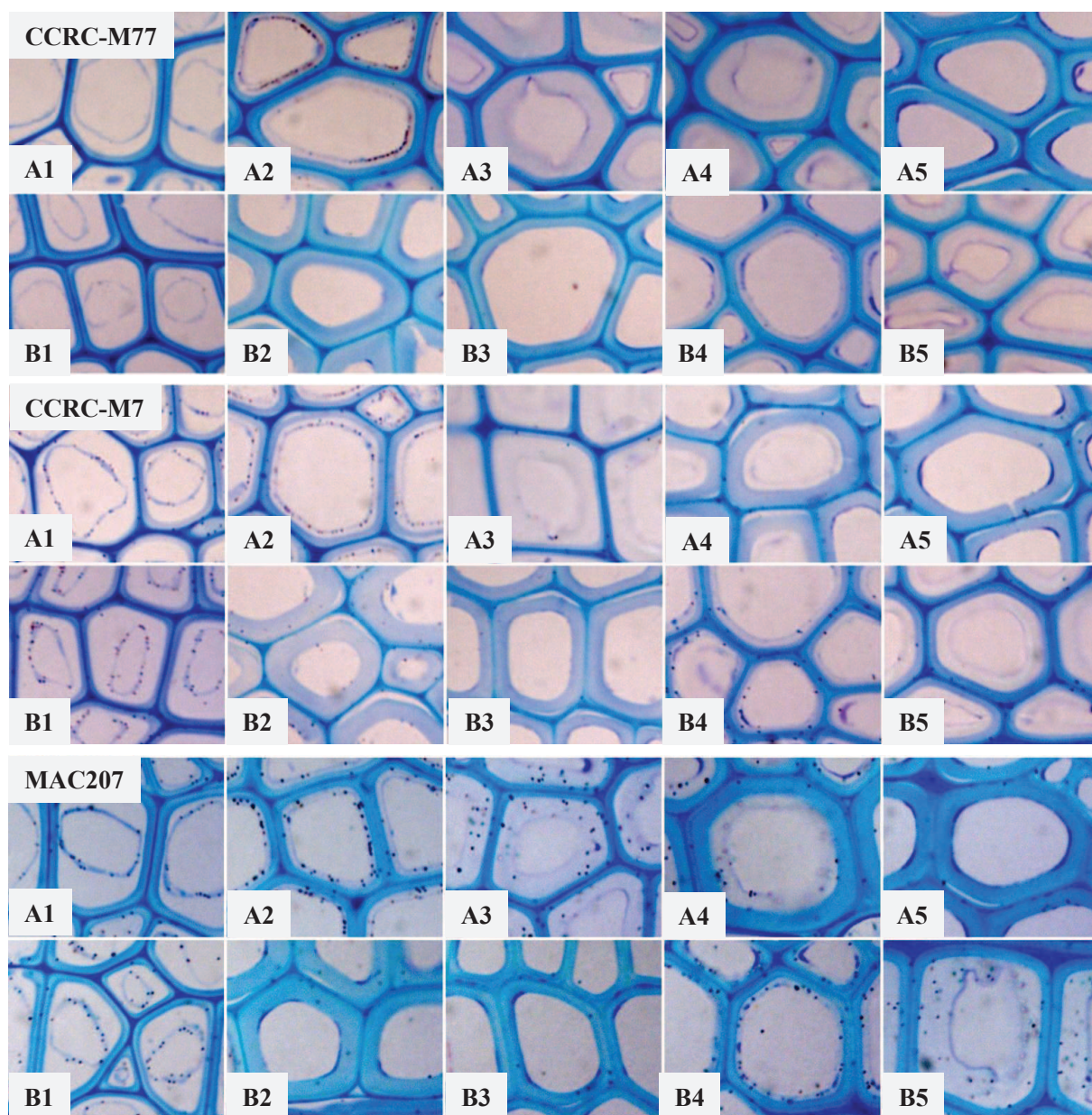


Figure 3. Continuation.

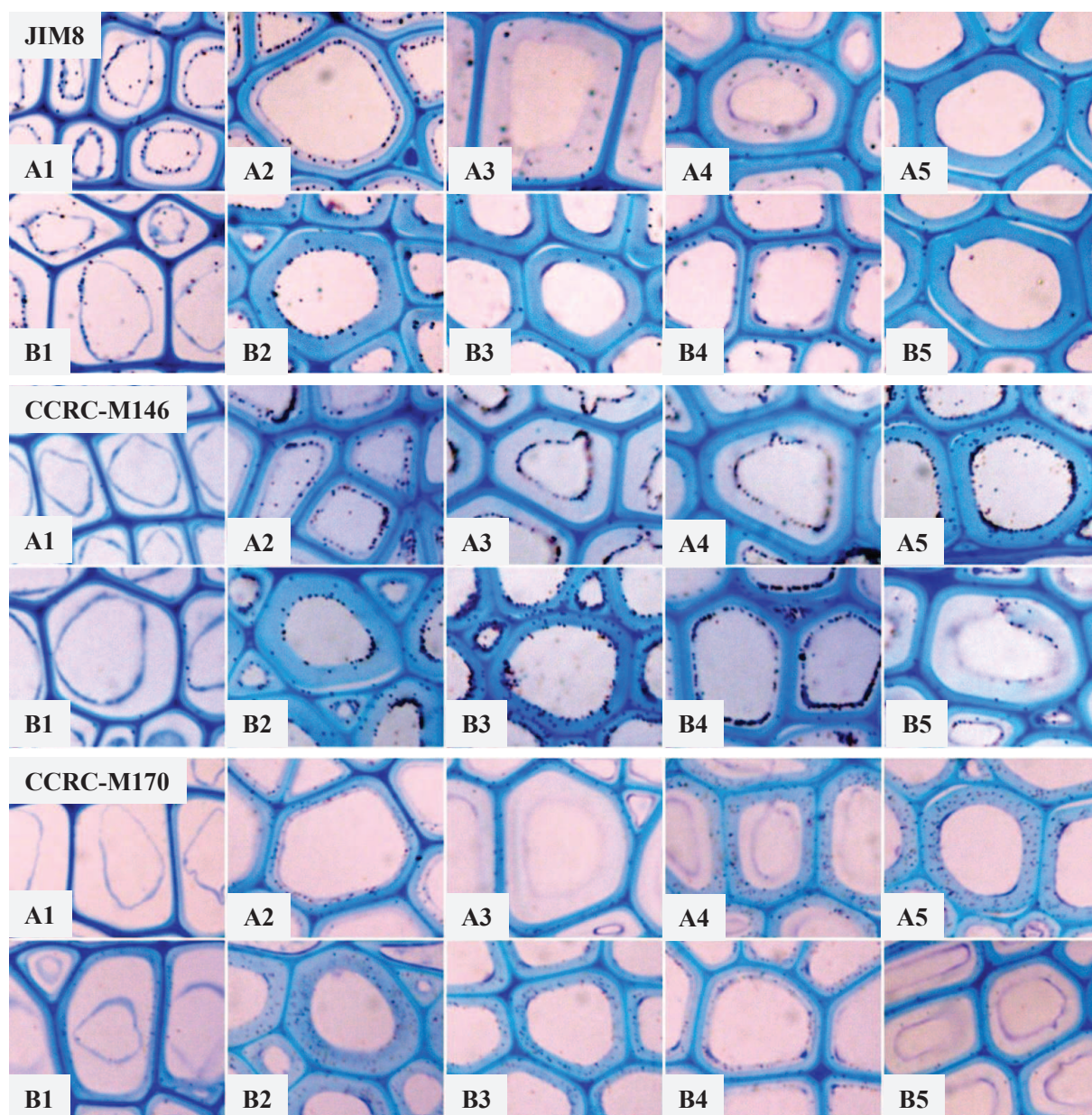


Figure 3. Continuation.

CHAPITRE 2

Alteration de l'expression d'une protéine à arabinogalactane avec domaine fascicline (FLA) entraîne des effets pleiotropiques chez un peuplier transgénique

Alteration de l'expression d'une protéine à arabinogalactane avec domaine fascicline (FLA) entraîne des effets pleiotropiques chez un peuplier transgénique

Guedes, F. T. P*.; Takeuchi, M*.; Laurans, F.; Lesage-Descauses, M-C.; Boizot, N.; Laine-Prade, V. ; Secerovic A. ; Leplé, J. C.; Déjardin, A.; Pilate, G.

*** these two authors contributed equally to this work**

Cet article devrait être soumis à la revue Annals of Botany

1. PRESENTATION SYNTHETIQUE DE L'ARTICLE

Contexte. Le bois est un tissu très complexe formé sous le contrôle de nombreux gènes et sous l'influence de l'environnement. Le bois de tension est un type particulier de bois produit en réponse à un stress mécanique ou gravitationnel. Il est formé à la face supérieure des axes inclinés et est associé à une forte tension de maturation, 10× plus importante que dans le bois normal. Cette force permet à l'arbre de réorienter ses axes. Le bois de tension présente d'importantes modifications anatomiques et biochimiques par rapport au bois dit normal, notamment l'existence d'une couche supplémentaire dans les fibres, une couche gélatineuse ou couche G déposée à la face interne de la couche S2, dont l'apparition coïncide avec la génération de la tension. Les couches G sont formées par des MFCs cristallines, orientées parallèlement à l'axe de la fibre et insérées dans une matrice composée par des polysaccharides et aussi par des protéines. Différentes études ont été faites sur le rôle de ces protéines dans la formation du bois de tension. Certaines sont fortement régulées pendant la formation du bois de tension, comme certaines protéines à arabinogalactane à domaine fascicline-like (FLAs).

Objectif. L'objectif de cette étude a été d'étudier la fonction possible d'une FLA de peuplier (PopFLA), dans la formation du bois de tension d'un peuplier hybride (*Populus tremula* × *Populus alba*).

Stratégie. Pour l'étude de la fonction de cette PopFLA, nous avons déterminé la localisation précise de 2 de ces protéines à l'aide de deux anticorps qui ont été produits à cette fin. Nous avons également générés des peupliers transgéniques pour lequel l'expression du gène *popFla1* a été modifiée. Une des lignées transgénique produite présentait une forte modification phénotypique surtout au niveau de la tige. Nous avons étudié la distribution des principaux polysaccharides pariétaux au cours de la différenciation dans les plantes modifiées

et témoins, et avons confronté les résultats obtenus. Le choix des anticorps testés s'est basé sur des résultats obtenus au préalable et qui sont présentés dans le chapitre 1.

Résultats. Le changement de niveau d'expression des PopFLAs a un large effet sur la morphologie des peupliers avec la production de feuilles plus petites et courbées, la croissance de la tige principale en spirale. De plus, des modifications importantes ont été observées au niveau du bois telles que la production de bois de tension distribué en spirale autour de la moelle, la mise en place de rayons bisériés et de cellules à l'aspect parenchymateux. La distribution des polysaccharides dans la paroi est également modifiée : Alors que chez le peuplier témoin, les PopFLAs sont détectées à la face interne de la couche G du bois de tension et dans les rayons, dans le peuplier transgénique, les PopFLAs sont seulement détectés dans les rayons, alors que la présence et la distribution d'autres AGPs et de pectines ont été également affectées.

Conclusions. Les modifications observées chez le peuplier transgénique ont probablement eu par conséquence la production d'un bois de tension inefficace, i. e. qui ne permet pas aux arbres d'orienter leurs tiges. Nous avons des indices en faveur d'une forte implication des PopFLAs dans la construction de la couche G chez le peuplier. Cependant, la fonction principale de ces PopFLAs dans la formation du bois de tension est d'une certaine façon masquée par les effets pleiotropiques de la transformation génétique.

2. CONTRIBUTION AU TRAVAIL

- Participation à l'installation et au suivi de l'expérience en serre ;
- Participation à l'interprétation des résultats des analyses d'expression des gènes ;
- Caractérisation anatomique du bois des peupliers transgéniques ;
- Analyses d'immunolocalisation ;
- Compilation et participation à l'interprétation des résultats issus des analyses d'immunolocalisation ;
- Participation à la rédaction de l'article.

Alteration of the expression of a tension wood specific fasciclin-like arabinogalactan protein (FLA) results in pleiotropic effects in transgenic aspen.

Guedes, F. T. P.^{1*}; Takeuchi, M.^{2*}; Laurans, F.¹; Lesage-Descauses, M-C.¹; Boizot, N.¹; Laine-Prade, V.¹; Leplé, J. C.¹; Déjardin, A.¹; Pilate, G.¹

*** these two authors contributed equally to this work**

¹ INRA, UR0588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, F-45075 Orléans cedex 2, France

² Department of biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657, Japan

*Author to whom correspondence should be sent:

Gilles Pilate

Phone: +33 (0)2 38 41 78 38

Fax: +33 (0)2 38 41 78 79

Email: gilles.pilate@orleans.inra.fr

Abstract

In hardwood trees, tension wood (TW) is a remarkable adaptive mechanism that allows the tree to reorient its axes. In many species, TW fibres harbor a supplemental layer named G-layer. Previous analyses demonstrated that a number of arabinogalactan proteins (AGP) were up-regulated during tension wood formation in poplar. Therefore we investigated the function of one of them, a fasciclin-like arabinogalactan protein (PopFLA1) in the G-layer maturation and in the mechanical properties of tension wood: PopFLA1 distribution was evaluated during TW and opposite wood (OW) differentiation by immunolocalisation. We also analyzed the distribution of other polysaccharide possibly implicated in mechanical properties of TW in a GM poplar modified for the level of *PopFLA1* expression. One of the GM lines exhibited a very strong phenotype with loss of apical dominance, with curly and reduced growth. While PopFLA1 was detected at the early stages of G-layer differentiation in control poplars, in GM poplars over-expressing this gene, the corresponding proteins were not detected in fibers. In addition, the genetic modification leads to the alteration in the distribution of other polysaccharides and suggests an early G-fibre maturation in the transgenic plants

key words: Poplar, tension wood, G-layer, cellulose, polysaccharides, arabinogalactane proteins, fasciclin-like arabinogalactane proteins, pectins

INTRODUCTION

Wood or xylem is a highly variable and complex tissue, whose formation is strongly controlled in response to environmental cues. Xylem cells, mainly fibres, vessels and ray cells in hardwood species result from cambial cell division and differentiate following different steps: cell elongation, secondary cell wall development, lignification and finally cell death (Dejardin et al., 2010, Mellerowicz et al., 2001, Plomion et al., 2001). Thus, wood is mainly made of the walls of dead cells, with highly variable composition and properties that depend on the expression of a wide set of genes during cell differentiation (Boerjan et al., 2003, Hertzberg et al., 2001, Mellerowicz and Sundberg, 2008).

Reaction wood is a peculiar type of wood produced in response to mechanical or gravitational stresses and associated with pith eccentricity (Du and Yamamoto, 2007). In hardwood trees, reaction wood, named tension wood (TW), is formed at the upper side of leaning stems and is associated with a strong maturation stress about 10× higher than in normal wood (Clair et al., 2006). Thanks to TW formation, trees are able to orient or reorient their axes (trunk or branches) in response to gravity and light stimuli, to support their own weight and to resist to prevailing winds (Almeras and Fournier, 2009, Bonser and Ennos, 1998, Matsuzaki et al., 2007, Scurfield, 1973). TW contains less lignin and more cellulose than normal wood (Timell, 1969). Anatomically, fibres are slightly longer in TW whereas vessels and parenchyma rays are in lower proportion (Jourez et al., 2001). Moreover, in poplar as for most temperate hardwood species, TW is typically characterized by the occurrence of specific fibres with an extra secondary cell wall (SCW) layer, named gelatinous layer (G-layer), deposited at the inner face of the S2 layer.

A strong correlation has been established between the magnitude of maturation stress and the amount of G-layer in TW suggesting that the strong TW maturation stress is very likely supported by the G-layer (Clair et al., 2003, Fang et al., 2008). Further, synchrotron X-Ray diffraction studies demonstrated that in the G-layer, the cellulose microfibrils are indeed the support of the tensile stress (Clair et al., 2011, Clair et al., 2006). It remains to determine what puts cellulose microfibrils under tension. Recently, it was evidenced that the G-layer contains a gel-like structure with high porosity embedding cellulose microfibrils (Chang et al., 2009, Clair et al., 2008). The formation of this gel-like structure in the matrix and the associated

swelling may possibly be responsible for the generation of the mechanical stress in the cellulose microfibrils, while the mechanism of its formation remains unknown.

G-layer composition appears very different from the other SCW layers with highly crystalline cellulose oriented parallel to the cell axis and very low quantities or no lignin (Kaku et al., 2009, Nishikubo et al., 2007, Norberg and Meier, 1966). In a recent study, we demonstrated that differentiating G-layers also contain high amounts of Rhamnogalacturonan type I pectins (RG-I) with small amounts of acetylated glucomannans and glucuronoxylans, while contrary to previous studies, no evidence on the presence of xyloglucans was found (Guedes et al., manuscript in preparation). The presence of pectin RG-I, glucomannans and xylans was also evidenced in previous immunolocalisation studies (Arend, 2008, Bowling and Vaughn, 2008, Kim and Daniel, 2012). Surprisingly, we observed that G-layers contain rather high proportion of non-polysaccharidic constituents, suggesting that, at least during its differentiation, proteins may be present in rather high quantities. Indeed, transcriptomic, proteomic and immunolocalisation studies reported the occurrence of different classes of proteins in the G-layer (Bowling and Vaughn, 2008, Kaku et al., 2009, Lafarguette et al., 2004) Guedes et al., manuscript in preparation).

Important efforts were also invested to identify proteins involved in TW formation. From transcriptional studies, a set of genes highly regulated in TW has been identified (Andersson-Gunneras et al., 2006, Dejardin et al., 2004, Qiu et al., 2008). Among them, a number of genes coding for arabinogalactan proteins (AGPs) appeared highly and specifically expressed in tension wood (Dejardin et al., 2004, Lafarguette et al., 2004). AGPs are known to be cell surface glycoproteins with a core-protein backbone O-glycosylated by one or more complex carbohydrates (Gaspar et al., 2001). AGP arabinogalactan polysaccharides typically consist of short side chains containing arabinose and often rhamnose (Rha) and glucuronic acid (GlcUA) attached to a β -1,3-linked galactan backbone core (Tan et al., 2004). There is a large variability in AGP glycosylation. The degree and pattern of glycosylation probably modulate AGP biological activity: AGP glycosylation likely consists in a bulky glycan that provides contact surface for interaction with other matrix molecules (Ellis et al., 2010, Seifert and Roberts, 2007). Otherwise, AGPs often harbor a glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchor attached to their C-terminus during posttranslational modifications, which implies these AGPs remain attached to the outer side of the cell membrane when the xylem fibre is still alive, before program cell death occurs.

The function of AGPs in the secondary cell wall formation remains unclear. However, in an analysis of publicly available microarray data, the expression pattern of 2 AGPs, belonging to the fasciclin-like AGPs family (FLAs) appeared highly correlated with those of secondary cell wall specific *CesA* genes (Persson et al., 2005), suggesting an involvement of these proteins in cellulose synthesis. Immunolocalisation study in poplar tension wood indicated that a number of AGP epitopes localized at the inner side of the G-layer (Lafarguette et al., 2004; Guedes et al., manuscript in preparation). The tight physical association of AGP-like glycoproteins with flax fibre cellulose (Girault et al., 1997), suggests that GPI-anchored AGPs might be secreted to the cell surface in parallel with cellulose synthase, and while binding to cellulose they might be released from their GPI anchor and incorporated into cell wall thickening (Seifert and Roberts, 2007). Alternatively, AGPs have been proposed to act as plasticizers by decreasing pectin cross-linking and increasing pectin porosity (Lamport and Kieliszewski, 2005): in flax periphloem fibres, which are fibres with a number of features similar to TW fibres, the main encrusting polysaccharides were shown to be long chains of β -1,4-galactans (Girault et al., 1997), probably linked to RG-I backbone (Gorshkova et al., 1997). We recently demonstrated that the differentiating G-layer contains a high proportion of galactose originating from RG-I side chains (Guedes et al., manuscript in preparation). Finally, it has been recently reported that in the primary cell wall AGPs were able to form a complex proteoglycan with RG-I and arabinoxylans, named Arabinoxylan Pectin Arabinogalactan Protein 1 (APAP1, Tan et al., 2013).

A distinct subgroup of AGP strongly represented in TW are the fasciclin like AGPs (FLAs), which in addition to AG modules harbor a fasciclin-like domain (Johnson et al., 2003). Fasciclins were first described in *Drosophila* as adhesion molecules important for axonal guidance (Elkins et al., 1990). Thus, FLAs possess domains for both protein and carbohydrate interactions that are certainly important in their functions. Interestingly, an Arabidopsis T-DNA knockout mutant for 2 FLA genes (FLA11 and FLA12) co-expressed with secondary cell wall *cesA* genes (Persson et al., 2005) presents altered stem biomechanics with reduced tensile strength and a reduced tensile modulus of elasticity, as well as altered cell wall architecture and composition, with increased cellulose microfibril angle and reduced arabinose, galactose and cellulose content: this suggests that these FLAs contributes to plant stem biomechanic by affecting both cellulose deposition and the integrity of the cell-wall matrix (MacMillan et al., 2010).

In a previous study, we have finely characterized 15 highly homologous poplar genes encoding FLAs (named PopFLA1-15) that were preferentially expressed in the differentiating xylem (Lafarguette et al., 2004), while their transcripts were not detected in newly formed xylem cells from the cambial zone: this suggests the involvement of AGP in secondary cell wall formation. Moreover, 10 of these PopFLAs (PopFLA1-10) were specifically expressed in TW during secondary cell wall formation (Lafarguette et al., 2004), while these PopFLAs were among the most highly represented sequences in a differentiating TW cDNA library suggesting a very high expression levels in this tissue (Déjardin et al., 2004). The deduced protein sequence of these 15 PopFLAs possesses the features of fasciclin-like AGPs with a N-terminal secretion signal and a fasciclin-like domain flanked by two AGP-like regions rich in Ala, Pro, Ser and Thr. They all presented a conserved structural organization with only some variations in the length and composition of the first AGP-like domains. Likewise, all 15 PopFLAs sequences were predicted to have an N-terminal signal peptide for secretion, while nine of them were also predicted to have a complete C-terminal signal for the addition of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (Lafarguette et al., 2004). Interestingly, phylogenetic analysis of subgroup A fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLAs) from *Arabidopsis* and *Populus*, indicated that the PopFLA genes with increased transcript abundance in TW have their highest homology with AtFLA12 (Andersson Gunneras et al., 2006), one of the two FLAs co-expressed with Cesa genes specific to the secondary cell wall (Persson et al., 2005).

From the present knowledge, both RG-I pectins and AGPs appear as potential important players in the formation of the gel-like structure in the G-layer as observed by Clair et al. (2006) and may therefore be directly involved in the creation of tensile stress in the G-layer microfibrils. Otherwise, FLAs seems also to be associated with cellulose biosynthesis in the G-layer and possibly to its low cellulose microfibril angle.

In this paper, we further investigated the possible function of FLAs in the G-fibre. Toward this end, we investigated their precise localization during G-fibre differentiation, thanks to the production of specific antibodies directed against FLA peptide moiety. We also generate transgenic poplars altered in FLA expression: one of the transgenic lines presented strongly altered growth and development. This material was further characterized by localization of the main cell wall polysaccharides during xylem cells differentiation.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and sampling

Transgenic and control poplar micropropagated plants (*Populus tremula* × *P. alba*, section Populus, clone INRA 717–1-B4) were transferred to the glasshouse, potted in compost and individually supplied with water and fertilizers by a drip system. To induce tension wood formation, two months poplars were artificially tilted by inclining the pots at 30° from the vertical using a rigid stick. Height and stem diameter were regularly recorded and sample collection took place three months after inclination.

Vector construction and production of the ‘Miyuki’ transgenic line

Generation of ‘Miyuki’ transgenic line

The ‘Miyuki’ transgenic line was obtained from *Agrobacterium*-mediated transformation of *Populus tremula* × *P. alba* INRA clone 717-1B4, according to (Leple et al., 1992). To prepare the binary vector for poplar transformation, the full-length *PopFLAI* CDS was first PCR-amplified from CF229653 plasmid clone (Déjardin et al., 2004; Lafarguette et al., 2004) with Pfx polymerase and the following forward and reverse primers: 5'-CACCCTGGTGCCGCGCGGCAGCATGAAGCCACAGTACTTAC-3' and 5'-TTACAGAGAAAACATTGC-3'). The PCR product was then cloned into pENTR™ vector using pENTR™/D-TOPO® cloning kit (Invitrogen, Life Technologies, St-Aubin, France) according to the manufacturer's instructions, to generate pENTR_556, an entry clone for the Gateway® cloning system (Invitrogen). pENTR_556 construct was verified by sequencing. *PopFLAI* CDS was then shuttled from pENTR_556 to pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003) using Gateway® LR Clonase™. The generated pMDC32_556 binary vector was suited for the overexpression of *PopFLAI* CDS under 2×35S constitutive promoter: it was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pMP90) strain using triparental mating. A Gateway™ cloning vector set was used for high-throughput functional analysis of genes *in planta*.

DNA analyses: determination of copy number and insertion sites

Genomic DNA was isolated from about 80 mg of ground leaf tissue according to (Dellaporta et al., 1983). DNA was then purified with Nucleospin Plant DNA (Macherey-Nagel) according to manufacturer's recommendations. Four milligrams EcoRV or HindIII digested genomic DNA were separated on a 0.8% agarose gel in TAE buffer and transferred to a nylon membrane (N+, Ge Healthcare) by capillary transfer method (Southern, 1975). Blots were hybridized using the DIG system (Roche) according to manufacturer's recommendations: *hpt* and *PopFla1* probes were labeled with dUTP-Digoxigenine by PCR using plasmid DNA from pMDC32-556 binary vector as template. Pre-hybridization was performed in DIG Easy Hyb buffer at 42°C for 2 h; hybridization was realized with 200 ng of DIG-labeled denatured probe overnight at 42°C. Blots were washed twice in low stringency buffer (2×SSC containing 0.1 % SDS) for 5 min with shaking, then in high stringency buffer (0.1 % SSC containing 0.1 % SDS) at 67°C for 15 min with shaking. Probe-target hybrids were detected using CDP-Star (Roche) chemiluminescent assay according to manufacturer's recommendations.

RNA extraction and gene expression analysis

Total RNA was isolated from the xylem of greenhouse-grown plants according to Chang et al. (1993). 100 mg of ground stem tissues were lysed in 900 µl of extraction buffer followed by chloroform: isoamylalcohol (24:1) extraction and overnight ethanol precipitation with 2.5 M lithium chloride. RNA pellet was re-suspended in RNase-DNase free water and purified with RneasyMinElute kit (Qiagen) according to manufacturer's recommendations. After DNase I treatment, RNA quality was verified using Experion RNA StdSens Analysis kit (Biorad). qRT-PCR analysis were performed on 2 µg of total RNA using SuperScript Platinum qRT-PCR kit (Invitrogen, Life Technologies) for reverse transcription reaction and qPCR Platinum Sybr Green super-Mix kit (Invitrogen, Life Technologies) for the following qPCR reaction using 2 µl RT reaction after 1:3 (v:v) dilution as cDNA template. is used in for qPCR reaction was realized in a volume of 25 µl on MasterCycler Realplex (Eppendorf). Each reaction was realized in triplicate with the following PCR conditions: 50°C for 2 min (95°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 45 s). Melting curve analysis was performed during real-time qPCR to analyze the specificity of reaction and check for the presence of primer dimers. Primers are also designed to analyze expression of ubiquitin was also amplified and used as a housekeeping gene to normalize the results.

Production of FLA specific antibodies

The antibody anti-PopFla1 was produced against the whole PopFla1 peptide (263 aa) and anti-PopFla8 was produced against the whole PopFla1 peptide (269 aa). These antibodies were produced by a specialized company (Agro-Bio, La Ferté Saint Aubin, France). The sequences of *PopFla1* and *PopFla8* were cloned in the vector pETG-10K which allows the production of proteins in *E. coli* (Rosetta, Invitrogen). These proteins are labelled with 6HIS to ease their purification. Fla1 and Fla8 cross-reactivity against PopFLA1 and PopFLA8 recombinant proteins are illustrated on Fig. S1.

Protein extraction and western blot analysis

Protocol 1: TCA protein extraction and purification. To evaluate the presence of PopFla1 and PopFla8 proteins in different types of xylem collected from control and transgenic poplars, total proteins were extracted using TCA-acetone method (Damerval et al., 1986) and then quantified by Bradford method (Bradford, 1976).

Protocol 2: for protein fractionation. Frozen tissues (200 mg) were ground to a fine powder in liquid nitrogen. Proteins were extracted 1 min at 4°C in 1 ml of 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 2% PEG 6000 (w/v), 2% PVPP (w/v), 0.2 sodium ascorbate. The crude extract was clarified by centrifugation (13,000 g/10 min) at 4 °C and the supernatant (AS) containing mostly cytosolic and plasma membrane-bound proteins and pellet (AP) containing mostly cell wall bound proteins. Proteins were further fractionated by ultracentrifugation. Fraction B, was then extracted from the remaining supernatant and pellet with 1M NaCl during one night at 4°C under vigorous shaking. After centrifugation (13 000 g/10 min) at 4°C, the supernatant (BS) and pellet (BP) were collected. Proteins were quantified according to Bradford method (Bradford, 1976), aliquot and stored at -20°C before use. These proteins were used to verify which fraction is preferentially recognized by antibodies.

Western blot analysis. A total of 15µg of proteins per well and 50 ng of PopFLA1 and PopFla8 for recombinant proteins were separated in SDS-PAGE migration on 12% Mini-PROTEAN®TGX™ Precast Gel (Bio-Rad). Proteins were subsequently transferred onto nitrocellulose membrane using the iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Western blot analysis was performed using primary antibodies diluted at 1:5000 and secondary antibody anti-rabbit IgG HRP conjugate (GE Healthcare) at 1:3000. Labeling was visualized by ECL detection following the manufacturer's instructions (GE Healthcare).

Anatomical and histochemical studies

Sample preparation

Sections of about 3 mm were excised from tension and opposite wood samples and fixed for 4 h in a solution of 2.5% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M McIlvaine citrate-phosphate buffer, pH 7.0. After dehydration in a graded series of ethanol, samples were embedded in medium grade LR White resin (London Resin Company Ltd, UK). Semi-thin sections (0.8 µm) were collected with a diamond knife (Diatome, Biel, Switzerland) installed on an ultracut R microtome (Leica, Rueil-Malmaison, France). These sections were laid on silanized slides (Dako Cytomation, Trappes, France) and fixed by heating at 55°C.

Antibodies

The 23 tested monoclonal antibodies (mAbs) were purchased from Carbosource, Complex Carbohydrate Research Center (University of Georgia, Athens, Georgia, USA) and from Plantprobes (Leeds, UK). The mAbs AX1 and RG1 were kindly provided by Dr Fabienne Guillon (INRA, Nantes, France). While the Fla1 and Fla8 were produced as described above.

Immunogold labelling

To prevent liquid evaporation, all subsequent incubations were conducted in a moist chamber. Sections were firstly incubated for 1 h with a droplet of blocking solution containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% Tween-20 in 10 mM Tris Buffered Saline (TBS) buffer, pH 7.5, and then for 10 min in droplets of dilution buffer (0.3% BSA and 0.01% Tween-20 in 10 mM TBS, pH 7.5) at room temperature. Sections were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody diluted ten times for CCRC, JIM, LM and MAC series, three times for RG1 and twenty times for AX1 in the same buffer. Sections were then washed three times in TBS buffer before incubation with 20 nm gold-conjugated, secondary antibody in the dilution buffer (1:50) (BB International, British-biocell, Cardiff, UK). Immunogold labelling was enhanced 6 min by the Silver Enhancing kit (British Biocell International, Cardiff, UK) according to the manufacturer's instructions. Sections were subsequently post-stained with a mix of methylene blue/Azur II and examined under light microscope (DMR, Leica microsystems).

Immunofluorescent labelling

After the primary antibody incubation the section were incubated with Alexa 633 or Alexa488 antibodies in the dilution buffer (1:500) (Invitrogen, Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Sections were examined under a Zeiss LSM700 confocal laser scanning microscope using excitation 488 nm, emission >490 nm for detection of the Alexa 488 signal and using excitation 630 nm, emission > 640 for detection of the Alexa 633 signal. All fluorescence detection settings were kept at the same level for the sets of samples being compared. All images are shown as maximum intensity projections.

RESULTS

Analysis of fasciclin-like proteins in poplar TW

The expression of two genes which code for different fasciclin-like proteins, *PopFla1* and *PopFla8* was analyzed in different tissues of wild-type poplar. These genes were strongly expressed in differentiating (DX) and mature TW xylem (MX) and it seems to be only slightly expressed in young stem (Fig. 1). Western blot analyses of proteins extracted from different tissues of the same poplar plant using the Fla1 antibody gave positive signals in differentiating and mature TW, and also in leaf and in midrib. The signal detected at 66 kDa appeared as a sharp band in leaf extracts while it was a smear in TW samples, typical of glycosylated proteins.

FLAs are often associated to the plasma membrane when they harbor a GPI-anchor. For this reason, they are expected to be associated with plasma membrane at least during some period of their processing or function. In order to verify if PopFla1 was associated to the plasma membrane, membrane associated TW xylem proteins were separated from soluble proteins by ultracentrifugation. Western blot analysis using two specific antibodies directed against PopFLA1 (Fig. 2 A) and PopFLA8 recombinant proteins (Fig. 2 B) reveals strong band of about 66 kDa and a lighter band below 36 kDa in the membrane bound protein fraction with no signal in the soluble protein fraction. The signal appears a lot stronger in mature TW xylem samples. The two antibodies appear to detect proteins of slightly different sizes. PopFLA1 and PopFLA8 seem to be strongly bound to membrane fraction in the differentiating xylem, as PopFLAs were more efficiently extracted using a buffer with stronger ionic strength (1M NaCl in B samples vs 0.1M Tris buffer A samples); this does not seem to be the case anymore in the mature xylem samples. Likewise, JIM14 directed against

an AGP epitope (Knox et al., 1991; Showalter, 2001; van Hengel and Roberts, 2002) reveals stronger bands in membrane associated proteins of high MW while a weak signal was still detected at 66 kDa (Fig. 2 C).

The localization of the epitopes recognized by the Fla1 and Fla8 antibodies was determined in poplar TW and OW. Fla1 and Fla8 were specifically detected at the inner face of differentiating G-layers, while a signal was consistently detected in parenchyma ray cells both in TW and OW (Fig. 3). The strong signal observed in differentiating G-layers progressively decreased during G-fibres maturation and was completely absent in mature G-fibres.

Characterization of genetic modified poplar plants with altered *PopFLA* expression

To study the function of *PopFLA1* gene in the wood formation, we produced genetic modified (GM) poplar plants transformed with the pMDC32-556 construct. Ten antibiotic resistant *calli* were produced, but we were able to regenerate GM plants from only three of them. GM plants regenerated from only one of them (named “Miyuki” event) exhibited a very strong phenotype at the plant level while the others gave rise to plants with wild-type (WT) phenotype. Plants issued from the Miyuki event were further characterized at the molecular level.

Morphology of Miyuki GM poplar plants

Obviously, when compared to wild-type plants (Fig. 4 A), three month-old greenhouse-grown Miyuki plants were not able to maintain a vertical position (Fig. 4 B). They also exhibited twisted roots and small and curled leaves (Fig. 4 C-D). Miyuki plants also exhibited very important alteration in their growth and development including a reduced stem growth both in length and diameter. In addition, the crawling stems exhibited a wave and twisted morphology, with short internodes (Fig. 4 E) with a number of stem lateral ramifications probably resulting from a weak apical dominance (Fig. 4 F). All these characteristics appear reminiscent of the pendula phenotype described in several tree species.

Anatomical and histochemical analysis of “Miyuki” xylem

Wild-type plants produced small amounts of TW in straight stems (Fig. 5 A), and high amounts of TW at the upper side of tilted stems (Fig. 5 B). On the contrary, Miyuki transgenic poplar plants appear to consistently produce TW fibres in very high quantities. TW distribution in the stem seemed to follow a spiral pattern (Fig. 5 C-D).

Vessels, parenchyma rays and fibre still occurred in this transgenic line but with frequency and shape sometimes affected. The density of fibres in transgenic plants not-tutored is around 7% inferior and for tutored transgenic plants it is 21% superior comparing to the wild-type and for OW and respectively 4% inferior and 23% superior in TW (Fig. 6 A-D). Concerning the density of vessels in transgenic plants not tutored is around 26% superior and for tutored transgenic plants it is 89% superior comparing to the wild-type and for OW and respectively 32% and 93% superior in TW (Fig. 6 E-H). However, for transgenic and wild-type poplars, in TW the density of fibres is around 20% superior and vessels 60% inferior. In transgenic plants parenchyma rays are sometimes bi-seriates whereas in control they are uni-seriate (Fig. 6 E-H). Associated with these rays a type of cell similar to a parenchyma one is often observed, but in general they seem to be randomly distributed in xylem (Fig. 6 I-P). When observed in longitudinal sections, xylem fibres present a different shape more rectangular than elongated shape with tapered ends as observed in control (Fig. 6 Q-R).

Molecular characterization

Southern analysis revealed that the Miyuki event involved only one T-DNA insertion. And expression analyses performed at the molecular level reveals alteration of *PopFLA1* expression (Fig. 7). Indeed, qRT-PCR analyses performed on xylem stem tissues indicate that *PopFLA1* transcripts seem to be expressed in all the stem of Miyuki plants, although with important variations between plants. In Miyuki plants left in free growth, transcript expression appears severely reduced as indicated by ubiquitin level of expression, while tutored plants seems to exhibit near normal levels of transcription. In tilted Miyuki plant, *PopFLA1* expression seems to be expressed in the whole stem at a level comparable to its expression in TW area of wild-type plants. In comparison the level of expression of *PopFLA14* does not seem to be directly affected by the genetic modification. Likewise, the intensity of the 66 kDa main band detected by the Fla1 antibody appears comparable in Miyuki whole stems and in TW area of wild-type plants, and a lot stronger than in wild type plants freely standing (Fig. 8 A). On the reverse, the signal corresponding to the lower bands (36-40 kDa) remains at the same intensity than in all the wild type samples. This suggests that this signal corresponds to PopFLAs which are not regulated in TW and that may be weakly recognized by Fla1 antibody. Western analyses performed with the Fla8 antibody (Fig. 8 B) gave similar results as with Fla1 antibody, but the absence or near absence of signals for the low molecular weight bands. This may result from the fact that Fla8 recognize to some extent Fla1 as verified by

cross-reactivity tests with PopFLA1 and PopFLA8 recombinant proteins (Fig. S1), while it does not recognize PopFLA not regulated in the tension wood.

Distribution of proteins and polysaccharides through the gradient of differentiation of xylem cells in wild-type and transgenic poplars

In a previously study Guedes et al. (manuscript in preparation) tested 178 antibodies raised against the major polysaccharides of plant cell wall. Based on this previous work, twenty-one antibodies were chosen based on their labelling pattern. The two antibodies directed against PopFLA1 and PopFLA8 epitopes were also tested. These antibodies were analyzed for their distribution through the gradient of xylem differentiation of transgenic and wide-type poplars (Table I).

The presence and distribution of AGPs were studied by using seven monoclonal antibodies: popFla1 and popFla8 which directed against PopFLA protein moiety from AGPs and JIM8, JIM14, CCRC-M7 and MAC207 and all of them were detected in the G-layers of TW in wild-type poplar. In the transgenic poplars, popFla1 and popFla8, contrary to what was observed in wild-type poplars, were not detected at the inner face of differentiating G-layers. However these antibodies labelled Miyuki ray parenchyma cells: this labeling appears to be stronger than what was observed in the rays of wild-type plants (Fig. 3). JIM8 which recognizes a plasma membrane AGP epitope (Costa et al., 2013; Dolan et al., 1995; Knox, 1997; Showalter, 2001), JIM14 which recognizes AGP epitopes present specifically in plasma membrane and cell walls of plants (van Hengel et al., 2002; Showalter, 2001; Knox et al., 1991) were also not detected in fibres of TW and OW, in any of the fibre wall of transgenic poplars. But, they were detected in the cell wall content of parenchyma rays of these plants. However, in wild-type poplar JIM8 was detected in the inner face of differentiating fibres in G-layer in TW fibres and S2 layer in OW fibres and also in the plasma membrane in the cambial zone of TW and OW while in mature G-layers, it was detected in its whole thickness (Fig. 9). JIM14 were detected in the inner face of the G-layer in all of the differentiation stages even if slightly detected in mature G-layers. CCRC-M7 directed against epitopes that maybe present in RG-I and AGP side chains and MAC207 which recognizes a family of abundant AGPs that are associated with plasma membranes were detected in both control and transgenic poplars with the same pattern of labeling for both plants but with differences between each other (Fig. 10). CCRC-M7 was detected in the inner face of differentiating G-layers and in the PCW/ML of TW and OW and through the gradient of differentiation while

MAC207 was detected in the whole thickness of G-layer through its gradient of differentiation.

One antibody raised against an extensin was also tested, the JIM19 (Knox et al. 1995). It was exclusively detected in the G-layer but with a different pattern of distribution between wild-type and transgenic poplars. In wild-type xylem fibres this antibody was detected in the inner face of differentiating G-layer and in the whole thickness of mature G-layer, while in transgenic plants it was detected only in the inner face of differentiating G-layers.

To study pectins distribution in xylem, nine antibodies directed against epitopes present in HG and RG-I was tested. All of them were detected in wild-type poplars fibres but four of them were not detected in transgenic plants and the five others were detected with differences in its distribution. The LM19 antibody recognizes HG domains of pectic polysaccharides preferentially un-esterified (Verhertbruggen et al., 2009) while LM20 recognizes methyl-esterified HG domains (Verhertbruggen et al., 2009) and both were not detected in xylem of transgenic poplars while in wild-type it was detected in cell wall corner of TW and OW fibres (Fig. 11). Epitopes of HG were also not detected in PCW/ML with the LM7 antibody which reacts with partially methyl-esterified epitopes of HG. Contrary to findings in wild-type, LM7 was also not detected in G-layers. The antibody LM6 recognize α -1,5-L-arabinan that maybe present in RG-I side chains (Willats et al., 1998) was also not detected in G-layers of transgenic poplars while in wild-type poplars it was detected in the inner face of differentiating G-layers. The well characterized LM5 antibody that recognizes β -1,4-galactans (Jones et al., 1997) and CCRC-M107 which epitope recognized is not very well defined but that also recognizes an epitope in RG-I side chain (Pattathil et al., 2010) present the same pattern of distribution in G-layers of wild-type poplars (Fig. 11). They were detected in the whole thickness of differentiating G-layers, in the outer face and inner face of G-layers in an intermediate state of development and finally only in the outer face of mature G-layers. LM5 was also detected in the PCW/ML and cell wall corners of TW and OW through the gradient of differentiation whereas CCRC-M107 was not detected in this fraction of fibres wall. In transgenic plants the distribution of epitopes recognized by LM5 is the same, but markedly weaker than in wild-type. Concerning CCRC-M107, in transgenic poplars it was also detected in PCW/ML in both TW and OW fibres through the gradient of differentiation.

CCRC-M12 (Puhlmann et al., 1994) which may recognizes epitopes in RG-I and AGP side chains was detected in the inner face of differentiating and mature G-layers in wild-type. However, in transgenic poplars its distribution is strongly different: it was not detected in

mature G-layer but, was detected in the secondary cell wall of mature fibres of TW and in PCW/ML through the gradient of differentiation. For both plants, CCRC-M12 was never detected in OW fibres.

CCRC-M14 and RG1, both directed against RG-I backbone and characterized respectively by Patthatil et al. (2010) and (Ralet et al., 2010) were detected in mature G-layers only in the inner face, in the zones where LM5 and CCRC-M107 in general are only detected in the outer face of G-layer and in the G-layer both at the inner face of differentiating fibres tip. However, in transgenic plants in addition to their presence in the inner face of differentiating G-layers in tip of fibres and in the inner face of mature G-layers, they were also detected in the inner face of differentiating G-layers and in the inner face of S2 layer in OW fibres (Fig. 11).

Concerning hemicelluloses seven antibodies were tested, four directed against xylans, one against mannans, two against xyloglucans., all of them detected in fibres of wild-type poplars. Two of them present differences in its distribution when comparing with wild-type poplars: CCRC-M138 which recognizes epitopes present in xylans and that was not detected in transgenics and CCRC-M170, directed against acetylated mannans (Tan et al., 2013) and probably an acetylated glucomannan (Guedes et al., manuscript in preparation). The epitope of mannan recognized by CCRC-M170 were also detected in the whole thickness of mature G-layer in transgenic poplars, indeed to the whole thickness of differentiating G-layer, secondary cell wall of mature G-fibres and OW fibres (Fig. 12).

Three others antibodies directed against xylans were also tested for its distribution in fibres of TW and OW. AX1, which recognizes arabinoxylans (Guillon et al., 2004), CCRC-M119 and CCRC-M146 which probably recognize glucuronoxylans (WallmAbDB) and they present the same pattern of distribution in transgenic and wild-type poplars (Fig. 12). CCRC-M119 is only detected in differentiating G-layer while CCRC-M146 is present in the inner face of differentiating and mature G-layer of TW and also in the inner face of S2 layer in OW fibres. Another group of hemicelluloses, the xyloglucans also present the same pattern of distribution between wild-type and transgenic poplars. The two tested antibodies, CCRC-M1 which recognizes the fucosyl side chain of xyloglucans (Puhlmann et al., 1994) and LM15 which recognizes XXXG motif of xyloglucan (Marcus et al., 2008) were only detected in the PCW/ML of TW and OW fibres through its gradient of differentiation (Fig. 12). This antibodies were not detected in G-layer of wild-type or transgenic poplars.

DISCUSSION

At the onset of this study, we produced antibodies directed against the protein moiety of 2 poplar fasciclin-like arabinogalactan proteins specifically expressed in tension wood (Lafarguette et al., 2004). These antibodies appear rather specific to PopFla, but they probably are able to recognize to some extents related PopFLA. These antibodies have made possible to complete the transcriptional studies that have led to the identification of a set of 10 PopFLAs highly and specifically expressed in tension wood xylem and of 5 others expressed in xylem cells differentiating their secondary cell wall (Lafarguette et al., 2004). These 2 polyclonal antibodies are able to recognize to some extent both PopFLA1 and PopFLA8 recombinant proteins and we may anticipate that they may as well recognize to some extent the other PopFLAs present in the xylem.

Western blot analyses with the Fla1 antibody reveal a specific signal in young and mature TW at circa 66 kDa (Fig. 1). The stronger signal detected in the mature TW probably results from the fact that there are a lot less protein present in mature TW and in consequence for a same amount of total protein analyzed, the proportion of PopFLAs will be higher. The smear in the 66 kDa band is indicative of glycosylation although the detected protein is not highly glycosylated, as suggested by the molecular mass of the corresponding recombinant protein (35kDa) (Fig. 1). Further analyses indicated that the protein associated to this band are mainly co-purified in the membrane bound protein fraction, in accordance to a binding of FLAs to the plasma membrane by their GPI anchor (Fig. 2). Interestingly, a sharp signal is also detected at 66 kDa in the leaf suggesting the presence of a FLA which is not glycosylated in this organ. In addition, 2 other sharper bands detected at *circa* 36 and 40 kDa that may be weakly glycosylated, are not regulated between TW and OW. In comparison, JIM14 also recognize a 66 kDa band regulated between TW and OW (data not shown) that may correspond to PopFLAs while a strong signal is also detected that fits with high molecular weight proteins (115 kDa and higher) that may be either other AGPs or highly glycosylated PopFLAs or PopFLAs associated to high molecular weight polysaccharide complexes such as evidenced by Tan et al. (2013). Interestingly, these high molecular weight proteins are also co-purified in the membrane protein fraction (Fig. 2).

Immunolocalisation studies were also realized with the same anti-FLAs antibodies; however, it appears rather difficult to establish a direct correspondence between western analyses and localization studies. Immunolocalisation carried out with FLA1 and FLA8 antibodies both

revealed a strong labeling at the internal face of differentiating G fibres: however, this labeling completely vanished in mature G fibres: this absence of labeling results either from an elimination of PopFLAs at the end of the maturation process or, more probably, from an hindrance for antibodies access to FLAs specific epitopes. This masking may be either linked to some changes in FLAs conformation, to a stronger glycosylation of these proteins or even to the association of these proteins to high molecular weight compounds. A moderate labeling was consistently detected in the cytoplasm of parenchyma ray cells both from TW and OW areas. This labeling may correspond to the low MW bands detected during western blots analyses and also to the PopFLAs 11 to 15 not regulated in the TW. It remains to determine what can be the function of these PopFLAs in ray cells. Finally, the strong signal detected previously by JIM 14 in the primary cell wall (Lafarguette et al., 2004) are not likely to correspond to PopFLAs. Interestingly, JIM 14 also detect a strong signal in the primary cell wall of mature wood (both TW and OW), while it was not present in young differentiating xylem. In conclusion, to this first part of the paper, we were able to detect specific signals indicative of the presence of PopFLAs at the inner face of the G-layer, while less specific signals were consistently detected in the rays. It would be worth now to design antibodies specifically targeted to PopFLAs 11 to 15 in order to determine where these proteins are expressed in xylem cells differentiating their secondary cell walls.

To get a better knowledge on the function of *PopFLA* in TW formation, we produced transgenic poplar plants with altered *PopFLA1* expression. Very few transformation events (less than 10) were obtained, with very few transformed *calli* able to regenerate plants and finally with only one (the Miyuki event) harboring a strongly altered phenotype: this suggests a strong effect of the alteration of PopFLA1 over-expression on plant development and likely the selection of less affected events. According to the molecular characterization of the Miyuki plants, it seems very likely that in this transgenic line, the PopFLA1 gene expression has been affected. Southern analysis indicates a single insertion site, this site is currently under determination.

Miyuki plants exhibit a very strong phenotype with an apparent reduction or suppression of apical dominance reminiscent of the pendula phenotype observed in several other tree species, and with enhanced lateral branching as observed by (Sun et al., 2004) in GM tomato over-expressing an AGP. Apparently, all vascular tissues appear affected by the genetic modification, stems, petioles, midribs, translating in the disturbed plant stature. In addition, secondary growth appears also strongly affected, with strong reduction in stem diameter and

also in leaf size. When tilting the stem of Miyuki plants, TW still seems to be preferentially formed at the upper side of the stem, while TW mechanical properties were not more effective to reorient stem axis: indeed when released from their tilted position stems curve down in place of recovering a vertical position as is observed for control plants.

Stem anatomical observations indicate that in Miyuki plants left in free growth, tension wood detected by blue astra and safranin coloration formed following a spiral (Fig. 5). This formation seems to occur very early in young stem, but not on the whole stem circumference, probably leading to (or being the consequence of) the twisted stem growth. Indeed, the use of a constitutive promoter to drive PopFLA1 transgene expression may affect primary as well as secondary growth.

Stem anatomical observations revealed apparent strong xylem alteration. Ray cells appears a lot thicker with rectangular sometimes almost isodiametric shape, in any case, a lot less elongated than ray cells from wild-type plants, with a very dense cell content. In addition, their cell walls exhibited strong pink-red coloration by safranin indicative of an increased level in polyphenols or lignin. In addition, rays appear most of the time multiseriata, suggesting an early effect of the modification in the cambium when cambial cells get specified to differentiate into radial initials that give rise to ray cells.

Likewise, fibers appear strongly affected, with numerous areas with fibre cell walls weakly colored by safranin, indicative of a reduced lignification, with cell wall therefore mostly colored blue without G-layer though. Stem sections also exhibit numerous TW areas with apparently normal G fibres, apparently organized in a helical pattern. More interestingly, observation of longitudinal sections, numerous “fibres” actually do not exhibit fibre characteristic fusiform shapes but instead rectangular shape, shorter than regular fibre, actually more similar to parenchyma cells. This may be related to the effects of AGP modifications observed in GM cotton fibers with altered expression of a FLA gene that led to the involvement of AGPs for normal fiber initiation and elongation through tip intrusive growth (Huang et al., 2013, Knox et al., 1995). Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*.

Finally, vessels do not seem much affected, also they appears more often clustered together than in wild-type plants. They are also smaller in diameter with sometimes collapsed shapes. Therefore, the strong phenotype observed at the plant scale seems to be, at least partly, the consequence of the alterations at the level of xylem stem cells.

Surprisingly, anti-FLA antibodies did not detect any signal in Miyuki G-fibres (as observed in wild type G-layer), whereas a signal is consistently detected in Miyuki rays whether or not in TW area: in apparent contradiction to both qRT-PCR and western analyses, the signal remains of the same amplitude or a little stronger than in rays from wild-type plants. Interestingly, the labeling patterns obtained using Fla8 antibodies appeared similar to Fla1 labeling patterns, as well as those obtained with JIM14 and JIM8. Even more interestingly, the signal detected in the primary cell wall with those 2 antibodies also disappeared in Miyuki stem sections. However, this was not the case for another antibody potentially directed against an AGP epitopes, CCRC-M7. All of this suggests that Fla1 over-expression directly or indirectly affected cell wall building in xylem fibres, while some similar mechanisms may occur between primary cell wall and G-layer edification.

We also evaluated the labeling patterns on the cell wall of xylem Miyuki plants with a set of antibodies directed against epitopes from polysaccharides present during the maturation of the G-layer (Guedes et al., manuscript in preparation). LM5 that recognizes RG-I β -1,4-galactan side chains weakly labels differentiating G-layers and the label is even weaker in mature G-layer in Miyuki plants. For comparison, LM5 labeling is very strong in differentiating G-layer and is restricted to the external side of mature G-layer (Arend et al., 2008; Guedes et al., manuscript in preparation). Likewise, LM6 labeling, directed against RG-I arabinan side chains, is not present in Miyuki plant stems differentiating G-layers as is the case in wild-type plants. On the reverse, the RG1 labeling is visible even in differentiating G-layers, while in wild type plants, the labeling with RG1 is only visible in mature G-layers. The labeling observed for JIM19, directed against an extension epitope, is only present in differentiating G-layers of Miyuki plants, while it remains present in mature g-layers of wild-type plants. Finally, it is worth to notice that the CCRC-M170 antibody directed against an acetylated mannan epitope, reveals a labeling in the whole thickness of differentiating and mature G-layer, whereas this labeling vanishes in wild-type G-layer. From all these observations, it appears that the genetic modification in Miyuki plants led to several important modifications in the xylem cell walls of tension wood G fibres.

To explain these important differences, we may formulate an hypothesis that may explain most but not all of the observed differences: indeed, all happens as if the early overexpression of PopFLA1 in Miyuki plants may speed up G-layer maturation process that lead, as previously demonstrated on wild type plants, to the disappearance of the Fla1 labeling in mature G fibres, resulting for example from the association of PopFLA1 with other cell wall

components hindering the antibody access to PopFLA epitopes. Alternatively, the decreased cambial activity resulting from the genetic modification translated in a decreased production of xylem cells, which results in the presence of matured xylem cells in close vicinity to the cambial zone. In other words, the cells observed in what we defined as differentiating G fibres were in fact already mature G fibres. This hypothesis permit to account for the disappearance of the Fla1 labelling in all the observed Miyuki G-fibres, as well as the precocious disappearing of LM5 and LM6 labeling: indeed, if we follow the hypothesis of an hydrolysis of RG-I side chains during G-layer maturation, our results with the labeling observed with these antibodies are in accordance with the presence of mature G-layer in the vicinity of the cambial zone in Miyuki plants, whether it is the results of PopFLA1 direct action on the maturing process or most likely to a decreased cell division rate in the cambium due to a global effect of PopFLA1 altered expression. However, this hypothesis does not give any clue to explain labeling pattern of the CCRC-M170 antibody directed against acetylated glucomannans. Indeed, this labeling remains visible in mature G-layers of Miyuki plants, while it is no more visible in mature wild-type plants. Likewise, the disappearance of the JIM19 labeling in mature G-layers of Miyuki plants, while it remains visible in mature g-layers from wild-type plants cannot be easily explained by this hypothesis. Also, the question remains to explain why the formation of TW G fibres in the Miyuki plants is not efficient enough to permit the stem to be reoriented toward the vertical in tilted Miyuki plants. This may be related to a reduced cambial activity due to the alteration in PopFLA1 expression or also to other modifications in the building of tension wood cell walls in these transgenic plants. Our observation are in accordance with the effects observed by (MacMillan et al., 2010) on the effect in *Arabidopsis thaliana* T-DNA double mutant of FLA11 and FLA12, homologous to PopFLA1, the plant mechanical properties through their potential action on both cellulose deposition and the integrity of the cell-wall matrix. It would be certainly useful to evaluate if some cell wall properties such as the cellulose microfibril angle are not altered in the Miyuki cell walls. Certainly, the pleiotropic effects of the genetic modifications induced by the potential constitutive expression of PopFla1 are so numerous that they obscure the primary function of PopFLA1 in tension wood formation. Probably, the production of transgenic poplar plants modified for a tension wood specific over-expression or down-regulation of *PopFLA1* expression in transgenic poplar plants may bring some novel valuable information on these proteins whose functions remains to be clearly determined.

LITERATURE CITED

- Almeras T, Fournier M. 2009.** Biomechanical design and long-term stability of trees: Morphological and wood traits involved in the balance between weight increase and the gravitropic reaction. *Journal of Theoretical Biology*, **256**: 370-381.
- Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B. 2006.** Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in Populus: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant Journal*, **45**: 144-165.
- Arend M. 2008.** Immunolocalization of (1,4)-beta-galactan in tension wood fibers of poplar. *Tree Physiology*, **28**: 1263-1267.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003.** Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, **54**: 519-546.
- Bonser RHC, Ennos AR. 1998.** Measurement of prestrain in trees: implications for the determination of safety factors. *Functional Ecology*, **12**: 971-974.
- Bowling AJ, Vaughn KC. 2008.** Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. *American Journal of Botany*, **95**: 655-663.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993.** A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, **11**: 113-116
- Chang SS, Clair B, Ruelle J, Beauchene J, Di Renzo F, Quignard F, Zhao GJ, Yamamoto H, Gril J. 2009.** Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 3023-3030.
- Clair B, Almeras T, Pilate G, Jullien D, Sugiyama J, Riekel C. 2011.** Maturation Stress Generation in Poplar Tension Wood Studied by Synchrotron Radiation Microdiffraction. *Plant Physiology*, **155**: 562-570.

- Clair B, Almeras T, Yamamoto H, Okuyama T, Sugiyama J. 2006.** Mechanical behavior of cellulose microfibrils in tension wood, in relation with maturation stress generation. *Biophysical Journal*, **91**: 1128-1135.
- Clair B, Gril J, Di Renzo F, Yamamoto H, Quignard F. 2008.** Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood. *Biomacromolecules*, **9**: 494-498.
- Clair B, Ruelle J, Thibaut B. 2003.** Relationship between growth stress, mechanical-physical properties and proportion of fibre with gelatinous layer in chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Holzforschung*, **57**: 189-195.
- Costa M, Pereira AM, Rudall PJ, Coimbra S. 2013.** Immunolocalization of arabinogalactan proteins (AGPs) in reproductive structures of an early-divergent angiosperm, *Trithuria* (Hydatellaceae). *Annals of Botany*, **111**: 183-190.
- Curtis MD, Grossniklaus U. 2003.** A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology*, **133**: 462-469.
- Damerval C, De Vienne D, Zivy M, Thiellement H. 1986.** Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *ELECTROPHORESIS*, **7**: 52-54.
- Dejardin A, Laurans F, Arnaud D, Breton C, Pilate G, Leple JC. 2010.** Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies*, **333**: 325-334.
- Dejardin A, Leple JC, Lesage-Descauses MC, Costa G, Pilate G. 2004.** Expressed sequence tags from poplar wood tissues - A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biology*, **6**: 55-64.
- Dellaporta S, Wood J, Hicks J. 1983.** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-21.
- Dolan L, Linstead P, Roberts K. 1995.** An AGP epitope distinguishes a central metaxylem initial from other vascular initials in the *Arabidopsis* root. *Protoplasma*, **189**: 149-155.
- Du S, Yamamoto F. 2007.** An Overview of the Biology of Reaction Wood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology*, **49**: 131-143.

- Elkins T, Zinn K, McAllister L, Hoffmann FM, Goodman CS. 1990.** Genetic-analysis of a *Drosophila* neural cell-adhesion molecule-interaction of fasciclin-I and abelson tyrosine kinase mutations. *Cell*, **60**: 565-575.
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A. 2010.** Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *Plant Physiology*, **153**: 403-419.
- Fang CH, Clair B, Gril J, Liu SQ. 2008.** Growth stresses are highly controlled by the amount of G-layer in poplar tension wood. *Iawa Journal*, **29**: 237-246.
- Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ. 2001.** The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, **47**: 161-176.
- Girault R, Bert F, Rihouey C, Jauneau A, Morvan C, Jarvis M. 1997.** Galactans and cellulose in flax fibres: Putative contributions to the tensile strength. *International Journal of Biological Macromolecules*, **21**: 179-188.
- Gorshkova TA, Chemikosova SB, Lozovaya VV, Carpita NC. 1997.** Turnover of galactans and other cell wall polysaccharides during development of flax plants. *Plant Physiology*, **114**: 723-729.
- Guillon F, Tranquet O, Quillien L, Utile JP, Ortiz JJO, Saulnier L. 2004.** Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *Journal of Cereal Science*, **40**: 167-182.
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlen M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G. 2001.** A transcriptional roadmap to wood formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 14732-14737.
- Huang G-Q, Gong S-Y, Xu W-L, Li W, Li P, Zhang C-J, Li D-D, Zheng Y, Li F-G, Li X-B. 2013.** A Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein, GhFLA1, Is Involved in Fiber Initiation and Elongation of Cotton. *Plant Physiology*, **161**: 1278-1290.
- Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ. 2003.** The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of Arabidopsis. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. *Plant Physiology*, **133**: 1911-1925.

- Jones L, Seymour GB, Knox JP. 1997.** Localization of Pectic Galactan in Tomato Cell Walls Using a Monoclonal Antibody Specific to (1[->]4)-[beta]-D-Galactan. *Plant Physiology*, **113**: 1405-1412.
- Jourez B, Riboux A, Leclercq A. 2001.** Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). *Iawa Journal*, **22**: 133-157.
- Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T. 2009.** Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. *Journal of Wood Science*, **55**: 250-257.
- Kim JS, Daniel G. 2012.** Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. *Planta*, **236**: 35-50.
- Knox JP. 1997.** The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. In: Jeon KW ed. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 171.
- Knox JP, Linstead PJ, Peart J, Cooper C, Roberts K. 1991.** Developmental regulated epitopes of cell-surface arabinogalactan proteins and their relation to root-tissue pattern-formation. *Plant Journal*, **1**: 317-326.
- Knox JP, Peart J, Neill SJ. 1995.** Identification of novel cell, surface epitopes using a leaf epidermal-strip assay system. *Planta*, **196**: 266-270.
- Lafarguette F, Leple JC, Dejardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses MC, Pilate G. 2004.** Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist*, **164**: 107-121.
- Lamport DTA, Kieliszewski MJ. 2005.** Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins. *Plant Biosystems*, **139**: 60-64.
- Leple J, Brasileiro A, Michel M, Delmotte F, Jouanin L. 1992.** Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports*, **11**: 137-141.
- MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG. 2010.** Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant Journal*, **62**: 689-703.

- Marcus SE, Verherbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WGT, Knox JP. 2008.** Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *Bmc Plant Biology*, **8**.
- Matsuzaki J, Masumori M, Tange T. 2007.** Phototropic bending of non-elongating and radially growing woody stems results from asymmetrical xylem formation. *Plant Cell and Environment*, **30**: 646-653.
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W. 2001.** Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology*, **47**: 239-274.
- Mellerowicz EJ, Sundberg B. 2008.** Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 293-300.
- Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ. 2007.** Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar - A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant and Cell Physiology*, **48**: 843-855.
- Norberg PH, Meier H. 1966.** Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung*, **20**: 174-178.
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z, Bootten T, Albert A, Davis RH, Chennareddy C, Dong R, O'Shea B, Rossi R, Leoff C, Freshour G, Narra R, O'Neil M, York WS, Hahn MG. 2010.** A Comprehensive Toolkit of Plant Cell Wall Glycan-Directed Monoclonal Antibodies. *Plant Physiology*, **153**: 514-525.
- Persson S, Wei H, Milne J, Page GP, Somerville CR. 2005.** Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 8633-8638.
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A. 2001.** Wood formation in trees. *Plant Physiology*, **127**: 1513-1523.
- Puhlmann J, Bucheli E, Swain MJ, Dunning N, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG. 1994.** Generation of Monoclonal Antibodies against Plant Cell-Wall Polysaccharides

- (I. Characterization of a Monoclonal Antibody to a Terminal [alpha]-(1->2)-Linked Fucosyl-Containing Epitope. *Plant Physiology*, **104**: 699-710.
- Qiu D, Wilson IW, Gan S, Washusen R, Moran GF, Southerton SG. 2008.** Gene expression in Eucalyptus branch wood with marked variation in cellulose microfibril orientation and lacking G-layers. *New Phytologist*, **179**: 94-103.
- Ralet MC, Tranquet O, Poulain D, Moise A, Guillon F. 2010.** Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta*, **231**: 1373-1383.
- Scurfield G. 1973.** Reaction wood: its structure and function. *Science*, **179**: 647-655.
- Seifert GJ, Roberts K. 2007.** The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*. Palo Alto, Annual Reviews.
- Showalter AM. 2001.** Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **58**: 1399-1417.
- Southern EM. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**: 503-517.
- Sun W, Kieliszewski MJ, Showalter AM. 2004.** Overexpression of tomato LeAGP-1 arabinogalactan-protein promotes lateral branching and hampers reproductive development. *The Plant Journal*, **40**: 870-881.
- Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J, Yuan CH, Hao ZY, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D. 2013.** An Arabidopsis Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *Plant Cell*, **25**: 270-287.
- Tan L, Qiu F, Lamport DTA, Kieliszewski MJ. 2004.** Structure of a Hydroxyproline (Hyp)-Arabinogalactan Polysaccharide from Repetitive Ala-Hyp Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 13156-13165.
- Timell TE. 1969.** The chemical composition of tension wood. *Svensk Papperstidning*, **72**: 173-181.
- van Hengel AJ, Roberts K. 2002.** Fucosylated arabinogalactan-proteins are required for full root cell elongation in arabidopsis. *Plant Journal*, **32**: 105-113.

Verhertbruggen Y, Marcus SE, Haeger A, Ordaz-Ortiz JJ, Knox JP. 2009. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate Research*, **344**: 1858-1862.

Willats WGT, Marcus SE, Knox JP. 1998. Generation of a monoclonal antibody specific to (1→5)- α -l-arabinan. *Carbohydrate Research*, **308**: 149-152.

TABLE

Table 1. Detection of different structures of polysaccharides in G-layer and its distribution through the gradient of differentiation

Glycan	Probe	Differentiating G-layers			Mature G-layers			S1/S2	PCW/ML	Cell wall corner
		Whole thickness	Inner face	Outer face	Whole thickness	Inner face	Outer face			
AGP	popFla1	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	popFla8	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	JIM14	- / -	+ / +	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -	+ / -	+ / -
	JIM8	- / -	+ / +	- / -	+ / -	- / -	- / -	+ ^A / -	- / -	- / -
	MAC207	+ / +	- / -	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	CCRC-M7	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -
	LM19	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -
Pectins	LM20	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -
	JIM7	+ / -	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	- / -
	LM6	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	LM5	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -	+ / +	+ / +
	CCRC-M107	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -	- / +	- / -
	CCRC-M12	- / -	+ / +	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / + ^B	- / +	- / -
	CCRC-M14	- / -	- / +	- / -	+ / -	- / +	- / -	- / + ^A	- / -	- / -
	RGI	- / -	- / +	- / -	+ / -	- / +	- / -	- / + ^A	- / -	- / -
	CCRC-M138	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	- / -	- / -
	CCRC-M119	- / -	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
Xylans	CCRC-M146	- / -	+ / +	- / -	- / -	+ / +	- / -	+ ^C / + ^C	- / -	- / -
	AX1	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -	- / -
Mannan	CCRC-M170	+ / +	- / -	- / -	- / +	- / -	- / -	+ ^D / + ^D	- / -	- / -
Xyloglucans	LM15	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -
	CCRC-M1	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / +	- / -
Extensin	JIM19	- / -	+ / +	- / -	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -

Notes: ML= middle lamella; PCW= primary cell wall; SCW= secondary cell wall; S1= secondary cell wall layer 1; S2= secondary cell wall layer 2; - = not detected; + = detected; ^A detected in the inner face of S2 in differentiating OW fibres; ^B detected in the S1/S2 layers of mature OW fibres; ^C detected in the inner face of S2 in differentiating and mature OW fibres and in the inner face of differentiating and mature G-layers. ^D Detected in the S1/S2 of OW fibres and in the S1/S2 of mature TW fibres.

FIGURES

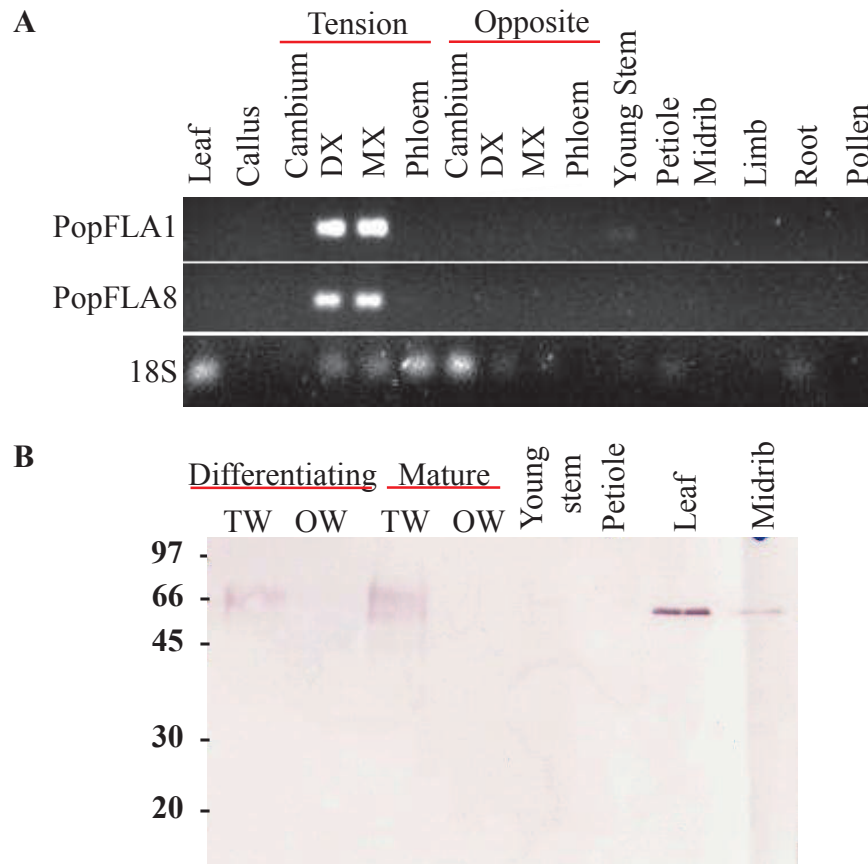


Figure 1. Semi-quantitative polymerase chain reaction on reverse transcribed cDNAs from different poplar wild-type tissues (A). PopFLA1 and PopFLA8 expression was assessed in different tissues. Detection of FLAs by western blot in different tissues (B). Control amplifications have been done using a primer set amplifying a poplar *18S rRNA* housekeeping gene.

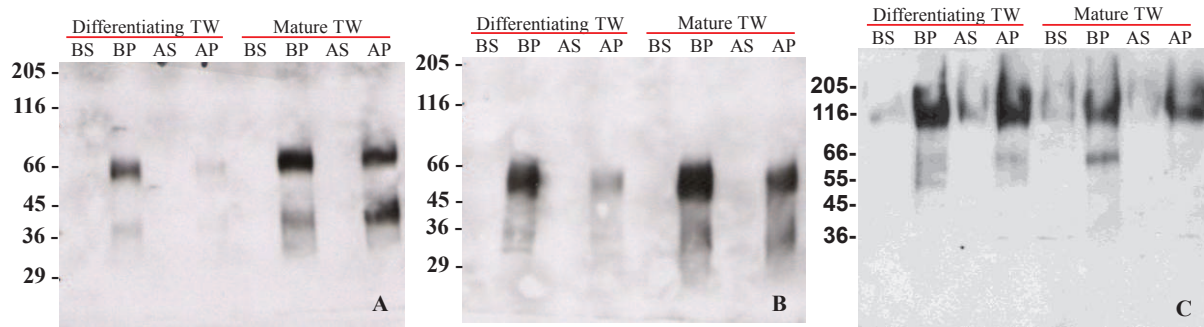


Figure 2. In western-blot analyzes PopFla1 (A), PopFla8 (B) and JIM14 (C) antibodies label polypeptides present in plasma membrane-bound proteins (BS and AS). JIM 14 labels also cell wall-bound proteins (BP and AP). These proteins were extracted from differentiating TW and mature TW. Protein fractions were extracted and separated as described in material and methods, protocol 1.

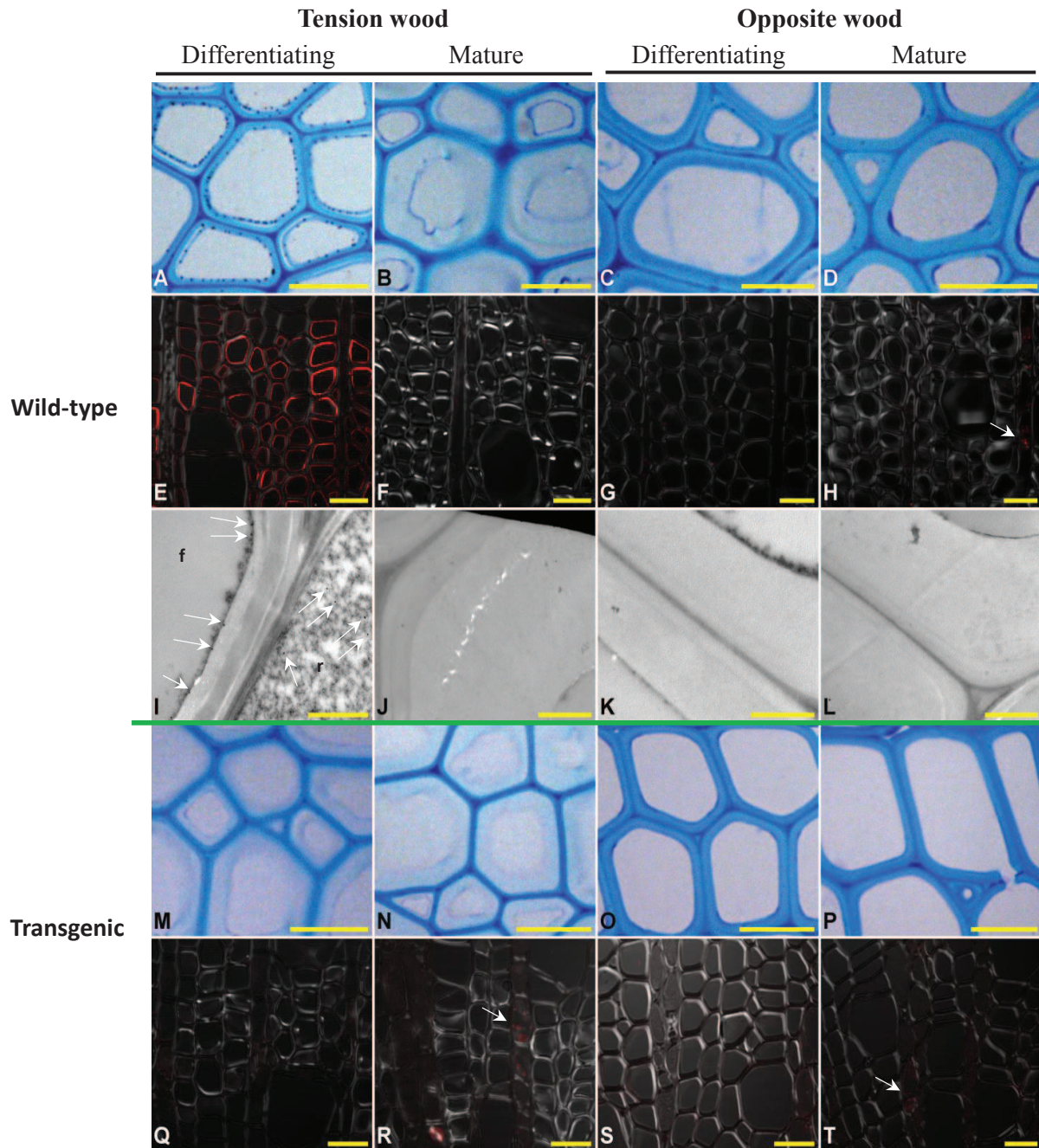


Figure 3. Immunolabeling using FLA1 antibody. Fig 3A to 3L: FLA1 detection at the inner face of differentiating fibers of wild-type poplar by immunogold labeling and optical microscopy (Fig 3A-3D), immunofluorescent labeling and confocal microscopy (Fig 3E-3H) and finally, immunogold labeling and MET (Fig 3I-3L). Fig 3M-3T: no signal in the fibers of Miyuki plants detected using FLA1 antibody using immunogold labeling and optical microscopy observations (Fig 3M-3P) or immunofluorescent labeling and confocal microscopy (Fig 3Q-3T)). For both Miyuki and wild-type plants, a rather strong signal was detected in the rays of both TW and OW. Scale bar = 20 μ m.

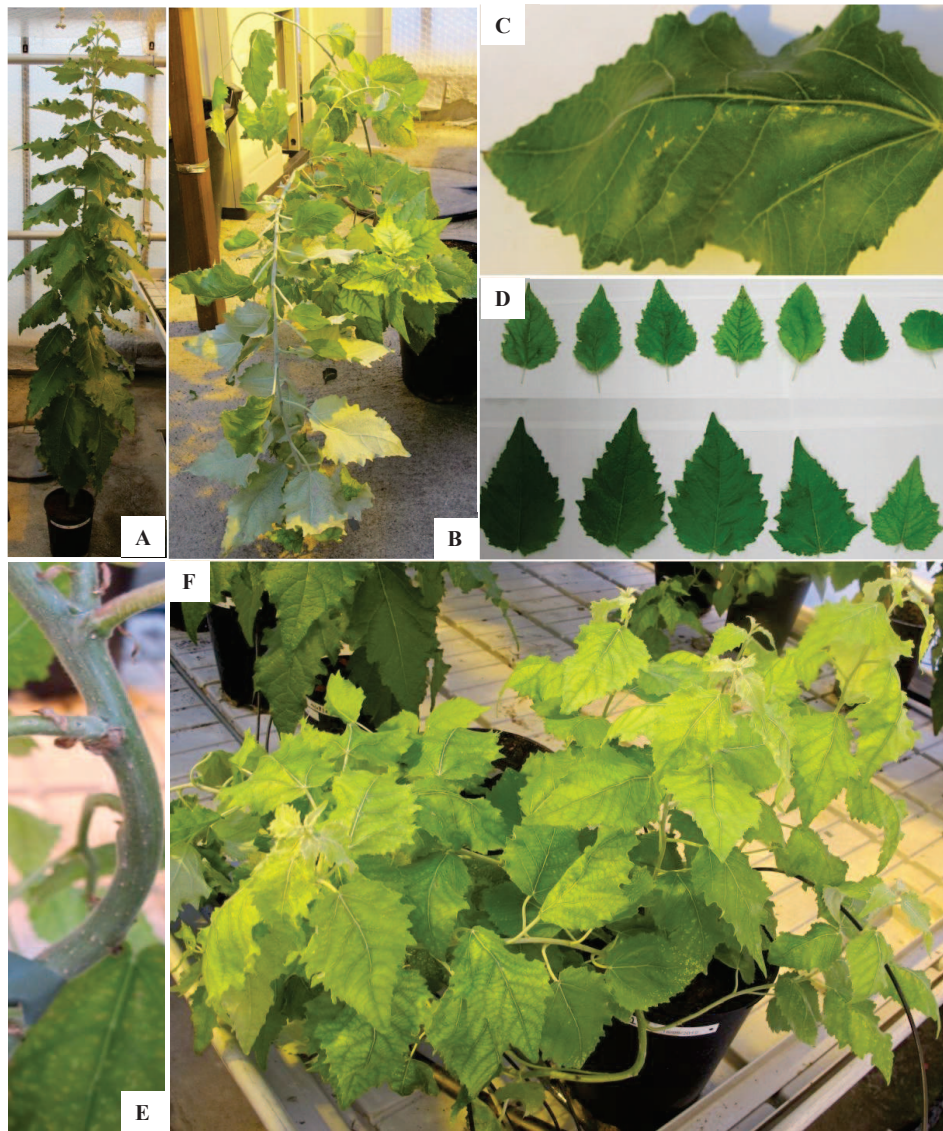


Figure 4. Morphological differences exhibited by transgenic poplars. Wild-type poplar (A); transgenic poplar after detachment of its tutor showing a tendency to growth in an horizontal position (B); curled leaves (C) and small leaves of transgenic poplars (upper side) compared to wild-type poplar leaves (underside) (D); wave and twisted growth of the stem (E) and crawling growth of non-tutored transgenic poplars (F).

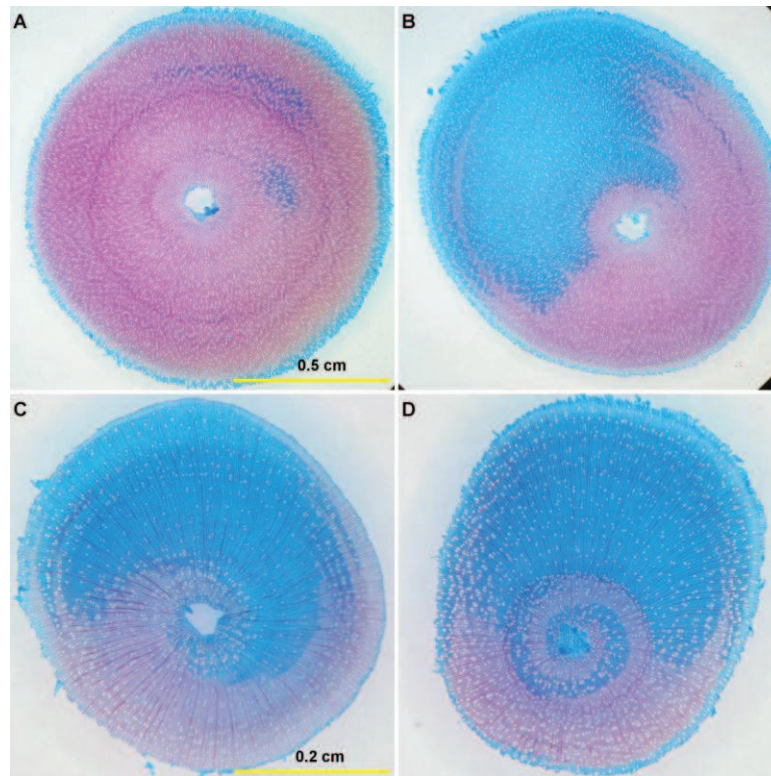


Figure 5. Distribution of TW and OW in transgenic and wild-type poplar stem. Wild-type control, plant that was not-tilted and also produce few TW (A). Scale bar = 0.5 cm. Wild-type tilted showing formation of TW in one side of stem which correspond to upper side of stem in trees (B). Scale bar = 0.5 cm. Transgenic not-tilted showing TW formation in a spiral way but more concentrated in one side of plants (C). Scale bar = 0.2 cm. Transgenic tilted showing TW distribution in a stronger spiral way but also more concentrated in one side of stem (D). Scale bar = 0.2 cm.

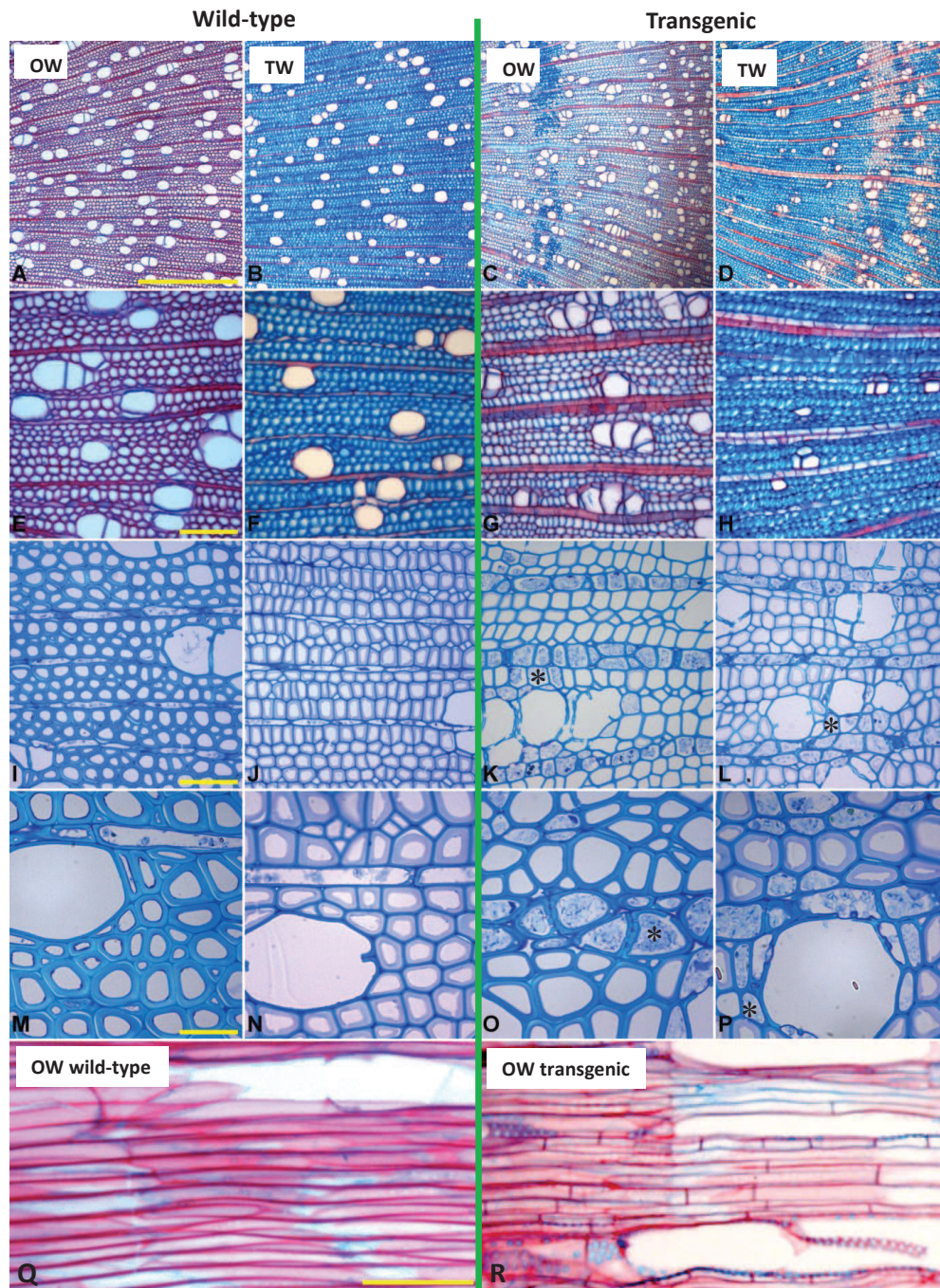


Figure 6. Anatomical comparisons between wild-type and transgenic poplar xylem. Transversal section of wood showing the differences in proportion between OW and TW and also between wild-type and transgenic poplars (A-D). Scale bar = 500 µm. Difference between ray cell distribution between wild-type and transgenic. In transgenic, rays are frequently biseriate and more sectioned (E-H). Scale bar = 100 µm. View in detail of anatomical differences between wild-type and transgenic poplars and the presence of a different particular type of cell indicated by * frequently find associated with biseriate vessels and similar to parenchyma ones (I-L). Scale bar = 50 µm. M-P View in more detail of « parenchyma – like » cells (M-P). Scale bar = 20 µm. longitudinal section of OW of wild-type and transgenic. In transgenic plants fibers are more rectangular shape while in wild-type they present more elongated shape with tapered ends (Q-R). Scale bar = 100 µm.

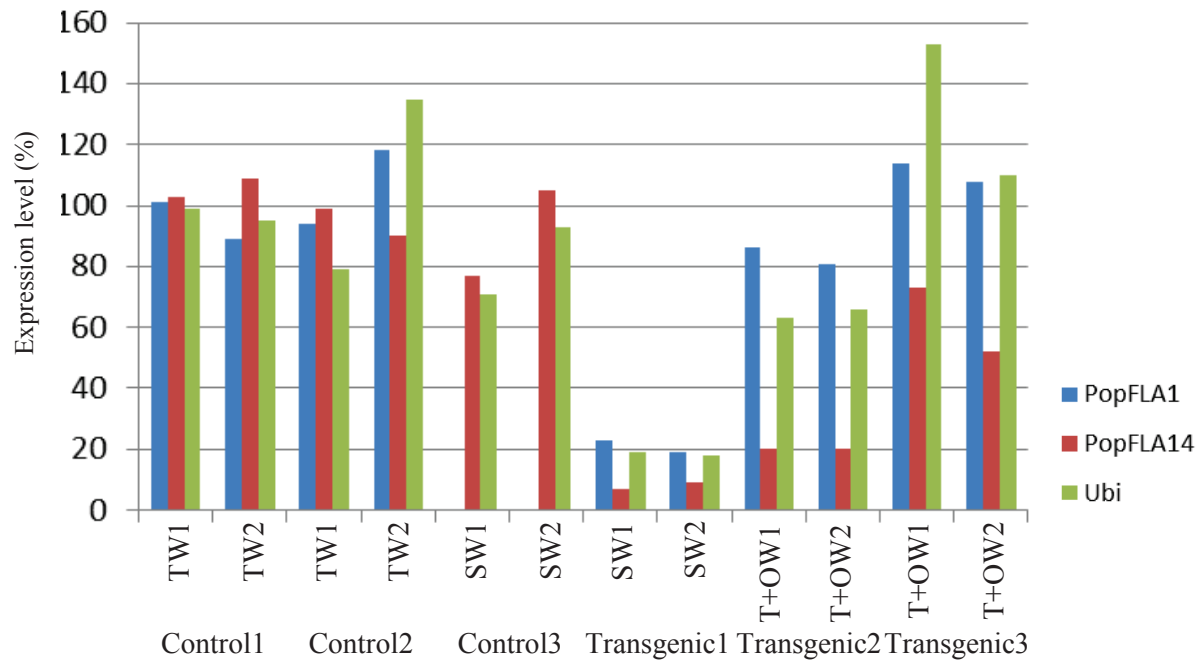


Figure 7. Expression level of PopFLA1 and PopFLA14 in TW of wild type plants and in xylem of wild-type plants which growth straight (SW) and in transgenic plants that growth “normal” (SW) and plants which growth attached (T+O).

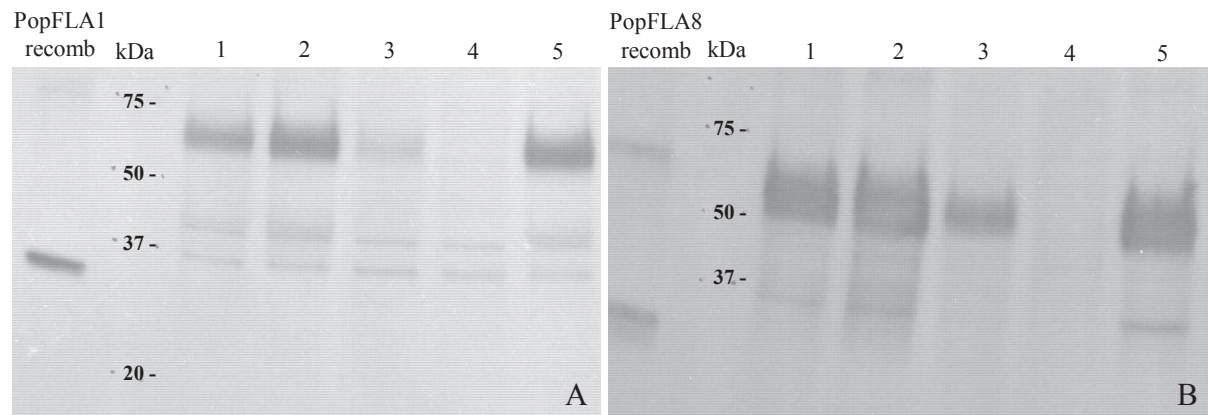


Figure 8. In western-blot analyzes PopFla1 (A), PopFla8 (B) antibodies labelling. These proteins were extracted from transgenic plants 1 and 2 of whole stem (tension and opposite wood), from control poplars which growth straight (3) and from opposite wood (4) and tension wood (5) of the same tree. Proteins were separated by SDS-PAGE.

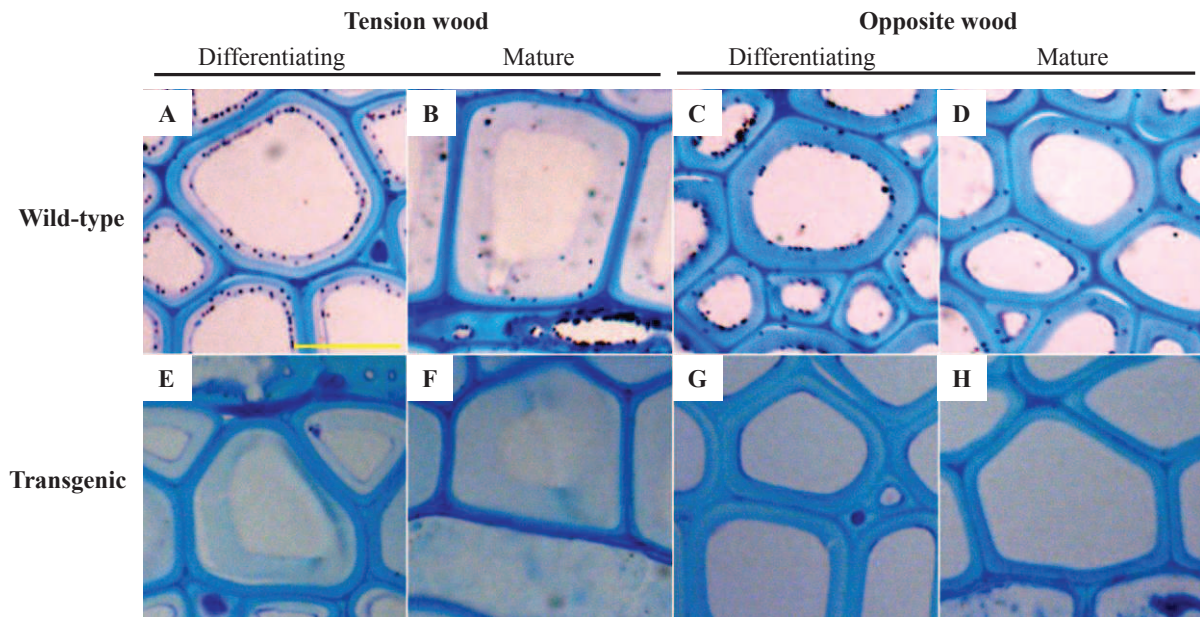


Figure 9. AGP epitope detection with JIM8 antibody; in wild-type poplar (A-D) and Miyuki plant (E-H): in the WT, signals were detected at the inner face of differentiating G-layer (A); in the whole thickness of mature G-layer (B); at the inner face of S2 layer in differentiating OW fibers (C); no signal in mature OW fibers (D). no signal using JIM8 in transgenic poplar plant. Scale bar = 10 μ m.

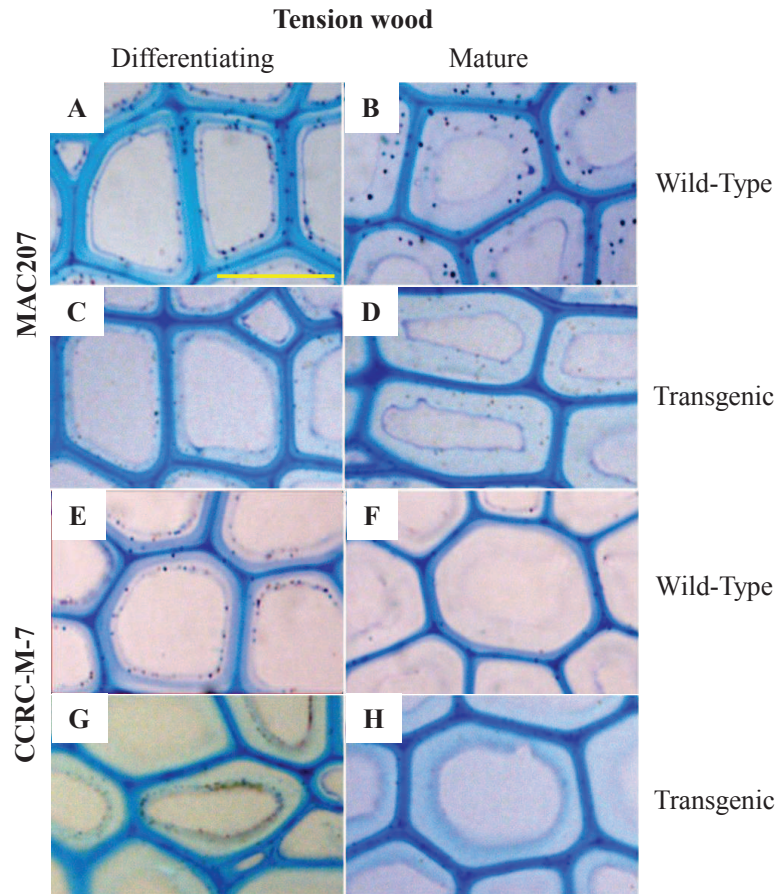


Figure 10. AGP detection using MAC207 and CCRC-M7 antibodies in TW of wild-type and transgenic poplar. Both antibodies recognize epitopes present in AGP proteins. MAC207 labelling is present at the inner face of differentiating G-layer (A and C) and in the thickness of mature G-layer of wild-type and transgenic (B and D). CCRC-M7 labelling is present at the inner face of differentiating G-layer (E and G) and absent in mature G-layer (F and H). Scale bar = 20 μ m.

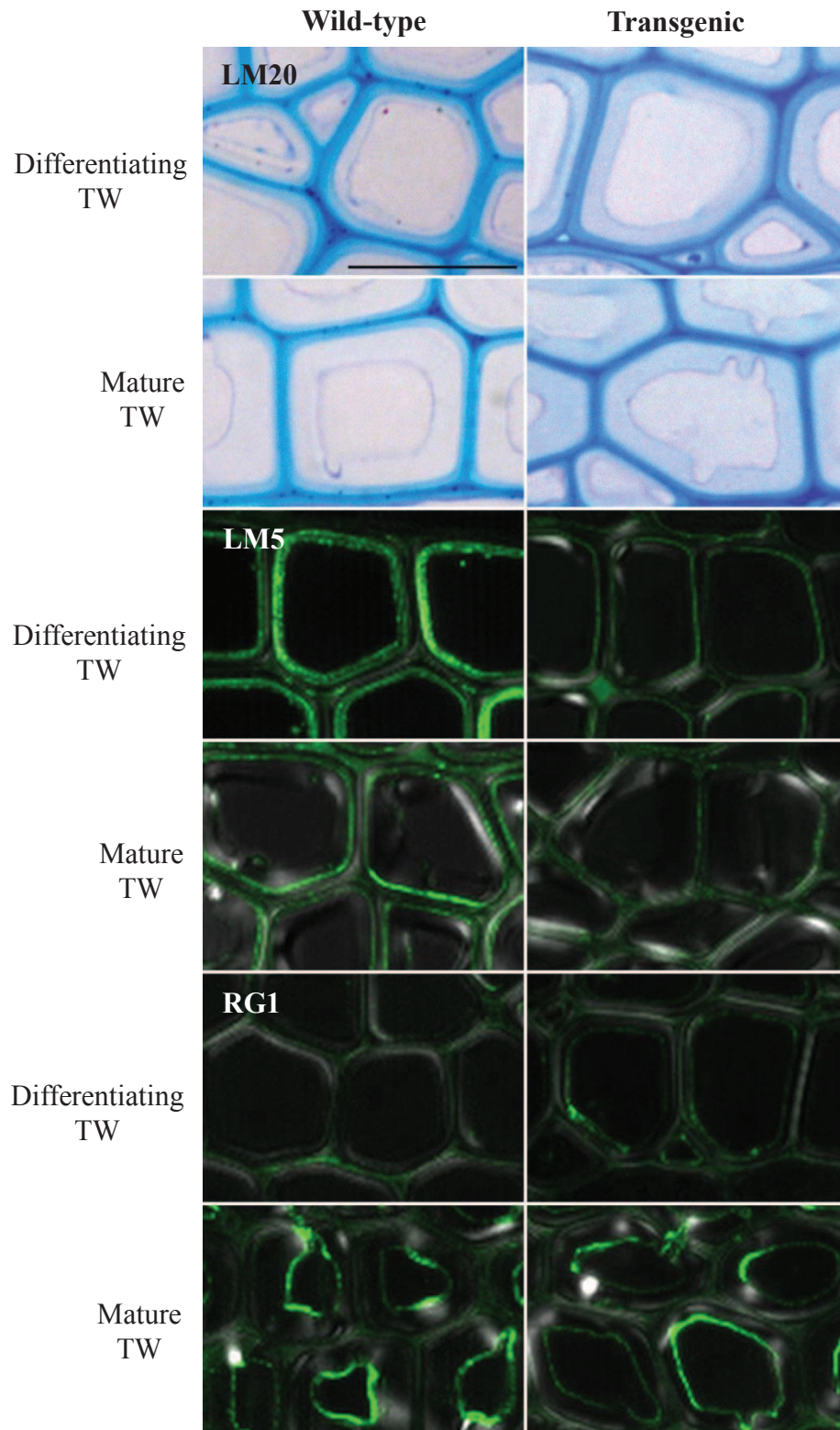


Figure 11. Immunogold labeling of TW and OW of wild-type and transgenic poplars with: LM20 directed against HG domain. Immunofluorescence labeling with LM5 directed against galactan present in RG-I side chains; and RG1 directed against RG-I backbone. Details of the observations are presented in Table I. Scale bar = 20 μm .

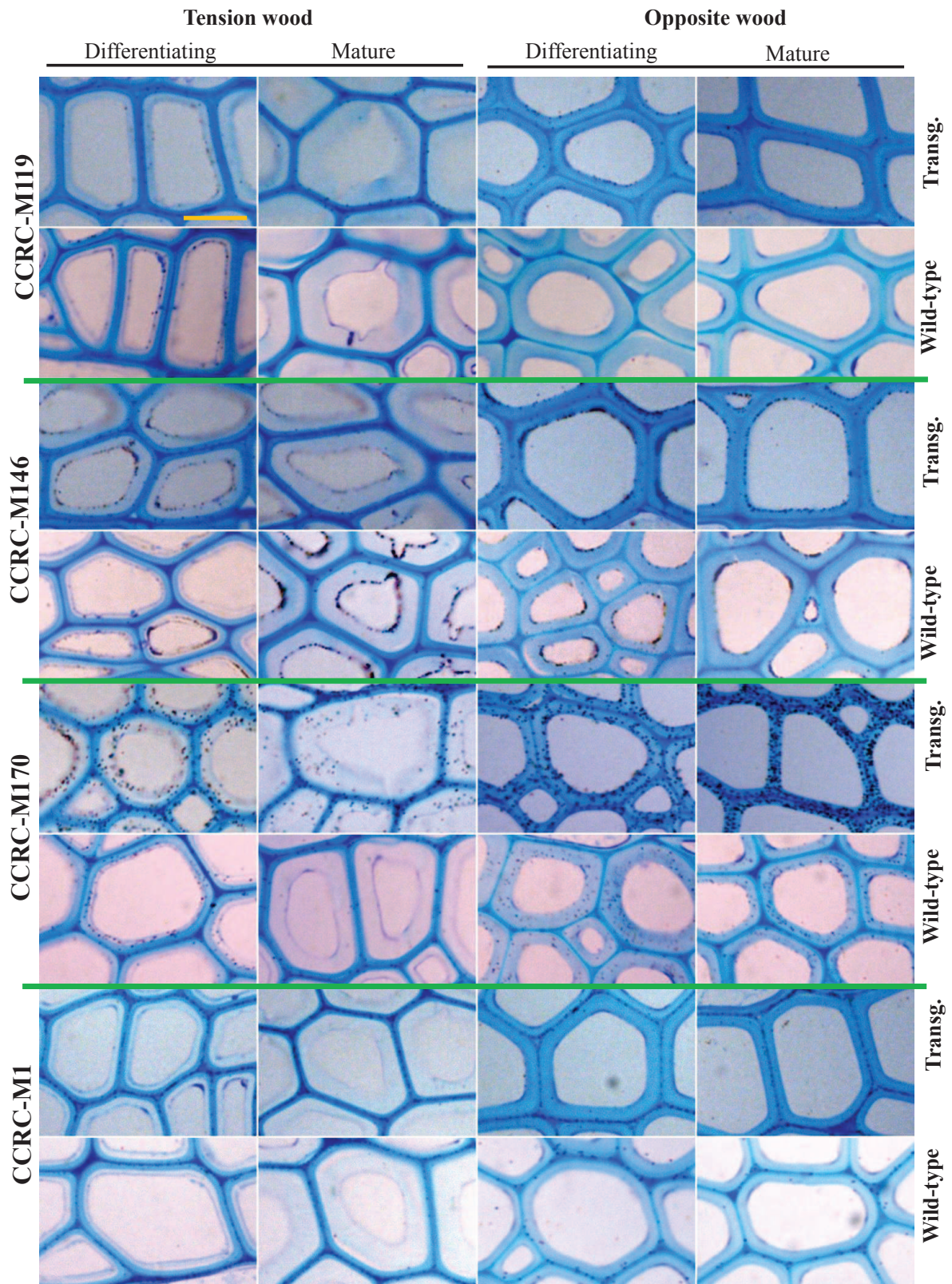


Figure 12. Immunogold labeling of TW and OW of wild-type and transgenic poplars with CCRC-M119, CCRC-M170 and CCRC-M1 which recognize epitopes from xylan, acetylated glucomannans and fucosylated xyloglucans, respectively, according to hierarchical clustering of ELISA data obtained from <http://www.wallmabdb.net>. Labelling patterns are presented in Table I. Scale bar = 10 μ m.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

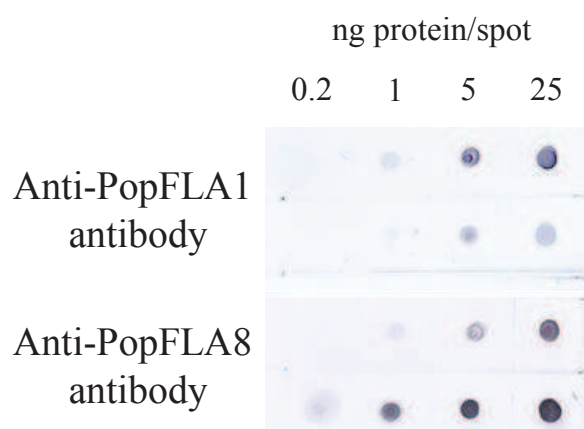


Figure S1. Cross-reaction of PopFLA1 and PopFLA8 antibodies, with spotted PopFLA1 in the first and third lines and PopFLA8 in the second and fourth lines.

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

Ce travail de thèse avait pour objectif d'identifier les molécules impliquées dans la création de la tension dans le bois de tension chez le peuplier. Pour cela, des couches G ont été isolées à partir du bois de tension de jeunes arbres du clone de peuplier INRA 717-1B4 et leur composition a été déterminée par des analyses biochimiques. L'évolution de cette composition au cours de la différenciation de la couche G et des autres couches de la paroi des fibres de BT et BO a été également déterminée par immunolocalisation. Enfin, pour compléter cette étude, l'implication de *popFla1*, un des gènes les plus exprimés et fortement régulé lors de la formation du BT, a été analysée par génétique inverse.

Des études d'immunolocalisation ont permis de tracer un profil de la composition en polysaccharides dans les différentes couches des parois des fibres du bois de tension et du bois opposé pour deux hybrides de peuplier, les clones INRA 717-1B4 et Ogy (figure 1). Afin de simplifier la comparaison entre la paroi des plants témoin et transgénique (présenté figure 2), ne sont représentés que les anticorps qui ont également été testés dans le peuplier transgénique (Tableau 1, chapitre 2). Chaque symbole représente un profil de marquage et peut représenter un seul anticorps ou plusieurs ayant un même profil de marquage.

Lors de l'analyse de ce profil, il apparaît que la PCW/ML présente la même composition en polysaccharides dans le BT et dans le BO tout au long du gradient de différenciation des cellules du xylème (Fig. 4, chapitre 1). Les différents polysaccharides détectés dans la PCW/ML, RG-I, HG et AGPs, présentent pour la plupart des caractéristiques hydrophiles, comme déjà décrit (Cosgrove and Jarvis, 2012). Des xylanes et différentes structures de xyloglucanes, fucosylés ou non, ont également été détectées, ces derniers composés apparaissant, à l'issue de notre étude, très spécifique à la PCW/ML, à la différence de ce qui a été décrit auparavant, où les XG apparaissaient comme un composant majeur de la couche G (Nishikubo et al., 2007).

Les sous-couches S de la paroi secondaire sont parfois nommées parois à xylanes par certains auteurs, car de fait, les xylanes y sont les polysaccharides non-cellulosiques les plus abondants (Gorshkova et al., 2010; Gorshkova et al., 2012) et d'ailleurs, certains épitopes de xylanes apparaissent spécifiques à la couche S2. La plupart des épitopes de xylanes sont détectés dans toute l'épaisseur de ces parois tout au long de leur différenciation dans les zones de bois de tension ou de bois opposé, comme l'ont déjà observé Decou et al. (2009) à l'aide de l'anticorps AX1.

Par ailleurs, dans les fibres de BT, des glucuronoxylanes ont été détectés à la face interne de la couche G, en différenciation et mature, tandis que dans les fibres de BO, ils sont détectés à la face interne de la S2 également tout au long de leur différenciation. Dans les deux cas, les glucuronoxylanes seraient donc déposés à la surface de la dernière paroi déposée qui se trouvait en contact avec la membrane plasmique. Cela suggère que ces molécules pourraient avoir un rôle entre la paroi des fibres et le contenu cellulaire mais, cela demande à être mieux étudié.

Des glucomannanes acétylés ont été détectés dans la SCW, à l'aide des anticorps CCRC-M169 et CCRC-M170. Dans la SCW des fibres de BO, ces polysaccharides ont été détectés tout au long de leur différenciation. Cependant, dans les fibres de BT, ces glucomannanes acétylés ont été détectés seulement dans la S2 des fibres G matures et également dans toute l'épaisseur de la couche G en différenciation. La présence de glucomannanes dans la SCW a déjà été décrite auparavant (Morvan et al., 2003; Cosgrove, 2005; Nishikubo et al., 2007; Moreira and Filho, 2008; Hamman, 2008; Donaldson and Knox, 2012; Kim and Daniel, 2012) : elles pourraient y interagir avec les microfibrilles de cellulose (Morvan et al., 2003; Cosgrove, 2005) ou avoir un rôle dans le processus de lignification (Donaldson and Knox, 2012). Kim and Daniel (2012) ont observé que des glucomannanes sont présents tout au long de la différenciation des fibres chez le peuplier, mais à des concentrations variables en fonction du stade de différenciation et des différentes couches de la paroi (S2 ou G). De ce fait, nous pouvons supposer que les glucomannanes acétylés semblant apparaître dans la S2 des fibres de BT matures sont en fait issus de glucomannanes déjà présents dans les fibres en différenciation, mais détectés par notre anticorps après leur acétylation, qui se passerait plus tardivement que dans la S2 des fibres de BO. Il reste à déterminer le rôle de ces glucomannanes dans chacune de ces fibres.

La présence de glucomannanes acétylés au cours de la différenciation de la couche G a été mise en évidence dans le cadre de ma thèse par des études en immunolocalisation : ce

polysaccharide est présent dans toute l'épaisseur de la couche G en différenciation mais, une fois la couche G mature, il n'est plus détecté. Cependant, la présence des glucomannanes acétylés dans les couches G a été confirmée par des analyses biochimiques (chapitre 1) et a également été observée par d'autres (Nishikubo et al., 2007; Kim and Daniel, 2012) mais, jusqu'à présent la fonction de cette hémicellulose dans la couche G n'est pas déterminée.

Des anticorps spécifiques ont permis de détecter des RG-I dans la couche G, ce qui a été confirmé par l'analyse biochimique des couches G isolées, qui nous a permis de conclure que les β -1,4-galactanes qui sont des chaînes latérales des RG-I, constituent le polysaccharide non-cellulosique le plus abondant de la couche G. De plus, les diverses structures de RG-I détectables par les anticorps dont nous disposons présentent des profils de distribution différents dans la couche G et la PCW/ML durant la différenciation du xylème. La présence d'une telle diversité de structures de RG-I associée à ces différences de distribution pourrait être un indice des différents rôles que pourraient avoir les RG-I dans la fonctionnalisation de la couche G : certains d'entre eux pourraient par exemple être liées avec les MFCs, alors que d'autres seraient plus importantes pour spécifier les propriétés de la matrice.

Récemment, la présence de xylanes a été détectée dans la couche G par Kim and Daniel (2012) et confirmée dans mon travail de thèse. Nous avons montré la présence d'au moins deux structures de xylane, car deux profils de marquage ont été identifiés par immunolocalisation : une première structure présente seulement à la face interne de la couche G en différenciation et la seconde également détectée à la face interne de la couche G qu'elle soit en différenciation ou mature. La présence des xylanes dans la couche G a été confirmée par les analyses biochimiques de couche G isolée indiquant qu'il s'agit spécifiquement de glucuronoxylanes. Avant cela, il était largement admis que les couches G étaient dépourvues de xylanes (Gorshkova et al., 2010; Gorshkova et al., 2012). Bien que l'on reconnaisse maintenant la présence de xylanes dans la couche G, leur rôle n'est pas clairement défini, mais ils pourraient être impliqués dans l'orientation de l'angle des microfibrilles de cellulose (Mellerowicz et al., 2013).

Grâce à la mise en œuvre de techniques d'immunolocalisation, il apparaît que les polysaccharides ne sont pas toujours distribués dans la couche G de façon homogène. Certains polysaccharides sont effectivement distribués de façon homogène dans toute l'épaisseur de la couche G, tandis que d'autres sont détectables seulement à la face interne et d'autres à la face externe. Il est important de rappeler que le fait de ne pas être détecté, ne signifie pas que le

polysaccharide est absent. Il peut être présent mais, à cause d'interactions avec d'autres composants, il peut devenir inaccessible aux anticorps (Marcus et al., 2008).

La stratégie adoptée dans le cadre de ma thèse a également permis de constater que la couche G présente une composition en polysaccharides assez similaire à celle de la PCW/ML, sauf pour les xyloglucanes qui n'ont pas été détectées dans la couche G. Mais, malgré la similarité entre la composition en polysaccharides entre la PCW/ML et la couche G, la structure sur laquelle chacun est présent dans ces parois n'est pas toujours la même. En ce qui concerne les xyloglucanes, la détection de cette hémicellulose était fortement attendue dans la couche G principalement au vu des résultats de Nishikubo et al. (2007) et également de Baba et al. (2009) et Sandquist et al. (2010): Nishikubo et al. (2007) proposent que dans la couche G de peuplier, les xyloglucanes sont les polysaccharides non cellulosiques les plus abondants. Cependant, Bowling and Vaughn (2008) n'ont pas détecté la présence de xyloglucanes dans leur étude sur la composition de la couche G chez *Liquidambar styraciflua* et *Celtis occidentalis*. La présence de cette hémicellulose n'a pas non plus été rapportée chez d'autres espèces produisant des fibres à paroi gélatineuse (Gorshkova et al., 2010).

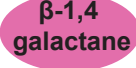
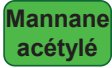
Les travaux précédents ont été surtout réalisés sur des arbres adultes qui ont poussé en conditions naturelles (Bowling and Vaughn, 2008; Kim and Daniel, 2012). Nishikubo et al. (2007), quant à eux, ont réalisé une partie de leurs analyses sur de jeunes arbres et pour le reste sur des troncs de vieux arbres : leurs analyses n'ont pas toujours été réalisées sur les mêmes arbres et parfois, elles ont été menées sur des troncs ou sur des branches (Nishikubo et al., 2007; Kaku et al., 2009). Pour mon travail de thèse, toutes les analyses ont été réalisées sur des arbres ayant le même âge et élevés en conditions contrôlées. De plus, la plupart des études précédemment réalisées sur la composition de la couche G n'ont pas se sont intéressées uniquement à la fibre G mature, sans prendre en compte les fibres G en cours de différenciation. Tandis que dans mon travail de thèse, nous avons suivi la distribution d'un large éventail de composants au cours de la mise en place des fibres G. L'aspect cinétique a également été pris en compte par Kim and Daniel (2012) sur différents types de bois (BO, BT et BN) dans une étude focalisée sur la distribution des xylanes et des glucomanannes.

Ainsi, l'étude de l'évolution de la composition de la couche G nous a permis de mettre en évidence une évolution importante de la composition des couches G au cours de leur différenciation et de leur maturation. Ces profils peuvent être le reflet de changements d'interactions entre les composants ou encore résulter de l'action d'enzymes de modification potentiellement associées à la mise en place des propriétés caractéristiques du bois de tension.

Comme la différenciation des cellules de bois normal, la formation du bois de tension est sous fort contrôle génétique, de nombreux gènes étant fortement régulés pendant la formation du BT (Dejardin et al., 2004; Andersson-Gunneras et al., 2006). Parmi ces gènes, les gènes codant pour des protéines à arabinogalactanes avec domaine fascicline-like sont retrouvés parmi les gènes les plus exprimés pendant la formation du BT chez le peuplier. Dans le cadre de ma thèse, l'étude de l'implication de ce gène dans la formation du BT a été abordée par génétique inverse : cette approche nous a permis de montrer que l'altération de l'expression de ce gène a des effets non seulement sur la formation du BT mais également beaucoup plus largement sur le développement de la plante. Les peupliers Miyuki transformés produisent du BT apparemment similaire à celui des plants sauvages. Cependant, la distribution des polysaccharides apparaît différente par rapport aux couches G produites dans le peuplier témoin (figure 1). La modification entraîne l'apparition d'un phénotype très perturbé au niveau de la plante entière résultant au moins en partie des modifications observables au niveau du xylème. Enfin les analyses d'immunolocalisation ont permis de montrer que la distribution des RG-I et des AGPs était fortement affectée. De fait, le profil de distribution des polysaccharides dans les fibres G semblent indiquer que celles-ci sont matures précocement, résultant soit d'un effet direct des PopFLAs au niveau des parois, soit d'un effet indirect lié à la réduction générale de croissance se traduisant par une diminution d'activité cambiale et la présence de cellules différenciées à plus faibles distances de la zone cambiale. Il reste à déterminer comment les modifications observées au niveau de la paroi conduisent à une perte des propriétés mécaniques caractéristiques du bois de tension.

FIGURES

LEGENDE

   	Protéines à arabinoglactanes
	Protéines à arabinoglactanes avec domaine fascicline
	Pectine du type homogalacturonane
  	Pectine du type rhamnogalacturonanne I (RGI)
	Pectine du type rhamnogalacturonanne I (RGI) (anticorps LM5)
	Xylane
	Arabinoxylane
	Xylane
	Glucuronoxylane
	Glucomannane acétylé
	Xyloglucane
	Extensine

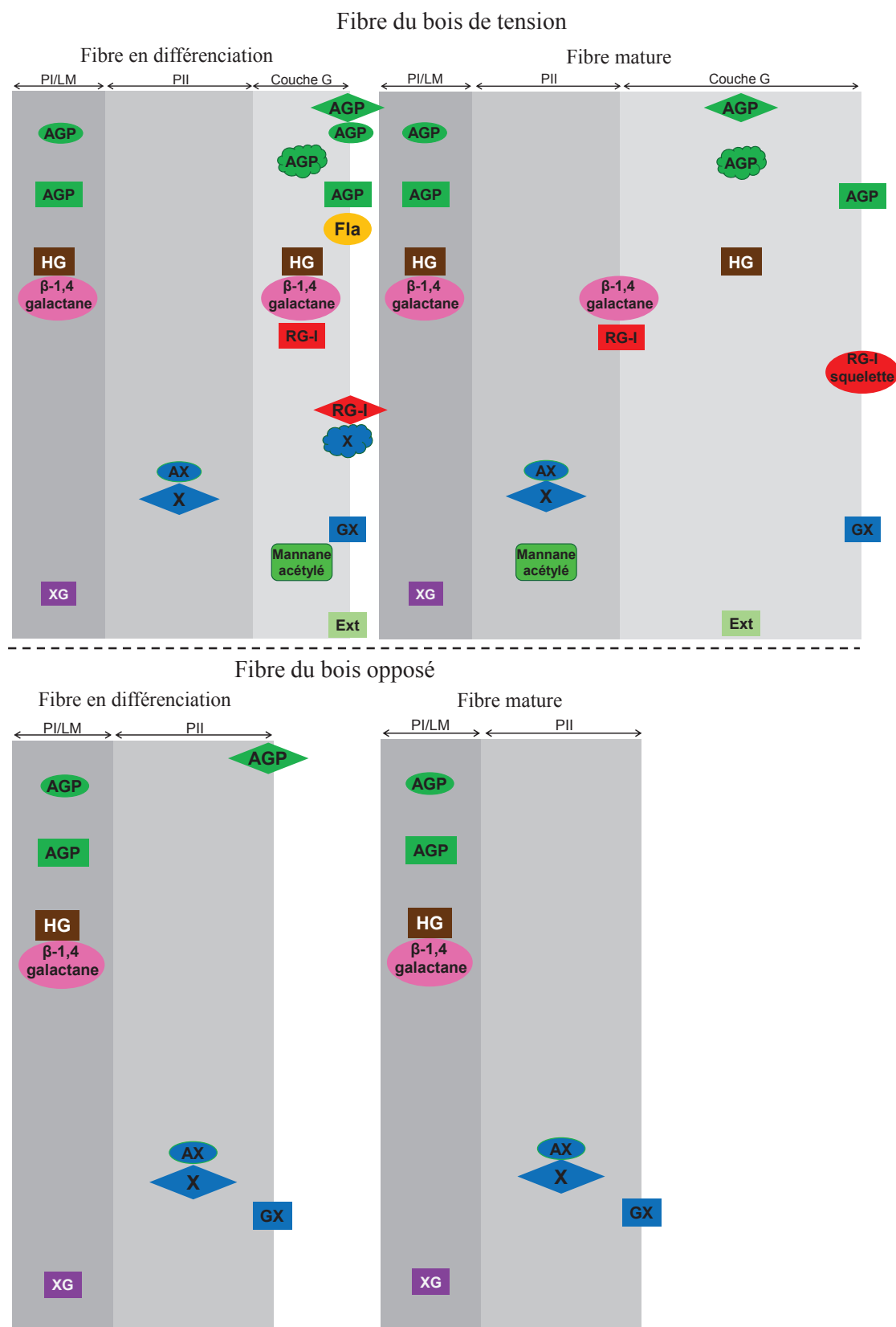


Figure 1. Schéma de la composition des parois des fibres du BT et BO chez le peuplier récapitulant les informations contenues dans les tableaux II et III, chapitre I. Chaque symbole représente un profil de marquage et peut représenter un seul anticorps ou plusieurs ayant un même profil de marquage.

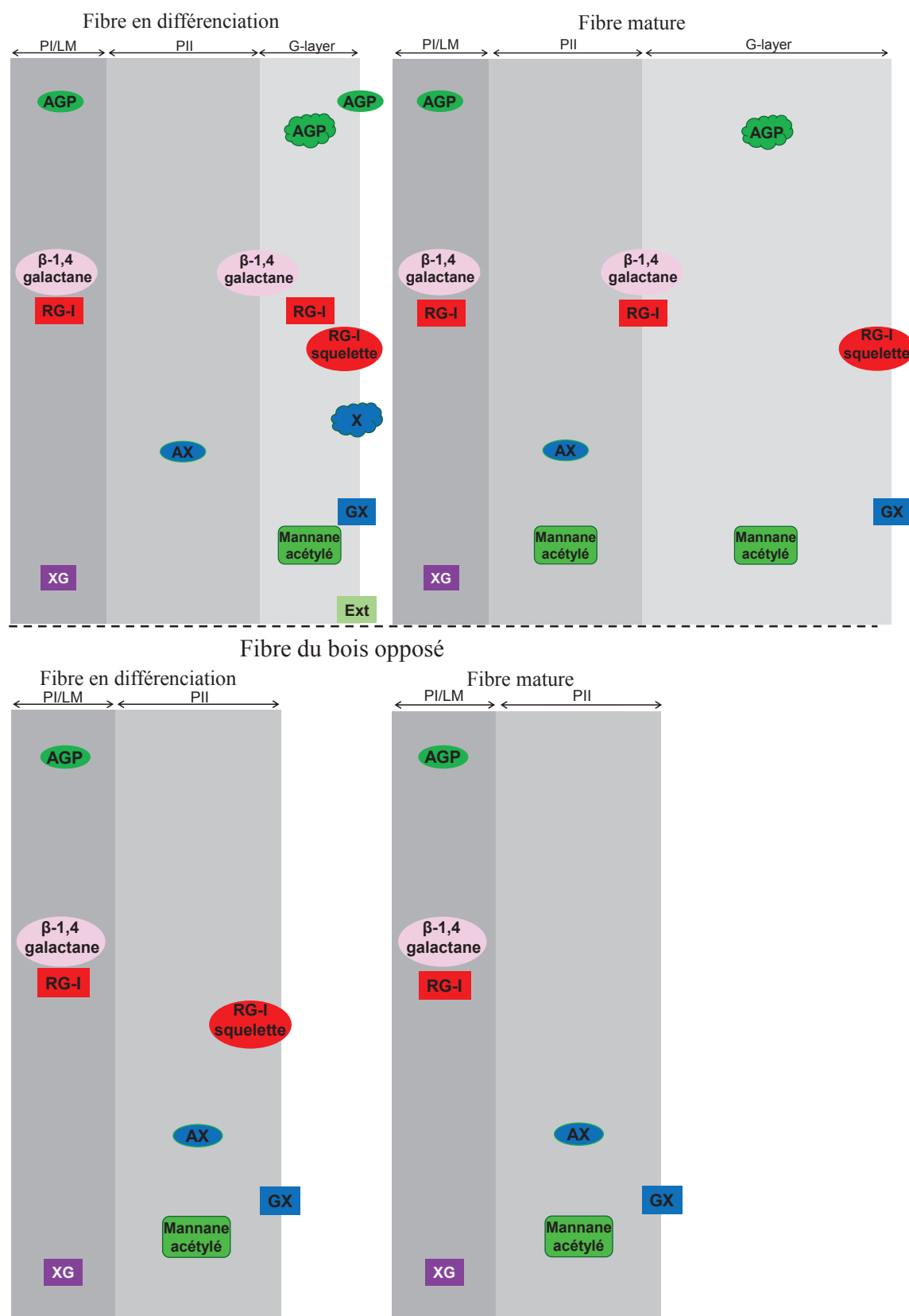


Figure 2. Schéma de la composition des parois des fibres du BT et BO chez le peuplier transgénique (Myiuki) récapitulant les informations contenues dans le tableau I, chapitre 2. Chaque symbole représente un profil de marquage et peut représenter un seul anticorps ou plusieurs ayant un même profil de marquage.

MODELE

La création de la tension dans la couche G du bois de tension de peuplier

Clair et al. (2011) ont montré que les MFCs sont mises en tension pendant la maturation de la couche G ce qui ne se produit pas dans la S2 des fibres du bois opposé qui sont dépourvues de couche G. L'étude réalisée durant mon travail de thèse a mis en évidence une évolution de la composition en polysaccharides de la couche G au cours de la différenciation alors qu'une telle évolution n'a pu être détectée dans les fibres du BO. Ces travaux ont permis de mieux comprendre la composition de la couche G, son évolution spatio-temporelle et son rôle dans la création de la tension. A partir des connaissances accessibles dans la bibliographie et à la lumière des nouvelles connaissances acquises dans le cadre de ma thèse, il est possible de proposer un modèle expliquant en partie la génération de la tension dans le bois de tension. Pour illustrer les différents événements qui se produiraient dans la mise en place de la couche G lors de la différenciation des fibres de BT, un schéma est présenté où l'échelle et les dimensions des différents composants sont arbitraires. En outre, afin de simplifier ce schéma, le mécanisme est détaillé en plusieurs étapes mais, il s'agirait en réalité d'une série d'événements continus et concomitants.

Etape 1. La déposition des microfibrilles de cellulose

Dans les fibres du BT, une fois que la couche S2 de la paroi secondaire est achevée, la mise en place de la couche G est initiée. A ce stade de la différenciation, les AGPs (FLAs et autres), des pectines de type RG-I, des xylanes et des arabinogalactanes, qui peuvent être des chaînes latérales des RG-I et/ou des AGPs, sont présentes à la face interne de la couche G.

À cette étape, les MFCs sont produites par les complexes en rosettes de cellulose synthase et sont déposées sous un angle très faible (parallèle à l'axe de la fibre). L'orientation de ces MFCs serait guidée par les microtubules dont la disposition serait elle-même indirectement dirigée par des AGPs (Lafarguette et al., 2004; Driouich and Baskin, 2008; MacMillan et al., 2010). Qui plus est, les pectines de type RG-I pourraient former grâce à leurs chaînes latérales galactanes des sortes de ponts qui lieraient les MFCs (Zykwinska et al., 2005; Zykwinska et al., 2007) et pourraient ainsi participer à leur orientation (Yoneda et al., 2010).

L'utilisation de l'anticorps LM5 dirigé contre des β -1,4 galactanes a révélé la présence de RG-I dès le début de la différenciation à l'interface entre la couche G et la S2. Le marquage

montre également que les RG-I demeurent dans cette zone lorsque la couche G est terminée. Des observations similaires ont été faites par Arend (2008). La localisation de ces RG-I à l'interface entre couche G et parois secondaires serait stratégique pour la transmission de la tension, créée au sein de la couche G, aux couches sous-jacentes de la paroi secondaire puis à toute la fibre (Clair et al., 2005; Arend, 2008; Goswami et al., 2008; Mellerowicz et al., 2008). Les RG-I, par leur capacité à se lier à la cellulose via leurs chaînes latérales, pourraient créer des ponts entre les microfibrilles de cellulose de la couche G et les MFCs de la S2.

Etapes 2 et 3. La cristallisation des microfibrilles de cellulose

Puis, les MFCs subiraient un processus de cristallisation, i. e., un certain nombre de MFCs s'assemblerait pour former une microfibrille fonctionnelle (Muller et al., 2006 ; Mellerowicz et al., 2008) . Enfin les microfibrilles de cellulose ainsi formée s'associeraient.

Notre modèle propose l'intervention d'une β -galactosidase dans le processus de cristallisation des MFCs à l'exemple de ce qui a été décrit chez les fibres de lin (Roach et al., 2011). Ainsi, une fois les MFCs déposées, les RG-I qui ont participé à leur orientation perdraient cette fonction et une β -galactosidase libérerait leurs chaînes latérales galactanes de la chaîne principale. Les galactanes alors réduites en taille resteraient entre les MFCs pour faciliter leur interaction et par conséquent leur cristallisation (Roach et al., 2011). Le squelette principal porteur des chaînes arabinanes serait, du fait de la disparition des branchements galactanes, plus facilement intégré à la matrice, puisque plus soluble dans l'eau (Macquet et al., 2007).

Les résultats d'immunolocalisation obtenus avec l'anticorps LM5 étayaient notre théorie. En effet, au début de la différenciation de la couche G, le marquage est situé dans toute l'épaisseur de la couche G et pourrait correspondre à la détection des chaînes galactanes de RG-I. En revanche, une fois la couche G mature, l'anticorps LM5 détecte l'épitope uniquement à la face externe de la couche G à l'interface de la S2. La perte des chaînes latérales galactanes des RG-I, par action d'une β -galactosidase, se traduirait par la disparition du marquage dans l'épaisseur de la couche G.

Toutefois, dans cette théorie une question reste posée : pourquoi les mêmes β -galactosidases n'hydrolyseraient pas les RG-I situées à l'interface S2 / couche G ? Afin de trouver un début de réponse, dans le modèle proposé, nous supposons que l'interaction entre les microfibrilles de la couche G et les MFCs de la S2 fait intervenir des liaisons de nature différente de celles liant les MFCs présentes dans l'épaisseur de la couche G. Les chaînes arabinanes des RG-I pourraient interagir avec les arabinanes présents sur des xyloxyanes (arabinoxylanes) de la S2,

tandis que, aucun xylane n'ayant été détecté dans la couche G mature, les chaînes latérales galactanes des RG-I pourraient interagir avec les microfibrilles de la couche G.

Un modèle alternatif plus simple n'impliquerait pas l'action d'une β -galactosidase. Dans un tel modèle, les molécules RG-I complètes, constituées de la chaîne principale et des chaînes latérales, se retrouveraient piégées entre les MFCs au moment de leur cristallisation.

En effet, à ce jour, ni les études de protéomique (Kaku et al., 2009), ni les études de transcriptomique (Dejardin et al., 2004; Andersson-Gunneras et al., 2006) ne permettent de prouver la présence d'une telle enzyme dans le bois de tension de peuplier. Toutefois, deux gènes codant pour des β -galactosidases sont fortement exprimés dans le xylème de peuplier et co-expriment avec d'autres gènes généralement surexprimés lors de la formation du bois de tension, tels que les popFLAs.

Etape 4 et 5. Mise en tension des microfibrilles de cellulose

Une fois les MFCs déposées, les AGPs perdraient leur site d'ancrage GPI et seraient incorporées à la matrice de la couche G (Seifert and Roberts, 2007). Dans cette matrice, les squelettes de RG-I libérés lors de la cristallisation des MFCs interagiraient avec ces AGPs nouvellement incorporées pour former un gel (Lamport and Kieliszewski, 2005).

De plus, les résultats obtenus à l'aide des anticorps CCRC-M169 et CCRC-M170 qui reconnaissent des glucomannanes acétylées montrent une disparition du signal de ces anticorps à mesure que la couche G se différencie. Notre hypothèse est que dans la matrice, les glucomannanes seraient dé-acétylés pendant la différenciation par l'action d'enzymes de type dé-acétylase. Une fois dé-acétylées, ces glucomannanes pourraient également former un gel (Maekaji, 1974).

Ce gel, formé entre les microfibrilles de cellulose, aurait la capacité de gonfler en présence d'eau et ce gonflement aurait pour conséquence la mise en tension des microfibrilles de cellulose.

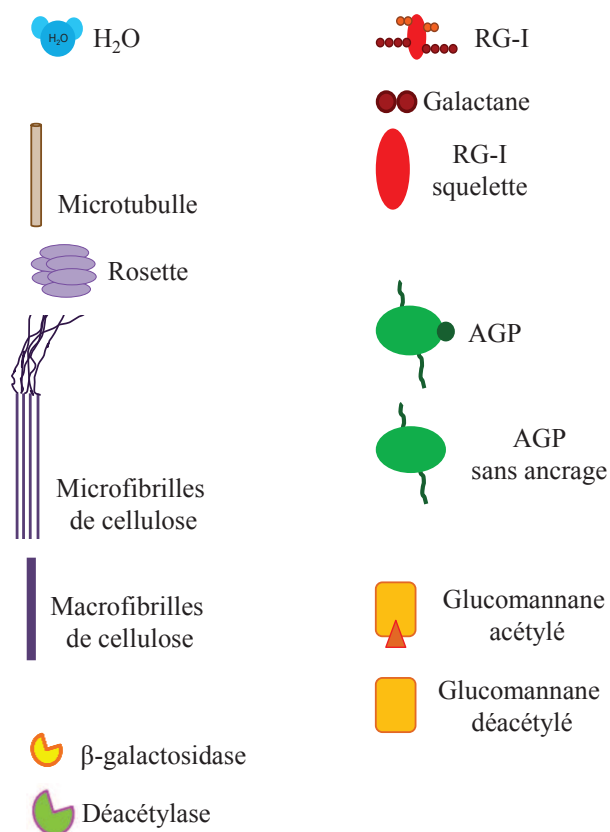
Dans l'hypothèse, où des RG-I (le squelette portant les chaînes latérales) resteraient entièrement piégés entre les MFCs pendant leur cristallisation, le gel serait formé grâce à l'interaction entre les AGPs et des RG-I ne possédant pas les épitopes détectés par l'anticorps LM5. En effet, le LM5 n'est pas le seul anticorps qui nous ait permis de détecter des structures de RG-I dans la couche G (Tableau III, chapitre 1). En outre, les résultats des analyses biochimiques des couches G isolées montrent que les β -galactanes sont les polysaccharides les plus abondants de la couche G.

Tous les composants retrouvés dans la couche G ne participent pas forcément à la formation du gel, ni à la création de la tension, du moins pas directement. Certains composants pourraient assurer d'autres fonctions, telles que le contrôle de la lignification, comme cela a été montré pour les xylanes et les mannanes (Donaldson and Knox, 2012). En l'état actuel des connaissances, les résultats de mon travail de thèse ne permettent pas d'expliquer dans le modèle que nous proposons le rôle précis de tous les composants de la couche G. Ainsi, les glucomannanes acétylés, qui ne sont pas spécifiques de la couche G, et les glucuronoxylanes reconnus par les anticorps du groupe xylane-5 joueraient un rôle autre que la création de la tension. Cela serait également le cas de certains RG-I et AGPs présents à la fois dans la couche G et la paroi primaire ou encore de xylanes présents à la face interne de la couche G des fibres du bois de tension et à la face interne de la S2 dans les fibres de bois opposé.

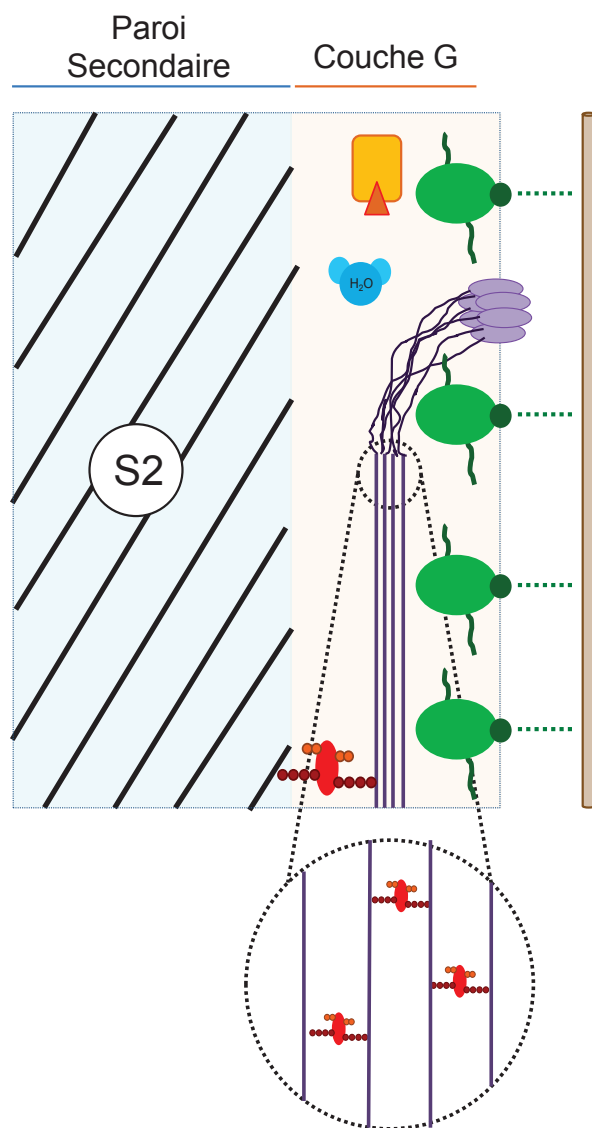
Schématisation d'un modèle pour expliquer une partie du mécanisme de la création de tension dans la couche G

Ce schéma a été conçu avec des échelles arbitraires.

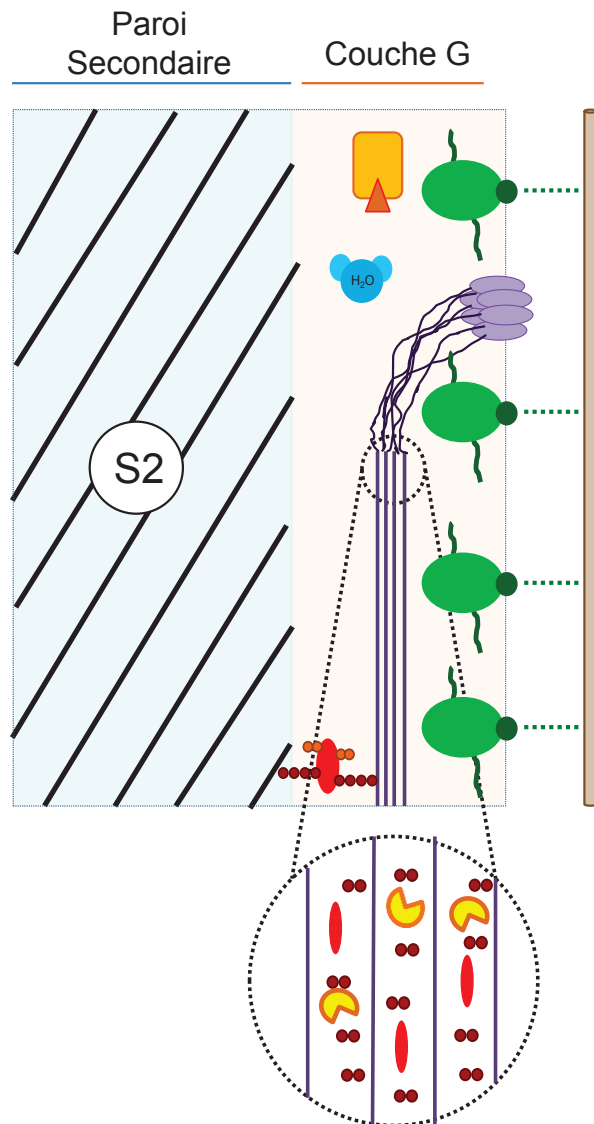
LEGENDE



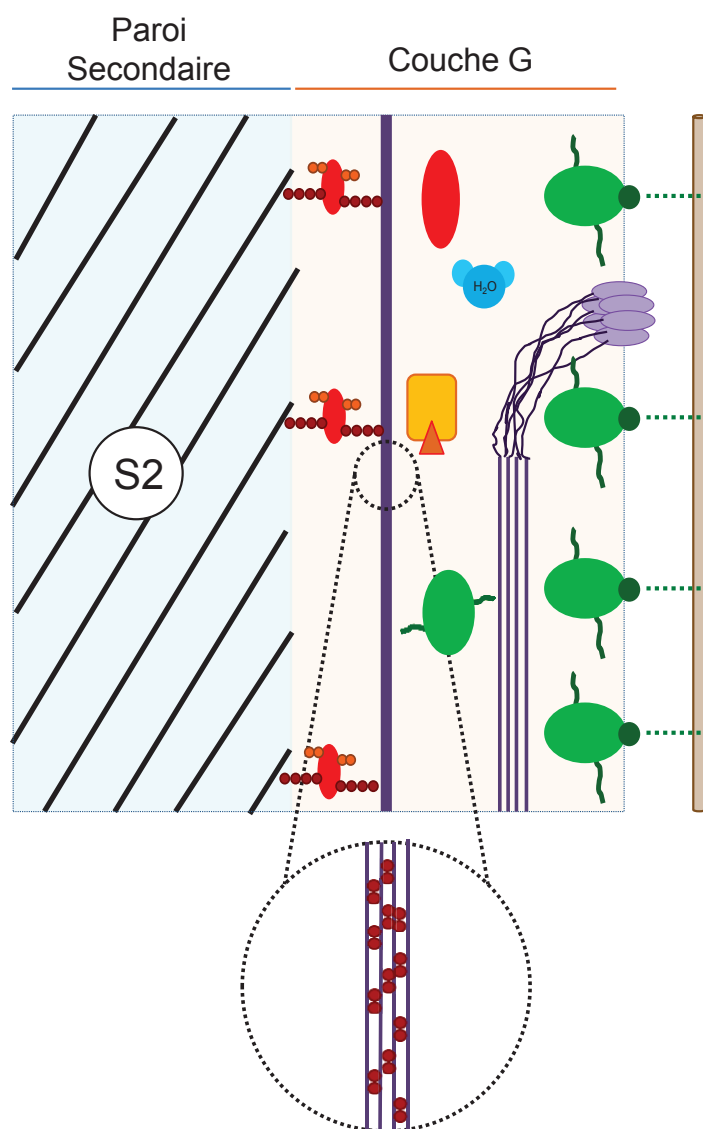
Etape 1. Les AGPs et les RG-I sont impliqués dans l'orientation des MFCs lors de leur déposition dans la couche G.



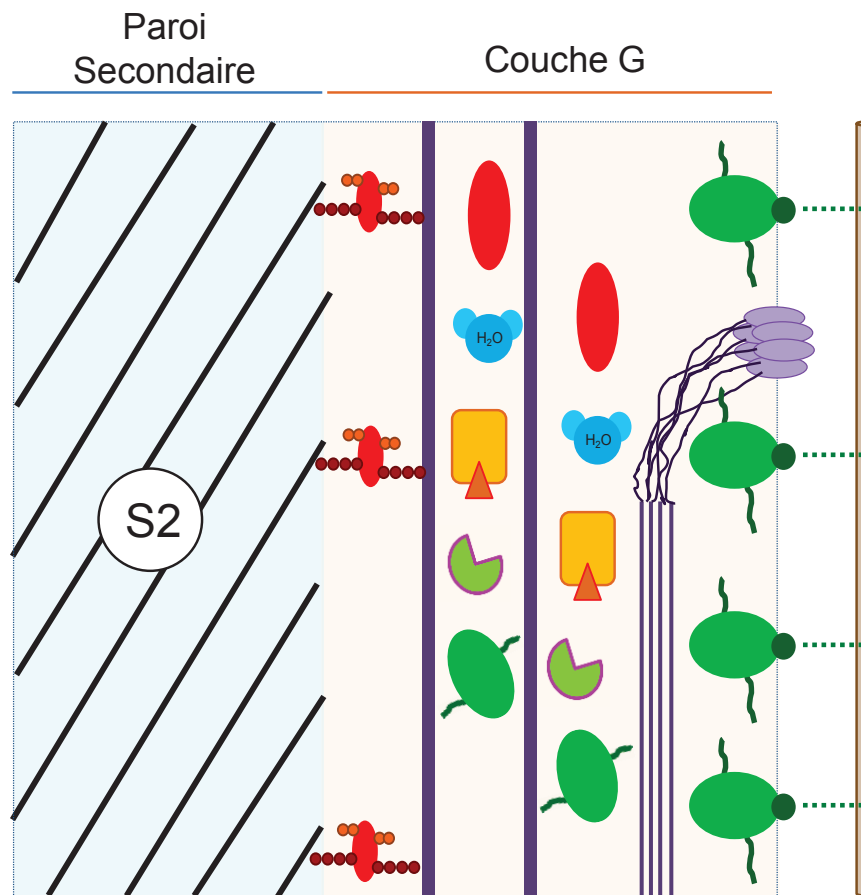
Etape 2. Des enzymes du type β -galactosidases hydrolisent les RG-I et libèrent le squelette et réduisent la taille des galactanes branchés sur les RG-I.



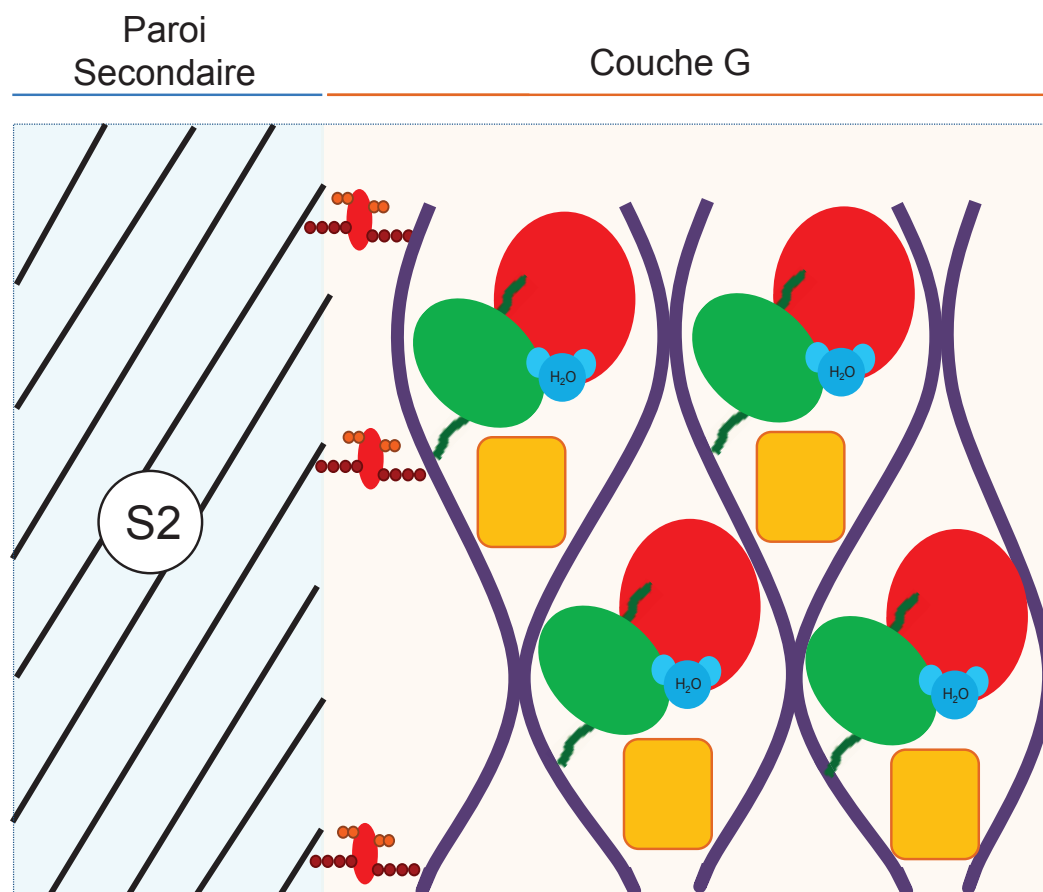
Etape 3. Les MFCs se cristallisent à l'aide des galactanes et forment des macrofibrilles. Le squelette des RG-I est intégré dans la matrice en même temps qu'une partie des AGPs qui se trouvaient à la face interne de la couche G.



Etape 4. Des glucomanannes sont dé-acétylés par l'action d'une enzyme à activité dé-acétylase.



Etape 5. Les AGPs et le squelette des RG-I interagissent et forment un gel ainsi que les glucomanannes dé-acétylées. Ce gel en présence de l'eau gonfle, ce qui met en tension les macrofibrilles de cellulose.



Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse ont contribué à l'avancement des connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la création de la tension dans la couche G du BT de peuplier. Cependant, ces résultats ne suffisent pas à expliquer totalement le mécanisme. La fonction de chacun des composants de la couche G n'a pas pu être déterminée et des analyses complémentaires doivent être envisagées pour valider le modèle proposé.

Ainsi, une série de perspectives s'ouvrent à la vue des nouveaux résultats acquis et des connaissances bibliographiques.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse ont permis de mettre en évidence une large diversité de polysaccharides présents dans la couche G sous différentes structures. Certains serviraient donc à relier les MFCs, d'autres les microfibrilles de cellulose et d'autres encore composent la matrice qui enrobe la cellulose, comme proposé dans le modèle détaillé ci-dessus. Afin de valider ce modèle, il serait important dans un premier temps de déterminer les polysaccharides qui serviraient à relier les MFCs et les microfibrilles de cellulose et ceux qui composent la matrice. Cela pourrait être possible par une analyse biochimique des couches G isolées qui serait basée sur l'extractibilité des polysaccharides : les polysaccharides facilement extraits à 20 °C seraient plutôt susceptibles d'être des composants de la matrice tandis que ceux solubilisés à l'acide nitrique ou à l'alcali à 100 °C seraient plutôt des polysaccharides liés à la cellulose (Morvan et al., 2003).

De plus, afin de mieux comprendre la composition et les interactions entre les différents composants de la couche G, la détermination des composants autres que les polysaccharides devrait être réalisée. D'après les résultats des analyses biochimiques pour la détermination de la composition des couches G isolées, 72% serait de polysaccharides. Les autres 38% pourraient être d'autres composants tels que des protéines ou des composés inorganiques. Des études sur la composition protéique des couches G seraient également importantes pour vérifier la présence d'enzymes pouvant agir sur l'hydrolyse des chaînes latérales des RG-I, ayant une action similaire aux β -1,4- galactosidases trouvées chez le lin.

Finalement, pour clôturer l'étude de la composition chimique du BT, il serait intéressant de faire une étude similaire (quantité, proportion et distribution des composants) sur des couches G de bois de tension issus d'arbres adultes afin de vérifier si la composition de la couche G évolue avec l'âge de l'arbre.

Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que la composition de la couche G varie au cours de la différenciation cellulaire dans le bois juvénile. Il a été mis en évidence des différences entre la distribution de certains épitopes de polysaccharides (xylanes et mannanes) entre la paroi secondaire des fibres du BO et du BT. Cela laisse supposer que dans le BT, en plus de l'épaisseur de la paroi secondaire, d'autres modifications existent dans cette paroi et mériteraient d'être considérées. Une étude plus approfondie sur la composition de la paroi secondaire mériterait donc d'être réalisée. Cela pourrait être fait par immunolocalisation en utilisant la microscopie confocale afin de pouvoir considérer en plus de la présence des

polysaccharides, des variations quantitatives mesurées par les variations de l'intensité de signal. En effet, les différences de composition entre parois secondaires des fibres du BT et de BO laissent supposer qu'elles pourraient jouer un rôle dans la tension et mériteraient donc d'être prise en compte dans les modèles pour expliquer le mécanisme de création ou de transmission de la tension dans la totalité de la fibre et du bois.

Dans le but de mieux comprendre le possible rôle de la SCW dans les fibres du BT, il serait nécessaire de réaliser une étude comparative de la composition des parois des fibres du BT et BO chez le peuplier et chez une espèce dont le BT ne présente pas de couche G. Cela permettrait de vérifier si leur composition chimique est similaire et d'étudier les interactions entre composants de la paroi. De cette manière, il serait possible de mieux comprendre comment la SCW crée la tension et si les mêmes phénomènes se produisent dans les fibres avec ou sans couche G.

Des analyses biochimiques de la couche G des fibres du bois de peupliers transgéniques seraient intéressantes pour évaluer les effets de changements qualitatifs et quantitatifs dans les polysaccharides pariétaux et valider le rôle de certains composants dans la création de la tension. Il existe des indices pour que les AGPs soient impliqués dans l'orientation des MFCs et dans ce cas il semblerait très important de vérifier l'AMF dans les couches G des peupliers Miyuki. Cela permettrait de valider dans le modèle proposé, le rôle des AGPs dans l'orientation des MFCs. Concernant la fonction des AGPs, il serait également intéressant d'étudier l'effet du « knock-out » du gène *popFla1* sous contrôle d'un promoteur conférant une expression ciblée dans le BT.

REFERENCES

- Albenne C, Canut H, Boudart G, Zhang Y, San Clemente H, Pont-Lezica R, Jamet E** (2009) Plant Cell Wall Proteomics: Mass Spectrometry Data, a Trove for Research on Protein Structure/Function Relationships. *Molecular Plant* **2**: 977-989
- Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B** (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant Journal* **45**: 144-165
- Arend M** (2008) Immunolocalization of (1,4)-beta-galactan in tension wood fibers of poplar. *Tree Physiology* **28**: 1263-1267
- Baba K, Park YW, Kaku T, Kaida R, Takeuchi M, Yoshida M, Hosoo Y, Ojio Y, Okuyama T, Taniguchi T, Ohmiya Y, Kondo T, Shani Z, Shoseyov O, Awano T, Serada S, Norioka N, Norioka S, Hayashi T** (2009) Xyloglucan for Generating Tensile Stress to Bend Tree Stem. *Molecular Plant* **2**: 893-903
- Bamber RK** (1987) The origin of growth stresses: a rebuttal. *IAWA Bulletin* **8**: 80-84
- Bao W, O'Malley DM, Sederof RR** (1992) Wood contains a cell-wall structural protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 6604-6608
- Barnett JR, Bonham VA** (2004) Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. *Biological Reviews* **79**: 461-472
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M** (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 519-546
- Boudet A-M** (2000) Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 81-96
- Bourquin V, Nishikubo N, Abe H, Brumer H, Denman S, Eklund M, Christiarnin M, Teeri TT, Sundberg B, Mellerowicz EJ** (2002) Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *The Plant Cell* **14**: 3073-3088

- Bowling AJ, Vaughn KC** (2008) Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose. *American Journal of Botany* **95**: 655-663
- Boyd JD** (1972) Tree growth stresses — Part V: Evidence of an origin in differentiation and lignification. *Wood Science and Technology* **6**: 251-262
- 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. *The Plant Journal* **3**: 1-30
- Carpita NC** (2011) Update on Mechanisms of Plant Cell Wall Biosynthesis: How Plants Make Cellulose and Other (1 → 4)-beta-D-Glycans. *Plant Physiology* **155**: 171-184
- Cassab GI** (1998) Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 281-309
- Chang SS, Clair B, Ruelle J, Beauchene J, Di Renzo F, Quignard F, Zhao GJ, Yamamoto H, Gril J** (2009) Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3023-3030
- Clair B, Almeras T, Pilate G, Jullien D, Sugiyama J, Riekkel C** (2011) Maturation Stress Generation in Poplar Tension Wood Studied by Synchrotron Radiation Microdiffraction. *Plant Physiology* **155**: 562-570
- Clair B, Almeras T, Yamamoto H, Okuyama T, Sugiyama J** (2006) Mechanical behavior of cellulose microfibrils in tension wood, in relation with maturation stress generation. *Biophysical Journal* **91**: 1128-1135
- Clair B, Gril J, Baba K, Thibaut B, Sugiyama J** (2005) Precautions for the structural analysis of the gelatinous layer in tension wood. *Iawa Journal* **26**: 189-195
- Clair B, Gril J, Di Renzo F, Yamamoto H, Quignard F** (2008) Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood. *Biomacromolecules* **9**: 494-498
- Clair B, Ruelle J, Beauchene J, Prevost MF, Fournier M** (2006) Tension wood and opposite wood in 21 tropical rain forest species 1. Occurrence and efficiency of the G-layer. *Iawa Journal* **27**: 329-338

- Cosgrove D, Jarvis M** (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science* **3**
- Cosgrove DJ** (2000) Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 109-124
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 850-861
- Coutand C, Jeronimidis G, Chanson B, Loup C** (2004) Comparison of mechanical properties of tension and opposite wood in *Populus*. *Wood Science and Technology* **38**: 11-24
- Decou R, Lhernould S, Laurans F, Sulpice E, Leple JC, Dejardin A, Pilate G, Costa G** (2009) Cloning and expression analysis of a wood-associated xylosidase gene (PtaBXL1) in poplar tension wood. *Phytochemistry* **70**: 163-172
- Dejardin A, Laurans F, Arnaud D, Breton C, Pilate G, Leple JC** (2010) Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 325-334
- Dejardin A, Leple JC, Lesage-Descauses MC, Costa G, Pilate G** (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues - A comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biology* **6**: 55-64
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP** (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant cell Physiology* **43**: 1407-1420
- Donaldson LA** (2001) Lignification and lignin topochemistry — an ultrastructural view. *Phytochemistry* **57**: 859-873
- Donaldson LA, Knox JP** (2012) Localization of Cell Wall Polysaccharides in Normal and Compression Wood of Radiata Pine: Relationships with Lignification and Microfibril Orientation. *Plant Physiology* **158**: 642-653
- Driouich A, Baskin TI** (2008) Intercourse between cell wall and cytoplasm exemplified by arabinogalactan proteins and cortical microtubules. *American Journal of Botany* **95**: 1491-1497
- Du S, Yamamoto F** (2007) An Overview of the Biology of Reaction Wood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 131-143

- Ebringerova A, Heinze T** (2000) Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - Naturally occurring xylans structures, procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications* **21**: 542-556
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A** (2010) Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *Plant Physiology* **153**: 403-419
- Fang CH, Clair B, Gril J, Liu SQ** (2008) Growth stresses are highly controlled by the amount of G-layer in poplar tension wood. *Iawa Journal* **29**: 237-246
- Fournier M, Chanson B, Thibaut B, Guitard D** (1994) Measurements of residual growth strains at the stem surface observations on different species. *Annales Des Sciences Forestieres* **51**: 249-266
- Freshour G, Bonin CP, Reiter W-D, Albersheim P, Darvill AG, Hahn MG** (2003) Distribution of Fucose-Containing Xyloglucans in Cell Walls of the mur1 Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**: 1602-1612
- Fry SC** (1989) The structure and functions of xyloglucan. *Journal of Experimental Botany* **40**: 1-11
- Fry SC, York WS, Albersheim P, Darvill A, Hayashi T, Joseleau J-P, Kato Y, Lorences EP, Maclachlan GA, McNeil M, Mort AJ, Grant Reid JS, Seitz HU, Selvendran RR, Voragen AGJ, White AR** (1993) An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum* **89**: 1-3
- Fry S C** (1995) Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 497-520
- Gaspar Y, Johnson KL, McKenna JA, Bacic A, Schultz CJ** (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology* **47**: 161-176
- Gorshkova T, Brutch N, Chabbert B, Deyholos M, Hayashi T, Lev-Yadun S, Mellerowicz EJ, Morvan C, Neutelings G, Pilate G** (2012) Plant Fiber Formation: State of the Art, Recent and Expected Progress, and Open Questions. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 201-228
- Gorshkova TA, Gurjanov OP, Mikshina PV, Ibragimova NN, Mokshina NE, Salnikov VV, Ageeva MV, Amenitskii SI, Chernova TE, Chemikosova SB** (2010) Specific

- type of secondary cell wall formed by plant fibers. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**: 328-341
- Goswami L, Dunlop JWC, Jungnikl K, Eder M, Gierlinger N, Coutand C, Jeronimidis G, Fratzl P, Burgert I** (2008) Stress generation in the tension wood of poplar is based on the lateral swelling power of the G-layer. *Plant Journal* **56**: 531-538
- Gray-Mitsumune M, Mellerowicz EJ, Abe H, Schrader J, Winz  ll A, Sterky F, Blomqvist K, McQueen-Mason S, Teeri TT, Sundberg B** (2004) Expansins Abundant in Secondary Xylem Belong to Subgroup A of the α -Expansin Gene Family. *Plant Physiology* **135**: 1552-1564
- Guillon F, Philippe S, Bouchet B, Devaux MF, Frasse P, Jones B, Bouzayen M, Lahaye M** (2008) Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. *Journal of Experimental Botany* **59**: 273-288
- Hamman JH** (2008) Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules* **13**: 1599-1616
- Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV** (2010) Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology* **153**: 384-395
- Hayashi T, Kaida R, Kaku T, Baba K** (2010) Loosening xyloglucan prevents tensile stress in tree stem bending but accelerates the enzymatic degradation of cellulose. *Russian Journal of Plant Physiology* **57**: 316-320
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlen M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G** (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14732-14737
- Hoffman M, Jia Z, Peña MJ, Cash M, Harper A, Blackburn AR, II, Darvill A, York WS** (2005) Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. *Carbohydrate Research* **340**: 1826-1840
- Jacobs MR** (1945) The growth stresses of wood stems. *Commonwealth Forestry Bureau* **28**: 1-67

- Jamet E, Canut H, Boudart G, Pont-Lezica RF** (2006) Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science* **11**: 33-39
- Johnson KL, Jones BJ, Bacic A, Schultz CJ** (2003) The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology* **133**: 1911-1925
- Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME** (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* **345**: 2583-2595
- Joseleau JP, Imai T, Kuroda K, Ruel K** (2004) Detection in situ and characterization of lignin in the G-layer of tension wood fibres of *Populus deltoides*. *Planta* **219**: 338-345
- Joshi CP, Thammannagowda S, Fujino T, Gou JQ, Avcı U, Haigler CH, McDonnell LM, Mansfield SD, Mengesha B, Carpita NC, Harris D, DeBolt S, Peter GF** (2011) Perturbation of Wood Cellulose Synthesis Causes Pleiotropic Effects in Transgenic Aspen. *Molecular Plant* **4**: 331-345
- Jourez B, Riboux A, Leclercq A** (2001) Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cv 'Ghoy'). *Iawa Journal* **22**: 133-157
- Jourez B** (1997) Le bois de tension. 1. Définition et distribution dans l'arbre. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2**: 100-112
- Kaku T, Serada S, Baba K, Tanaka F, Hayashi T** (2009) Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood. *Journal of Wood Science* **55**: 250-257
- Kerstens S, Decraemer WF, Verbelen JP** (2001) Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. *Plant Physiology* **127**: 381-385
- Kim JS, Daniel G** (2012) Distribution of glucomannans and xylans in poplar xylem and their changes under tension stress. *Planta* **236**: 35-50
- Knox JP** (1997) The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. In KW Jeon, ed, *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 171, Vol 171, pp 79-120

- Lafarguette F, Leple JC, Dejardin A, Laurans F, Costa G, Lesage-Descauses MC, Pilate G** (2004) Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* **164**: 107-121
- Lamport DTA, Kieliszewski MJ** (2005) Stress upregulates periplasmic arabinogalactan-proteins. *Plant Biosystems* **139**: 60-64
- Liepmann AH, Nairn CJ, Willats WGT, Sorensen I, Roberts AW, Keegstra K** (2007) Functional genomic analysis support conservation of function among cellulose synthase-like A gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. *Plant Physiology* **143**: 1881-1893
- Lindeboom J, Mulder BM, Vos JW, Ketelaar T, Emons AMC** (2008) Cellulose microfibril deposition: coordinated activity at the plant plasma membrane. *Journal of Microscopy* **231**: 192-200
- Liwanag AJM, Ebert B, Verherbruggen Y, Rennie EA, Rautengarten C, Oikawa A, Andersen MCF, Clausen MH, Scheller HV** (2012) Pectin Biosynthesis: GALS1 in *Arabidopsis thaliana* Is a beta-1,4-Galactan beta-1,4-Galactosyltransferase. *Plant Cell* **24**: 5024-5036
- MacMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG** (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant Journal* **62**: 689-703
- Macquet A, Ralet MC, Loudet O, Kronenberger J, Mouille G, Marion-Poll A, North HM** (2007) A naturally occurring mutation in an *Arabidopsis* accession affects a beta-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage. *Plant Cell* **19**: 3990-4006
- Maekaji K** (1974) The mechanism of gelation of konjac mannan. *Agricultural And Biological Chemistry* **38**: 315-321
- Marcus SE, Verherbruggen Y, Herve C, Ordaz-Ortiz JJ, Farkas V, Pedersen HL, Willats WGT, Knox JP** (2008) Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *Bmc Plant Biology* **8**:60
- Marcus SE, Blake AW, Benians TAS, Lee KJD, Poyser C, Donaldson L, Leroux O, Rogowski A, Petersen HL, Boraston A, Gilbert HJ, Willats WGT, Knox JP**

- (2010) Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. *The Plant Journal* **64**: 191-203
- Mellerowicz E J, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W** (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Molecular Biology* **47**: 239-274
- Mellerowicz EJ, Immerzeel P, Hayashi T** (2008) Xyloglucan: The Molecular Muscle of Trees. *Annals of Botany* **102**: 659-665
- Mellerowicz EJ, Sundberg B** (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 293-300
- Mohnen D** (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 266-277
- Moreira LRS, Filho EXF** (2008) An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**: 165-178
- Morvan C, Andeme-Onzighi C, Girault R, Himmelsbach DS, Driouich A, Akin DE** (2003) Building flax fibres: more than one brick in the walls. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 935-944
- Muller M, Burghammer M, Sugiyama J** (2006) Direct investigation of the structural properties of tension wood cellulose microfibrils using microbeam X-ray fibre diffraction. *Holzforschung* **60**: 474-479
- Munoz C, Baeza J, Freer J, Mendonca RT** (2011) Bioethanol production from tension and opposite wood of *Eucalyptus globulus* using organosolv pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**: 1861-1866
- Nishikubo N, Awano T, Banasiak A, Bourquin V, Ibatullin F, Funada R, Brumer H, Teeri TT, Hayashi T, Sundberg B, Mellerowicz EJ** (2007) Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar - A glimpse into the mechanism of the balancing act of trees. *Plant and Cell Physiology* **48**: 843-855
- Norberg PH, Meier H** (1966) Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of aspen (*Populus tremula* L.). *Holzforschung* **20**: 174-178

- Okuyama T, Yamamoto H, Yoshida M, Hattori Y, Archer RR** (1994) Growth stresses in tension wood - role of microfibrils and lignification. *Annales Des Sciences Forestieres* **51**: 291-300
- Olsson AM, Bjurhager I, Gerber L, Sundberg B, Salmén** (2011) Ultra-structural organization of cell wall polymers in normal and tension wood of aspen revealed by polarization FTIR microspectroscopy. *Planta* **233**: 1277-1286
- Park YB, Cosgrove DJ** (2012) Changes in Cell Wall Biomechanical Properties in the Xyloglucan-Deficient xxt1/xxt2 Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiology* **158**: 465-475
- Paux E, Carocha V, Marques C, de Sousa AM, Borralho N, Sivadon P, Grima-Pettenati J** (2005) Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation. *New Phytologist* **167**: 89-100
- Persson S, Caffal K H, Freshour G, Hilley M T, Bauer S, Poindexter P, Hahn M G, Mohnen D, Somerville C** (2007) The arabidopsis irregular *xylem8* mutant is deficient in glucuronoxylan and homogalacturonan, which are essential for secondary cell wall integrity. *The Plant Cell* **19**: 237-255
- Pilate G, Dejardin A, Laurans F, Leple JC** (2004) Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytologist* **164**: 63-72
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A** (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiology* **127**: 1513-1523
- Ralet MC, Tranquet O, Poulain D, Moise A, Guillon F** (2010) Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. *Planta* **231**: 1373-1383
- Ringli C, Keller B, Ryser U** (2001) Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1430-1441
- Roach MJ, Mokshina NY, Badhan A, Snegireva AV, Hobson N, Deyholos MK, Gorshkova TA** (2011) Development of Cellulosic Secondary Walls in Flax Fibers Requires beta-Galactosidase. *Plant Physiology* **156**: 1351-1363
- Sachetto-Martins G, Franco LO, Oliveira DE** (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* **1492**: 1-14

- Sandquist D, Filonova L, von Schantz L, Ohlin M, Daniel G** (2010) Microdistribution of xyloglucan in differentiating poplar cells. *Bioresources* **5**: 796-807
- Scheller HV, Ulvskov P** (2010) Hemicelluloses. *In* S Merchant, WR Briggs, D Ort, eds, Annual Review of Plant Biology, Vol 61, Vol 61. Annual Reviews, Palo Alto, pp 263-289
- Scheible WR, Pauly M** (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 285-295
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A** (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends in Plant Science* **3**: 426-431
- Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YM, Bacic A** (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology* **129**: 1448-1463
- Seifert GJ, Roberts K** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *In* Annual Review of Plant Biology, Vol 58. Annual Reviews, Palo Alto, pp 137-161
- Showalter AM** (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* **5**: 9-23
- Showalter AM** (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1399-1417
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H** (2004) Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science* **306**: 2206-2211
- Sommer-Knudsen J, Bacic A, Clarke AE** (1998) Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* **47**: 483-497
- Tan L, Eberhard S, Pattathil S, Warder C, Glushka J, Yuan CH, Hao ZY, Zhu X, Avci U, Miller JS, Baldwin D, Pham C, Orlando R, Darvill A, Hahn MG, Kieliszewski MJ, Mohnen D** (2013) An Arabidopsis Cell Wall Proteoglycan Consists of Pectin and Arabinoxylan Covalently Linked to an Arabinogalactan Protein. *Plant Cell* **25**: 270-287

- Tan L, Qiu F, Lampert DTA, Kieliszewski MJ** (2004) Structure of a Hydroxyproline (Hyp)-Arabinogalactan Polysaccharide from Repetitive Ala-Hyp Expressed in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 13156-13165
- Timell TE** (1969) The chemical composition of tension wood. *Svensk Papperstidning* **72**: 173-181
- Tryfona T, Liang HC, Kotake T, Tsumuraya Y, Stephens E, Dupree P** (2012) Structural characterization of Arabidopsis leaf arabinogalactan polysaccharides. *Plant Physiology* **160**: 653-666
- Wang HT, Liu IH, Yeh TF** (2012) Immunohistological study of mannan polysaccharides in poplar stem. *Cellulose Chemistry and Technology* **46**: 149-155
- Willats WGT, Gilmartin PM, Mikkelsen JD, Knox JP** (1999) Cell wall antibodies without immunization: generation and use of de-esterified homogalacturonan block-specific antibodies from a naive phage display library. *Plant Journal* **18**: 57-65
- Willats WGT, Orfila C, Limberg G, Buchholt HC, van Alebeek G-JWM, Voragen AGJ, Marcus SE, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Murray BS, Knox JP** (2001) Modulation of the Degree and Pattern of Methyl-esterification of Pectic Homogalacturonan in Plant Cell Walls: IMPLICATIONS FOR PECTIN METHYL ESTERASE ACTION, MATRIX PROPERTIES, AND CELL ADHESION. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 19404-19413
- Wolf S, Hematy K, Hofte H** (2012) Growth Control and Cell Wall Signaling in Plants. *In* SS Merchant, ed, *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63, Vol 63. Annual Reviews, Palo Alto, pp 381-407
- Wolf S, Mouille G, Pelloux J** (2009) Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant* **2**: 851-860
- Wu YY, Williams M, Bernard S, Driouich A, Showalter AM, Faik A** (2010) Functional Identification of Two Nonredundant Arabidopsis $\alpha(1,2)$ Fucosyltransferases Specific to Arabinogalactan Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 13638-13645

- Yamamoto H, Ruelle J, Arakawa Y, Yoshida M, Clair B, Gril J** (2010) Origin of the characteristic hygro-mechanical properties of the gelatinous layer in tension wood from Kunugi oak (*Quercus acutissima*). *Wood Science and Technology* **44**: 149-163
- Yates EA, Valdor JF, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Mackie W, Knox JP** (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6**: 131-139
- Yoneda A, Ito T, Higaki T, Kutsuna N, Saito T, Ishimizu T, Osada H, Hasezawa S, Matsui M, Demura T** (2010) Cobtorin target analysis reveals that pectin functions in the deposition of cellulose microfibrils in parallel with cortical microtubules. *The Plant Journal* **64**: 657-667
- York WS, O'Neill MA** (2008) Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up? *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 258-265
- Zykwinska A, Thibault JF, Ralet MC** (2007) Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1795-1802
- Zykwinska AW, Ralet M-CJ, Garnier CD, Thibault J-FJ** (2005) Evidence for In Vitro Binding of Pectin Side Chains to Cellulose. *Plant Physiology* **139**: 397-407

Fernanda T. P. GUEDES

Vers l'identification des acteurs moléculaires responsables des propriétés mécaniques du bois de tension de peuplier

Cette thèse visait à caractériser la composition en polysaccharides des fibres de bois de tension chez le peuplier et établir de possibles corrélations avec les mécanismes de création de la tension. A cette fin, nous avons étudié le bois de jeunes peupliers qui ont poussé sous conditions contrôlées. Nous avons pu déterminer la composition en polysaccharides des couches G isolées ainsi que la structure de ces polysaccharides. L'évolution de cette composition au long de la différenciation du bois de tension et du bois opposé a été évaluée à l'aide de 178 anticorps dirigés contre les principaux polysaccharides pariétaux. La fonction de deux protéines à arabinogalactanes avec domaine fascicline-like a été également étudiée à l'aide des anticorps produits à cet effet. La génétique inverse a été également utilisée pour compléter l'étude de la fonction d'une de ces protéines dans la formation du bois de tension. Les résultats obtenus ont mis en évidence une évolution de la composition de la couche G au cours de la différenciation. Des différences entre la composition de la couche S2 des fibres du bois de tension et du bois opposé ont aussi été détectées. Une grande quantité de pectines de type RG-I a été décelé dans la couche G, molécules qui pourraient participer à la formation d'un gel. Le gonflement de ce gel serait responsable de la mise en tension des microfibrilles de cellulose. Cependant, nos travaux ne montrent aucune évidence pour la présence de xyloglucanes dans la couche G. Des indices en faveur de l'implication des FLAs dans la construction de la couche G ont été également trouvés dans cette étude. Ce travail de thèse ouvre des perspectives pour l'identification du déterminisme moléculaire à l'origine de la création de la tension dans le bois de tension.

Mots clés : peuplier, bois de tension, couche G, polysaccharides, pectines, AGP

Toward identifying molecules responsible for the mechanical properties of poplar tension wood

This work aimed at characterizing the composition in polysaccharides of poplar tension wood fibres and a possible correlation with mechanisms for creating tension. Firstly, we isolated G-layers from tension wood formed in young poplars which grows in a greenhouse under controlled conditions and determine its polysaccharides composition and the structure of these polysaccharides. Therefore, we investigate the polysaccharide distribution during tension and opposite wood fibres differentiation by using 178 antibodies raised against the major wall polysaccharides. The distribution and function of two fasciclin-like arabinogalactan proteins were studied using two antibodies produced to this end and the function of one of the proteins were studied by reverse genetics. This work show an evolution in the polysaccharides composition of G-layer through its differentiation and also differences concerning S2 layer composition between tension and opposite wood fibres. No evidences for the presence of xyloglucans in the G-layer. However, this work shows the presence of a high quantity of RG-I type pectin which may be implicated in a gel-like structure formation which swelling could be responsible for tension creation in cellulose microfibrils. Our results suggest an implication of fasciclin-like arabinogalactan proteins in G-layer construction. Further, this work opens up new perspectives towards identification of molecular basis of tension creation in tension wood.

Keywords: poplar, tension wood, G-layer, polysaccharide, pectin, AGP



**INRA UR588, Unité Amélioration, Génétique
et Physiologie Forestières**

215

