



# ***JOURNÉES DU RÉSEAU FRANÇAIS DES PAROIS***

***29-30 Mai 2002***

***Reims, France***

***PROGRAMME et RÉSUMÉS***

*Organisé par*

***INRA***

*Parois et Matériaux Fibreux, UMR FARE,  
Centre de Recherche Agronomique de la Ville de Reims  
51686 Reims, France*

*et*

*Le Bureau du Réseau Français des Parois*

***Subventionné par :***



**Département de Transformation des Produits Végétaux**



# ***Programme Scientifique***

# ***jRFP, Reims, 29-30 Mai 2002***

## **Mercredi 29 Mai 2002**

12h30-13h45 **Accueil et Inscription; mise en place des posters**

13h45-14h00 **Ouverture de la journée du Réseau Français des Parois (jRFP)**  
J. P Joseleau (CERMAV); B. Kurek (INRA) ; V. Steinmetz (Europol'agro)

- **Animateur** : J.P. Joseleau (CNRS, CERMAV)

14h00-14h40 **Debeire P.**, INRA Reims **O1**  
*Conférence: Fractionnement enzymatique et valorisation des lignocelluloses: quels verrous et quelles solutions pour l'avenir.*

14h40-15h00 **Antoine C., Peyron S., Lullien V., Surget A., Mabilie F., Guillon F., Bouchet B., Abecassis J., Rouau X.**, INRA Montpellier **O2**  
*Composition et propriétés mécaniques des couches périphériques du grain de blé tendre.*

15h00-15h20 **Cathala B.**, INRA Reims **O3**  
*Etude modèle des associations entre lignines-polyosides : propriétés associatives et conséquences sur la réactivité de l'alcool coniférylique.*

15h20-15h40 **Vicré M., Andème-Onzhigi C., Follet Gueye M.L., Chevalier L., Driouich A.** Université de Rouen **O4**  
*Caractérisation des cellules bordantes de racine chez Arabidopsis thaliana, Approche microscopique.*

15h40-16h00 **Deniaud E., Fleurence J., Lahaye M.**, INRA Nantes **O5**  
*Interactions des xylanes mixtes  $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4) dans les parois de l'algue rouge *Palmaria palmata* (L. Kuntze, Rhodophyta).*

16h00-16h30 **Pause café**

- **Animateur** : A. Boudet (CNRS, Toulouse)

16h30-16h50 **Guillet C., Barraud S., Barrière Y.**, INRA Lusignan **O6**  
*Allelic polymorphism analysis for strategic genes involved in the maize plant digestibility.*

16h50-17h10 **Goujon T., El Amrani A., Minic Z., Aletti E., Lapierre C., Lerouxel O., Joseleau J.P., Lerouge P., Jouanin L.**, INRA Versailles **O7**  
*AtBXL1, a novel beta-xylosidase gene from Arabidopsis thaliana, involved in secondary cell wall metabolism.*

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 17h10-17h30 | <b><u>Sivadon P.</u>, Foucart C., Paux E., Grima-Pettenati J.</b> , Université de Toulouse<br><i>A functional genomic approach to clone regulatory genes involved in xylem formation in Eucalyptus.</i>                                                                                 | <b>O8</b>  |
| 17h30-17h50 | <b><u>Guillemin F.</u>, Devaux M.-F. , Guillon F., Bouchet B., Bonnin E., Thibault J.F.</b> , INRA Nantes<br><i>Morphologie des cellules du parenchyme et des faisceaux libéro-ligneux de la racine de betterave sucrière par microscopie photonique associée à l'analyse d'images.</i> | <b>O9</b>  |
| 17h50-18h10 | <b><u>Tokarski C.</u>, Day A., David H., Rolando C.</b> , Université de Lille<br><i>Differential proteomics of the fiber-bearing stem tissues in flax.</i>                                                                                                                              | <b>O10</b> |
| 18h10-18h30 | <b>Pause</b>                                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
| 18h30-21h00 | <b>Session poster (cf Page 5) - cocktail dînatoire</b>                                                                                                                                                                                                                                  |            |
| 21h15       | <b>Départ des navettes pour les hôtels et le centre ville</b>                                                                                                                                                                                                                           |            |

## **Jeudi 30 Mai 2002**

à partir de 07h30: Navettes des hôtels vers le CRA (sauf centre ville)

- **Animateur** : H. David (Univ. Lille)

08h30-09h10 **Boudet A.M., Chabannes M., Ruel K., Ranocha, P. Goffner D.,** **O11**  
**Rossignol, M.** CNRS Toulouse  
*Conférence : Towards an understanding of the supramolecular organization of the cell wall through genomics and proteomics.*

09h10-09h30 **Aouali N., Clément C.,** Université de Reims **O12**  
*Pollen wall formation in Lilium: efficient collaboration between the tapetum and the developing pollen grain.*

09h30-09h50 **Lerouxel O., Choo T.S., Séveno M., Usadel B., Faye L., Lerouge P.,** **O13**  
**Pauly M.** CNRS Rouen  
*Criblages de mutants d' A. thaliana présentant des défauts de structure du xyloglucane.*

09h50-10h10 **Day A., Neutelings G, Dehorter B., Ruel K., Chabbert B., David H.** **O14**  
Université de Lille  
*Expression chez le lin d'une Caffeoyle Coenzyme A 3-O-Méthyltransférase spécifique des tissus externes riches en fibres en relation avec leur (hypo)lignification: Approches moléculaires, cytologiques et structurales.*

10h10-10h40 **Pause café**

- **Animateur** : K. Ruel (CNRS, CERMAV)

10h40-11h00 **Goicoechea M., Rech P., Lacombe E., El Kayal A., Milahevic S.,** **O15**  
**Sivadon P., Grima-Pettenati J.** CNRS Toulouse  
*Role of MYB transcription factors in secondary xylem formation.*

11h00-11h20 **Refrégier G., Doblin M., Sugimoto K., Quintard E., Höfte H.,** **O16**  
INRA Versailles  
*Role of cellulose synthesis in cell elongation.*

11h20-11h40 **Leplé J.C., Lafarguette F., Déjardin A., Pilate, G.** INRA Orléans **O17**  
*Identification of poplar genes differentially expressed during tension wood formation.*

11h40-12h00 **Michonneau P., Chabbert B., Driouich A., Morvan C., Fleurat-Lessard P.,** **O18**  
Métaflora Poitiers  
*Effect of abiotic stresses on the rose-bushes : comparative biochemistry of wall in the stem.*

- 12h00-12h10            **Bilan et clôture de la journée du Réseau Français des Parois**
- 12h10-12h50           **Assemblée Générale du Réseau Français des Parois**
- à partir de 13h00-      **Déjeuner optionnel (Maison des Agriculteurs)**
- 14h00-                   **Navettes de la Maison des Agriculteurs vers le centre ville et la gare  
SNCF**
- 15h00: ouverture du séminaire de  
l'Action Européenne **COST E-20 "Wood Fiber Cell Wall Structure"**

●●●●●

## ***POSTERS***

**session du 29 mai 2002 - 18h30-21h00**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <p><b><u>M. Addi</u></b>, F. Lamblin, F. Esnard, L. Bensaddek, S. Raynaud, S. Charlet, F. Gillet, B. Chabbert, H. David, M-A. Fliniaux, S. Hawkins – <i>Université de Picardie</i><br/>Modulation of lignan biosynthesis by elicitation and genetic modification in flax cell-suspension cultures.</p>                   | <b>P1</b>  |
| <p>N. Grozev, <b><u>V. Aguié-Beghin</u></b>, Y. Panaiotov, R. Douillard, B. Cathala - <i>INRA Reims</i><br/>Polymérisation de l'alcool coniférylique (précurseur des lignines) à l'interface air/eau.</p>                                                                                                                | <b>P2</b>  |
| <p><b><u>C. Andème-Onzighi</u></b>, J. Judy-March, M. Sivaguru, T. I. Baskin, A. Driouich - <i>Université de Rouen</i><br/>Le mutant <i>reb1-1</i> d'<i>Arabidopsis thaliana</i>: alterations pariétales des cellules racinaires.</p>                                                                                    | <b>P3</b>  |
| <p><b><u>Y. Barrière</u></b>, V. Roussel, C. Gibelin - <i>INRA Lusignan</i><br/>QTL mapping for cell wall constituents and digestibility traits in a RIL progeny of two early dent forage maize lines.</p>                                                                                                               | <b>P4</b>  |
| <p>S. Benamrouche, <b><u>J. Beaugrand</u></b>, G. Chambat, B. Chabbert, P. Debeire, M. O'Donohue - <i>INRA Reims</i><br/>Dégradation enzymatique des hémicelluloses du son de blé.</p>                                                                                                                                   | <b>P5</b>  |
| <p><b><u>D. Crônier</u></b>, B. Chabbert - <i>INRA Reims</i><br/>Evolution des constituants non-cellulosiques des fibres extra-xylémiennes au cours de la maturation du chanvre.</p>                                                                                                                                     | <b>P6</b>  |
| <p><b><u>F. Delmas</u></b>, M. Hernould, A. Mouras, C. Chevalier - <i>INRA Bordeaux</i><br/>Etude fonctionnelle de l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique 8-phosphate (Kdo-8P) synthase de tomate. Caractérisation de plantes transgéniques de tomate et d'un mutant de perte de fonction chez <i>Arabidopsis</i>.</p> | <b>P7</b>  |
| <p>N. Durot, <b><u>B. Kurek</u></b> - <i>INRA, Reims</i><br/>Treatment of wheat straw by potassium carbonate and sodium hydroxide: the unmasking of a hidden side of lignin.</p>                                                                                                                                         | <b>P8</b>  |
| <p><b>A-S. Fontaine</b> - <i>INRA Lusignan</i><br/>Composition "plante entière sans épis" et structure histologique des parois chez 10 lignées de maïs ensilage: influence sur la digestibilité in vitro de leurs parois.</p>                                                                                            | <b>P9</b>  |
| <p><b>D. Fournand</b>, <b><u>I. Mila</u></b>, C. Lapierre - <i>INRA-INA Grignon</i><br/>Analyse par électrophorèse capillaire des monomères issus de la thioacidolyse des lignines.</p>                                                                                                                                  | <b>P10</b> |
| <p><b><u>F. Guillon</u></b>, T. Chevalier, L. Quillin, J.P. Uille, B. Bouchet, M.-F. Devaux, L. Saulnier - <i>INRA Nantes</i><br/>Un serum polyclonal anti beta (1-4) xylanes et son application pour la localisation des arabinoxylanes dans les parois du grain de blé.</p>                                            | <b>P11</b> |

- A. Habrant, B. Chabbert et B. Cathala - INRA Reims** **P12**  
Etude par Infra-Rouge à Transformé de Fourier des interactions hydrogènes au sein de composites pectines-DHP.
- T. Imai, K. Ruel, G. Pilate, J Ch. Leplé and J-P. Joseleau** – CERMAV Grenoble **P13**  
Influence of environmental or genetic factors on the formation of tension wood.
- M. Lahaye, K. Faïza, B. Bouchet, F. Guillon, P. Frasse, M. Bouzayen – INRA Nantes** **P14**  
Composition, structure et localisation des pectines d'un mutant pleiotrope de fruit de tomate affecté sur un facteur de transcription sensible à l'auxine.
- E. Leboeuf, S. Thoiron, M. Lahaye – INRA Nantes** **P15**  
Modulation des pectines en relation avec l'adhésion cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*.
- J-Y. Lee, M-L. Follet-Gueye, R. Viëtor, L. Chevalier, A. Driouich** - Université de Rouen **P16**  
*Emezzy (emz)*, a novel growth-defective mutant of flax.
- A.Lejeune, S. Thoiron, S. Constant, E. Demarsy, M. Lahaye, L. Caron – Université de Nantes** **P17**  
Changes in cell wall structural protein patterns during tomato fruit maturation. Biochemical and molecular studies.
- S. Lepifre, S. Baumberger, C. Lapierre - INRA-INA Grignon** **P18**  
Sulfur-free lignins from alkaline pulping: some structural features.
- M. Mathieu, G. Neutelings, S. Hawkins, E. Grenier, H. David, - Université de Lille** **P19**  
Analyse de l'activité du promoteur d'un gène "germin-like", *PcGER1* au cours de la croissance cellulaire (système hétérologue : cellules BY-2 de tabac).
- V. Meyer-Pinson, M. Petit-Conil, K. Ruel, G. Valtat and B. Kurek** - INRA Reims **P20**  
The use of manganese and oxalate in fiber technology: Biochemical and technical issues.
- S. Peyron, J.C. Autran, J. Abecassis, X. Rouau- INRA Montpellier** **P21**  
Effets d'un prétraitement oxydant sur le degré de réticulation des arabinoxyldes pariétaux dans les enveloppes du grain de blé dur. Influence sur le comportement rhéologique des tissus
- C. Pouteau, B. Cathala, N. Boquillon, P. Dole – INRA Reims** **P22**  
Détermination de la composition en groupements hydroxyles de lignines. Relations avec leurs propriétés antioxydantes.
- J. Proust, E. Pesquet, M. Bosio, S. Guillaumie, D. Rouquié, R. de Rose, Y. Barrière, J-P. Martinant, A. Murigneux, D. Goffner, M. Pichon - CNRS Toulouse** **P23**  
Towards a better understanding of forage digestibility using genomic approaches and model species.

- D. van Raemdonck, W. Boerjan, M. Jaziri and M. Baucher - *Univ Bruxelles* **P24****  
In vivo wood formation analysis in poplar through cDNA-AFLP technology.
- S. Robert, S. Pagant, G. Mouille, G. Réfrégier , H. Höfte, O. Lerouxel, R. J. **P25****  
**Viëtor, P. Lerouge, S. Vernhettes – *INRA Versailles***  
Elucidation of the role of KORRIGAN, a endo 1,4 - $\beta$ -glucanase in cellulose biosynthesis.
- R. Sibout, I. Mila, B. Pollet, T. Goujon, L. Jouanin, C. Lapierre - *INRA Versailles* **P26****  
Overexpression of monolignol biosynthesis poplar genes in Arabidopsis: impact on lignin content and structure.
- J.-P. Touzel, B. Chabbert, B. Monties, P. Debeire, B. Cathala - *INRA Reims* **P27****  
Synthèse et caractérisation de DeHydrogéo Polymères (modèles de lignines) dans de la cellulose bactérienne et dans des composites cellulose/pectine.
- R.Viëtor, F. Brun, L. Faye, P. Lerouge, M. Gonneau – *INRA Versailles* **P28****  
Biosynthèse de la paroi et contrôle de la morphogenèse chez la mousse *Physcomitrella patens*.

••••

# ***Communications Orales***

## **Le fractionnement enzymatique et la valorisation des lignocelluloses : quels verrous et quelles solutions pour l'avenir**

**Philippe Debeire**

UMR INRA-URCA FARE, Reims

### **Conférence**

Les recherches sur le fractionnement enzymatique des parois végétales de nature lignocellulosique datent des années 1970. Ces recherches initiées aux Etats-Unis visaient à concurrencer la production de glucose à partir d'amidon par la mise en œuvre de cellulases d'origines fongique ou bactérienne sur différents substrats lignocellulosiques. L'application de ces recherches s'est heurtée aux difficultés d'hydrolyser les parois secondaires lignifiées dans des conditions compatibles avec une exploitation industrielle rentable. Les principaux verrous de ces technologies reposaient sur :

- le coût et l'efficacité des préparations cellulasiques (endoglucanases, cellobiohydrolases)
- l'insolubilité et la structure des substrats pariétaux rendant leur hydrolyse longue et difficile.

Depuis 1999, les recherches sur l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose sont de nouveau d'actualité. L'objectif de ces recherches est clairement affiché : la bioconversion de la plante entière pour des raisons de rentabilité (blé, maïs, canne à sucre, herbacées...), y compris les co-produits de nature lignocellulosique (pailles, rafles, tiges...) pour la production de sucres fermentescibles en éthanol (diminution de l'effet de serre, indépendance économique vis-à-vis des énergies fossiles). Ces recherches, financées par le programme américain «Developing and promoting biobased products and bioenergy» et par le 6<sup>ème</sup> PCRD européen, visent à lever les verrous scientifiques et technologiques de la bioconversion des matières premières agricoles, et plus particulièrement à l'obtention de polysaccharide-hydrolases de « nouvelle génération ».

Au niveau de notre laboratoire nous avons initié depuis plusieurs années des recherches visant à la bioconversion enzymatique *in situ* d'hémicelluloses de différents co-produits agricoles lignocellulosiques en vue de la production de pentoses, à l'aide d'enzymes modèles purifiées (endoxylanases, arabinofuranosidases, glucuronidases). Des résultats encourageants ont été obtenus sur la paille et le son de blé mais montrent à l'évidence que les différents verrous à lever pour une optimisation de la bioconversion de ces substrats reposent sur :

- une meilleure connaissance de la structure et de la mise en place des différents constituants pariétaux (lignine, cellulose, hémicelluloses) et de leurs interactions avec les différentes enzymes utilisées.
- la création de nouveaux outils enzymatiques performants (évolution moléculaire, mutagénèse) possédant des spectres d'activité ou des propriétés physico-chimiques plus étendus.

## **Composition et propriétés mécaniques des couches périphériques du grain de blé tendre**

**Antoine C., Peyron S., Lullien V., Surget A., Mabilie F., Guillon F., Bouchet B., Abecassis J., Rouau X.**

Unité de Technologie des Céréales et des Agropolymères INRA-ENSAM  
2, Place Pierre Viala, 34060 cedex1 Montpellier

Dans la filière blé tendre, les couches périphériques du grain ou sons (couche à aleurone, épiderme du nucelle, testa et péricarpe) sont peu valorisées. Elles représentent pourtant une source importante de micronutriments, essentiellement concentrés dans la couche à aleurone. Ces micronutriments, enchâssés dans des structures pariétales complexes et résistantes, ne sont pas rendu accessibles lors de la mouture traditionnelle.

Dans cette étude, une caractérisation des propriétés mécaniques et structurales des couches constitutives des enveloppes de grains de blés tendres, hard et soft, a été réalisée pour comprendre les bases de leur fractionnabilité.

Trois types d'éprouvettes de tissus ont été isolées manuellement des sons. Leur composition histologique déterminée par microscopie photonique a permis d'y reconnaître le péricarpe externe, la couche intermédiaire et la couche à aleurone respectivement. Des tests de traction ont été effectués à humidité et température contrôlées avec un appareil de DMTA, sur des éprouvettes taillées selon les orientations longitudinale et transversale au grand axe du grain.

Le péricarpe, dont le comportement mécanique est anisotrope, présente une contrainte à la rupture de type fragile plus importante que la couche à aleurone. Cette dernière, constituée de cellules polygonales, se caractérise par un comportement isotrope associé à une importante déformation plastique. La couche intermédiaire présente un comportement intermédiaire.

Les analyses biochimiques montrent que les parois du péricarpe sont plus réticulées par des dimères d'acide férulique que celles de la couche à aleurone, et que leurs arabinoxylanes sont plus substitués. Les parois de la couche intermédiaire présentent une teneur en dimères d'acide férulique et une structure d'arabinoxylanes semblables à celles de la couche à aleurone.

A terme, la mise en relation des propriétés structurales et mécaniques et du comportement au broyage permettra d'établir les connaissances nécessaires pour piloter la mise au point de procédés d'extraction des micronutriments de la couche à aleurone.

## Etude modèle des associations entre lignines-polyosides : Propriétés associatives et conséquence sur la réactivité de l'alcool coniférylique

**Bernard Cathala**

Unité Mixte de Recherche Fractionnement des Agro-Ressources et Emballages, CRA 2 Esp  
R. Garros 51686 Reims Cedex, France.  
cathala@reims.inra.fr

La biosynthèse des parois végétales secondaires consiste en la mise en place d'un réseau polyosidiques dans lequel est ensuite polymérisée la lignine (1). Des polymères hydrophiles (pectines par exemple) sont associés à des polymères plus hydrophobes (les lignines). La polymérisation de la lignine est un phénomène dynamique qui modifie le réseau polyosidique préexistant (réticulation, greffage covalent, etc...), lequel influence, en retour, la réaction de polymérisation de la lignine. La compréhension de l'architecture pariétale nécessite la prise en compte de ces **interactions croisées** et leurs impacts sur la cohésion des parois végétales.

Les résultats présentés portent sur la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de la polymérisation de l'alcool coniférylique (monomère des lignines) en présence de pectines. Afin d'établir les bases physico-chimiques de la réactivité de l'alcool coniférylique, cette étude a tout d'abord été réalisée en **solution** ; elle a ensuite été poursuivie en milieu **solide** afin de se rapprocher au plus près de la réalité physique des parois végétales.

### a. Etude modèle en solution :

La polymérisation de l'alcool coniférylique entraîne la formation de complexes covalents entre les pectines et les DHP (polymères dehydrogénatifs) (2). Ces structures mixtes (hydrophobes- hydrophiles) forment des microdomaines (3) qui ont pour effet de limiter la précipitation des DHPs. Cette "compatibilisation" modifie l'équilibre global de la réaction de polymérisation en permettant à des polymères normalement insolubles de réagir, mais également en créant des microenvironnements hydrophobes susceptibles de modifier l'équilibre mésomérique du radical de l'alcool coniférylique (4).

### b. Etude modèle en milieu solide :

Afin de valider les hypothèses obtenues en solution nous avons réalisé la polymérisation de l'alcool coniférylique en milieu solide en mettant à profit la possibilité de produire des gels de cellulose bactérienne et des composites cellulose/pectine au moyen de "*Gluconacetobacter xylinus* " (5). Un effet important des pectines sur la structure et la dispersion des DHP synthétisés au sein des gels a pu être mis en évidence.

(1) Terashima, N.; Fukushima, K.; He, L.-F.; Takabe, K. *Comprehensive model of the Lignified Plant Cell Wall*; Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D. and Ralph, J., Ed.; American Society of Agronomy: Madison, 1993, pp 247\_270.

(2) Cathala, B.; Chabbert, B.; Joly, C.; Dole, P.; Monties, B. *Phytochemistry* 2001, 56, 195.

(3) Cathala, B.; Monties, B. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001, 29, 45.

(4) Houtman, C. J. *Holzforschung* 1999, 53, 585.

(5) Chanliaud, E.; Gidley, M. J. *The Plant Journal* 1999, 20, 25.

## **Caractérisation des cellules bordantes de racine chez *Arabidopsis thaliana*, Approche microscopique**

**Maïté Vicré, Christine Andème-Onzhigi, Marie Laure Follet Gueye,  
Laurence Chevalier et Azeddine Driouich**

UMR CNRS 6037. CCME IFRMP23. Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan Cedex.

La plupart des plantes produisent des milliers de cellules métaboliquement actives programmées pour se détacher de la coiffe racinaire et être relâchées dans l'environnement externe, il s'agit des cellules bordantes. Ces cellules semblent jouer un rôle important dans les relations entre hôtes et pathogènes (Hawes et al. 1998). Les études de Hawes et al. (2000) indiquent que, suivant la nature de la plante et des microorganismes, ces cellules peuvent spécifiquement attirer ou refouler les pathogènes.

La différenciation des cellules périphériques de racine en cellules bordantes s'accompagne de changements significatifs dans la nature des protéines synthétisées (Brigham et al. 1995). La composition de ces cellules en polysaccharides et arabinogalactanes protéines (AGPs) est encore inconnue. Dans cette étude nous avons caractérisé les cellules bordantes par approche microscopique. Dans un premier temps l'ultrastructure de ces cellules a été étudiée après fixation par congélation sous haute pression suivie de cryosubstitution. L'une des particularités de ces cellules est la présence de nombreux empilements golgiens et l'association de vésicules de sécrétion aux citernes golgiennes ou dispersées dans le cytoplasme. Ces observations sont en accord avec le fait que les cellules bordantes restent actives même une fois détachées de la coiffe de la racine. La composition des cellules bordantes a été étudiée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre des pectines et des AGPs. Nous avons pu détecter par cette technique un marquage très important des AGPs spécifiquement associé aux cellules bordantes chez *Arabidopsis thaliana*. Il n'est pas exclu que ces AGPs jouent un rôle dans les relations hôtes-pathogènes. Des études sont actuellement en cours pour vérifier cette hypothèse.

Brigham et al. (1995) *Plant Physiol.* 109 : 457-463.

Hawes et al. (1998) *Annu.Rev. Phytopathol.* 36 : 311-327.

Hawes et al. (2000) *Trends in Plant Science.* 5 (3) : 128-133

## Interactions des xylanes mixtes $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4) dans les parois de l'algue rouge *Palmaria palmata* (L. Kuntze, Rhodophyta)

**Estelle Deniaud, Joël Fleurence, Marc Lahaye**

INRA-Unité de Recherche sur les Polysaccharides, leurs Organisations et Interactions,  
Centre de Recherche de Nantes, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3  
IFREMER-Laboratoire de Biochimie des Protéines et Qualité,  
Rue de l'Ile d'Yeu, BP 21115, 44311 Nantes

*Palmaria palmata* (L. Kuntze) est une algue rouge alimentaire présentant d'intéressantes potentialités nutritionnelles et biotechnologiques. Ses parois cellulaires jouent un rôle important sur les caractéristiques organoleptiques, sur la texture de l'algue et sur l'extraction des composés cytoplasmiques d'intérêt. Elles ont été décrites comme étant composées par une faible proportion (3 à 4 % du poids sec de l'algue) de cellulose et de xylanes  $\beta$ -(1,4) associés par des liaisons hydrogène et de façon majoritaire (35 à 40 % du poids sec de l'algue) par des xylanes neutres liés  $\beta$ -(1,3)/ $\beta$ -(1,4). La connaissance des mécanismes d'interactions de ces xylanes matriciels au sein des parois est essentielle pour aborder l'impact de la structure pariétale sur les propriétés mécaniques de l'algue. Pour déterminer ces interactions, les xylanes ont été extraits de façon séquentielle par des solutions salines, alcalines, phénoliques, chaotropes et acides. Une étude de la composition chimique et des propriétés physico-chimiques des xylanes extraits a mis en évidence leur acidité en relation avec la présence de sulfates et de phosphates. Toutefois, bien que les fonctions acides suggèrent l'existence d'interactions ioniques, l'extraction des xylanes  $\beta$ -(1,4)/ $\beta$ -(1,3) par NaOH 1-8 M et particulièrement par l'urée 8M et le guanidium thiocyanate 4.5 M indique qu'ils sont principalement associés par des liaisons hydrogène. Les bases structurales de ces interactions seront discutées en relation avec la localisation des sulfates et des phosphates, la répartition des liaisons  $\beta$ -(1,3) au sein du xylane et le rôle de protéines pariétales.

## Allelic Polymorphism Analysis for Strategic Genes Involved in the Maize Plant Digestibility

**C. Guillet, S. Barraud and Y. Barrière**

Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, INRA, Route de Saintes,  
86 600 Lusignan, France.

Maize silage represent the main rough feed resource for dairy and meat cattle. Lignin is a major cell wall polymer of vascular plants that provides mechanical strength to the stem, but protects cellulose fibers from microbial fermentation in the rumen of cattle. For instance, the amount of lignin and the ratio between the methoxylated monomers (termed guaiacyl (G) and syringyl (S) units) are of critical importance in forage crop digestibility (Baucher et al., 1998).

The objective of this study was to determine molecular polymorphism (SNP and insertion/deletion) within genes involved in lignin biosynthesis in order to identify correlation between polymorphism and digestibility trait. In a first step, allelic variation have been studied on 11 maize lines chosen for their high or poor digestibility. Because of their strategic importance in lignin biosynthesis, six genes, CCoAOMT1, CCoAOMT2, AldOMT, CCR1, CCR2 and a laccase have been subject to allele sequencing. It was recently shown that CCoAOMT (Caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase) was involved in the setting up of lignin content and quality (S/G ratio) (Zhong et al., 1998 ; Guo et al., 2001). CCR (cinnamoyl-CoA Reductase) catalyses the first specific step in the synthesis of lignin monomers. Laccases participate in lignin polymerization (Sato et al., 2001).

Genomic coding regions for all the combinations gene / studied maize lines were obtained by PCR amplification with primers designed from cDNA or EST sequences (Pichon *et al.*, 1998; Civardi *et al.*, 1999; Biogemma: confidential data). After allele sequencing, we have determined the genes intron/exon structure and identified polymorphism by sequence alignment analysis using the software DnaSP (Rozas and Rozas, 1997). Maize CCR2 and CCoAOMT2 genes present an original organization. Although almost all plant CCR genes sequenced to date have four introns, CCR2 consists of three introns whose positions and number are identical to that of the *Arabidopsis thaliana* CCR2 gene (*AtCCR2*) (Lauvergeat *et al.*, 2001). As observed in other CCoAOMT genes known, the sequence corresponding to CCoAOMT1 gene contained four intron, but the fourth intron is missing in CCoAOMT2.

The multiple alignments, realized for each gene genomic sequences, showed that polymorphism was mainly located in the non coding region. In comparison to the maize genes examined to date, the six genes have a high degree of nucleotide polymorphism (values of  $\theta$  vary between 10 to 28/1000 pb). The AldOMT gene presents the most important variability with numerous SNPs and INDELs in its unique intron and several amino acids changes. The relationships between these modifications and the digestibility trait are under analysis. Moreover, for one gene, important deletions were observed in it first exon leading to major modifications in the amino acids sequences. As these INDELs were found for a maize line with high digestibility, this study highlights that this gene could have a significant role in maize digestibility variation.

This project is financed by the Genoplante program "maize"

Baucher M, Monties B, Van Montagu M, Boerjan W (1998) Crit Rev Plant Sci 17, 125-197

Sato Y., Wuli B., Sederoff R., Whetten R. (2001) J. Plant res. 114: 147-155

Civardi L, Rigau J, Puigdomenech P (1999) Plant Physiol 120, 1206-1206

Guo D, Chen F, Inoue K, Blount J W, Dixon R A (2001) Plant Cell 13, 73-88

Pichon M, Courbou I, Beckert M, Boudet A-M, Grima-Pettenati J (1998) Plant Mol Biol 38, 671-676

Zhong R, Morrison W H, Negret J, Ye Z-H (1998) Plant cell 10, 2033-2045

***AtBXL1*, a novel beta-xylosidase gene from *Arabidopsis thaliana*, involved in secondary cell wall metabolism**

**Thomas Goujon<sup>1</sup>, Abdelhak El Amrani<sup>1</sup>, Zoran Minic<sup>1</sup>, Estelle Aletti<sup>1</sup>, Catherine Lapierre<sup>2</sup>, Olivier Lerouxel<sup>3</sup>, Jean-Paul Joseleau<sup>4</sup>, Patrice Lerouge<sup>3</sup> and Lise Jouanin<sup>1</sup>**

1: Biologie Cellulaire, INRA, F78026 VERSAILLES Cedex

2: Chimie Biologique, INRA-INA PG, F78850 THIVERVAL-GRIGNON

3: Faculté des sciences, Université de Rouen, F76821 MONT ST AIGRAN.

4: CERMAV, CNRS, BP53, F38041 GRENOBLE Cedex 9.

Screening for GUS expression in secondary tissues of mature stems of *Arabidopsis thaliana* in Versailles T-DNA insertion library allowed the isolation of a transformant with an insertion of the GUS coding sequence, located 700 bp upstream the ATG of a gene encoding a putative beta-xylosidase. The transformant has no phenotype since the expression of the gene is not disrupted by the insertion. The analysis of the predicted protein, *AtBXL1*, suggests its targeting to the extra-cellular matrix and its involvement in cell-wall metabolism through its putative activity towards xylans. The 2 kb promoter sequence of *AtBXL1* was fused with the GUS coding sequence and introduced into wild-type *Arabidopsis thaliana*. GUS expression was shown to be restricted to tissues undergoing secondary cell wall formation. Beta-xylosidase activity was found in the cell wall fraction of different organs of wild-type plants, in correlation with *AtBXL1* gene transcript accumulation. Transgenic plants expressing the full lenght *AtBXL1* cDNA in antisense orientation were generated. Lines exhibiting the most decreased beta-xylosidase transcript accumulation and beta-xylosidase activity, had phenotypical alterations and an altered composition of polysaccharides. This newly identified gene is proposed to be involved in secondary cell wall hemicellulose metabolism.

This work was performed in the frame of a Genoplante program.

## **A functional genomic approach to clone regulatory genes involved in xylem formation in *Eucalyptus***

**Pierre SIVADON, Camille FOUCART, Etienne PAUX,  
Jacqueline GRIMA-PETTENATI**

Laboratoire « Régulation Transcriptionnelle et Formation du Xylème »  
Pôle de Biotechnologie Végétale, UMR UPS-CNRS 5546, 24 chemin de Borde Rouge,  
BP17 Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France  
tél: 05 62 19 35 51 ; fax: 05 62 19 35 02 ; e-mail: [sivadon@smcv.ups-tlse.fr](mailto:sivadon@smcv.ups-tlse.fr)

Xylem formation is a complex developmental process which involves coordination of cell division, cell differentiation with secondary cell wall formation and programmed cell death. Recent results obtained in our lab indicate that the vascular pattern of expression of *Eucalyptus CAD2* and *CCR* genes involved in lignin biosynthesis is controlled transcriptionally and therefore support the hypothesis that xylem formation is genetically coordinated. In order to identify genes that are key regulators of xylogenesis, suppression subtractive hybridization, whose main advantage is to give access to poorly expressed transcripts as it is commonly the case for regulatory genes, has been used to construct a series of cDNA libraries enriched in genes preferentially expressed in *Eucalyptus* cambium, differentiating phloem and xylem. These libraries have been spotted onto high density filters and hybridized with probes from different *Eucalyptus* tissues in order to characterize genes specifically expressed during xylogenesis. Probes specifically designed to recognize gene families coding for transcription factors, kinases and other signalling proteins are also being used. Sequencing of selected clones and sequence comparisons to databases have assigned putative functions to some of the selected clones. Sequence and functional analysis of all selected clones are in progress and will be discussed.

## **Morphologie des cellules du parenchyme et des faisceaux libéro-ligneux de la racine de betterave sucrière par microscopie photonique associée à l'analyse d'images.**

**F. Guillemin, M.-F. Devaux, F. Guillon, B. Bouchet, E. Bonnin, J.-F. Thibault.**

URPOI, INRA Nantes, BP 71627, 44316 Nantes cedex 3, France  
guillemi@nantes.inra.fr

La compréhension de l'organisation cellulaire au sein du végétal est essentielle pour appréhender les relations entre la structure et les propriétés mécaniques, rhéologiques ou sensorielles. La mise en relation des propriétés du matériel végétal avec sa structure nécessite de quantifier l'organisation cellulaire, morphologie et agencement des cellules.

La quantification implique de visualiser les différents tissus par imagerie à l'échelle microscopique et d'appliquer des techniques d'analyse d'images pour extraire les caractéristiques morphologiques des cellules.

Dans ce cadre, l'objectif de cette étude est d'identifier les différents types cellulaires dans une structure complexe par des paramètres morphologiques.

La racine de betterave est composée de différents tissus (parenchyme saccharifère, faisceaux libéro-ligneux comprenant le cambium secondaire, le phloème, les cellules compagnes, le parenchyme phloémien, les vaisseaux de xylème entourés d'un parenchyme à petites cellules). Elle constitue, de ce fait, un bon modèle pour étudier la morphologie des cellules en fonction de leur appartenance à un type cellulaire.

Des coupes à main levée de racine de betterave ont été colorées à l'acridine orange. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (MCBL ZEISS LSM 410).

Dans les images, les parois apparaissent comme un réseau continu séparant les cellules à caractériser. Les paramètres morphologiques calculés pour chaque cellule sont : aire (A), longueur (L), largeur ( $\lambda$ ), excentricité, élongation ( $\lambda/L$ ), orientation dans l'image, diamètre équivalent, aire de l'enveloppe convexe ( $A_c$ ), solidité ( $A/A_c$ ) et épaisseur de la paroi.

Une analyse en composantes principales a permis de sélectionner 5 paramètres complémentaires : aire, élongation, orientation, solidité et épaisseur des parois.

Les paramètres aire et solidité permettent de discriminer les cellules du parenchyme saccharifère des cellules des faisceaux libéro-ligneux.

Pour différencier les différents types cellulaires présents dans les faisceaux libéro-ligneux, c'est-à-dire le cambium, le xylème et le phloème, 3 paramètres sont nécessaires : aire, élongation ou orientation et épaisseur des parois.

Cette étude morphologique nous a permis d'identifier les différents types cellulaires et de déterminer les caractéristiques morphologiques de chacun grâce à des paramètres descriptifs simples. Afin de poursuivre cette étude, il est envisagé de caractériser chaque cellule non plus par ces seules caractéristiques mais en y associant les caractéristiques morphologiques de ces voisines.

## Differential Proteomics the fiber-bearing stem tissues in flax

**Caroline TOKARSKI, Arnaud DAY, Hélène DAVID, Christian ROLANDO**

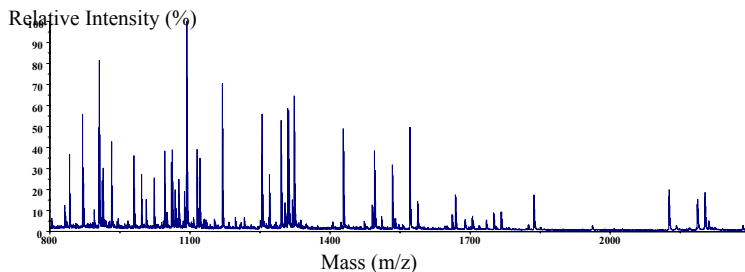
Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire UPRESA CNRS 8009, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bat.C4, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales UPRES 2702, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bat.SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

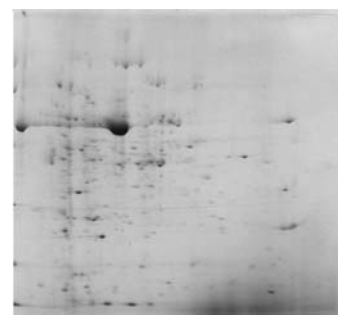
Proteomics has been defined as the systematic analysis of the protein population in a tissue, cell, or subcellular compartment. Plant proteomics is still in its infancy, but is likely to become an active field with a large impact on plant biology. It is fair to say that proteomics has been driven by rapid advances in biological techniques and mass spectrometric equipment, together with increasing amounts of EST and genomic sequence data.

The aim of this study is to develop differential plant proteomics and to identify the proteins present in fiber-bearing stem tissues. First, protein extraction<sup>1</sup> was realized on the flax stem tissues at different height of the stem. The 2D-PAGE was used to separate the extracted proteins and to observe the differences between each gels corresponding to different heights. Proteins are separated on the basis of charge in the first dimension and molecular masses in the second.

Some selected proteins separated by electrophoresis were digested with a site-specific protease named trypsin, resulting in a set of peptides. The masses of the peptides were measured by MALDI-TOF-MS to produce a peptide mass fingerprint. This discriminative signature is compared with the peptide masses predicted from theoretical digestion of protein currently contained within databases.



MALDI-TOF-MS spectrum of a protein from the 2D gel electrophoresis



**Erreur !**

2D gel electrophoresis of extracted proteins from medium height of flax stem tissues

Plants proteins generally share a significant amount of homology between each other, this make it feasible to search the database directly with ion masses generated by mass spectrometry. But in order to have an unambiguous identification, we have started to identify proteins by peptide fragmentation mass spectra, that contain rich information on a small section of a protein. The information on the sequence of each peptide enables the identification of a protein from a single peptide. This allows searching of databases that contain incomplete gene information, for exemple, Expressed Sequence Tags (ESTs). These spectra are realized with nanospray tandem mass spectrometer (Q-STAR PULSAR) coupled to nano liquid chromatography. A fused-silica capillary column with an inner diameter of 75  $\mu\text{m}$  is applied for the separation of peptide mixtures.

<sup>1</sup>Arnaud Day, Bertrand Dehorter, Godfrey Neutelings, Xavier Czeszak, Brigitte Chabert, Lionel Belingheri, Hélène David, Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase enzyme activity, protein and transcript accumulation in flax (*Linum usitatissimum*) stem during development, *Physiologia Plantarum* 113, 275-284, 2001

## **Towards an understanding of the supramolecular organization of the cell wall through genomics and proteomics**

**A.M. BOUDET, M. CHABANNES, K. RUEL, Ph. RANOCHA, D. GOFFNER  
and M. ROSSIGNOL**

UMR CNRS-UPS 5546

Pôle de Biotechnologie Végétale

BP 17 Auzeville

F-31326 CASTANET TOLOSAN

T. 33 (0)5 62 19 35 21

F. 33 (0)5 62 19 35 02

e-mail : amboudet@smcv.ups-tlse.fr

### **Conférence**

Various data are available to demonstrate that the chemical composition of lignocellulosics is essentially variable depending on the species, the developmental stage and the environmental conditions.

An additional level of complexity is related to the fact that the walls are composite materials resulting essentially from the assembly of different polymers. In addition to the basic chemical composition, the nature of the interactions between wall constituents is undoubtedly a crucial parameter for determining the wall properties *in planta* and the technological characteristics of plant products. This aspect is becoming particularly important since we are entering an era where plants will be more and more considered as sources of renewable carbon. Consequently, wall polymers are likely to be increasingly used starting from conventional resources or from redesigned plant materials with optimized cell wall composition. In this way, a better knowledge of the supramolecular organization of the plant cell wall and particularly of the lignified plant cell wall - the major carbon sink in the biosphere- will become necessary for optimized breeding, genetic manipulation and processing of plants and plant products.

In this presentation we will report data from the literature showing or suggesting specific locations and specific interactions of cell wall constituents. In addition, we will present results from our laboratory, on transgenic plants, indicating the occurrence of sub domains in the lignified wall and the role of specific types of lignins in the cohesion of wall components.

We will also show results indicating the role of laccases in the organization and association of wall polymers. Finally we will provide preliminary attempts aiming to exploit various physical methods for probing the relative mobility of the wall macromolecules and the mechanical properties of cell walls of different origins.

We are starting in Toulouse a proteomic approach in order to identify the proteins associated to the primary and the secondary wall and the most recent data will be presented.

## **Pollen wall formation in *Lilium*: efficient collaboration between the tapetum and the developing pollen grain**

**Nassera AOUALI, Christophe CLÉMENT**

Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, Biologie et Physiologie Végétales,  
URVVC - UPRES EA 2069, BP 1039, 51687 REIMS Cedex 2, France

Pectin has been quantitatively assayed in three anther compartments of *Lilium* during pollen development. Pectin levels in both the anther wall and the loculus increased following meiosis, were maximal during the early microspore stages and declined during the remainder of pollen ontogenesis. In the microspores/pollen grains, pectin was detectable at low levels during the microspore stages but accumulated significantly during pollen maturation.

In addition, pectin has been immuno-localized in the anther using monoclonal antibodies JIM 5 and 7. During microspore vacuolation, pectin was detected both in the tapetum cytoplasm as well as in the undulations of the plasma membrane and in the locular fluid. After callose degradation, pectin epitopes were as abundant in the primexine matrix as in the loculus but absent in the microspore cytoplasm, suggesting that pectin synthesized and secreted by the tapetum is transferred to the microspore through the locular fluid. At the end of microspore vacuolation, esterified pectin epitopes were present within the lipids of the pollenkit, and released in the loculus at pollen mitosis.

In the pollen wall, pectin epitopes were slightly detected in the microspore before mitosis. From pollen mitosis and during pollen maturation, pectin was newly synthesized in the vegetative cell and secreted in the proximal intine. In the mature pollen grain, unesterified pectin epitopes were located in the proximal intine whereas esterified pectin epitopes were deposited in the distal intine.

In the meantime, both unesterified and esterified pectin labelling accumulated as reserves in the cytoplasm of the vegetative cell, concurrently with starch degradation, suggesting that 1/ pectin constitutes a significant component of the pollen carbohydrate reserves in the mature grain of *Lilium*; 2/ pollen anticipates the formation of the pollen tube wall by storing cell wall elements during maturation.

## Criblages de mutants d'*A. thaliana* présentant des défauts de structure du xyloglucane

**Olivier Lerouxel<sup>1</sup>, Tze Siang Choo<sup>2</sup>, Martial Séveno<sup>1</sup>, Björn Usadel<sup>2</sup>, Loïc Faye<sup>1</sup>,  
Patrice Lerouge<sup>1</sup>, Markus Pauly<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> CNRS UMR 6037, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan, France

<sup>2</sup> Max-Planck Institute for molecular plant physiology, Am Mühlenberg 1, 14476 Golm, Potsdam, Germany

La paroi végétale est une structure dynamique dont la régulation détermine l'élongation cellulaire, et par conséquent la morphogénèse de la plante. Cette paroi est composée principalement de polysaccharides, parmi lesquels on retrouve chez les dicotylédones la cellulose et le xyloglucane. Cellulose et xyloglucane interagissent alors dans un même réseau qui détermine les propriétés mécaniques de la paroi. Cependant de nombreuses inconnues existent, tant sur la mise en place de ce réseau que sur les acteurs moléculaires responsables de la biosynthèse des polymères qui le constitue.

Nous avons développé des techniques de cribles biochimiques permettant de rechercher des altérations du réseau cellulose/hémicellulose chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana*. Les cribles retenus incluent d'une part l'analyse de la composition en monosaccharides de la paroi et la quantification de la cellulose par chromatographie gazeuse et d'autre part l'analyse qualitative du xyloglucane. Ces cribles ont été adaptés aux faibles quantités de matériel disponible à partir de plantules d'*A. thaliana*. Afin d'évaluer rapidement des défauts de structure du xyloglucane, les plantules sont chauffées dans l'éthanol puis la fraction insoluble est directement soumise à une digestion par une endoglucanase. Les fragments ainsi libérés par l'enzyme sont par la suite directement analysés par chromatographie, par électrophorèse après couplage à un fluorophore (FACE) ou par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Au-delà de l'analyse qualitative des oligosaccharides dérivés du xyloglucane, le groupe de Markus Pauly a développé un programme de quantification des spectres MALDI-TOF qui permet d'obtenir un phénotypage précis, hautement reproductible, de la structure du xyloglucane, ceci de façon semi-automatique. Ces approches permettent très rapidement d'établir une " empreinte " enzymatique du xyloglucane du mutant et permettent donc d'identifier les perturbations de sa structure par comparaison avec des empreintes obtenues à partir de plantules sauvages.

Les protocoles ont été validés sur 33 mutants d'*Arabidopsis thaliana*, préalablement référencés, notamment des mutants affectés dans la biosynthèse de la cellulose et des mutants *mur* présentant des altérations de la composition monosaccharidique de la paroi [1]. Une analyse systématique de la collection de Versailles de mutants étiquetés d'*Arabidopsis thaliana* est en cours et devrait permettre de cibler de nouveaux candidats altérés pour ces polymères.

[1] Reiter et al. (1997) The Plant Journal **12**(2), 335-345.

**Expression chez le lin d'une Caffeoyle Coenzyme A 3-O-Méthyltransférase  
spécifique des tissus externes riches en fibres  
en relation avec leur (hypo)lignification :  
Approches moléculaires, cytologiques et structurales**

**A. Day<sup>1,3</sup>, G. Neutelings<sup>1</sup>, B. Dehorter<sup>1</sup>, K. Ruel<sup>2</sup>, B. Chabbert<sup>3</sup>, H. David<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales, UPRES EA– UCS INRA, USTL,  
Bat SN2, F-59655 Villeneuve d'Ascq cedex,

<sup>2</sup> CERMAV-CNRS, UPR 5301, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

<sup>3</sup> Equipe Parois et matériaux fibreux, UMR-INRA FARE, Esplanade R Garros BP224,  
F-51686 Reims cedex 2, France

Angiosperme dicotylédone de la famille des linacées, le lin (*Linum usitatissimum*) est la principale plante à fibres cultivée en France. L'intérêt industriel de cette plante repose sur la longueur et l'épaisseur des fibres celluloseuses externes (périphloémiques) de sa tige. Ces fibres, contrairement à la plupart des espèces dicotylédones herbacées (luzerne), ont la particularité d'être peu lignifiées. Cependant, la présence de composés ligneux, difficilement extractibles, rendant les fibres extrêmement cohésives, augmente la difficulté de transformation de ce matériau ligno-celluloseux. En effet, l'incrustation tardive de la fibre par des phénols (tiges au stade floraison) participe à la forte cohésion intercellulaire observée dans ce tissu. Une étude (1) portant sur deux variétés de lins a montré des incrustations de lignines de type gâiacycle, difficilement extractibles car riches en liaisons de types condensées. Nous avons mis en évidence la présence de lignines gâiacycles condensées dans ces parois par marquage immunochimique en microscopie électronique. Or, il a été montré que les O-méthyltransférases et plus particulièrement la Caffeoyle-Coenzyme A O-Méthyltransférase (CCoAOMT) seraient responsables de la production des unités gâiacycles (2).

Nous avons réalisé une banque d'ADNc à partir de tissus externes (riches en fibres celluloseuses) de tiges de lin prélevé au stade floraison. En utilisant des oligonucléotides désignés à partir d'une microséquence d'un polypeptide identifié comme une CCoAOMT (3), nous avons obtenu un ADNc (1200 pb). La caractérisation de cet ADNc et particulièrement ses niveaux d'expression dans les tissus externes de tiges au cours du développement est en cours. Ces études moléculaires associées à la localisation *in situ* et à la caractérisation structurale par voie chimique des lignines seront présentées.

**References :**

- 1 - Akin, D.E. Morrison, W.H. Gamble, G. R. Rigsby, L. L. Dodd, R.B. (1996). The 4<sup>th</sup> Europ Reg Workshop on Flax Rouens : 419-426.
- 2 - Guo, D.J. Chen, F. Inoue, K. Blount, J.W. Dixon, R.A. (2001). Plant Cell 13 (1) : 73-88.
- 3 - Day, A. Dehorter, B. Neutelings, G. Czeszack, X. Chabbert, B. Belingheri, L. David, H. (2001). Physiol Plant 113 (2) : 275-284.

## Role of MYB transcription factors in secondary xylem formation

Goicoechea M, Rech P, Lacombe E., El Kayal A, Milahevic S, Sivadon P,  
Grima-Pettenati J.

UMR CNRS-UPS 5546 “Signaux et Messages Cellulaires chez les Végétaux”, Pôle de  
Biotechnologie Végétale, BP 17 Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France.

The functional analysis of the *Eucalyptus* Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) and Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (CAD2) promoters have demonstrated that these genes are preferentially expressed in vascular tissues undergoing active lignification. Analysis of promoters deletions together with gel shift assays revealed that the regions involved in the vascular expression of the CCR and the CAD2 genes contain *cis*-elements corresponding to a consensus motif, the ACI element, known to bind Myb transcription factors.

These data suggest that Myb factors are potentially involved in the transcriptional regulation of CCR and CAD genes. In order to test this hypothesis, an *Eucalyptus* xylem cDNA library was screened using a degenerated oligonucleotide corresponding to a highly conserved motif in the DNA binding domain of Myb factors. Three distinct Mybs factors (EgMyb1, 2 and 4) were obtained. The analysis of the amino acid composition of the DNA binding domains of EgMyb 1 and 2, suggests that they preferentially bind to MBSIIG motives. Gel-shift assays performed with the recombinant EgMyb1 and EgMyb2 proteins confirmed that both factors specifically recognise the MBSIIG site present in the CCR and CAD2 promoters.

The effects of the Myb factors on the transcriptional activity of the CCR and CAD genes were studied using co-transfection experiments in tobacco plants. Results strongly suggest that EgMyb 1 acts as a repressor of CAD and CCR transcriptional activity whereas EgMyb 2 behaves as an activator of the same genes.

In order to decipher *in planta*, the role of the two *Eucalyptus* Myb factors, tobacco and *Arabidopsis* plants were transformed with constructs allowing either over-expression or down-regulation of each of the two Mybs. For down regulation, dominant negative mutation constructs were generated, i.e. only the DNA binding domains were placed under the control a constitutive promoter. Molecular, histological and biochemical analysis of the transformants are in progress. Finally, the role of these Myb factors in xylem formation will be discussed.

## Role of cellulose synthesis in cell elongation

**Refrégier G., Doblin M., Sugimoto K., Quintard E., and Höfte H.**

Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA Versailles  
Rte de St Cyr, 78 026 Versailles cedex, France.  
refregie@versailles.inra.fr

Cellulose-synthase genes (*CESA*) in plants were discovered on the basis of sequence homology with a bacterial catalytic subunit. Confirming this finding, several *Arabidopsis thaliana* mutants were described having a marked decrease in their cellulose content. These mutants fall in two classes : some are impaired in organ elongation, like *rsw1* (also called *cesA01*) (Arioli et al., 1998), and *prc* (*cesA06*) (Fagard et al., 2000), other show abnormal cell wall specifically in xylem vessels without expansion defects. Corresponding genes are frequently described as respectively primary cell wall- and secondary cell wall- specific.

We investigated the specificity of CESA 06 versus CESA01 in controlling hypocotyl and root elongation.

Through *in situ* hybridisation and promoter-GUS fusion, we confirmed that CESA06 is expressed in young elongating tissues like CESA01 (Doblin, personal communication).

We also observed that transgenic plants overexpressing CESA06 exhibited longer hypocotyls than wild type. The growth kinetics indicate that their elongation rate but not elongation period is modified. Elongation rate was also increased in *rsw1* overexpressing CESA6 without complementing the radial expansion phenotype of *rsw1*.

Cellulose control on cell elongation is associated with microfibril disorganisation in *rsw1* and wild-type treated with cellulose synthesis inhibitor DCB (Sugimoto et al., 2000). On the contrary, the inner cell wall of *prc* mutants studied through FEGSEM (Field Emission Gun Electron Microscopy) exhibit normal transverse microfibrils in all cells of the affected organ.

Contradictory with the similar phenotypes of the mutants, these results show that the CESA01 and CESA06 seem to contribute in two different ways to the elongation of organs. Moreover, for the first time to our knowledge, cellulose synthesis seems to control cell elongation without exhibiting any microfibril deposition pattern defect.

The possibility of an active control of CESA06 on cell elongation will be discussed.

## **Identification of poplar genes differentially expressed during tension wood formation**

**Jean-Charles Leplé, Florian Lafarguette, Annabelle Déjardin and Gilles Pilate**

INRA Orléans, Unité AGPF, Avenue de la Pomme de Pin, BP20319 ARDON, 45166  
OLIVET CEDEX. E-mail : leple@orleans.inra.fr

With the aim to identify and characterise target genes important for some wood properties we initiated a genome-wide mRNA expression study on poplar wood formation (see also abstract from A. Déjardin et al.). As a model case, we focused first on tension wood formation in response to mechanical and gravitational stress. Tension wood forms at the upper face of branches and tilted stems in response to a gravitational stimulus. This tissue is characterised by some distinctive ultrastructural, biochemical and mechanical properties, and is known to play an important role in the tree architecture. Using this experimental model we intend to identify genes highly up- or down-regulated at the transcriptional level. For this purpose, AFLP-based transcript profiling was used to compare differentially accumulated mRNA from tension wood to opposite or upright wood. Formation of tension wood was obtained on one-year-old poplar tree, tilted in the greenhouse for 2 month. From 96 different couple of enzyme/primer tested, we found more than 100 transcript-derived fragments presenting a differential amplification. Approximately 80% of the differentially amplified TDFs were mainly identified in tension wood compared to opposite wood. About 70 of these TDFs have been cloned. These partial cDNA fragments have been sequenced and expression analyses using either reverse northern blot (macro-array) or RT-PCR were carried on. We will present results obtained these few last months.

This work is supported by a grant from the “Direction de l'Espace Rural et de la Forêt” (Déterminisme génétique de la qualité du bois chez les arbres forestiers : approche gènes candidats ; convention N° 01.40.40/99). F.L. is indebted to the “Conseil Régional de la Région Centre”.

## Effect of abiotic stresses on the rose-bushes : comparative biochemistry of wall in the stem.

**P. Michonneau<sup>1</sup>, B. Chabbert<sup>2</sup>, A. Driouich<sup>3</sup>, C Morvan<sup>3</sup>, P Fleurat-Lessard<sup>4</sup>**

**1:** METAFLORE, route de Niort, 79370 Mougou, Tel: +33 (0)5 49 26 16 00 – Fax: +33 (0)5 49 26 16 01 – email: [contact@metaflore.fr](mailto:contact@metaflore.fr) - site web: [www.metaflore.fr](http://www.metaflore.fr)

**2:** INRA Parois Végétales et Matériaux Fibreux UMR FARE, 2 Esplanade R Garros B.P. 224, 51686 Reims, Tel: +33 (0)3 26 77 35 97 – Fax: +33 (0)3 26 77 35 99 – email: [chabbert@reims.inra.fr](mailto:chabbert@reims.inra.fr)

**3:** Faculté des Sciences de Rouen, CNRS ESA 6037, 76821 Mont-Saint-Aignan cedex

**4:** Faculté des Sciences de Poitiers. CNRS UMR 6161, 25 fbg Saint-Cyprien, 86000 Poitiers, Tel: +33 (0)5 49 36 61 50 – Fax: +33 (0)5 49 55 93 74 – email: [pfleurat@univ-poitiers.fr](mailto:pfleurat@univ-poitiers.fr)

The production of rose-bushes carried out in METAFLORE, the leader in France, needs strictly controlled horticultural techniques. Low temperatures (-4 to +10°C) are used during the long (10 months) growth cycle (LGC) whereas 20°C occurred in the short (4 months) growth cycle (SGC). To produce a well-lignified, stocky and branched frame, similar to LGS, we submitted SGC to abiotic stresses. In the 4<sup>th</sup> inter-node lignins reached 16% of wall compounds in SGC whereas 19% in LGS, so that lignification was increased by 14%. Comparatively chemical (CuSO<sub>4</sub> pulverization) and water stresses both inhibited lignification (17%) and walls contained only 13% of lignins. The lignin quality was not altered by low temperatures, whereas water and chemical stresses significantly increased the Syringyl/Guaiacyl ratio, respectively 24 and 11%. By comparison with SGC, the amount of wall polysaccharides was increased in LGC and hydric stress (15%), but decreased by 22% after CuSO<sub>4</sub> treatment. Our observation in the pit-fields located at the vessel associated cell (VAC)/vessel interface, has shown that neutral polysaccharides and non-methylated pectins are always more expressed in the rose-bushes submitted to chilling temperatures than in the controls. VACs intervene in defence reactions by inducing physical barriers. In the rose-bushes the first response to abiotic stresses is the elaboration of a transfer apparatus in the pectocellulose wall of pit-fields, without plasmodesmata, adjacent to the vessels. Using immunocytochemistry, we have initiated a molecular topography in this wall area connecting VACs to vessels.

## ***Posters***

## Modulation of Lignan Biosynthesis by Elicitation and Genetic Modification in Flax Cell-Suspension Cultures

**Mohamed Addi<sup>1</sup>, Frédéric Lamblin<sup>2</sup>, François Mesnard<sup>1</sup>, Lamine Bensaddek<sup>1</sup>, Sophie Raynaud<sup>1</sup>, Stéphane Charlet<sup>1</sup>, Françoise Gillet<sup>1</sup>, Brigitte Chabbert<sup>3</sup>, Hélène David<sup>4</sup>, Marc-André Fliniaux<sup>1</sup> and Simon Hawkins<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratoire de Phytotechnologie, Unité Régulation du Métabolisme Cellulaire Végétale, UPRES EA 2085, Faculté de Pharmacie d'Amiens, Université de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens Cedex 01, France ; <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, 21 rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France ; <sup>3</sup>INRA Parois Végétales et Matériaux Fibreux UMR FARE, 2 Esplanade R Garros, BP224, 51686 Reims ; <sup>4</sup>Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales, UPRES EA/USC-INRA, UFR de Biologie Bat SN2, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex

Lignans are small phenolic molecules which have received much interest from the pharmaceutical, cosmetic and other health industries over the last few years. These molecules exhibit a number of important biological activities (anti-bacterial, anti-viral, anti-oxydant, anti-tumoral and immunomodulating) which makes economically interesting. In addition, lignans have also been implicated in several important plant physiological processes – plant defence, stress resistance, cellular division, and heartwood formation in trees. Chemically, lignans are dimers or oligomers of ‘monolignols’ (hydroxycinnamyl alcohols) which are themselves the end-products of the phenylpropanoid pathway. Interestingly, monolignols are also the monomeric units for the cell wall polymer lignin, but as yet, the control mechanism by which monolignols are channelled into either lignan or lignin synthesis is unknown. Although lignans are widespread throughout the plant kingdom, they are present in only small quantities in various plant tissues – flax seed being one of the richest sources. The fact that lignans are present in such low concentrations represents an obstacle to their industrial utilisation. Relatively minor increases in lignan concentration could, however, render possible the economic exploitation of these molecules. In this poster we present the results of our initial work aimed at modulating lignan levels in cell-suspension cultures of flax (*Linum usitatissimum* and *L. flavum*). Two main strategies have been adopted : 1) elicitation of the phenylpropanoid pathway by fungal pathogens and host cell-wall fragments and 2) genetic transformation aimed at either *increasing* monolignol production by up-regulating cinnamyl alcohol dehydrogenase activities (S-CAD transformation), or decreasing monolignol production by down-regulating cinnamyl alcohol dehydrogenase activities (AS-CAD transformation). The levels of different lignans (secoisolariciresinol diglucoside, secoisolariciresinol and podophyllotoxin) are being determined by HPLC. In addition, initial analyses of the levels of other phenolic molecules are also being made in order to evaluate the effects of elicitation and genetic transformation on general phenolic metabolism. The quantity of lignin will also be determined in order to provide preliminary data on monolignol channelling to either lignans or lignins.

## Polymérisation de l'alcool coniférylique (précurseur des lignines) à l'interface air/liquide.

N. Grozev<sup>1</sup>, V. Aguié-Béghin<sup>2</sup>, Y. Panaiotov<sup>1</sup>, R. Douillard<sup>2</sup> and B. Cathala<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biophysical Chemistry Laboratory, University of Sofia, J. Bourchier str. 1.,  
1126 Sofia, Bulgaria

<sup>2</sup> UMR FARE INRA/URCA, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims cedex 2, France

Les lignines sont des polymères pariétaux naturels et se placent quantitativement au deuxième rang des biopolymères terrestres après la cellulose. Leurs biosynthèses proviennent de la copolymérisation oxydative des monolignols (alcools p-hydroxycinnamiques) dont l'alcool coniférylique (alcool p-hydroxy-3-méthoxycinnamique). La réaction est initiée par la présence de peroxydases pariétales et dépend des conditions (pH, T°C, hétérogénéité du milieu, environnement, ...). Durant la réaction, il y a formation de radicaux qui peuvent exister sous différentes formes mésomères et s'associer de multiples façons et former ainsi des polymères tridimensionnels différents que sont les lignines. Dans les parois végétales, ces molécules, dites hydrophobes, sont fortement associées aux polysaccharides pariétaux (celluloses, hémicelluloses) et forment ainsi de nombreuses zones de contacts hydrophobe/hydrophile.

Afin d'évaluer l'influence de l'hétérogénéité du milieu hydrophobe/hydrophile sur la réactivité des monolignols, une étude modèle est réalisée à l'interface air/liquide, en présence d'un monolignol, l'alcool coniférylique (AC) et d'eau oxygénée dans la solution. La réaction de polymérisation est initiée à l'interface air/liquide par le dépôt d'une peroxydase. Des mesures de pression de surface,  $\pi$  et d'ellipticité à l'angle de Brewster,  $\bar{\rho}_B$  (proportionnelle à la concentration de surface,  $\Gamma$ ) permettent d'analyser la cinétique de la réaction. Celle-ci dépend de la quantité d'enzyme déposée et de la concentration en alcool coniférylique dans le substrat. Les spectres d'absorption des polymères formés à l'interface, extraits des données ellipsométriques, sont comparables à ceux des polymères dehydrogénatifs (DHPs, modèles de lignines). L'identification, par chromatographie liquide des produits de réaction a montré qu'il s'agit majoritairement de composés dimériques. L'effet de l'interface sur leur proportion relative est discutée comparativement à la distribution en solution.

## Le mutant *reb1-1* d'*Arabidopsis thaliana* : altérations pariétales des cellules racinaires

**C. Andème-Onzighi<sup>1</sup>, J. Judy-March<sup>2</sup>, M. Sivaguru<sup>2</sup>, T. I. Baskin<sup>2</sup> et A. Driouich<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> UMR CNRS 6037, IFRMP 23, C.C.M.E., Université de Rouen. 76821 Mont Saint Aignan

<sup>2</sup> University of Missouri at Columbia. Biological Sciences. Columbia, MO 65211-7400 USA.

Le mutant *reb1-1* (*r*oot *e*pidermal *b*ulger) d'*Arabidopsis thaliana* présente un défaut morphologique caractérisé par une réduction de l'élongation racinaire et l'apparition des protubérances au niveau de la racine (i.e. une importante expansion radiale de certaines cellules rhizodermiques) (Baskin et *al.* 1992). Une telle altération morphologique pourrait être liée à une orientation anormale des microtubules corticaux (MTs), et donc des microfibrilles de cellulose (Baskin et *al.* 1992) ou encore à un défaut associé aux composés non-cellulosiques de la paroi tels que les pectines, ou les arabinogalactane-proteines (AGPs).

Afin d'établir une corrélation entre ce phénotype et les altérations morphologiques et moléculaires de la paroi des cellules rhizodermiques, nous avons entrepris des études microscopiques (i.e. microscopie optique, confocale, électronique à transmission et immunocytochimie) détaillées de la racine du mutant et du type sauvage (WT). Nos principaux résultats sont 1) l'élargissement radial des cellules rhizodermiques est exclusivement associé aux trichoblastes (cellules destinées à donner les poils absorbants) et est initié dans la zone d'élongation de la racine du mutant ; 2) ces trichoblastes n'expriment pas certains épitopes associés aux AGPs (reconnus par les anticorps JIM14 et LM2). Des épitopes pectiques (reconnus par le JIM5) sont, quant à eux, parfaitement exprimés par les mêmes cellules ; et 3) l'ultrastructure des parois des trichoblastes du mutant est fortement désorganisée.

De plus, l'analyse des MTs dans une lignée de mutant *reb1-1* exprimant la green-fluorescent protein (GFP) fusionnée à une MAP (Microtubule Associated Protein) révèle que les MTs dans les cellules trichoblastes « gonflées » ont une orientation anormale et sont parfois absents. Par ailleurs, l'organisation des microfibrilles de cellulose, est actuellement en cours d'examen par microscopie à force atomique et électronique à transmission couplée à l'emploi de la cellobiohydrolase I-or (CBH I-or). L'ensemble de ces résultats sera présenté et discuté.

Références : - Baskin T et *al.* (1992) Aust. *J Plant Physiol.* 19: 427-437.

## QTL mapping for cell wall constituents and digestibility traits in a RIL progeny of two early dent forage maize lines

Yves Barrière, Valérie Roussel, Chrystel Gibelin

INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères,  
Route de Saintes, 86600 Lusignan, France - (barriere@lusignan.inra.fr)

Quantitative trait loci (QTL) affecting cell wall constituents and digestibility traits in forage maize were evidenced and mapped in a recombinant inbred lines (RIL) progeny, descended from the cross between two early dent lines, F288 and F271, of contrasted cell wall digestibility<sup>1</sup>. Cell wall content was estimated as NDF, and cell wall composition was estimated as ADL and Klason lignins, NDF-ADF (hemicellulose), ADF-ADL (cellulose), all of them being computed as a percentage of NDF (ADL/NDF, KL/NDF, Hcell/NDF and Cell/NDF). Whole plant digestibility was estimated according to an enzymatic solubility (IVDMD), and cell wall digestibility was estimated through the IVNDFD and DINAGZ traits. Traits related to agronomic value were also investigated to study the possibility of breeding for both feeding value and agronomic traits in forage maize<sup>2</sup>.

Field evaluation was performed among a set of 131 RILs studied *per se* and after top crossing with the early flint line of high cell wall digestibility F286. Heterosis was considered as the difference between hybrid value and average value of the parents (RIL and F286 *per se*). The map, achieved with 108 SSR markers, was in agreement with others maize maps previously published. However, the chromosome 10 appeared quite monomorphic, and eight other large monomorphic areas, more than 60 cM long, were observed, because the two parental lines were both related to the line Co125. The observed consanguinity between F288 and F271 was nearly 3 times higher than the 1/8 coefficient expected from a random divergence.

The genotypic effects were highly significant and always greater than genotype  $\times$  environment interactions. Transgressive lines were observed for digestibility traits only towards higher values in RILs *per se*, and only towards lower values in top cross.

Putative QTL were identified through composite interval mapping, and were given for LOD values higher than 2.0. Additive  $\times$  additive epistatic effects were investigated and observed in few cases. QTL observed in RILs *per se* were logically more numerous than QTL evidenced in top cross, but all QTL evidenced in top cross were not yet evidenced in RILs *per se*.

Amongst QTL observed for Hcell/NDF and Cell/NDF, two QTL of these two cell carbohydrates traits colocalized and were common both to RIL *per se* and top cross. However, F271 alleles, that increased the Cell/NDF content, decreased the Hcell/NDF content. Five major clusters of QTL were evidenced for digestibility and lignification traits. ADL/NDF was more related to cell wall digestibility than KL/NDF, and 9 QTL (amongst 12) for DINAGZ colocalized with QTL for ADL/NDF. Bins 6.06, 3.05/6 and 8.05 were greatly involved in variation for lignin content and cell wall digestibility, supporting QTL of which  $r^2$  values were higher or close to 20 %. Some of the QTL involved in heterotic effects, both for digestibility traits and lignin content, were observed in specific locations. Computed cell wall digestibility trait such as DINAGZ was a satisfactory dissection of this quantitative trait in its underlying mendelian determinants. On the contrary, the QTL analysis of whole plant IVDMD, which gave rise to confused effects related to protein, carbohydrates, and NDF content variation, did not allow us to improve our knowledge of the molecular determinants of wall biogenesis, or forage cell wall digestibility.

Significant simultaneous improvements of top cross yield, earliness, root morphology, protein content and cell wall digestibility were expected from MAS based on the high yielding RIL n°143 and 3 other RILs resources of favorable alleles for the respective traits under breeding.

<sup>1</sup> V Roussel, C Gibelin, AS Fontaine, Y Barrière, 2002. Genetic analysis in recombinant inbred lines of early dent forage maize. II – QTL mapping for cell wall constituents and cell wall digestibility from *per se* value and top cross experiments. Maydica, in press.

<sup>2</sup> Y Barrière Y, C Gibelin, O Argillier, V Méchin, 2002. Genetic analysis in recombinant inbred lines of early dent forage maize. I – QTL mapping for yield, earliness, starch and crude protein contents from *per se* value and top cross experiments. Maydica, in press.

## Dégradation enzymatique des hémicelluloses du son de blé

Benamrouche S<sup>1</sup>., Beaugrand J.<sup>1</sup>, Chambat, G.<sup>2</sup>, Chabbert B.<sup>1</sup>, Debeire P.<sup>1</sup>, O'Donohue M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité INRA URCA FARE, Reims.

<sup>2</sup>Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales, CNRS, Grenoble.

Les co-produits agricoles constituent une matière première renouvelable et abondante. La bioconversion enzymatique de ces ressources lignocellulosiques représente une alternative non polluante aux procédés chimiques généralement employés pour la production de monosaccharides et la production d'éthanol après fermentation.

Le son de blé, co-produit issu de la production du blé, est particulièrement riche en hémicelluloses (40% de sa matière sèche). L'utilisation d'une  $\beta$  (1,4) endoxylanase thermostable de 20 KDa permet la libération de 50 % des arabinoxylanes du son de blé. Ce résultat a par ailleurs été confirmé sur des sons provenant de différentes variétés de blé tendre (Aztec, Shango, Soissons, Courtot,...).

La composition en monosaccharide des produits d'hydrolyse du son montre que la xylanase permet la solubilisation de structures arabinoxylanes faiblement substitués. Le degré élevé de substitution des arabinoxylanes résiduels représente un facteur limitant l'action de l'endoxylanase. Afin de favoriser la dégradation des arabinoxylanes fortement substitués par l'arabinose, l'action d'une arabinofuranosidase de 56 KDa (AbfD3) a été envisagée [1].

L'hydrolyse du son de blé par l'AbfD3 seule permet la libération de faibles quantités d'arabinose monomérique (1 % des arabinoses totaux). Par ailleurs, l'AbfD3 ne conduit pas à accroître l'efficacité de l'endoxylanase sur le son.

Afin de préciser le mode d'action de l'AbfD3 in situ, la dégradation enzymatique des arabinoxylanes extraits du son de blé a été étudiée. Les arabinoxylanes du son sont extraits en milieu alcalin puis précipités par un gradient d'éthanol. Trois fractions ont ainsi été isolées en fonction de leur degré de solubilité dans l'éthanol. La fraction Fi, insoluble dans l'eau, se caractérise par un rapport X/A (Xylose/Arabinose) de 6.13, les fractions Fs1 et Fs2 solubles dans l'eau renferment des arabinoxylanes dont le rapport X/A est respectivement de 2.68 et 0.88. L'endoxylanase permet la dégradation des structures hémicellulosiques les moins substituées par l'arabinose (Fi et Fs1). En revanche, elle est très peu efficace sur les arabinoxylanes les plus substitués (Fs2). L'action de l'AbfD3 sur les arabinoxylanes des fractions Fi, Fs1 et Fs2 conduit respectivement à la libération d'environ 70, 30 et 5 % des arabinoses totaux. L'AbfD3, inefficace sur les arabinoxylanes in situ du son, est cependant capable de désubstituer certaines des structures arabinoxylanes extraites du son.

L'action in situ de l'endoxylanase est facilitée par sa faible masse moléculaire (20,7 Kda). La diffusion de cette enzyme a été démontrée dans le cas de la paille de blé [2]. En revanche, la taille élevée de l'AbfD3 (56 KDa ) semblerait être un obstacle à son activité in situ.

### Références

1. Debeche, T., Cummings, N., Connerton, I., Debeire, P., and O'Donohue, M.J., *Genetic and biochemical characterization of a highly thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from Thermobacillus xylanilyticus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000. 66 (4): p. 1734-1736.
2. Zillox, C., and Debeire, P., *Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase : Adsorption and kinetic studies*. Enzyme and Microbial Technology, 1998. 22: p. 58-63.

## **Evolution des constituants non-cellulosiques des fibres extra-xylémiennes au cours de la maturation du chanvre**

**Crônier D, Chabbert B**

INRA UMR FARE, 2 esplanade Roland Garros, BP 224, 51686 Reims cedex 2  
chabbert@reims.inra.fr

Principalement utilisées dans le domaine papetier, les fibres de chanvre sont susceptibles de donner lieu à des applications diversifiées en raison de leur biodégradabilité et de leur propriétés mécaniques. Toutefois, la maîtrise de la qualité reste un préalable indispensable à toute valorisation raisonnée de ces fibres. En particulier, les conditions éco-physiologiques influencent grandement la proportion et la composition globale de ces fibres végétales (1). Peu de données existent cependant quant à la mise en place et la constitution fine des fibres extra-xylémiennes du chanvre contrairement au lin pour lequel divers travaux ont permis d'identifier les éléments incrustant la fibre de lin (2,3,4).

Afin de mieux appréhender l'incidence de la variabilité naturelle sur les caractéristiques chimiques de ces fibres, nous avons examiné l'évolution des constituants pariétaux en fonction du stade de développement du chanvre (floraison, maturité des graines) et du degré de différenciation tissulaire le long de la tige. Après observation cytologique des tiges, nous avons choisi de prélever les fibres à partir de 3 fractions distinctes. La partie apicale correspond à une zone d'élongation cellulaire, les parois des fibres corticales sont en phase d'épaississement. Les fractions médianes et basales correspondent aux zones d'épaississement de la tige, lié à la formation de tissus à partir du cambium. Les fibres périphloéminennes incluent alors des fibres primaires et secondaires.

La maturation des parois des fibres se traduit par une proportion accrue de cellulose, constituant majeur. En revanche, les teneurs en hémicelluloses ( $\approx 10\%$ ) et en lignines ( $\approx 3\%$ ) ne révèlent pas de variation significative en fonction du degré de maturation et de différenciation. Les constituants non celluloses de chanvre présentent essentiellement des modifications qualitatives lors de la maturation du chanvre. En particulier, la proportion en monomères de lignine impliqués dans les liaisons éther évolue au cours de la maturation de la plante: un état de maturation avancée des fibres se traduit par une augmentation de la fraction non condensée des lignines, et une proportion accrue en monomères diméthoxylés (résidu syringyles). Par ailleurs, les variations des proportions en sucres neutres (arabinose, galactose, mannose) suggèrent une évolution dans la nature des hémicelluloses selon les stades de maturité et fractions de tiges. L'incrustation de galactanes et de galacto-glucomannanes dans ces fibres celluloses est suggérée au regard des éléments identifiés par ailleurs dans les fibres de lin (5,6).

1-Mediavilla, V., Leupin M., Keller A. 2001 Industrial Crops and Products. 13 :49-56

2-Gorshkova T.A., Wyatt S.E., Salnikov V.V., Gibeau D.M., Ibragimov R., Lozovaya V.V., Carpita N.C. 1996 Plant Physiol. 110 :721-729.

3-Girault R., His I. Andeme-Onzighi C., Driouich A., Morvan C. 2000 Planta 211 :256-264.

4- Gorshkova T.A., Salnikov V.V., Pogodina M., Chemiksova S.B., Yablokova E.V., Ulanov A. V., Ageeva M.V., Van Dam, J.E.G., Lozovaya, V.V. 2000 Ann. Bot. 85 :477-486

5-Girault R., Bert F., Rihouey C., Jauneau A., Morvan C., Jarvis M. 1997 Int. J. Biol. Macromol. 21 :179-188.

6- McDougall GJ., Morrison I.M., Stewart D., Weyers J.D.B., Hillman J.R. 1993. J. Sci. Food Agric. 62 :1-20.

**Etude fonctionnelle de l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique  
8-phosphate (Kdo-8P) synthase de tomate.  
Caractérisation de plantes transgéniques de tomate  
et d'un mutant de perte de fonction chez Arabidopsis.**

**F. Delmas, M. Hernould, A. Mouras and Christian Chevalier.**

U.M.R.619 de Physiologie et Biotechnologie Végétales, I.B.V.M. - INRA Bordeaux,  
B.P. 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex.

L'acide 3-désoxy-D-manno octulosonique 8-Phosphate (Kdo-8-P) synthase catalyse la condensation du D-arabinose-5-phosphate avec le phospho*enol*pyruvate pour former le Kdo-8-P et une molécule de phosphate inorganique. La forme déphosphorylée du Kdo-8-P, le Kdo, est un constituant des pectines de la paroi primaire des cellules végétales. Il intervient dans la composition d'un petit et très complexe polysaccharide pectique : le Rhamnogalacturonane II.

Sur la base d'identité de séquences en acides aminés, nous avons identifié un clone d'ADNc codant pour la Kdo-8-P synthase de tomate. L'expression de la protéine de tomate à partir de cet ADNc complémente le mutant *kdsA*<sup>ts</sup> de *Salmonella enterica*. La fonctionnalité de l'enzyme de tomate a été démontrée par mesure de son activité spécifique à partir d'extraits bactériens de souches complémentées. L'étude de la Kdo-8-P synthase de tomate modifiée après mutagenèse dirigée a montré que les acides aminés impliqués dans les sites actifs sont conservés entre les enzymes de tomate et de bactéries.

L'étude par RT-PCR de l'expression des transcrits de Kdo-8-P synthase chez la tomate a montrée que le gène est majoritairement exprimé dans les tissus en cours de division cellulaire (fleurs et fruits en développement précoce, méristèmes végétatifs).

La caractérisation fonctionnelle *in planta* de la Kdo-8-P synthase de tomate a été entreprise. Nous avons généré des plantes transgéniques de tomate visant à surexprimer ou réprimer le gène codant pour la Kdo-8-P synthase. De plus nous avons pu identifié grâce au programme de séquençage des zones d'insertion de T-DNA de l'URGV-Evry (INRA-GENOPLANTE) un mutant d'insertion dans le gène orthologue d'*Arabidopsis* issu de la collection de l'INRA-Versailles. Les résultats de caractérisation des plantes transgéniques de tomate et du mutant d'*Arabidopsis* seront exposés.

## **Treatment of wheat straw by potassium carbonate and sodium hydroxide: the unmasking of a hidden side of lignin**

**Durot Nathalie and Kurek Bernard**

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR FARE 614, Equipe Parois et Matériaux Fibreux, 2, Esplanade Roland Garros, 51686 REIMS cedex 2.

This study reports on the destructure of wheat straw cell wall induced by maceration in potassium carbonate and sodium hydroxide.

First of all, one third and one sixth of the total lignin of wheat straw was solubilized in the  $K_2CO_3$  and NaOH medium at pH10, respectively. These lignin fractions exhibited a characteristic bonding pattern rich in C-C linkages compared to the polymer in the non-extracted cell wall.

Concomitantly, a strong enrichment in  $\beta$ -O-4 structures (up to 45%) was observed in the resting lignin in cell wall.

By adding together the amounts of  $\beta$ -O-4 structures in the extracted lignin and in the lignin remaining within the cell wall, the total obtained was in excess of up to 40% of the amount quantified in the unextracted reference cell wall samples, depending on the alkali treatment applied. This indicated that some lignin structures not detected initially within the intact cell wall were unmasked by the removal of a particular lignin fraction soluble in carbonate and hydroxyde media.

This phenomenon is not related only to saponification of ester linked structures within the cell wall. Indeed, in the experimental conditions used here, no modification of the phenolic acid content was observed in the treated wheat straw but some significant loss in uronic acids has been detected. Considering their low respective amounts in wheat straw, such slight modification cannot alone explain the strong apparent increase of the total content of lignin in ether linked structures observed either by thioacidolysis or nitrobenzene oxidation techniques.

An alternative explanation would be the modifications by carbonate and/or hydroxyde of the interactions between lignin, cellulose and hemicelluloses within the cell wall.

Indeed, the fractionation pattern of the cell wall component after the alkali treatments were modified. In particular, the amount of lignin carbohydrate complexes (LCC) extracted by hot water after milling of alkali treated straws and further delignification was more important. Also, the chemical composition of the LCC fractions isolated in glucose and xylose were clearly different from those of the reference samples.

In conclusion, carbonate and hydroxide maceration at pH 10 of wheat straw induces strong modifications of the environment of the lignin polymer within the cell wall, with concomitant alterations of the interactions between the other polymeric constituents. Such modifications would result in the unmasking of some particular lignin fractions within the cell wall. The localization of these lignin domains from a topochemical point of view remains to be discovered.

**Composition « plante entière sans épis » et structure histologique  
des parois chez 10 lignées de maïs ensilage :  
influence sur la digestibilité in vitro de leurs parois.**

**Anne-Sophie FONTAINE**

INRA UGAPF Route de Saintes 86600 Lusignan. e-mail : fontaine@lusignan.inra.fr

Plusieurs études ont montré la grande variabilité de la composition des parois des lignées de maïs, mais elles ne nous permettent pas encore de savoir exactement quels sont les paramètres de la paroi végétale, hormis la teneur en lignine, capables d'influencer le plus fortement la digestibilité du maïs fourrage. On sait qu'à degré de maturité croissant le maïs est de moins en moins digestible. En effet, la structure et la composition de la paroi évoluent au cours du temps, la paroi se rigidifie et s'épaissit principalement au niveau des vaisseaux, du sclérenchyme et des fibres, ceci en accumulant davantage de lignine qui s'enrichit progressivement en alcool sinapylique. La lignine réticulée dans les trois dimensions se développe dans l'espace pariétal disponible et s'interconnecte avec d'autres polymères (hémicellulose, glycoprotéines riches en hydroxyproline), figeant ainsi la cellulose dans une matrice construite en particulier grâce aux propriétés réactionnelles des hydroxyles et des carboxyles des alcools et des acides phénoliques.

En considérant qu'au stade ensilage (matière sèche supérieure à 28 %), la majorité des parois de la plante ont atteint leur maturité et n'évoluent plus beaucoup dans leur composition et leur structure, nous avons estimé la teneur de différents caractères de la paroi et sa digestibilité in vitro chez 10 génotypes dont un mutant bm3. Ces 10 génotypes ont été cultivés sur deux blocs et deux années à Lusignan, les plantes ont été ensilées sans épis pour obtenir les données suivantes : teneur en paroi (NDF), teneur en lignine (LK et ADL), teneur en cellulose et hémicellulose, composition en acides phénoliques estérifiés et étherifiés, digestibilité in vitro de la paroi (IVDNDF). L'effet du génotype est largement significatif pour la totalité des caractères observés et aucune interaction génotype x environnement n'est apparue. Comme on pouvait s'y attendre une corrélation négative est mise en évidence entre la teneur en lignine et la digestibilité et également entre la teneur en acide coumarique. Néanmoins, selon les caractères, quelques génotypes s'échappent toujours de la corrélation et une analyse par régression multiple montre qu'une grande part de la variation du IVDNDF n'est pas encore expliquée.

Une des raisons de ce problème est que pour les mêmes compositions pariétales, l'organisation des composants dans la paroi et les liaisons formées sont différentes. En d'autres termes, chaque génotype élabore avec les mêmes constituants une paroi différente. Nous avons donc également mis en œuvre une observation histologique de l'entre-nœuds sous-jacent de l'épis récolté pour chaque génotype 30 jours après floraison. Ainsi nous observerons si la teneur en paroi reflète son épaisseur et si la teneur en lignine reflète une plus large lignification des tissus.

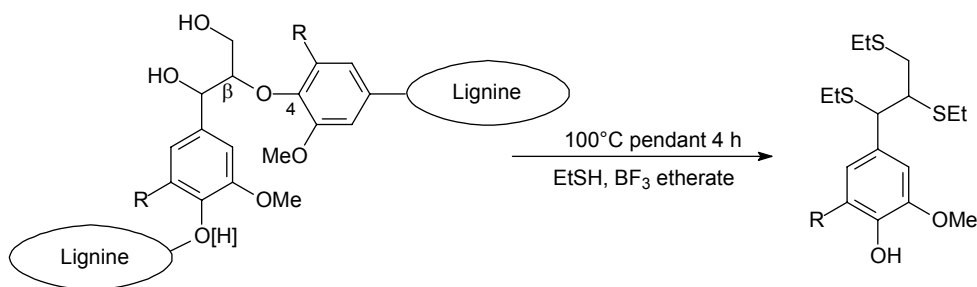
Une autre raison est qu'il n'existe certainement pas qu'une seule combinaison de la composition pariétale capable de résister aux enzymes du rumen et donc de la même façon, les solutions dans la composition de la paroi pour favoriser sa digestibilité sont sans doute multiples.

## Analyse par électrophorèse capillaire des monomères issus de la thioacidolyse des lignines

David FOURNAND, Isabelle MILA et Catherine LAPIERRE

Laboratoire de Chimie Biologique, INRA-INAPG, 78850, Thiverval-Grignon, France

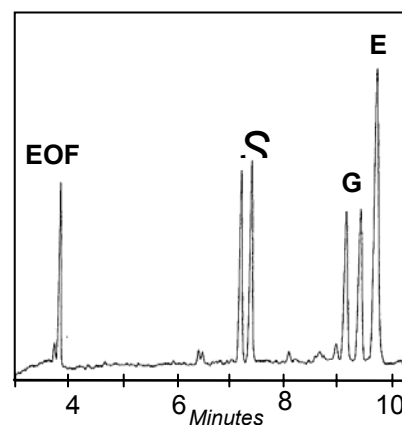
La thioacidolyse est une méthode de dépolymérisation en milieu acide, ayant pour but la détermination quantitative des unités structurales majoritaires des lignines (unités liées uniquement en  $\beta$ -O-4). Cette méthode combine un acide fort ( $\text{BF}_3$  etherate) et un nucléophile faible (ethanethiol, EtSH) et fait apparaître les unités liées uniquement en  $\beta$ -O-4 sous forme de monomères syringyle (S) et guaiacycle (G) en  $\text{C}_6\text{C}_3$  (trithioéthyl-phénylpropane) (Fig. 1). Classiquement, ces monomères en  $\text{C}_6\text{C}_3$  sont extraits avec du dichlorométhane puis dérivatisés avec des groupements TMS avant d'être quantifiés par CPG-FID (durée d'analyse : environ 50 min).



**Fig. 1.** Principe de la thioacidolyse des lignines.  $\text{R}=\text{H}$  pour les unités guaiacycles et  $\text{OMe}$  pour les unités syringyles. Chaque unité apparaît sous forme de diastéréoisomères *erythro/threo* en quantité équimolaire.

Les résultats présentés ici concernent l'optimisation d'une méthode d'électrophorèse capillaire de zone (CZE) couplée à un détecteur UV pour la détermination quantitative des unités trithioéthyl-phénylpropane.

En utilisant une solution d'électrolytes composée d'un mélange borate/phosphate 33,3mM/16,6mM pH 10,5 contenant 50% de MeOH, une température de  $35^\circ\text{C}$  et une tension de 30 kV, l'analyse des monomères issus de la thioacidolyse a été réalisée en moins de 10 min, sans dérivatisation préalable (Fig. 2). Les produits ont été détectés à une longueur d'onde de 214 nm et l'eugénol a été utilisé comme étalon interne. La méthode a été validée en comparant les résultats obtenus par CZE-UV et par CPG-FID avec différents échantillons de plantes (tabac, arabette, peuplier). Les deux méthodes donnent des rendements de thioacidolyse (S+G) et des ratios S/G très proches avec une reproductibilité satisfaisante (les déviations standards sont comprises dans les intervalles 1,9-6,6% et 8,1-10,6% pour S+G par CPG-FID et CZE-UV, respectivement et dans les intervalles 0,5-2,2% et 1,4-3,5% pour S/G par CPG-FID et CZE-UV, respectivement).



**Fig.2.** Electrophérogramme d'un thioacidolysat après optimisation des conditions d'électrophorèse. **S**, unités syringyles *erythro/threo*; **G**, unités guaiacyles *erythro/threo*; **E**, eugénol (étalon interne); **EOF**, flux électroosmotique.

## Un serum polyclonal anti beta (1-4) xylanes et son application pour la localisation des arabinoxylanes dans les parois du grain de blé

**F. Guillon<sup>1</sup>, T. Chevalier<sup>1</sup>, L. Quillien<sup>2</sup>, J.P. Utile<sup>3</sup>, B. Bouchet<sup>1</sup>,  
M.-F. Devaux<sup>1</sup>, L. Saulnier<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>URPOI, INRA, BP 71627, 44316 Nantes CEDEX 03

<sup>2</sup>UBTP, INRA, BP 71627, 44316 Nantes CEDEX 03

<sup>3</sup>CERMAV, BP 53, 38041 Grenoble CEDEX 09

Les arabinoxylanes avec les bêta glucanes sont les constituants majoritaires des parois des grains de céréales. Ces polymères influent sur les technologies de transformation des grains et qualité des produits finis (panification, biscuiterie, brasserie...). Les études réalisées sur les arabinoxylanes concernent essentiellement les fractions solubilisées par différents agents (eau, alcalis). Elles mettent en évidence des populations d'arabinoxylanes différant par leur structure chimique (taux de substitution des résidus xylose par l'arabinose, teneur en groupements féruloyles) et leur propriétés physicochimiques. La répartition des ces différents polymères a été peu étudiée *in situ*. L'étude de cette hétérogénéité est essentielle pour comprendre la fonction des arabinoxylanes *in situ* au sein du grain et, à terme, mieux maîtriser la teneur et les propriétés des arabinoxylanes du grain. Dans ce contexte nous avons développé un sérum polyclonal à l'encontre des séquences de résidus xylose liés en  $\beta(1-4)$  non substitués par de l'arabinose, afin de localiser les arabinoxylanes dans le grain par les méthodes d'immunohistochimie..

Un  $\beta(1-4)$  tetra-xyloside couplé à de l'albumine de sérum de bovin a été injecté à deux lapins pour générer des sérums polyclonaux anti- $\beta(1-4)$ -xylanes. Les sérums des deux lapins ont été caractérisés par des tests ELISA indirects et compétitifs. L'intérêt de ces sérums pour détecter les xylanes *in situ* a été évalué sur divers tissus végétaux par méthode de fluorescence indirecte. L'un des sérums a été utilisé pour examiner la distribution des xylanes dans le grain de blé.

Les sérums polyclonaux interagissent fortement avec les  $\beta(1-4)$  xylo-oligosides de DP supérieur à deux, moins fortement avec les  $\beta(1-3)(1-4)$  xylanes extraits de *Palmaria palmata* et modérément avec des xylanes fortement substitués comme les hétéroxylanes extraits de sons de maïs ou les arabinoxylanes hydrosolubles de l'albumen de grain de blé. Ils montrent peu d'affinité pour deux oligosides correspondant à un tétra (1-4)  $\beta$  xyloside substitué sur le X3 (à partir de l'extrémité réductrice) respectivement par un résidu arabinose en position 3 ou deux résidus arabinose en position O2 et O3, le xylose et les xyloglucanes extraits de tamarins. Ces premiers résultats suggèrent que les sérums reconnaissent spécifiquement des séquences de résidus xylose liés en  $\beta(1-4)$  et non substitués par de l'arabinose. La présence de telles structures est mise en évidence dans les tissus suivants : assise palissadique des téguments de graines de légumineuse, sclérenchyme de paille de blé, fibres phloémiennes et xylème d'hypocotyle (agé de 28 j) de lin.

Au sein du grain de blé, le péricarpe est peu marqué contrairement aux parois de l'albumen amylicé et de l'assise aleuronique. L'observation de la région aleuronique en MET confirme en particulier la présence de motifs peu substitués au niveau de l'épiderme du nucelle et dans les zones externes des parois de la couche à aleurone.

Cette étude se poursuit par le développement d'anticorps monoclonaux à l'encontre d'autres motifs structuraux rencontrés dans les arabinoxylanes.

## **Etude par Infra rouge à Transformé de Fourier des interactions hydrogènes au de sein composites pectines-DHP.**

**Anouck Habrant, Brigitte Chabbert et Bernard Cathala.**

INRA UMR FARE, 2 esplanade Roland Garros, BP 224, 51686 Reims cedex 2.

Les propriétés mécaniques des parois végétales ou des matériaux dérivés (papier, carton, composites, etc...) sont intrinsèquement reliées aux interactions existant entre les polymères pariétaux qui constituent ces édifices. Parmi les interactions faibles, les liaisons hydrogènes jouent un rôle de premier plan. Ces liaisons ont été largement étudiées dans le cas de la cellulose [1] [2] mais plus rarement pour ce qui concerne les mélanges de polymères amorphes des parois tels que les pectines et les lignines. Afin de mieux appréhender les interactions hydrogènes pouvant se mettre en place entre ces deux types de polymères, nous avons polymérisé des quantités croissantes d'alcool coniférylique en présence de pectines. A partir de ces solutions, des films fins ont été obtenus par casting. Nous avons ensuite étudié par Infra-Rouge à Transformé de Fourier (IRTF) leurs cinétiques de deutériation. En effet le deutérium et l'hydrogène absorbant dans deux zones distinctes du spectre infra-rouge ( $2000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$  et  $2800\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  respectivement), il est possible de suivre les échanges hydrogène/deutérium lorsque les films sont mis en présence d'une atmosphère saturée en eau lourde [3]. Il est alors possible de distinguer les hydrogènes engagés au sein de liaisons fortes (par conséquent non échangeables) de ceux qui sont libres ou impliqués dans des associations plus faibles et qui peuvent être remplacés par du deutérium. La proportion de chaque type d'hydrogène sera discutée en relation avec la quantité de lignine modèle présente au sein des composites.

[1]Hinterstoisser B., Salmén L., Cellulose, 1999; 6:251-263.

[2]Hullemen S. H. D., Hazendonk J. M., van Dam J., in "Cellulose and cellulose derivatives: physico chemical aspects and industrial applications." (J. F. Kennedy and G. O. Phillips and P. A. Williams, eds.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1995.

[3]Kondo T., Kataoka Y., Hishikawa Y., in "ACS Symposium Series N° 688. Cellulose derivatives, modification, characterization and nanostructures." (T. J. Heinze and W. G. Glasser, eds.), p. 173-183. American Chemical Society., Washington, DC., 1998.

## Influence de facteurs environnementaux ou génétiques sur la formation du bois de tension

T. Imai<sup>1</sup>, K. Ruel<sup>2</sup>, G. Pilate<sup>3</sup>, J-Ch. Leple<sup>3</sup> et J-P. Joseleau<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa,  
Nagoya 464-8601, Japon

<sup>2</sup> Centre d'Etudes et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)-CNRS  
UPR 5301 – BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France.

<sup>3</sup>INRA UAGPF, Avenue de la Pomme de Pin, BP20619 Ardon, 45 166 Olivet cedex, France

Par définition, le bois de tension chez les Angiospermes est le bois de réaction qui se forme sur la partie supérieure d'une tige recourbée. Cette modification apparaît en fin de secondarisation de la paroi en réponse à des changements d'orientation de la tige au cours de sa croissance. En dehors des manifestations morphologiques et mécaniques qui résultent de la présence de bois de tension, peu de choses sont connues quant à l'origine de ces modifications. Dans le cas du peuplier, la formation de bois de tension se traduit au niveau ultrastructural par la présence d'une couche additionnelle apposée à la face interne de la paroi des fibres connues sous le nom de couche gélatineuse dite « couche G ».

Des expériences de contrainte mécanique, maintenant les arbres inclinés à 45° durant trois mois ont été menées à Orléans sur des plants du cultivar Ogy (hybride *Populus deltoides* X *Populus nigra*) normaux et transformés sur une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des monolignols (la cinnamyl-alcool déshydrogénase ou CAD). Une étude ultrastructurale de la micromorphologie des plants témoins et transformés montre l'inaptitude des plants transformés à différencier la couche « G », typique des fibres à bois de tension. Une étude topochimique de la distribution des lignines, à l'aide d'anticorps dirigés contre les principaux types de lignines, a été également réalisée, faisant apparaître que la couche G n'est pas exclusivement constituée de cellulose.

## Composition, structure et localisation des pectines d'un mutant pléiotrope de fruit de tomate affecté sur un facteur de transcription sensible à l'auxine

**Lahaye Marc<sup>1</sup>, Khaif Faïza<sup>1</sup>, Bouchet Brigitte<sup>1</sup>, Guillon Fabienne<sup>1</sup>, Frasse Pierre<sup>2</sup>, Bouzayen Mondher<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> INRA-Unité de Recherche sur les Polysaccharides, leurs Organisations et Interactions, Centre de Recherche de Nantes, Rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes cedex 03

<sup>2</sup> INRA/INP-ENSA Toulouse, Biologie Moléculaire et Physiologie de la Maturation des Fruits, Avenue de l'Agrobiopole, BP 107, 31326 Castanet-Tolosan.

La mutation anti-sens d'un gène homologue à ARF4 d'*Arabidopsis thaliana* codant pour un facteur de transcription sensible à l'auxine et répondant à l'éthylène chez la tomate conduit à un phénotype pléiotrope (« DR12 », *Lycopersicon esculentum* cv Kemer ; Jones et al sous presse). En particulier les fruits présentent des divisions cellulaires du péricarpe inhabituelles et mûrissent par zones tout en gardant une fermeté accrue par comparaison au fruit sauvage. La composition, la structure chimique des pectines du péricarpe et leur localisation *in situ* ont été étudiées chez le fruit vert mature et rouge mature sauvage et anti-sens afin de préciser les caractéristiques de ce mutant et en particulier celles affectant la maturation. La composition osidique des matériels insolubles à l'alcool des fruits verts n'est pas affectée par la mutation et la maturation modifie de façon similaire la composition du MIA des fruits antisens et sauvages (diminution en galactose et du degré de substitution des acides galacturoniques par le méthanol). Par contre, la proportion d'ester d'acide acétique rapportée à la concentration en acides uroniques est plus élevée dans les fruits anti-sens que dans les fruits sauvages, indépendamment du stade de maturité. La quantité et la composition des pectines extraites par l'eau et par 1% d'oxalate de potassium ne diffèrent pas entre les fruits sauvages et anti-sens à stade de maturité équivalent. De même, la composition des résidus d'extractions séquentielles par l'eau et l'oxalate de potassium est voisine hormis un taux d'acétylation plus élevé pour les fruits antisens observé aux stades vert mature et rouge. Des observations microscopiques des péricarpes de tomates anti-sens et sauvages verts confirment la présence de cellules de morphologie atypique chez les anti-sens. Par contre, les mêmes phénomènes de dissociation des cellules sont observés pour les tomates rouges anti-sens et sauvages. Des marquages similaires à stade de maturité équivalent ont été observés avec l'anticorps anti-galactane (LM5), anti-arabinane (LM6) et anti-pectines (JIM 5 et JIM 7) dans les différents fruits sauvages et anti-sens. En accord avec les résultats de l'analyse chimique, les résultats des immunomarquages confirment la déméthylation des pectines et la disparition des galactanes au cours de la maturation.

En conclusion, cette mutation n'apparaît pas modifier les mécanismes classiques de la maturation du fruit de tomate faisant intervenir les modifications de pectines. Par contre, elle semble affecter la construction du fruit comme l'indiquent les cellules atypiques suggérant une activité de division cellulaire accrue et la proportion différente en groupement acétyl esters chez le fruit aux stades vert mature et rouge.

Jones, B, Frasse, P, Olmos E, Zegzouti H, Leclercq, J, Tounier, B, Latché, A, Pech, J-C, Bouzayen, M. Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in pleiotropic phenotype including dark-green and blotchy ripening fruit. Plant J. (in press)

## **Modulation des pectines en relation avec l'adhésion cellulaire chez *Arabidopsis thaliana***

**E. Leboeuf, S. Thoiron, M. Lahaye**

INRA-URPOI, BP 71627, 44316 Nantes ; Faculté des sciences et des techniques-GPPV, BP  
92208, 44322 Nantes.

E-mail : leboeuf@nantes.inra.fr

La structure des parois végétales et plus particulièrement celle des polysaccharides pectiques a été de nombreuses fois corrélée à des phénomènes d'adhésion cellulaire, notamment par le biais de leurs méthyl/acétyl-estérification et leurs substitution par des chaînes latérales d'oses neutres. Cependant leur rôle reste encore flou et c'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de ces polysaccharides en relation avec l'adhésion cellulaire d'une culture liquide de microcals d'*Arabidopsis thaliana* (Axelos *et al.*, 1992).

Trois phases de croissance ont été identifiées en fonction de l'âge de la culture : une phase de division cellulaire de 0 à 6 jours, puis une phase d'expansion cellulaire de 6 à 12 jours et enfin une phase stationnaire (sénescence) de 12 à 14 jours. Ces différentes phases de croissance s'accompagnent d'une consommation d'amidon et d'une modification de la composition des parois composant le MIA (matériel insoluble à l'alcool). La teneur en acide galacturonique, en rhamnose, en glucose, en xylose, en fucose et en mannose augmente alors que celle du galactose n'évolue pas au cours de la culture. Par contre la teneur en arabinose est 1,5 fois plus importante pendant la phase d'expansion cellulaire. Le degré de méthylation et d'acétylation exprimé en fonction de la teneur en acide galacturonique chute au cours de la culture. Le degré d'acétylation passe de 30 à 20%, et le degré de méthylation chute globalement de 40 à 30% mais de manière moins reproductible d'une culture à une autre que le degré d'acétylation.

Parallèlement à ces modifications biochimiques, une diminution de l'adhésion cellulaire au cours des phases de croissance a été mise en évidence à l'aide d'une méthode de mesure de la fragmentation des microcals. Celle-ci consiste à mesurer la taille des microcals aux différentes phases de croissance à l'aide d'un granulomètre laser avant et après un stress mécanique (« vortex »). Un indice de fragmentation (IF) ou  $IF = ((f_2 - f_1)/x) * e^{(f_1 * 7,5)}$  ( $f_1$  : fréquence de microcals inférieur à 250  $\mu m$  avant « vortex » ;  $f_2$  : fréquence de microcals inférieur à 250  $\mu m$  après « vortex » ;  $x$  : durée de « vortex » en minutes ;  $e^{(f_1 * 7,5)}$  : estimation de la fragmentation due à l'agitation circulaire à 120 rpm lors de la culture) a été établit. L'indice de fragmentation des microcals pour 2 min de « vortex » est de 0,25 +/-0,09 lors de la division cellulaire, de 0,40 +/-0,09 en phase d'expansion et de 0,75 +/-0,19 en phase stationnaire.

L'analyse structurale des polysaccharides pariétaux et plus particulièrement des pectines abordée par la caractérisation d'hydrolysats enzymatiques des MIA sera présenté et discuté en regard avec la croissance et le niveau d'adhésion cellulaire.

Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) Plant Physiol. Biochem. 30 (1), 123-128.

## ***Emezzy (emz), A novel growth-defective mutant of flax***

**J-Y. Lee, M-L. Follet-Gueye, R. Vietor, L. Chevalier and A. Driouich**

UMR CNRS 6037, Centre Commun de Microscopie Electronique. IFRMP23. 76821 Mont  
Saint Aignan, Cedex. France.  
email: adriouic@crihan.fr

Cell elongation is of crucial importance to plant growth and development. In a screen for growth-defective flax mutants among chemically mutagenized seedlings, we have selected a short mutant we named *emezzy* (berber word for short). Seed development and germination were normal; however, seedling growth was severely affected. The hypocotyl of 7-d-old dark-grown seedlings was 2.5 times shorter and thicker than the wild type. In contrast, the root length was not affected. Treatment with exogenous growth hormones, such as auxin, cytokinins or gibberellins, could not rescue the short phenotype of the mutant.

Scanning electron microscopy revealed that epidermal cells of *emz* hypocotyls were shorter than wild type cells, often exhibiting a bulbous shape. The reduced length of cells, indicates that growth inhibition in *emz* hypocotyls is primarily due to reduced cell elongation. Light microscopical observations of cross sections revealed a pronounced radial expansion of epidermal and cortical parenchyma cells.

Considering the importance of the cell wall in plant development, we looked for alterations in the composition of cell wall polysaccharides of *emz* plants using gas chromatography (GC). No obvious differences were detected in the monosaccharide composition of trifluoroacetic acid (TFA)-soluble fractions (non-cellulosic polysaccharides) between the wild type and *emz* plants. In contrast, analysis of the TFA-insoluble fraction (cellulosic fraction) showed that the amount of cellulose in *emz* hypocotyls was reduced to 77% of that in the WT.

We are currently conducting detailed electron microscopical studies to investigate the effect of the mutation on the architecture of the cell walls of different cell types in the mutant.

## **Changes in cell wall structural protein patterns during tomato fruit maturation. Biochemical and molecular studies.**

**Alexandre Lejeune<sup>1,2</sup>, Séverine Thoiron<sup>1</sup>, Sabine Constant<sup>1</sup>, Emilie Demarsy<sup>1</sup>,  
Marc Lahaye<sup>2</sup>, Lise Caron<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Faculté des Sciences et des Techniques-Université de Nantes, Groupe de Physiopathologie Végétale, 2 rue de la Houssinière- B.P. 92208-44322 Nantes Cedex 3

<sup>2</sup>INRA-URPOI, rue de la Géraudière, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3

Cell wall proteins are considered as important structural elements. Interacting with polysaccharides, they could contribute to the cell wall networks. The expression of these proteins has been correlated to pathogen attacks. It has been assumed they induce rigidification of cell wall and then prevent cells from pathogen penetration (1,2).

During the fruit maturation, important biochemical modifications occur in cell wall leading notably to the softening of fruit. The expression of some structural cell wall proteins is also modulated during fruit maturation (3). So, these proteins are supposed to play a key role in the structural modifications of cell wall.

We have investigated the presence of proteins covalently bound to the walls in tomato fruit. Using proteolytic digestion and immuno characterization, we showed that polypeptide populations are different in green and red stages of fruit.

To go forward in the study of differences in the structural proteins expressed during fruit maturation, we have studied mRNA accumulation coding for several putative structural proteins found in databases (AGP, proline-rich proteins, HRGP, GRP) according to maturation stage. Two lines showing contrasted firmness of the fruits at red ripe stage are used for this study. First Northern blot results indicate different patterns of mRNA levels over fruit maturation in both lines.

1-Garcia-Muniz N, Martinez-Izquierdo JA, Puigdomenech P. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Mol Biol.* 1998 ; 38(4):623-32.

2-Boudart G, Dechamp-Guillaume G, Lafitte C, Ricart G, Barthe JP, Mazau D, Esquerre-Tugaye MT. Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. *Eur J Biochem.* 1995 ; 232(2):449-57.

3-Davies C, Robinson SP. Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol.* 2000 ; 122(3):803-12.

## Sulphur-free lignins from alkaline pulping: some structural features

**Stéphane Lepifre, Stéphanie Baumberger, Catherine Lapierre**

UMR de Chimie Biologique INRA / INA PG, Institut National Agronomique Paris-Grignon,  
78850 Thiverval-Grignon, France.

The increasing cost of wood and concerns over its future availability generate renewed interest in using industrial crops as a source of non-wood fibres. One of the pulping processes developed today for the production of such fibres from lignocellulosic materials is based on alkaline and sulphur-free cooking. The lignins dissolved in the black liquor during the process provide a renewable raw material of ecological and economical interest.

The objective of our work was to evaluate the potential of such alkali sulphur-free lignins as raw material for the elaboration of starch/lignin films. We report here on some structural features relative to commercially available alkali wheat straw lignins provided by the Granit society. The lignins were recovered from black liquors by acidic precipitation according to a patented precipitation method [Abächerli, A. and Doppenber, F. 1998. *International Patent. PCT/IB98/00512*]. Thioacidolysis, high performance size exclusion chromatography (HPSEC) and HPLC determination of the neutral sugars after acidic hydrolysis were run on two samples derived from two distinct cooking batches. The low-molecular weight components were extracted and investigated by GC-MS.

The amount of monomers recovered by thioacidolysis is 50 to 64 % lower than that of native wheat straw lignin analysed in situ. This suggests an intensive hydrolysis of the  $\beta$ -O-4 ether linkages during cooking in agreement with the abundance of low molecular weight lignin fragments revealed by HPSEC. The monomeric fraction contains 53 to 59% of C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> phenolic acids, together with C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> and C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> monomers (vanillin, acetosyringone, vanillic acid and syringic acid). Both samples exhibit a low level of carbohydrate contamination (less than 5% total sugar primarily consisting of xylose, glucose and arabinose).

Although the two samples exhibit similar general features, some differences concerning the structure and the relative amount of the free monomers could be detected. These differences most probably reflect the variability of technological parameters and may be useful to elucidate relationships between the structure of lignins and their reactivity towards starch.

**Acknowledgements:** The author would like to thank the Granit Society (Lausanne, Suisse) for providing the lignin samples. This study was supported by AGRICE (Grant 01.01.086).

**Analyse de l'activité du promoteur d'un gène « germin-like », *PcGER1* au cours de la croissance cellulaire (système hétérologue : cellules BY-2 de tabac).**

**Mélanie Mathieu<sup>1</sup>, Godfrey Neutelings<sup>1</sup>, Simon Hawkins<sup>2</sup>, Emmanuel Grenier<sup>3</sup> and Hélène David<sup>1</sup>**

**e-mail : melanie.mathieu@ed.univ-lille1.fr**

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales UPRES- USC INRA, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bât SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, 21, rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France

<sup>3</sup> Cellule Statistique et Traitement Informatique des Données, Institut Supérieur Agricole de Beauvais, rue Pierre Waguët, 60026 Beauvais cedex, France

Les protéines « germin-like » et germines appartiennent à une superfamille de protéines associées à la paroi. Ces protéines semblent être impliquées dans divers processus de défense et de développement, mais leur rôle exact dans ces processus reste à préciser.

Chez *Pinus caribaea* Morelet, le gène *PcGER1*, codant une GLP ioniquement liée aux parois est spécifiquement exprimé lors du développement embryonnaire (1). Nous avons isolé une séquence promotrice de 1549 pb et son analyse bioinformatique a montré qu'elle possédait dans les 1000 pb distales de nombreux éléments *cis* retrouvés dans les promoteurs de gènes répondant aux hormones et/ou exprimés dans les tissus embryonnaires, dans la graine ou encore lors de la germination (SEF4, protéines de 60 kDa et sites de reconnaissance ABA-like et Dof (2)). Cette séquence promotrice *PcGER1* a été clonée en amont du gène rapporteur *GUS* ( $\beta$ - glucuronidase) et introduite dans des cellules BY-2 de tabac via *Agrobacterium tumefaciens*. Les cellules transformées ont été analysées pour leur taux de croissance en présence ou en absence de 2,4-D et/ou de BA, la viabilité, la prolifération et le phénotype cellulaires variant en fonction des conditions environnementales. Le promoteur *PcGER1* présente un pic maximum d'activité lors de la phase exponentielle de croissance en conditions optimales (BA + 2,4-D). Dans ce cas, la comparaison de l'activité du promoteur pleine longueur et de deux fragments délétés dans la partie distale montre que celle-ci décroît avec la longueur du promoteur ainsi qu'avec le nombre de boîtes Dof présentes dans le fragment étudié. Par ailleurs, nous avons mis en évidence des corrélations significatives entre le taux de paroi et l'activité du promoteur *PcGER1* (3). Le rôle potentiel de cette protéine pariétale dans la perception de l'auxine (4) sera discuté.

(1) : Neutelings G., Domon J.M., Membré N., Bernier F., David A. and David H. 1998. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet). *Plant Mol. Biol.*, 38, 1179-1190.

(2) : Yanasigawa S., Schmidt R. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant J.* 17(2) : 209-214.

(3) : Mathieu M., Neutelings G., Hawkins S., Grenier E. and David H. 2002. Cloning of a Pine Germin-Like Protein (GLP) Gene Promoter and Analysis of its Activity in Transgenic Tobacco Bright Yellow 2 Cells. *Physiol. Plant.* (soumis).

(4) : Ohmiya A., Tanaka Y., Kadowaki K., Hayashi T. 1998. Cloning of genes encoding auxin-binding proteins (ABP19/20) from peach: significant peptide sequence similarity with germin-like proteins. *Plant Cell Physiol.* 39 5 : 492-499.

## The use of manganese and oxalate in fiber technology: Biochemical and technical issues

**Valérie Meyer-Pinson<sup>1</sup>, Michel Petit-Conil<sup>2</sup>, Katia Ruel<sup>3</sup>, Gérard Valtat<sup>1</sup>,  
and Bernard Kurek<sup>4</sup>**

- (1) STORA-ENSO France, BP2, Corbéhem 62112, France, Valerie.Meyer@ctp.inpg.fr
- (2) Centre Technique du Papier, Domaine Universitaire, BP 251, 38044 Grenoble cedex 9
- (3) Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, Domaine Universitaire, BP53X, 38041, Grenoble cedex 9
- (4) Unité Mixte de Recherche INRA/URCA 614, Equipe Parois et Matériaux Fibreux, Institut National de la Recherche Agronomique, 2, esplanade Roland Garros, Reims 51686, France, Fax: 33 3 2677 3599, kurek@reims.inra.fr

Poplar and spruce wood chips were pretreated by MnO<sub>2</sub>/oxalate complex before mechanical pulping. The resulting effects were investigated: i/ on the energy consumption during defiberization and refining of wood chips; ii/ on the cell wall architecture of the wood chips and of the fibers produced; iii/ on the composition and structure of the main constitutive cell wall polymers of the wood chips.

A significant decrease of the energy consumption up to 20% was obtained during the mechanical pulping of MnO<sub>2</sub>/oxalate pre-treated poplar wood chips. Lignin was found to be the major target of MnO<sub>2</sub> / oxalate and no modification of the content of the wood chips in pentosans was observed. Transmission electron microscopy revealed a slight but significant modification of the structure of the interface area between S1 and S2, as well as modification of the aspect of the S2/S3 layers within the wood chips. This suggested that fracture zone during defiberization would be different after MnO<sub>2</sub>/ oxalate treatment of the raw material compared to controls impregnated with water.

The pretreatment of wood chips with Mn complexes formed by the dissolution of MnO<sub>2</sub> in oxalate led to similar effects for defiberizing but the total energy needed for the refining was much more higher than in control experiments and in poplar samples.

In conclusion slight and selective modifications at the level of lignin and its environment may have a great impact on the total energy needed to produce mechanical pulps. Further studies are ongoing in order to delineate the mechanisms of cell wall modifications by MnO<sub>2</sub>/oxalate.

## **Effets d'un prétraitement oxydant sur le degré de réticulation des arabinoxylanes pariétaux dans les enveloppes du grain de blé dur. Influence sur le comportement rhéologique des tissus**

**Stéphane Peyron, Jean-Claude Autran, Joël Abecassis, Xavier Rouau**

Unité de Technologie des Céréales et de Agropolymères  
ENSA/INRA Montpellier  
2, place Paul Viala - 34 060 Montpellier Cedex 01

La première transformation du blé dur vise à isoler et réduire en semoule l'albumen amyloacé sans contamination par les enveloppes du grain. Le succès de cette opération repose des différences de propriétés mécaniques entre les différentes composantes histologiques du grain. L'albumen amyloacé réduit en fines particules doit présenter une friabilité élevée en comparaison des enveloppes, éliminées sous forme de plus larges fragments.

Au regard de ce mode de séparation, Les propriétés mécaniques des tissus périphériques du grain se présentent donc comme une composante essentielle du comportement semoulier des blés durs. Le développement récent de tests de micro-rhéologie a rendu possible la caractérisation des propriétés mécaniques des différents tissus constitutifs des enveloppes du grain de blé (i.e. couche à aleurone et péricarpe)<sup>3</sup>.

A l'échelle moléculaire, Les parois cellulaires de ces tissus se caractérisent par une forte teneur en arabinoxylanes feruloylés (65-70 %MS). La réticulation de ces polymères produite par le couplage oxydatif de leurs substituants phénoliques apparaît comme un élément déterminant du comportement mécanique des tissus<sup>4</sup>. Différentes voies d'induction d'une dimérisation de l'acide ferulique ont été testées sur les enveloppes isolées afin de mesurer les conséquences de tels pontages sur leurs caractéristiques rhéologiques.

Par cette voie, nous avons pu mettre en évidence qu'un système enzymatique diffusible comme la manganèse peroxydase couplée à de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit une augmentation de près de 30 % du taux de dimérisation de l'acide ferulique au sein des enveloppes. Cette dimérisation s'accompagne d'une augmentation de la résistance mécanique des tissus et de leur extensibilité<sup>5</sup>.

Par ailleurs, un traitement par irradiation UV semble produire un couplage de l'acide férulique sous la forme de monomère et dimères aux lignines présentes dans le péricarpe. La formation de telles liaisons produit alors une augmentation de la rigidité et de la résistance mécanique des tissus.

Cette étude confirme ainsi le rôle clé joué par l'acide férulique dans l'organisation des polymères au sein de la paroi. L'influence des interactions polymériques dans lesquelles il est impliqué, sur les propriétés mécaniques des tissus est ici établie. En cela, il doit constituer un point d'intérêt majeur dans la recherche des bases physico-chimiques de l'aptitude au fractionnement du blé.

---

<sup>3</sup> Mabilley, F., Gril, J., Abecassis, J. 2001. Mechanical properties of wheat seed coats. *Cereal Chemistry* 78, 231-235.

<sup>4</sup> Waldron, K. W., Smith, A. C., Parr, A. J., Ng, A., Parker, M. L. 1997. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science and Technology* 8, 213-221.

<sup>5</sup> Peyron, S., Abecassis, J., Autran, J. C., Rouau, X. 2001. Enzymatic oxidative treatments of wheat bran layers: effects on ferulic acid composition and mechanical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10, 4694-4699.

## Détermination de la composition en groupements hydroxyles de lignines. Relations avec leurs propriétés antioxydantes

**C. Pouteau<sup>1</sup>, B. Cathala<sup>1</sup>, N. Boquillon<sup>2</sup>, P. Dole<sup>1</sup>**

1 : INRA, UMR FARE (Fractionnement des Agro-Ressources et Emballages)

Esplanade R. Garros. 51686 Reims cedex 2.

2 : ARD, Route de Bazancourt. 51100 Pomacle.

Très abondantes sur terre, les lignines sont des polymères naturels présentant des structures phénoliques encombrées. Cette caractéristique chimique peut être mise à profit afin de valoriser la lignine en tant qu'antioxydant au sein de polyoléfine (polypropylène ou polyéthylène). En effet, les thermoantioxydants commerciaux, (IRGANOX 1010, 1076, etc) peuvent présenter une fonctionnalité chimique analogue à celle des lignines. Ils retardent la dégradation du polypropylène en agissant comme capteurs des radicaux libres créés lors de l'oxydation du matériau (1) (2).

Pour cette étude, nous avons sélectionné différentes lignines (origine botanique et procédé d'extraction variables) afin d'obtenir une diversité de structure importante et ainsi, de pouvoir corréler structure des lignines et propriétés antioxydantes au sein du matériau.

Nous avons déjà montré que la dispersion de la lignine dans la matrice polypropylène est un facteur important qui contribue à l'efficacité antioxydante des lignines (3). Parmi les caractéristiques structurales pouvant influencer la dispersion, la teneur en hydroxyls phénoliques et aliphatiques peut être un facteur important. La connaissance exacte de la composition en hydroxyls est alors nécessaire à la compréhension du phénomène et l'optimisation des propriétés protectrices des lignines. Toutefois, étant donné la structure complexe de ces polymères, cette caractérisation reste délicate et a fait l'objet des nombreuses études dans la littérature (4) (5) (6).

Nous avons déterminé le taux d'hydroxyl par différentes méthodes : IRTF, RMN<sup>1</sup>H et RMN<sup>13</sup>C. La confrontation de ces résultats nous amènerons alors à discuter la structure optimum nécessaire à un bon pouvoir antioxydant.

(1) Raja, A.; Pendyala, V. N. S.; Xavier, S. F.; Shah, A. C.; Nai, K. B. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 1994, 215, 1.

(2) Gensler, R.; Plummer, C. J. G.; Kausch, H. H.; Kramer, E.; Pauquet, J. R.; Zweifel, H. *Polymer Degradation and stability* 1999, 67, 195.

(3) Pouteau, C.; Cathala, B.; Monties, B.; Fringant, C.; Dole, P. *11th ISWPC* 2001, 2, 59.

(4) Faix, O.; Grünwald, C.; Beinhoff, O. *Holzforschung* 1992, 46, 425.

(5) Faix, O.; Argyropoulos, D.; Robert, D. *Holzforschung* 1994, 48, 387.

(6) Lourdes, M.; Orejuela, M.; Richard, F. *Holzforschung* 1996, 50, 569.

## Towards a better understanding of forage digestibility using genomic approaches and model species

**J. Proust<sup>1</sup>; E. Pesquet<sup>1</sup>; M. Bosio<sup>2</sup>; S. Guillaumie<sup>1 3</sup>; D. Rouquié<sup>4</sup>; R. de Rose<sup>4</sup>; Y. Barrière<sup>3</sup>; J-P. Martinant<sup>2</sup>; A. Murigneux<sup>2</sup>; D. Goffner<sup>1</sup>; M. Pichon<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CNRS, UPS, INRA, Expression et Modulation de la lignification, Pole de biotechnologie végétale, UMR4456, 24 cheminde Borde Rouge, BP17, 31326 Catsaanet Tolosan

<sup>2</sup>Biogemma, Campus universitaire des Cézeaux, 24 avenue des Landais, 63170 Aubière

<sup>3</sup> INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, 86600 Lusignan

<sup>4</sup> Rhobio, 2 rue gaston Crémieux, CP5707, 91057 Evry cedex

Our main goal is to identify gene candidates to improve forage digestibility. Towards this end, we are developing three different strategies.

The first strategy is based on a gene source already available in the Toulouse laboratory. Indeed, we dispose of a model system of in vitro xylogenesis in *Zinnia elegans*. We have obtained a subtractive library, containing around 800 clones putatively involved in secondary cell wall biogenesis, and we have searched for orthologs in other species. As a first step, we have constituted an Arabidopsis data base with these orthologs (named OrtAt) and we have annotated most of these sequences. We have also searched for the presence of signal peptides, transmembrane domains, targeting signals and protein domains using programs such as SignalPv2.0, TMHMM, TargetPv1.0 or ppsearch. We are currently identifying maize orthologs by blasting the sequences of OrtAt against all available annotated maize databases via Genoplante Info (GPI2). If the identification of maize orthologs is successful, we will amplify gene specific tags (mainly 3'UTR regions). If not, we will select the clones of interest according to their pattern of expression or the presence of a signal peptide for amplification by RT-PCR. This approach will allow us to generate a pool of target genes potentially implicated in cell wall formation.

The second strategy depends on the construction of a new cDNA library made from RNA extracted from young maize internodes and rolled leaves, which are tissues undergoing active lignification. A large scale systematic sequencing of these EST will probably lead to the identification of new genes related to cell wall biosynthesis.

The last strategy is based on genes already known to be related to cell wall biogenesis. We have defined a list of wall-related key words and we are currently performing a systematic search in the maize data bases to list all of the corresponding clones. A collection of gene specific tags by PCR will then be established.

Together, these three strategies will allow the selection of around 1000 genes which will be spotted on a macro-array. We will perform this transcriptome analysis using different developmental stages and organs of maize, several inbred lines with varying digestibility and maize transformants or insertional mutants in lignin biosynthesis pathway already available and well characterized. Using this macro-array, we will be able to select candidates implicated more particularly in the maize digestibility, genes co-regulated in the lignification process, links between lignin and cell wall compounds and finally new members of cell wall biosynthesis.

This project relies on plant model systems, a significant bioinformatic phase and the construction of a gene pool to develop a genomic approach to identify suitable candidates implicated in the forage in plant lignification. These new targets could be further used in conventional or marked assisted selection for forage digestibility improvement, and will be subjected to functional analyses.

This project is financed, in part, by the Genoplante program « Espèces ».

***In vivo* wood formation analysis in poplar through cDNA-AFLP technology****Damien van Raemdonck<sup>1</sup>, Wout Boerjan<sup>2</sup>, Mondher Jaziri<sup>1</sup> and Marie Baucher<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Biotechnology, Free University of Brussels, Chaussée de Wavre 1850, B-1160, Brussels, Belgium.

<sup>2</sup>Department of Plant Genetics, Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent University, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Ghent, Belgium.

Xylem is a differentiated tissue that plays a major role in water transport and mechanical support in vascular plants. Until now, little is known about the sequence of genetic events that take place during *in vivo* xylogenesis. The aim of this work is to study molecular aspects of xylem differentiation along the stem in poplar. Differential gene expression between the top and the bottom of 6-month-old poplar stems (*Populus tremula* x *P. alba* clone INRA 717 1B-4) was investigated through cDNA-AFLP analysis. A hundred differentially expressed cDNA fragments were identified according to their expression pattern (from top to bottom). These cDNA fragments have been cloned and sequenced. BLAST analysis of the sequences allowed us to cluster the corresponding homologue genes according to their function, e.g. cell wall formation, lignin biosynthesis, cell cycle, amino acid transport and gene regulation. About one third of the sequences showed no significant homology against public protein databases. Further investigation will be carried out including confirmation of the differential expression using hybridisation method and functional analysis of particular genes.

DVR is a PhD student supported by a grant from the F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture)

## Elucidation of the role of korrigan, a endo 1,4 - $\beta$ -glucanase in cellulose biosynthesis

**Stéphanie Robert, Silvère Pagant, Grégory Mouille, Guislaine Réfrégier, Herman Höfte, Olivier Lerouxel, Remco J.Vietor, Patrice Lerouge and Samantha Vernhettes.**

Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA, Rte de St Cyr, 78 026 Versailles Cedex  
LTI-CNRS UPRESA 6037, UFR des sciences, 76 821 Mt St Aignant

Endo 1,4- $\beta$ -glucanases (EGases) form a large family of enzymes in prokaryotes and eukaryotes that hydrolyse 1,4  $\beta$  linkages adjacent to unsubstituted glucose residues. In *Arabidopsis thaliana*, there are more than 12 members which in most cases correspond to secreted proteins. EGases in principle can degrade xyloglucan or cellulose in cell wall. Most family members can degrade xyloglucan and are thought to be involved in degrading or remodelling cell walls. We isolated the *KORRIGAN (KOR)* gene that encodes a membrane-bound endo 1,4- $\beta$ -glucanase. KOR proteins are required for normal wall assembly and cell elongation (Nicol, 1998).

We show here that mutations in *KOR* cause a deficiency in cellulose and do not affect xyloglucans, indicating that enzyme is directly involved in the synthesis of cellulose microfibrils. We show that the enzyme is a part of high molecular weight complex that can be involved in *Arabidopsis* seedlings, but also in cotton fibers. Using *Arabidopsis* mutants potentially affected in the cellulose biosynthesis and the action of herbicides that specially inhibit cellulose synthesis, we analysed the regulation of KOR protein levels and the composition of the protein complex. The characterisation of partners that may interact with KOR is underway.

*Ref : Nicol et al. 1998 EMBO J., 17, 5563-5576*

## **Overexpression of monolignol biosynthesis poplar genes in *Arabidopsis*: Impact on lignin content and structure**

**Richard Sibout<sup>1\*</sup>, Isabelle Mila<sup>2</sup>, Brigitte Pollet<sup>2</sup>, Thomas Goujon<sup>1</sup>, Lise Jouanin<sup>1</sup> and  
Catherine Lapierre<sup>2</sup>**

1: Biologie Cellulaire, INRA, F78026 VERSAILLES Cedex

2: Chimie Biologique, INRA-INA PG, F78850 THIVERVAL-GRIGNON

\*: Present address: Centre de Foresterie des Laurentides, 1055 Rue du PEPS, Sainte Foy,  
QUEBEC, Canada G1V-4C7.

Many works concern underexpression of genes involved in the biosynthesis of monolignols, the lignin precursors, using sense or antisense strategies in different transgenic plants. They have demonstrated the possibilities to modify lignin structure and content. Each gene repression induces specific traits and some have positive impact on the industrial use of plants in the pulp and paper industry.

In contrast, very few reports relate the effects of overexpressing genes of the monolignol pathway in transgenic plants. This is mainly due to silencing problems observed when the homology is high between the endogenous gene and the transgene. In order to avoid these problems, we have overexpressed the poplar cDNAs encoding F5H, CCoAOMT, COMT, CCR and CAD under the control of the constitutive CaMV promoter in *Arabidopsis* and selected lines overexpressing each of these enzymes. The consequences on lignin content and structure have been determined and will be reported.

This work was performed in the frame of an AGRICE program.

## **Synthèse et caractérisation de DeHydrogéo Polymères (modèles de lignines) dans de la cellulose bactérienne et dans des composites cellulose/pectine.**

**Jean Pierre Touzel, Brigitte Chabbert, Bernard Monties, Philippe Debeire, Bernard Cathala.**

INRA UMR FARE, 2 esplanade Roland Garros, BP 224, 51686 Reims cedex 2.

Les parois végétales sont constituées principalement de quatre grandes classes de polymères : les celluloses ; les pectines , les hémicelluloses et les lignines. Ces polymères forment des réseaux tridimensionnels interpénétrés permettant à la paroi végétale d'assurer ces fonctions physiologiques. Ce composite complexe résulte d'un processus de mise en place séquentiel débutant par le dépôt des polysaccharides suivi de celui des lignines [1]. La connaissance de la structure et des propriétés des lignines passe par la compréhension de leur mode de dépôt. Afin de simuler le processus de polymérisation de la lignine au sein des parois végétales, nous avons utilisé des gels de cellulose bactérienne pure et de composites cellulose bactérienne/pectine[2, 3] comme supports de polymérisation d'alcool coniférylique. Une cellule de diffusion munie de membranes à dialyse a servi à assurer la diffusion de l'alcool coniférylique et de l'eau oxygénée au sein des matrices cellulosiques imprégnées de peroxydase. On a observé une polymérisation significative dans les gels de cellulose. Les mélanges binaires et ternaires obtenus ont été examinés en microscopie électronique à balayage et analysés chimiquement. La présence de pectine induit une meilleure dispersion de la lignine synthétique dans le réseau cellulosique et augmente la proportion de liens alkyl-aryl-éthers dans le polymère.

[1]Terashima N., Fukushima K., He L.-F., Takabe K., Comprehensive model of the Lignified Plant Cell Wall, *in* "Forage Cell Wall Structure and Digestibility" (H. G. Jung and D. R. Buxton and R. D. Hatfield and J. Ralph, eds.), p. 247\_270. American Society of Agronomy, Madison, 1993.

[2]Astley O. M., Chanliaud E., Donad A. M., Gidley M. J., International Journal of biological macromolecules., 2001; 29:193-202.

[3]Chanliaud E., Gidley M. J., The Plant Journal, 1999; 20:25-35.

## Biosynthèse de la paroi et contrôle de la morphogénèse chez la mousse *Physcomitrella patens*

Remco Viëtor<sup>2</sup>, Florent Brun<sup>1</sup>, Loïc Faye<sup>2</sup>, Patrice Lerouge<sup>2</sup> and Martine Gonneau<sup>1</sup>

1-Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA-Versailles, Route de St Cyr,  
78026 Versailles Cedex, France,

2-LTI-CNRS UPRESA 6037, UFR des Sciences, 76821 Mt St Aignan, France.  
e-mail gonneau@versailles.inra.fr,

La mousse *Physcomitrella patens* constitue un modèle végétal particulièrement bien adapté à l'étude du développement chez les plantes. *P. patens* possède une morphologie simple facilement accessible à l'observation. La mousse peut être produite *in vitro* sous forme de culture de tissus homogènes dont le développement peut être synchronisé par adjonction de phytohormones et notamment de cytokinines. Deux modes de croissance coexistent, une croissance de type apicale des filaments de protonema et une croissance tridimensionnelle de type méristématique lors de la mise en place du bourgeon et du développement du gamétophore. De plus, propriété unique à ce jour chez les plantes, des fréquences de recombinaison homologues élevées chez la mousse permettent d'obtenir l'extinction de gènes, ou leur remplacement par une copie modifiée.

Chez les bryophytes, la nature et l'organisation des polysaccharides pariétaux est très mal connue. Des rosettes de cellulose synthase ont été mises en évidence sur les membranes de cellules apicales de caulonema chez *Funaria hygrometrica*. Par ailleurs les programmes de séquençage systématique d'EST ont mis en évidence de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et la mise en place de la paroi chez *P. patens* et chez *Ceratodon purpureus*. Ces données permettent d'envisager le knockout de certains d'entre eux et l'analyse des conséquences de leur extinction en termes de perturbation de la morphogénèse.

Nous avons déterminé la composition pariétale chez *P. patens* par analyse et quantification des polysaccharides dans différents types cellulaires et par FTIR-microspectroscopie.

Par ailleurs un ADNc codant une protéine de *P. patens*, apparentée à la famille des protéines pariétales riches en proline, a été isolé au laboratoire à l'occasion d'un crible d'identification de gènes exprimés spécifiquement lors de la mise en place du bourgeon. La disruption de ce gène par recombinaison homologue sera présentée.

Schaefer DG and Zryd JP (2001) The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. Plant Physiology, 127 : 1430-1438.

## ***Liste des Participants***



| <b>NOM</b>                        | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                                                                            | <b>EMAIL</b>                  |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>ADDI</b> Mohamed               | Laboratoire de Phytotechnologie et Pharmacognosie, Unité Régulation du Métabolisme Cellulaire Végétale Univ Picardie, UPRES Univ de Picardie Jules Verne, 1 rue des Louvels, 80037 Amiens | m.addi@voila.fr               |
| <b>AGUIÉ-BÉGHIN</b> Véronique, Dr | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686 51686 Reims                                                                                          | aguie@reims.inra.fr           |
| <b>AL-QSOUES</b> Suha             | Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales, 33 rue St Leu, 80039 Amiens, France                                                                                               |                               |
| <b>ANTOINE</b> Carole             | INRA, Unité de Technologie des Céréales et Agropolymères, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 01                                                                                | antoine@ensam.inra.fr         |
| <b>AVEROUS</b> Luc, Dr            | UMR FARE INRA/URCA Équipe Emballage et Matériaux d'Origine Agricole, ESIEC, Pôle technologique Henri Farman, BP 1029, 51686 Reims                                                         | luc.averous@univ-reims.fr     |
| <b>BARRIERE</b> Yves, Dr          | UGAPF, route de Saintes, 86600 Lusignan, France                                                                                                                                           | barriere@lusignan.inra.fr     |
| <b>BAUCHER</b> Marie, Dr          | Laboratory of Plant Biotechnology, Université Libre de Bruxelles, 1850 Chaussée de Wavre, 1160 Bruxelles, Belgique                                                                        | mbaucher@ulb.ac.be            |
| <b>BAUMBERGER</b> Stéphanie, Dr   | UMR de Chimie Biologique, 78850 Thivernal-Grignon                                                                                                                                         | baumberg@grignon.inra.fr      |
| <b>BEAUGRAND</b> Johnny           | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                                                                         | beaugran@reims.inra.fr        |
| <b>BENAMROUCHE</b> Samina         | UMR FARE INRA/URCA Équipe Technologie Enzymatique et Physico-chimie des Agro-ressources, 8 Rue Gabriel Voisin, BP 316, 51686 Reims                                                        | Samina.benamrouche@voonoo.net |
| <b>BERTRAND</b> Isabelle, Dr      | INRA Unité d'Agronomie, 2 Esp R Garros, 51686, Reims, France                                                                                                                              | bertrand@reims.inra.fr        |
| <b>BOUDART</b> Georges, Dr        | UMR CNRS/UPS 5546, Chemin de Borde Rouge, BP 17 Auzeville France                                                                                                                          | boudart@smcv.ups-tlse.fr      |

| <b>NOM</b>                    | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                      | <b>EMAIL</b>                     |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>BOUDET</b> Alain, Pr       | UMR CNRS-UPS 5546 Signaux et Messages Cellulaires, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet Tolosan | amboudet@smcv.ups-tlse.fr        |
| <b>BROWN</b> R. Malcom        | Johnson and Johnson Centennial Chair in Plant Cell Biology, University of Texas, Austin, 78712 Texas, USA                           | mbrown@mail.utexas.edu           |
| <b>CABANE</b> Mireille, Dr    | UMR INRA-UHP-Nancy-Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre cedex, France             | cabane@scbiol.uhp-nancy.fr       |
| <b>CARON</b> Lise, Dr         | URPOI-INRA, Rue de la Géraudière BP 71627, 44316 Nantes cedex3, France                                                              | lcaron@nantes.inra.fr            |
| <b>CATHALA</b> Bernard, Dr    | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686 51686 Reims                                    | cathala@reims.inra.fr            |
| <b>CHABBERT</b> Brigitte, Dr  | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | chabbert@reims.inra.fr           |
| <b>CHANSON</b> Bernard, Dr    | LGMC, Pl Bataillon, CC081, 34095 Montpellier cedex 5                                                                                | bchanson@lmgc.univ-montp2.fr     |
| <b>CHEVALIER</b> Richard, Dr  | UMR Physiologie et Biotechnologies végétales, INRA Bordeaux, 77 Av E. Bouleaux, 33883 Villenave d'Ornon, France                     | chevalie@bordeaux.inra.fr        |
| <b>CLÉMENT</b> Christophe, Dr | UFR Sciences, Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, BP 1039, 51687 Reims cedex 02                                       | christophe.clement@univ-reims.fr |
| <b>CONSTANT</b> Sabine, Dr    | Groupe de Physiologie et Pathologie Végétale, Faculté des Sciences, 2 Rue de la Houssinière, 44322 Nantes cedex 3, France           | constant@svt.univ-nantes.fr      |
| <b>CRÔNIER</b> David          | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | cronier@reims.inra.fr            |
| <b>DAVID</b> Hélène, Pr       | LPPV, UFR Biologie, SN2, Univ Lille 1 (USTL), 59655 Villeneuve d'Ascq cedex                                                         | helene.david@univ-lille1.fr      |

| <b>NOM</b>                    | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                     | <b>EMAIL</b>                       |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>DAY</b> Arnaud             | LPPV-INRA PMF, (UMR FARE), Bât SN2 UFR de Biologie-USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex                                             | arnaud.day@univ-lille1.fr          |
| <b>DEBEIRE</b> Philippe, Dr   | UMR FARE INRA/URCA Équipe Technologie Enzymatique et Physico-chimie des Agro-ressources, 8 Rue Gabriel Voisin, BP 316 51686 Reims  | philippe.debeire@univ-reims.fr     |
| <b>DEJARDIN</b> Annabelle, Dr | INRA, Unité d'amélioration , Génétique et Physiologie forestières, BP 20619, Ardon, 45166 Olivet, France                           | Annabelle.Dejardin@orleans.inra.fr |
| <b>DELMAS</b> Frédéric        | UMR Physiologie et Biotechnologies végétales, INRA Bordeaux, 77 Av E. Bouleaux, 33883 Villenave d'Ornon, France                    | fdelmas@bordeaux.inra.fr           |
| <b>DENIAUD</b> Estelle        | URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                       | deniaud@nantes.inra.fr             |
| <b>DESPREZ</b> Thierry        | Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA 78026 Versailles cedex                                                                    | Thierry.Desprez@versailles.inra.fr |
| <b>DOLE</b> Patrice, Dr       | UMR FARE INRA/URCA Équipe Emballage et Matériaux d'Origine Agricole, CPCB Moulin de la Housse, Bât 18, 51687 Reims Cedex 2, France | dole@lille.inra.fr                 |
| <b>DOMON</b> Jean-Marc, Dr    | Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales, 33 rue St Leu, 80039 Amiens, France                                        | Jean-Marc.Domon@sc.u-picardie.fr   |
| <b>DOUILLARD</b> Roger, Dr    | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                  | douillar@reims.inra.fr             |
| <b>DRIOUICH</b> Azeddine, Dr  | UMR CNRS 6037, CCME, IFRMP23 76821 Mont-Saint-Aignan, cedex                                                                        | Azeddine.Driouich@crihan.fr        |
| <b>DUROT</b> Nathalie         | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                  |                                    |
| <b>EUDES</b> Aymerick         | Laboratoire de Biologie Cellulaire, Route de Saint-Cyr 78026 Versailles Cedex                                                      | eudes@versailles.inra.fr           |
| <b>FONTAINE</b> Anne-Sophie   | INRA-UGAPF Route de Saintes 86600 Lusignan                                                                                         | fontaine@lusignan.inra.fr          |

| <b>NOM</b>                               | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                      | <b>EMAIL</b>                |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>FRATZL</b> Peter, Pr                  | Erich Schmid Institute of Materials Science - Austrian Academy of Sciences, Jahnstr. 12, 8700 Leoben, Austria                       | fratzl@unileoben.ac.at      |
| <b>GAUDARD</b> François                  | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | gaudard@reims.inra.fr       |
| <b>GLASSER</b> Wolfgang, Pr              | Virginia Tech, 210 Julian Cheatham Hall, Blacksburg, VA 24061-0323, USA                                                             | wglasser@vt.edu             |
| <b>GONNEAU</b> Martine, Dr               | Laboratoire de Biologie Cellulaire, Route de Saint-Cyr 78026 Versailles Cedex                                                       | gonneau@versailles.inra.fr  |
| <b>GRIMA-PETTENATI</b><br>Jacqueline, Dr | UMR CNRS-UPS 5546 Signaux et Messages Cellulaires, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet Tolosan | grima@smcv.ups-tlse.fr      |
| <b>GUILLAUMIE</b> Sabine                 | Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet Tolosan                                                    | guillaumie@smcv.ups-tlse.fr |
| <b>GUILLEMIN</b> Florence                | URPOI, BP 71627 La Géraudière 44316 Nantes cedex 03                                                                                 | guillemi@nantes.inra.fr     |
| <b>GUILLET</b> Carine, Dr                | INRA UGAPF , Route de saintes 86600 Lusignan                                                                                        | guillet@lusignan.inra.fr    |
| <b>GUILLON</b> Fabienne, Dr              | INRA, URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                  | guillon@nantes.inra.fr      |
| <b>HABRANT</b> Anouk                     | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R.Garros, BP 686, 51686 Reims                                    | habrant@reims.inra.fr       |
| <b>HAMBARDZUMYANN</b> Arayik             | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | hambardz@reims.inra.fr      |
| <b>HAMM</b> Mélanie, Dr                  | LPPV-INRA PMF, (UMR FARE), Bât SN2 UFR de Biologie-USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex                                              | mhamm@freesurf.fr           |
| <b>HASSAN</b> Jwanro                     | UMR FARE INRA/URCA Equipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | jwanro@caramail.com         |

| <b>NOM</b>                      | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                             | <b>EMAIL</b>                        |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>HAWKINS</b> Simon, Pr        | Biologie des Ligneux et des grandes cultures Antenne Scientifique<br>Universitaire de Chartres 21 rue de Loigny la Bataille 28000 Chartres | simon.hawkins@univ-orleans.fr       |
| <b>HÖFTE</b> Herman, Dr         | INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Rte de St Cyr, 78026<br>Versailles, France                                                       | Herman.Hofte@versailles.inra.fr     |
| <b>JERONIMIDIS</b> Georges, Pr  | Dept of Engineering, Univ of Reading, Whiteknights, Reading, RG6<br>6AY, UK                                                                | g.jeronimidis@reading.ac.uk         |
| <b>JOLY</b> Catherine, Dr       | UMR FARE INRA/URCA Équipe Emballage et Matériaux d'Origine<br>Agricole, CPCB Moulin de la Housse, Bât 18, 51687 Reims Cedex 2,<br>France   | catherine.joly@univ-reims.fr        |
| <b>JOSELEAU</b> Jean-Pierre, Dr | CERMAV, CNRS UPR 5301, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9 France                                                                                | Jean-Paul.Joseleau@cermav.cnrs.fr   |
| <b>JOUANIN</b> Lise, Dr         | Laboratoire Biologie Cellulaire, INRA 78026 Versailles cedex                                                                               | jouanin@versailles.inra.fr          |
| <b>KUREK</b> Bernard, Dr        | UMR FARE INRA/URCA Équipe Paroi et Matériaux Fibreux, CRA 2<br>Espl. R. Garros 51686 Reims                                                 | kurek@reims.inra.fr                 |
| <b>LACOUX</b> Jérôme            | Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales, 33 rue St Leu,<br>80039 Amiens, France                                             | Jerome.Lacoux@sc.u-picardie.fr      |
| <b>LAFARGUETTE</b> Florian      | INRA, Unité d'Amélioration , Génétique et Physiologie forestières, BP<br>20619, Ardon, 45166 Olivet, France                                | Florian.Lafarguette@orleans.inra.fr |
| <b>LAHAYE</b> Marc, Dr          | INRA, URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                         | lahaye@nantes.inra.fr               |
| <b>LAINE</b> Eric, Dr           | Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales, 33 rue St Leu,<br>80039 Amiens, France                                             | Eric.Laine@sc.u-picardie.fr         |
| <b>LAMBLIN</b> Frederic, Dr     | Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, ASUC 21<br>rue de Loigny la Bataille 28000 Chartres                           | Frederic.Lamblin@univ-orleans.fr    |
| <b>LAPERCHE</b> Anne            | INRA UGAPF , Route de saintes 86600 Lusignan                                                                                               | laperc@lusignan.inra.fr             |

| <b>NOM</b>                          | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                     | <b>EMAIL</b>                       |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>LEBOEUF</b> Edouard              | URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                       | leboeuf@nantes.inra.fr             |
| <b>LEJEUNE</b> Alexandre            | Groupe de Physiologie et Pathologie Végétale, Faculté des Sciences, 2 Rue de la Houssinière, 44322 Nantes cedex 3, France          | alejeune@bionantes.com             |
| <b>LEMAITRE</b> Alain               | UMR FARE INRA/URCA Équipe Emballage et Matériaux d'Origine Agricole, CPCB Moulin de la Housse, Bât 18, 51687 Reims Cedex 2, France | lemaitre@lille.inra.fr             |
| <b>LEPIFRE</b> Stéphane             | UMR de Chimie Biologique, 78850 Thivernal-Grignon                                                                                  | stephane.lepifre@grignon.inra.fr   |
| <b>LE PROVOST</b> Gregoire          | INRA Pierroton, Lab Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, BP 45, 33611 Gazinet Cedex                                    | Gregoire@pierroton.inra.fr         |
| <b>LEPLÉ</b> Jean-Charles, Dr       | INRA, Unité d'Amélioration , Génétique et Physiologie forestières, BP 20619, Ardon, 45166 Olivet, France                           | leple@orleans.inra.fr              |
| <b>LEROUGE</b> Patrice, Pr          | UMR CNRS 6037, CCME, IFRMP23 76821 Mont-Saint-Aignan, cedex                                                                        | plerouge@crihan.fr                 |
| <b>LEROUXEL</b> Olivier             | UMR CNRS 6037 Bât Bio extension, 76821 Mont-Saint-Aignan                                                                           | olivier.lerouxel@univ-rouen.fr     |
| <b>LIMARE</b> Angela                | UMR FARE INRA/URCA Équipe Emballage et Matériaux d'Origine Agricole, CPCB Moulin de la Housse, Bât 18, 51687 Reims Cedex 2, France |                                    |
| <b>LIU</b> Yang                     | UMR FARE INRA/URCA Équipe Paroi et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros 51686 Reims                                            |                                    |
| <b>LULLIEN-PELLERIN</b> Valérie, Dr | Unité de Technologie des Céréales et des Agropolymères, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1                                   | lullien@ensam.inra.fr              |
| <b>MARTIN</b> Michel, Dr            | Université de Reims, UTAP, EA 2061, 21 rue Clément Ader, 51685 Reims Cedex 2, France                                               | mmartin@univ-reims.fr              |
| <b>MARTINANT</b> Jean-Pierre, Dr    | Biogemma, 24 Av Des Landais- campus universitaire des Cézeaux, 63170 Aubière, France                                               | jean-pierre.martinant@biogemma.com |

| <b>NOM</b>                    | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                     | <b>EMAIL</b>                        |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>MATHIEU</b> Mélanie        | Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales, USTL, Bât SN2, 59655 Villeneuve d'Ascq                                            | melanie.mathieu@ed.univ-lille1.fr   |
| <b>MICHAUD</b> Jennifer       | Laboratoire de Biologie Cellulaire Route de Saint Cyr 78026 Versailles cedex                                                       | vernhatt@versailles.inra.fr         |
| <b>MICHONNEAU</b> Philippe    | Métaflore, Route de Niort, 79930 Mougon, France                                                                                    | contact@metaflore.fr                |
| <b>MILA</b> Isabelle          | Laboratoire de Chimie Biologique, 78850 Thivernal-Grignon                                                                          | mila@grignon.inra.fr                |
| <b>MINIC</b> Zoran, Dr        | Laboratoire de Biologie Cellulaire Route de Saint Cyr 78026 Versailles cedex                                                       | zoran.minic@versailles.inra.fr      |
| <b>MONTIES</b> Bernard, Pr    | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                  | monties@jouy.inra.fr                |
| <b>MOUILLE</b> Grégory, Dr    | INRA, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Rte de St Cyr, 78026 Versailles, France                                                  | gmouille@versailles.inra.fr         |
| <b>NEUTELINGS</b> Godfrey, Dr | UST Lille, Laboratoire de Physiologie des Parois Végétales, Dat SN2, 59 655 Villeneuve d'Ascq                                      | Godfrey.Neutelings@univ-lille1.fr   |
| <b>OCHATT</b> Sergio, Dr      | INRA - URGAP- PCIV, BP86510, 21065 Dijon cedex, France                                                                             | ochatt@epoisses.inra.fr             |
| <b>O' DONOHUE</b> Michael, Dr | UMR FARE INRA/URCA Équipe Technologie Enzymatique et Physico-chimie des Agro-ressources, 8 Rue Gabriel Voisin, BP 316, 51686 Reims | michael.odonohue@univ-reims.fr      |
| <b>PAIVA</b> Jorge            | ITQB - IBET, Apartado 127 Av da Republica (EAN), 2781-901 Oeiras, Portugal                                                         | jorge@pierroton.inra.fr             |
| <b>PELLETIER</b> Sandra       | Laboratoire de Biologie Cellulaire Route de Saint Cyr 78026 Versailles cedex                                                       | Sandra.Pelletier@versailles.inra.fr |
| <b>PEYRON</b> Stéphane        | INRA, Unité de Technologie des Céréales et agropolymères, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex 01                         | peyron@ensam.inra.fr                |

| <b>NOM</b>                  | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                      | <b>EMAIL</b>                           |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>POLLET</b> Brigitte      | Laboratoire de Chimie Biologique, 78850 Thivernal-Grignon                                                                           | pollet@grignon.inra.fr                 |
| <b>POUTEAU</b> Charlyse     | UMR FARE INRA/URCA Équipe Parois et Matériaux Fibreux, CRA 2 Espl. R. Garros, BP 686, 51686 Reims                                   | pouteau@reims.inra.fr                  |
| <b>PROUST</b> Jezabel, Dr   | UMR CNRS-UPS 5546 Signaux et Messages Cellulaires, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet Tolosan | proust@smcv.ups-tlse.fr                |
| <b>QUEMENER</b> Bernard     | INRA, URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                  | quemener@nantes.inra.fr                |
| <b>QUENTIN</b> Michael      | ATO-BV, Bornsesteeg 59, P.O. Box 17, 6708 Wageningen, Netherlands                                                                   | m.g.e.quentin@ato.wag-ur.nl            |
| <b>REFREGIER</b> Guislaine  | Laboratoire de Biologie Cellulaire Route de Saint Cyr 78026 Versailles cedex                                                        | refregie@versailles.inra.fr            |
| <b>ROBERT</b> Stéphanie     | Laboratoire de Biologie Cellulaire, Route de Saint Cyr, 78026 Versailles                                                            | Stephanie.Robert@versailles.inra.fr    |
| <b>ROGER</b> David, Dr      | Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales, 33 rue St Leu, 80039 Amiens, France                                         | David.roger@sc.u-picardie.fr           |
| <b>ROLANDO</b> Christian.   | UST Lille, UMR 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France                                    | christian.rolando@univ-lille1.fr       |
| <b>ROSSIGNOL</b> Michel, Dr | UMR CNRS/UPS 5546, Chemin de Borde Rouge, BP 17 Auzeville France                                                                    | rossigno@smcv.ups-tlse.fr              |
| <b>ROUAU</b> Xavier Dr      | Unité de Technologie des Céréales et des Agropolymères, 2 Place Viala, 34060 Montpellier cedex 1                                    | rouau@ensam.inra.fr                    |
| <b>RUEL</b> Katia, Dr       | CERMAV, CNRS UPR 5301, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9 France                                                                         | ruel@cermav.cnrs.fr                    |
| <b>SADO</b> Pierre-Etienne  | Laboratoire de Biologie Cellulaire Route de Saint Cyr 78026 Versailles cedex                                                        | pierre-etienne.sado@versailles.inra.fr |

| <b>NOM</b>                     | <b>ADRESSE</b>                                                                                                                      | <b>EMAIL</b>                   |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>SAULNIER</b> Luc, Dr        | INRA, URPOI, BP71627, 44316 Nantes cedex 3, France                                                                                  | saunier@nantes.inra.fr         |
| <b>SEVENO</b> Martial          | UMR CNRS 6037, CCME, IFRMP23 76821 Mont-Saint-Aignan, cedex                                                                         |                                |
| <b>SIVADON</b> Pierre, Dr      | UMR CNRS-UPS 5546 Signaux et Messages Cellulaires, Pôle de Biotechnologie Végétale, 24 chemin de Borde Rouge 31326 Castanet Tolosan | sivadon@smcv.ups-tlse.fr       |
| <b>THOIRON</b> Séverine, Dr    | Groupe de Physiologie et Pathologie Végétale, Faculté des Sciences, 2 Rue de la Houssinière, 44322 Nantes cedex 3, France           | thoiron@svt.univ-nantes.fr     |
| <b>TOKARSKI</b> Caroline       | USTL, UMR 8009, Chimie Organique et Macromoléculaire, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex                                                 | caroline.tokarski@caramail.com |
| <b>TOUZEL</b> Jean Pierre, Dr  | UMR FARE INRA/URCA Équipe Technologie Enzymatique et Physico-chimie des Agro-ressources, 8 Rue Gabriel Voisin, BP 316, 51686 Reims  | touzel@reims.inra.fr           |
| <b>VAN RAEMDONCK</b> Damien    | Laboratory of Plant Biotechnology, Université Libre de Bruxelles, 1850 Chaussée de Wavre, 1160 Bruxelles, Belgique                  | dvraemdo@ulb.ac.be             |
| <b>VERNHETTES</b> Samantha, Dr | Laboratoire de Biologie Cellulaire, Route de Saint Cyr, 78026 Versailles                                                            | vernhett@versailles.inra.fr    |
| <b>VICRE</b> Maïté, Dr         | UMR CNRS 6037 Centre Commun de Microscopie Electronique, 76821 Mont-Saint-Aignan                                                    | maite.vicre@univ-rouen.fr      |

| <b>Sponsors</b>                    | <b>Adresses</b>                                                                                                                    | <b>Site Web</b>                                                                 |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Conseil Régional Champagne-Ardenne | Hôtel de Région, 5 Rue de Jéricho, 51000 Châlons en Champagne Cedex, France                                                        | <a href="http://www.cr-champagne-ardenne.fr">www.cr-champagne-ardenne.fr</a>    |
| Fondation du Sîte Paris-Reims      | 40, rue de Carnot, 51038 Châlons en Champagne cedex, France                                                                        | <a href="http://europolagro.univ-reims.fr">http://europolagro.univ-reims.fr</a> |
| Europol'agro                       | Villa Douce, 9 Boulevard de la Paix, 51097 Reims cedex, France                                                                     | <a href="http://europolagro.univ-reims.fr">http://europolagro.univ-reims.fr</a> |
| Ville de Reims                     | Hôtel de Ville, Direction de l'Économie, Enseignement et Recherche, Service du protocole et du Tourisme, 51100 Reims cedex, France | <a href="http://www.reims.fr">www.reims.fr</a>                                  |
| STORA-ENSO                         | Usine de Corbéhem, rue Brébières, 62112 Corbéhem, France                                                                           | <a href="http://www.storaenso.com">www.storaenso.com</a>                        |