

UNIVERSITE HENRY POINCARÉ
NANCY I
année universitaire 1997-1998

INRA LABORATOIRE DE GENÉTIQUE
ET AMÉLIORATION DES ARBRES
FORESTIERS BORDEAUX-PIERROTON

**DIPLOME D'ÉTUDES
APPROFONDIES DE BIOLOGIE FORESTIÈRE**

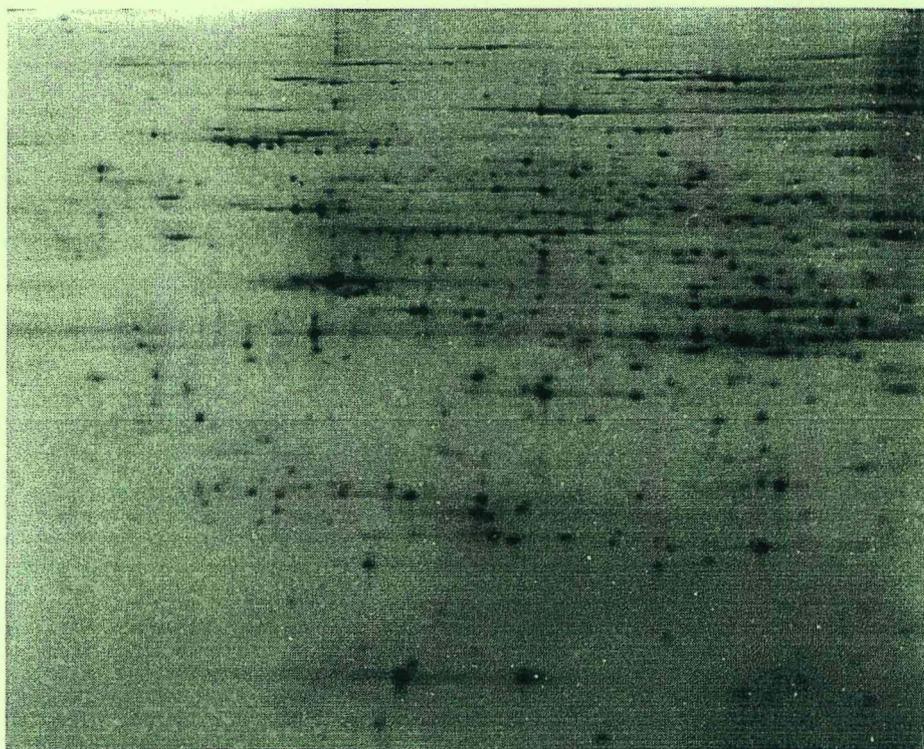
Sujet :

**IDENTIFICATION PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE
DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DU BOIS
DE REACTION CHEZ *Pinus pinaster* ET *Eucalyptus gunnii***

présenté le 2 Septembre 1998 par

Cédric Pionneau

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
BAILLARGUET**



responsables du stage : *Christophe PLOMION, Paulo COSTA*

Membres du jury : P. Dizengremel, G. Aussenac, D. Barthelemy, B. Botton, D. Cornu, C. Delatour, J. Dexheimer, J.F. Dhôte, E. Dreyer, J.L. Dupouey, J.M. Favre, J. Garbaye, J.P. Garrec, D. Gérant, J.M. Guehl, G. Guerrier, F. Houllier, C. Jay-Allemand, A. Kremer, F. Le Tacon, F. Lieutier, A. Marpeau, F. Martin, J.C. Pargney, D. Prat.

DK263596

BA-TH401

UNIVERSITE HENRY POINCARÉ
NANCY I
année universitaire 1997-1998

INRA LABORATOIRE DE GENETIQUE
ET AMELIORATION DES ARBRES
FORESTIERS BORDEAUX-PIERROTON

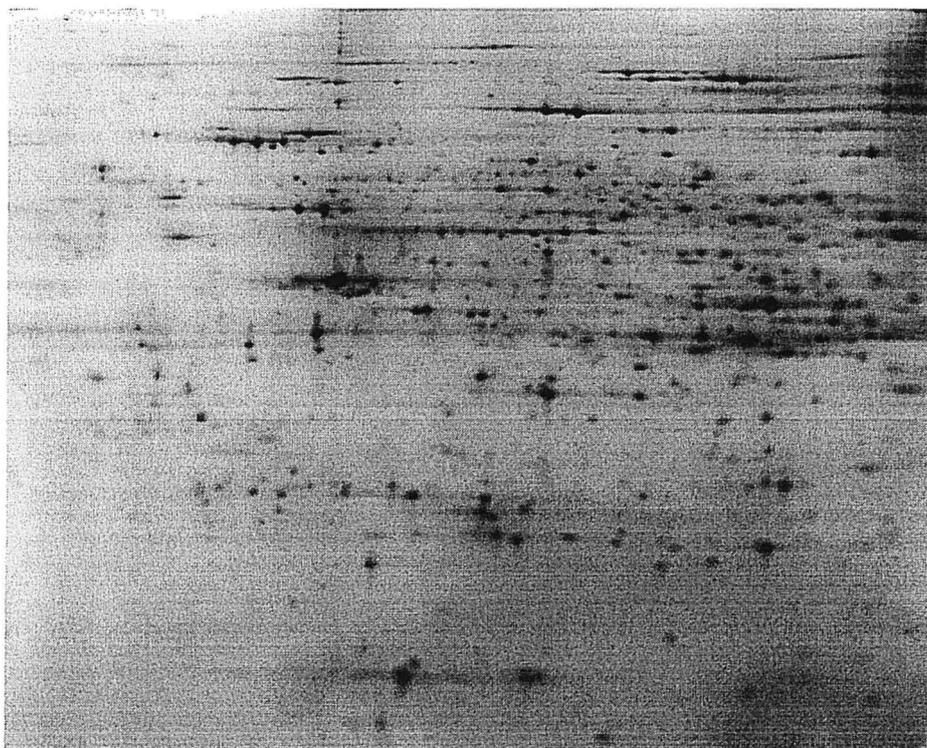
**DIPLOME D'ETUDES
APPROFONDIES DE BIOLOGIE FORESTIERE**

Sujet :

**IDENTIFICATION PAR ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE
DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA FORMATION DU BOIS
DE REACTION CHEZ *Pinus pinaster* ET *Eucalyptus gunnii***

présenté le 2 Septembre 1998 par

Cédric Pionneau



responsables du stage : *Christophe PLOMION, Paulo COSTA*



000001538

Membres du jury : P. Dizengremel, G. Aussenac, D. Barthelemy, B. Botton, D. Cornu, C. Delatour, J. Dexheimer, J.F. Dhôte, E. Dreyer, J.L. Dupouey, J.M. Favre, J. Garbaye, J.P. Garrec, D. Gérant, J.M. Guehl, G. Guerrier, F. Houllier, C. Jay-Allemand, A. Kremer, F. Le Tacon, F. Lieutier, A. Marpeau, F. Martin, J.C. Pargney, D. Prat.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Antoine Kremer pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe « amélio » de Pierroton.

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec d'autres laboratoires. Je tiens également à remercier :

- * Henri Baillères du CIRAD-Forêt de Montpellier, pour les mesures de DRLM, pour m'avoir fourni une bonne partie de la biblio concernant les contraintes de croissance, et pour toutes les réponses qu'il m'a apportées.
- * Georges Piombo du CIRAD-Forêt de Montpellier pour avoir réalisé toutes les analyses chimiques sur les échantillons de bois
- * Jacques d'Alayer du Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur à Paris pour avoir réalisé toutes les microséquences et pour toutes les réponses aux questions techniques que nous nous sommes posées.
- * Guillaume Chantre de l'AFOCEL de Nangis pour avoir présenté le poster à Atlanta et pour m'avoir transmis des informations sur *Eucalyptus gunnii*.

Mes remerciements sont ensuite adressés à Christophe Plomion qui m'a fait découvrir le monde de la recherche, et qui depuis l'année dernière (2 ans déjà !) m'a toujours encadré et soutenu : je lui en suis très reconnaissant. Merci pour les longues soirées passées à chouchouter nos petits gels, pour tout le temps que tu m'as accordé chaque fois qu'un problème se posait. Merci pour les « c'est cool ! », pour les soirées sympas chez toi et tous les autres bons moments que l'on a passés ensemble. Je pars dans une région que tu connais bien, et tout ça va beaucoup me manquer lorsque je serai là-haut, tout au nord, là où il fait très très très froid (« Allez Lens ! »). J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir (si tu viens dans le nord, n'hésite surtout pas à faire un détour par Arras !). Christophe, encore une fois, mille mercis.

Je ne pourrai pas non plus oublier Paulo, le grand maître Bidi du labo. Merci pour ton aide précieuse au cours des manips (« Paulo ! Au secours ! »), pour avoir toi aussi chouchouté nos petits gels, souvent tard le soir. Merci pour les réponses que tu m'as apportées au sujet des protéines, pour ton aide précieuse concernant les analyses statistiques. Merci de m'avoir initié à Splus, le logiciel qui en fait toujours plus. Merci pour les remarques judicieuses faites au cours de la rédaction de ce mémoire.

Enfin, merci à Réjane, quelqu'un de vââââchement sympa, et qui m'a de nombreuses fois dépanné, aux autres stagiaires de DEA : le breton David, Céline, Yann, avec qui j'ai eu de bons moments. Merci au « toulousaing » Christian, à Stéphane, à JMF pour m'avoir occasionnellement aidé à broyer mes échantillons. Merci à Annie, l'experte en fautes d'orthographe et en grammaire.

1- INTRODUCTION	1
2- MATERIEL ET METHODES.....	3
2-1 MATERIEL VEGETAL	3
2-2 METHODE D'ECHANTILLONNAGE.....	3
2-3 MESURE DE LA DRLM	4
2-4 ANALYSES CHIMIQUES DU BOIS	4
2-4-1 Dosage des lignines (méthode de Klason)	4
2-4-2 Dosage de la cellulose (méthode de Kurschner et Hoffner).....	5
2-5 ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE ANALYTIQUE	5
2-6 ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE PREPARATIVE	5
2-7 MICROSEQUENCAGE INTERNE DES SPOTS PROTEIQUES	6
2-8 CARACTERISATION DES PROTEINES.....	6
2-9 ANALYSE STATISTIQUE DES GELS 2-D DE PROTOXYLEME	7
2-10 ANALYSE STATISTIQUE DE GROUPES ("CLUSTERING").....	8
2-10-1 Analyse de groupes.....	8
2-10-2 Analyse de corrélations.....	9
3- RESULTATS.....	9
3-1 COMPARAISON DES PROFILS DES GELS 2-D D'AIGUILLES ET DE PROTOXYLEME DE PIN MARITIME...9	
3-2 DESCRIPTION DES PROTEINES IDENTIFIEES DANS LE PROTOXYLEME DE PIN MARITIME	10
3-2-1 Enzymes de la voie de biosynthèse des lignines et enzymes associées	10
3-2-2 Protéines induites lors de stress	10
3-2-3 Protéines chaperonnes	10
3-2-4 Enzymes détruisant les radicaux oxygénés	11
3-2-5 Autres protéines	11
3-3 RELATION ENTRE LA DRLM, LE TAUX DE LIGNINES ET LE TAUX DE CELLULOSE	11
3-3-1 Pin maritime.....	12
3-3-2 <i>Eucalyptus gunnii</i>	12
3-4 RELATION ENTRE LA DRLM ET LA QUANTITE DE PROTEINES	12
3-4-1 Pin maritime.....	12
3-4-2 <i>Eucalyptus gunnii</i>	13
4- DISCUSSION.....	14
4-1 RELATION ENTRE DRLM ET CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU BOIS	14
4-2 RELATION DRLM ET QUANTITE DE PROTEINES PROTOXYLEMIENNES	15
4-2-1 Pin maritime.....	15
4-2-2 <i>Eucalyptus gunnii</i>	17
4-3 STIMULATION DE LA PRODUCTION DE BOIS DE COMPRESSION CHEZ LE PIN MARITIME.....	17
4-3-1 Expérience 1 : flexion d'arbres adultes à l'aide de câbles	17
4-3-2 Expérience 2 : accrochage d'arbres jeunes sur un tuteur incliné	18
4-4 PLACE DE L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE (EBD) DANS LES ETUDES D'EXPRESSION .	19
5- CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	20
BIBLIOGRAPHIE	21
ANNEXES	25

1- INTRODUCTION

Le pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) et l'eucalyptus sont deux espèces forestières utilisées en culture intensive pour fournir principalement de la pâte à papier et du bois d'œuvre. En France, le pin maritime couvre 1,5 million d'hectares dont 1 million dans le massif forestier Aquitain. C'est le premier résineux français en terme de productivité avec 8,3 millions de m³ de bois produit par hectare et par an. Le genre *Eucalyptus* est à considérer à l'échelle planétaire : celui-ci est largement utilisé pour le reboisement industriel et on compte aujourd'hui plus de 10 millions d'hectares d'eucalyptus répartis à travers le monde, essentiellement dans les régions chaudes. L'*Eucalyptus gunnii* utilisé dans cette étude n'est cultivé qu'en France où l'AFOCEL l'a introduit pour sa résistance au froid. Hormis le sud de la France où il existe des projets de développements industriels sur cette espèce, le poids économique de l'*Eucalyptus gunnii* dans le monde est nul.

Depuis plusieurs années, l'INRA et l'AFOCEL (pour le pin maritime), le CIRAD et l'AFOCEL (pour l'eucalyptus) ont entrepris des programmes d'amélioration génétique sur ces deux espèces. A la demande des sylviculteurs et des industriels du bois, ces programmes avaient pour but principal d'augmenter le rendement en bois. Aujourd'hui, les efforts de la sélection portent encore sur le volume du fût mais aussi sur la qualité du bois. En effet, le souci actuel des industriels du bois vient de l'utilisation d'une matière première hétérogène dans sa composition chimique et ses propriétés mécaniques, propriétés qui dépendent des caractéristiques anatomiques et ultrastructurales du bois. Cette hétérogénéité s'observe aussi bien entre arbres au sein d'une même espèce (variabilité naturelle intraspécifique) qu'à l'intérieur d'un même arbre où elle est généralement très élevée.

La plus évidente des variations des propriétés du bois au sein d'un arbre est l'alternance du bois initial et du bois final observée dans les zones tempérées. Cette variation est réglée par les facteurs climatiques. Une autre source majeure de variation des propriétés du bois est le bois de réaction. Le dictionnaire de l'International Association of Wood Anatomists (IAWA, 1964) définit le bois de réaction comme un " bois qui présente des caractères anatomiques plus ou moins distinctifs ; il se forme typiquement dans les portions de tiges penchées ou courbées et dans les branches ; le végétal s'efforce de reprendre une position normale en réagissant de la sorte. ". On distingue deux types de bois de réaction (figure 1) :

- Le bois de compression qui est " un bois de réaction typiquement formé à la partie inférieure des branches et des tiges penchées ou recourbées des conifères " (IAWA, 1964). Sur une coupe transversale d'un tronc contenant du bois de compression, la moelle est excentrée du côté de la face supérieure. Le bois de compression est plus lignifié que le bois normal (environ 30% de lignines en plus). La lignine étant principalement constituée de 2 types de monomères chez les gymnospermes, H et G (figure 2), on note une plus grande proportion de monomères H dans le bois de compression (LAPIERRE *et al*, 1987 ; ROLANDO *et al*, 1992). Au niveau ultrastructural, les trachéides sont plus courtes longitudinalement, plus arrondies transversalement et présentent d'importants méats intercellulaires. La paroi pectocellulosique des cellules du bois de compression est plus épaisse que celle des cellules du bois normal. La face externe de la couche S2 (figure 3) possède des épaisissements et des cavités spiralées, et l'angle des microfibrilles de cellulose (AMF) par rapport à l'axe de la cellule est élevé : 30 à 50° (LOW, 1964). La couche S3 est absente. En ce qui concerne les propriétés technologiques, le bois de compression est plus dense que le bois normal. Son retrait longitudinal, c'est-à-dire la diminution dans le sens des fibres d'un volume de bois lors du séchage, est très important : 3% contre 0,1 à 0,3% pour le bois

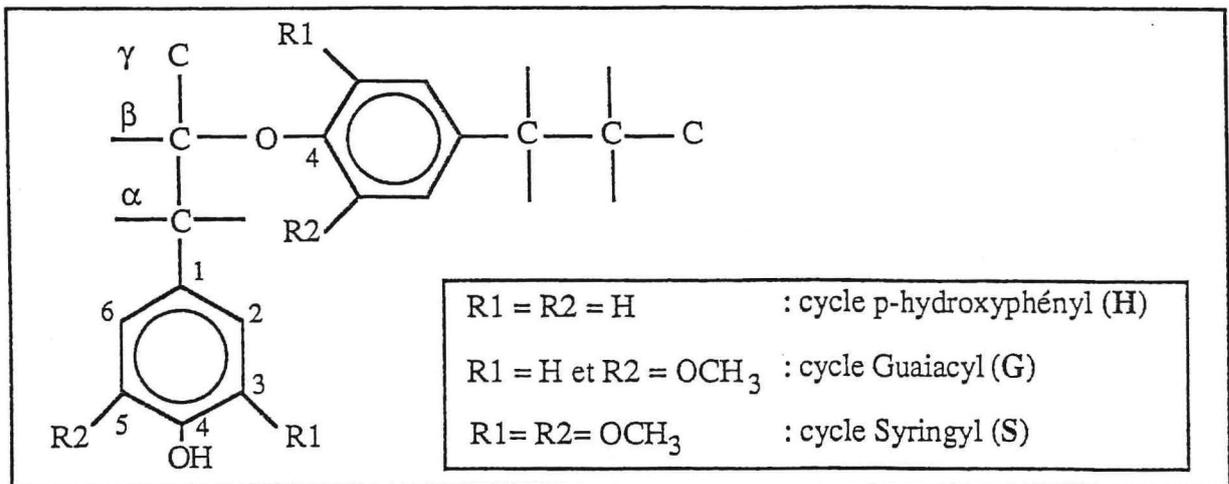


fig. 2 : Structure et nomenclature (H, G et S) des 3 monomères constitutifs des lignines - Structure de la liaison β -O-4 aryl alkyl éther la plus fréquente (d'après BAILLERES, 1994)

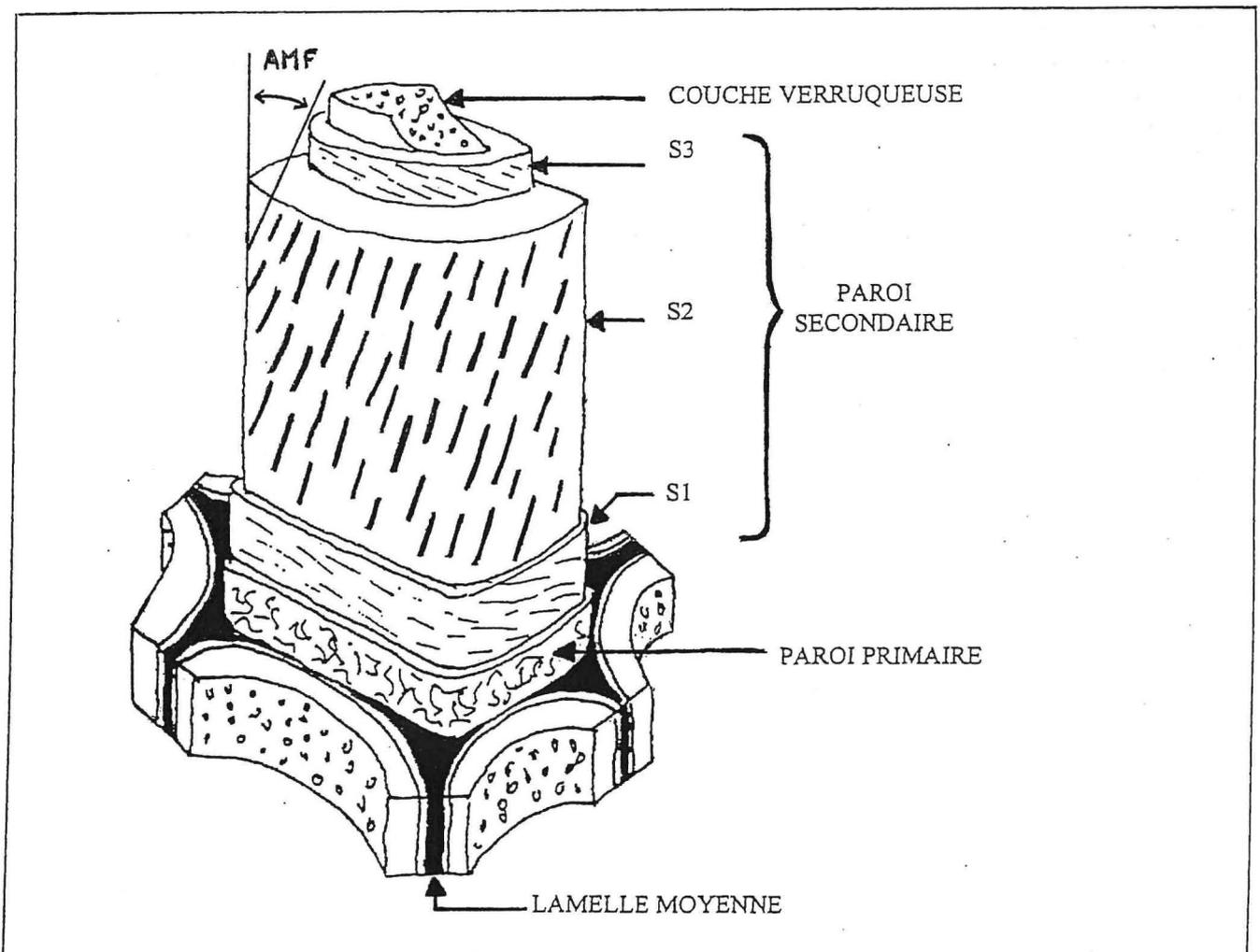


fig. 3 : Schéma tridimensionnel de la structure d'une fibre de bois *sensu stricto*. Les hachures indiquent l'angle des microfibrilles (AMF) (d'après COTE, 1981)

normal (WOOTEN, 1968). Enfin, le bois de compression se caractérise phénotypiquement par sa couleur brun-rouge.

- Le bois de tension qui est “ un bois de réaction typiquement formé à la partie supérieure des branches et des tiges penchées ou recourbées des dicotylédones. ” (IAWA, 1964). Le bois de tension contient moins de lignines que le bois normal. La proportion de monomères G est plus faible dans le bois de tension, d'où un rapport S/G supérieur à celui du bois normal. Les vaisseaux sont moins nombreux et plus petits que ceux du bois normal. Le bois de tension est parfois caractérisé par la présence de fibres particulières appelées fibres G : une partie ou la totalité de la paroi secondaire de ces fibres est presque exclusivement composée de cellulose cristalline. L'AMF dans la paroi des cellules est très faible ($< 5^\circ$). Le bois de tension a un retrait longitudinal important (1%), retrait cependant inférieur à celui observé pour le bois de compression. Grâce à une plus grande teneur en cellulose (due à la paroi de cellulose cristalline des fibres G) et une extraction plus facile des lignines, le bois de tension offre un meilleur rendement en pâte à papier que le bois normal (ONA *et al*, 1995).

On a ici deux définitions complémentaires du bois de réaction, l'une fonctionnelle, fondée sur l'aptitude mécanique de ce bois à réorienter les axes, l'autre structurale, fondée sur des critères anatomiques. Plus directement reliée à la fonction de réorientation du bois de réaction, la mesure de la Déformation Longitudinale de Maturation (DLM) permet de déterminer de façon simple et quantitative le type de bois à la surface d'un arbre. Intervenant après la différenciation, la maturation permet à une cellule de bois de devenir fonctionnelle. Lors de la maturation de ses cellules, la dernière couche de bois formée tend à se rétracter sur elle-même. Cette déformation longitudinale de maturation (négative) ne s'exprime pas dans l'arbre sur pied : elle est empêchée par la très forte adhésion du bois formé en périphérie au bois sous-jacent antérieurement formé et donc rigide. Il en résulte alors un état de tension dans la nouvelle couche de bois formée et un état de compression dans le bois central (figure 4). Dans le bois de tension, la DLM est plus intense (valeurs encore plus négatives) : le bois de tension, situé sur la face supérieure des axes inclinés, “ tire ” pour réorienter l'axe. Dans le bois de compression, les cellules sont au contraire comprimées : la DLM est donc positive. Le bois de compression, situé sur la face inférieure des axes inclinés, “ pousse ” pour réorienter l'axe. L'estimation de la DLM à la périphérie de l'arbre (on mesure en fait une Déformation Résiduelle Longitudinale de Maturation, notée DRLM, puisqu'une petite partie de la déformation s'est exprimée lors de la mise en place des cellules) permet non seulement de distinguer le bois de réaction du bois normal mais aussi d'évaluer quantitativement le type de bois, montrant ainsi un continuum entre bois normal et bois de réaction. De plus, de nombreux auteurs ont relié cette DRLM aux caractéristiques chimiques et anatomiques du bois précédemment décrites, et cela pour différentes espèces : eucalyptus (BAILLERES *et al*, 1995) et pin maritime (COMBES *et al*, 1996).

S'il est bénéfique et nécessaire au bon développement de l'arbre, le bois de réaction est perçu par les industriels comme un défaut majeur. La présence de bois de réaction au sein de bois normal induit une hétérogénéité des propriétés mécaniques et physiques, notamment celle du retrait longitudinal. Cette hétérogénéité se traduit par des déformations et des ruptures des pièces usinées au cours des étapes de transformation. A cause de sa densité élevée, le bois de compression est un bois très dur, cassant et difficile à travailler. Au niveau de la qualité papetière, la plus faible teneur en cellulose du bois de compression (environ 30% de cellulose en moins par rapport au bois normal) entraîne une baisse du rendement en pâte à papier (LADELL *et al*, 1967) ainsi qu'une moins bonne qualité du papier produit, celui-ci étant moins résistant (WATSON et DADSWELL, 1957).

Bien qu'abondamment caractérisé au niveau anatomique, cellulaire et chimique, le bois de réaction a été très peu étudié au niveau moléculaire, en particulier au niveau protéique. Ce stage de DEA a

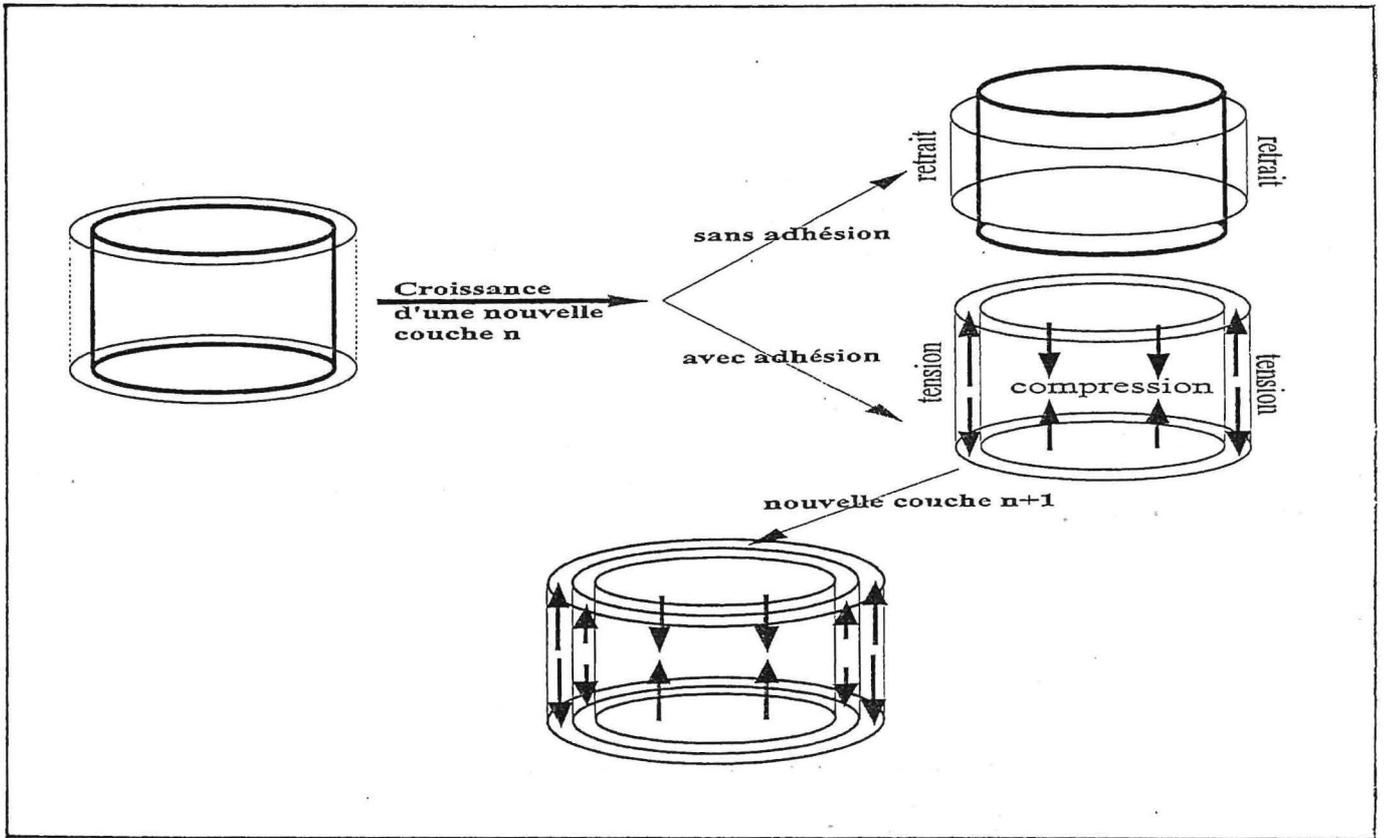


fig. 4 : Processus d'accumulation de contraintes longitudinales de maturation dans une tige déjà en place (d'après BAILLERES, 1994)

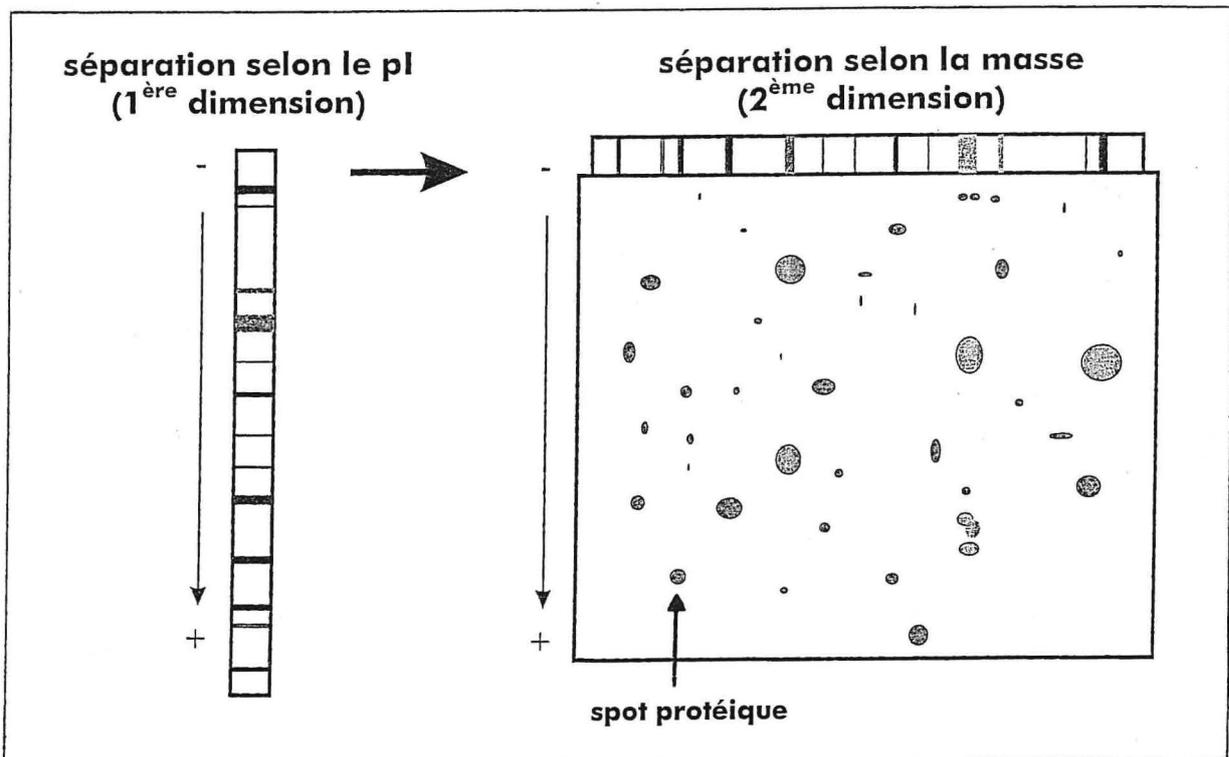


fig. 5 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (d'après de Vienne, 1998)

donc pour but de trouver et d'identifier des protéines caractéristiques du bois de réaction. Il s'intègre dans un vaste programme de recherche visant à étudier la qualité du bois au niveau de son déterminisme génétique (variabilité, héritabilité, recherche de QTL) et de son contrôle moléculaire (gènes et protéines impliquées dans la qualité). Le pin maritime (un conifère) et l'*Eucalyptus gunnii* (une dicotylédone) ont été utilisés pour caractériser respectivement le protoxylème associé au bois de compression et au bois de tension. L'étude protéique a été réalisée grâce à la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle (O'FARRELL, 1975) qui permet de séparer les protéines totales en fonction de leur point isoélectrique, pI (1^{ère} dimension) et de leur masse (2^{ème} dimension) (figure 5). La quantité des protéines sera déterminée grâce à un analyseur d'image. Dans un premier temps, les valeurs de DRLM seront comparées aux caractéristiques chimiques du bois (taux de lignines et taux de cellulose) pour vérifier ici la relation entre DRLM et type de bois. Dans un second temps, les quantités des protéines seront comparées aux valeurs de DRLM afin de déceler des protéines spécifiques du bois normal ou du bois de réaction.

2- MATERIEL ET METHODES

2-1 MATERIEL VEGETAL

Deux arbres situés sur le domaine expérimental de l'INRA de Pierroton ont été utilisés pour cette étude : un pin maritime âgé de 22 ans, et un *Eucalyptus gunnii* adulte. Ces deux arbres ont été choisis pour leur forme courbée qui laissait prévoir la présence de bois de réaction (photos 1 et 2). Un pin maritime plus jeune, appelé pin λ , situé au même endroit et lui aussi courbé, a également été utilisé.

2-2 METHODE D'ECHANTILLONNAGE

Sur le tronc de chaque arbre ont été déterminés plusieurs niveaux : 4 pour le pin et 3 pour l'eucalyptus (figure 6). A chaque niveau, des prélèvements et des mesures ont été réalisés sur 2 ou sur les 4 points cardinaux de l'arbre, après écorçage et suppression du phloème et du cambium :

- ⇒ récupération de protoxylème (xylème en différenciation) en grattant à l'aide d'un couteau la surface du bois. Ce tissu était immédiatement placé dans de l'azote liquide avant d'être stocké à -80°C au laboratoire. Le protoxylème a été utilisé pour l'étude protéique.
- ⇒ mesure au même endroit de la Déformation Résiduelle Longitudinale de Maturation (DRLM) afin de caractériser le type de bois présent à l'endroit du prélèvement du protoxylème.
- ⇒ prélèvement, au même endroit, d'un cube de bois à l'aide d'un ciseau à bois et stockage dans de l'alcool. L'objectif était de réaliser des analyses chimiques du bois (taux de lignines de Klason et de cellulose de Kurschner et Hoffner).



Photo 1
pin utilisé pour cette étude



Photo 2
eucalyptus utilisé pour cette étude

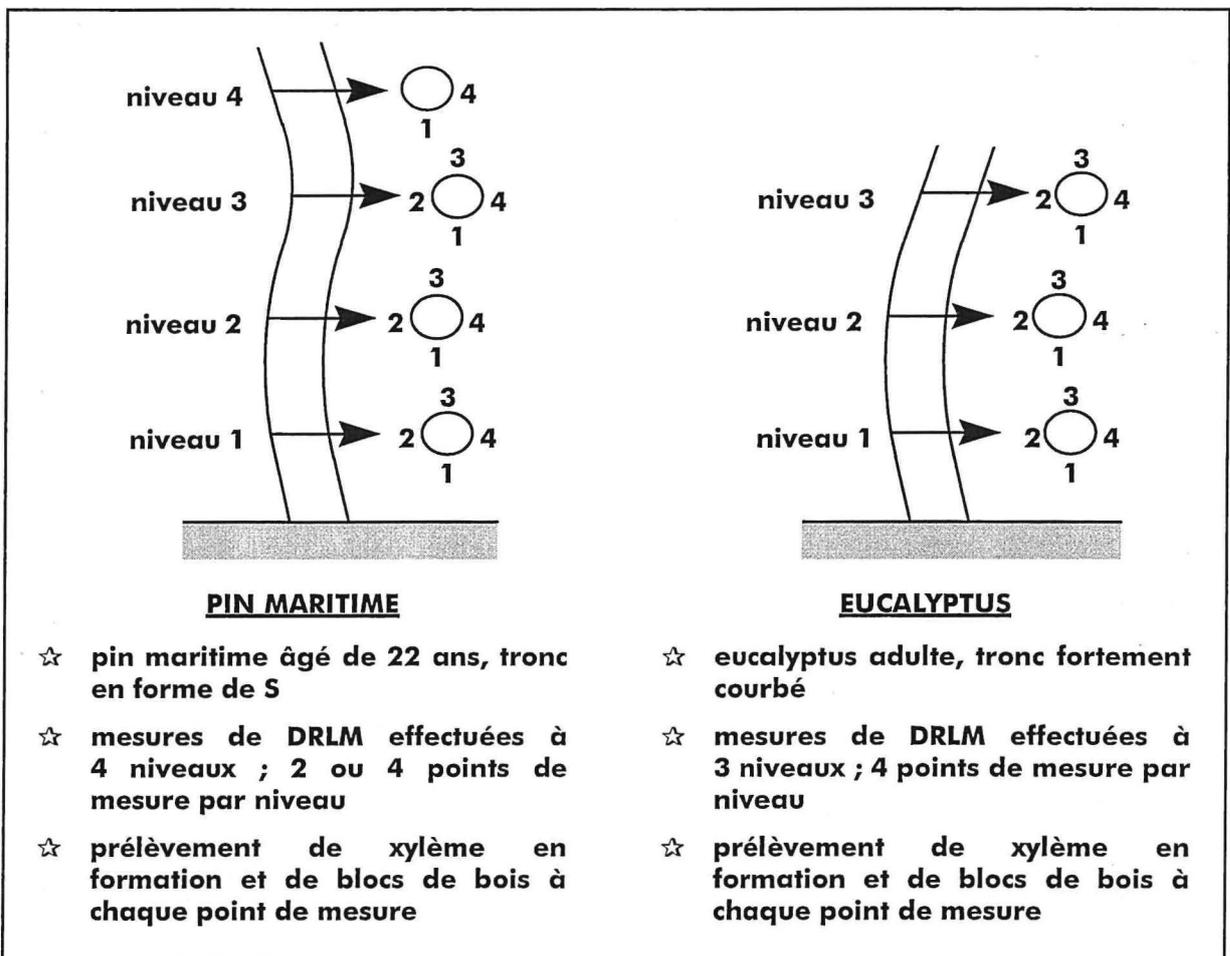


fig. 6 : méthode d'échantillonnage sur le pin maritime et l'*Eucalyptus gunnii*

Des mesures complémentaires de DRLM et des prélèvements de blocs de bois comme définis ci-dessus ont également été effectués à un niveau supplémentaire sur le pin maritime courbé (niveau 5) ainsi que sur le pin maritime λ . Pour l'*Eucalyptus gunnii*, une mesure de DRLM et un prélèvement ont été réalisés en supplément, entre le niveau 1 et le niveau 2 (bloc de bois appelé ES dans le tableau 2).

2-3 MESURE DE LA DRLM

La méthode utilisée pour la mesure des DRLM est celle des deux rainures ou “ méthode Wap’s ”. Cette méthode consiste à mesurer la déformation longitudinale résultant du sciage manuel de deux rainures de part et d’autre des pointes d’un capteur extensométrique relié à une centrale d’acquisition (figure 7).

Après écorçage, les deux pointes du capteur sont légèrement enfoncées dans le bois, butée abaissée. La droite (DD’) passant par les pointes doit être parallèle au fil du bois (figure 8). Après avoir relevé la butée et effectué la mise à zéro sur la base de mesure, on scie la première rainure perpendiculairement à (DD’) et située à $d=5$ mm de la pointe du capteur. Lorsque la valeur sur la centrale d’acquisition se stabilise, on procède au sciage de la deuxième rainure de la même façon que la première. La valeur relevée, exprimée en microdéformations (μdef), correspond soit à une augmentation de l’écartement des pointes (valeur positive de la DRLM \Rightarrow bois de compression) soit à une diminution de l’écartement des pointes (valeur négative de la DRLM \Rightarrow bois de tension ou bois normal selon l’intensité de la DRLM). Ces mesures ont été réalisées avec Henri Baillères du CIRAD-Forêt (Montpellier).

Pour plus de renseignements sur le principe mécanique et théorique de cette méthode de mesure de la DRLM, on pourra se rapporter à FOURNIER *et al* (1994b) et BAILLERES (1994).

2-4 ANALYSES CHIMIQUES DU BOIS

Les analyses chimiques effectuées sur les blocs de bois de pin et d’eucalyptus ont été gérées par Henri Baillères et réalisées par Georges Piombo (CIRAD-Forêt, Montpellier).

2-4-1 Dosage des lignines (méthode de Klason)

Le principe de cette méthode est l’hydrolyse et la solubilisation par un acide fort (acide sulfurique à 72%) des carbohydrates de la paroi. Le résidu insoluble restant est par définition de la lignine (EFFLAND, 1977).

Les blocs de bois sont d’abord broyés puis soumis à la séquence de solvants toluène-éthanol 2:1 \rightarrow éthanol \rightarrow eau afin d’éliminer essentiellement les résines et les tanins. Les résidus pariétaux sont ensuite séchés à l’état anhydre puis soumis à l’hydrolyse acide. Cette étape présente deux phases :

- 1) H_2SO_4 72% pendant 2h à 20°C
- 2) Chauffage sous reflux pendant 3h après dilution de l’acide à 0,5 N

Le résidu insoluble (exprimé en % du résidu pariétal) obtenu après filtration, lavage et séchage correspond à la lignine de Klason.

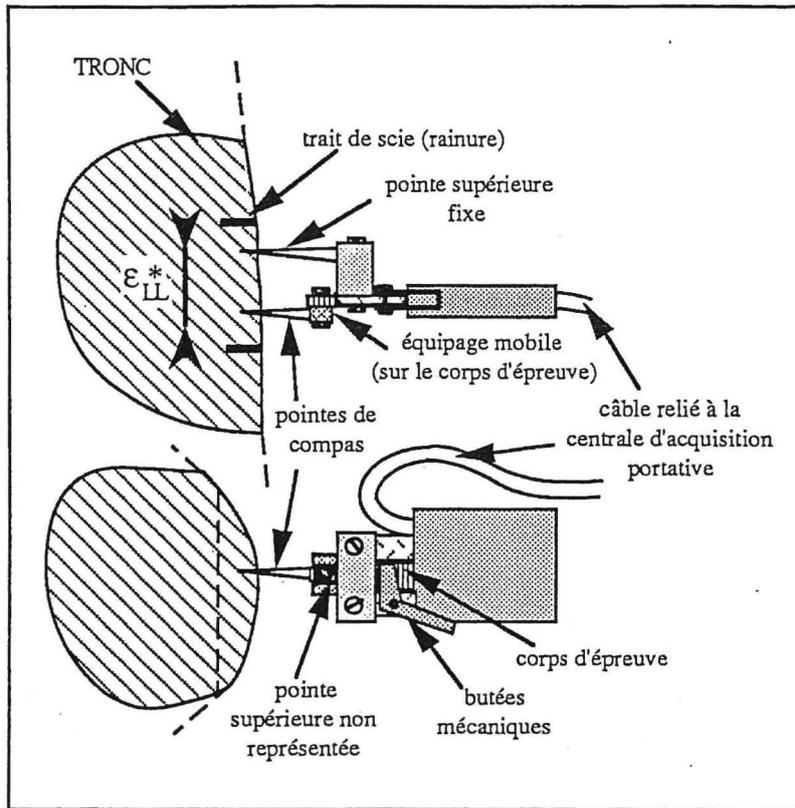


fig. 7 : méthode Wap's pour la mesure de la DRLM (d'après BAILLERES, 1994)

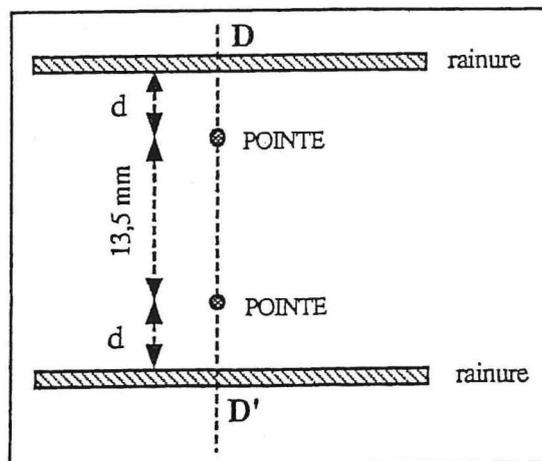


fig. 8 : plan de découpe des deux rainures (d'après BAILLERES, 1994)

2-4-2 Dosage de la cellulose (méthode de Kurschner et Hoffner)

Les blocs de bois sont d'abord broyés puis soumis à un mélange d'acide nitrique et d'alcool, porté à douce ébullition au bain-marie sous réfrigérant à reflux, afin de dissoudre les matières grasses, les hémicelluloses et les lignines. Le mélange est ensuite mis à décanter. Le liquide surnageant est éliminé et le résidu insoluble est soumis au même traitement que précédemment. L'opération est répétée une seconde fois puis le mélange est filtré sous vide, le résidu (c'est-à-dire la cellulose) lavé à l'eau chaude et séché à poids constant à 100° C. Le taux de cellulose est exprimé en g pour 100 g de matériel végétal hors extraits.

2-5 ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE ANALYTIQUE

L'électrophorèse bidimensionnelle de protéines a été effectuée sur les 14 échantillons de protoxylème de pin maritime et sur les 12 échantillons de protoxylème d'eucalyptus. Pour le pin maritime, les électrophorèses bidimensionnelles ont été répétées une fois, sauf pour deux échantillons. Il n'y a pas eu de répétition pour les échantillons d'*Eucalyptus gunnii*. Au total, 38 gels d'électrophorèse bidimensionnelle (gels 2-D) ont donc été réalisés (26 pour le pin maritime et 12 pour l'*Eucalyptus gunnii*). Un nombre de gels équivalent a également été réalisé pour les différentes mises au point de la technique.

La méthode employée pour l'extraction des protéines totales du xylème en différenciation a été la même que celle utilisée sur les aiguilles et les bourgeons par BARHMAN *et al* (1997). Seule l'étape de resolubilisation des protéines a été modifiée : 30 µl de tampon par mg de culot protéique ont été utilisés au lieu de 15 µl par mg de culot. L'isoélectrofocalisation (IEF, séparation des protéines selon leur point isoélectrique, pI, : 1^{ère} dimension) et l'électrophorèse résolutive (SDS-PAGE, séparation des protéines selon leur masse moléculaire relative, Mr, : 2^{ème} dimension) ont été effectuées selon la méthode décrite par COSTA *et al* (1998a). Ici, les deux modifications sont :

- l'utilisation d'une solution d'acrylamide à 40 % (rapport acrylamide-bis acrylamide 37,5/1) du commerce (INTERCHIM, France) pour la préparation des gels de résolution, à la place d'une solution d'acrylamide à 30 % (rapport acrylamide-bis acrylamide 36,5/1) habituellement préparée au laboratoire à partir d'acrylamide en poudre.
- le dépôt de 40 µl d'extrait protéique sur le gel d'isoélectrofocalisation au lieu de 20 µl.

Les protéines des gels 2-D ont été colorées au nitrate d'argent selon le protocole de DAMERVAL *et al* (1987), mais avec une température des bains de révélation de 4° C selon COSTA *et al* (1998a).

2-6 ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE PREPARATIVE

L'électrophorèse bidimensionnelle préparative permet la récupération des spots protéiques après migration dans les deux dimensions. Elle n'a été réalisée que pour le pin maritime.

Utilisant le même appareillage, l'électrophorèse bidimensionnelle préparative diffère peu de l'électrophorèse bidimensionnelle analytique :

- une quantité plus grande d'extrait protéique (400 µl) est déposée sur des gels d'isoélectrofocalisation plus gros (3 mm de diamètre).
- les gels de résolution sont plus épais (1,5 mm) et surmontés d'un gel de concentration.

- les protéines des gels 2-D sont colorées à l'aide d'une solution de Noir Amido selon le protocole de CHEN *et al* (1993). Cette coloration est environ 5 fois moins sensible que la coloration au nitrate d'argent : certains spots visibles après coloration au nitrate d'argent ne le sont plus après coloration au Noir Amido.

Les spots protéiques visibles sont récupérés directement sur les gels colorés à l'aide d'un scalpel et d'une pince, puis stockés à -80° C avant d'être microséquencés. 60 gels préparatifs ont été réalisés afin d'obtenir suffisamment de matériel pour le microséquençage.

Ce stage de DEA a également été l'occasion de rédiger un protocole très détaillé d'une vingtaine de pages sur l'électrophorèse analytique et préparative. Celui-ci uniquement envoyé aux 2 rapporteurs de ce mémoire de DEA est disponible sur demande auprès de Christophe Plomion.

2-7 MICROSEQUENCAGE INTERNE DES SPOTS PROTEIQUES

Le microséquençage interne des spots protéiques a été réalisé par Jacques d'Alayer du Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur à Paris.

Les protéines, fixées sur le gel d'acrylamide, sont d'abord digérées *in situ* soit par l'endoprotéase Lys C, soit par la trypsine (KAWASAKI *et al*, 1990). L'endoprotéase Lys C coupe les protéines au niveau des résidus de lysine, tandis que la trypsine clive les protéines au niveau des résidus d'arginine et de lysine. La trypsine est utilisée pour les protéines de faible poids moléculaire, donnant ainsi plus de peptides. L'endoprotéase Lys C est utilisée pour les protéines de haut poids moléculaire plutôt que la trypsine qui donnerait trop de peptides. De plus, la trypsine et l'endoprotéase Lys C sont les deux seules enzymes qui digèrent bien les protéines fixées sur gel d'acrylamide. Les peptides issus de la digestion sont ensuite séparés par HPLC en phase inverse selon le protocole de KAWASAKI et SUSUKI (1990). Enfin, une séquence d'environ 15 acides aminés est obtenue à partir d'un des peptides par la réaction récurrente d'Edman.

2-8 CARACTERISATION DES PROTEINES

Chaque séquence obtenue a été comparée à 5 banques de données de biomolécules disponibles sur Internet :

- « OWL » version 30.2, 250 514 séquences, dernière mise à jour le 11 juin 1998. Cette banque de données non redondante est la compilation de 4 banques de données protéiques : SWISSPROT, PIR, la traduction de GenBank et NRL-3D Brookhaven.
- « Non-redundant Nucleotide Sequence Databases » (2 501 073 séquences) qui contient la base de données non redondante GenBank ainsi que les bases de données EMBL, DDBJ et PDB.
- « dbSTS » version 98.07 (54 841 séquences), dernière mise à jour le 19 juillet 1998. Cette banque regroupe les STS (Sequence Tagged Site) ou séquences génomiques ciblées.
- « dbEST » version 98.07 (1 718 327 séquences), dernière mise à jour le 23 juillet 1998. Cette banque contient les EST (Expressed Sequence Tags), séquences anonymes ou de fonction connue, issues des projets de séquençage systématique des ADNc.
- la base de données EST *Pinus taeda* (<http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/Pine/>).

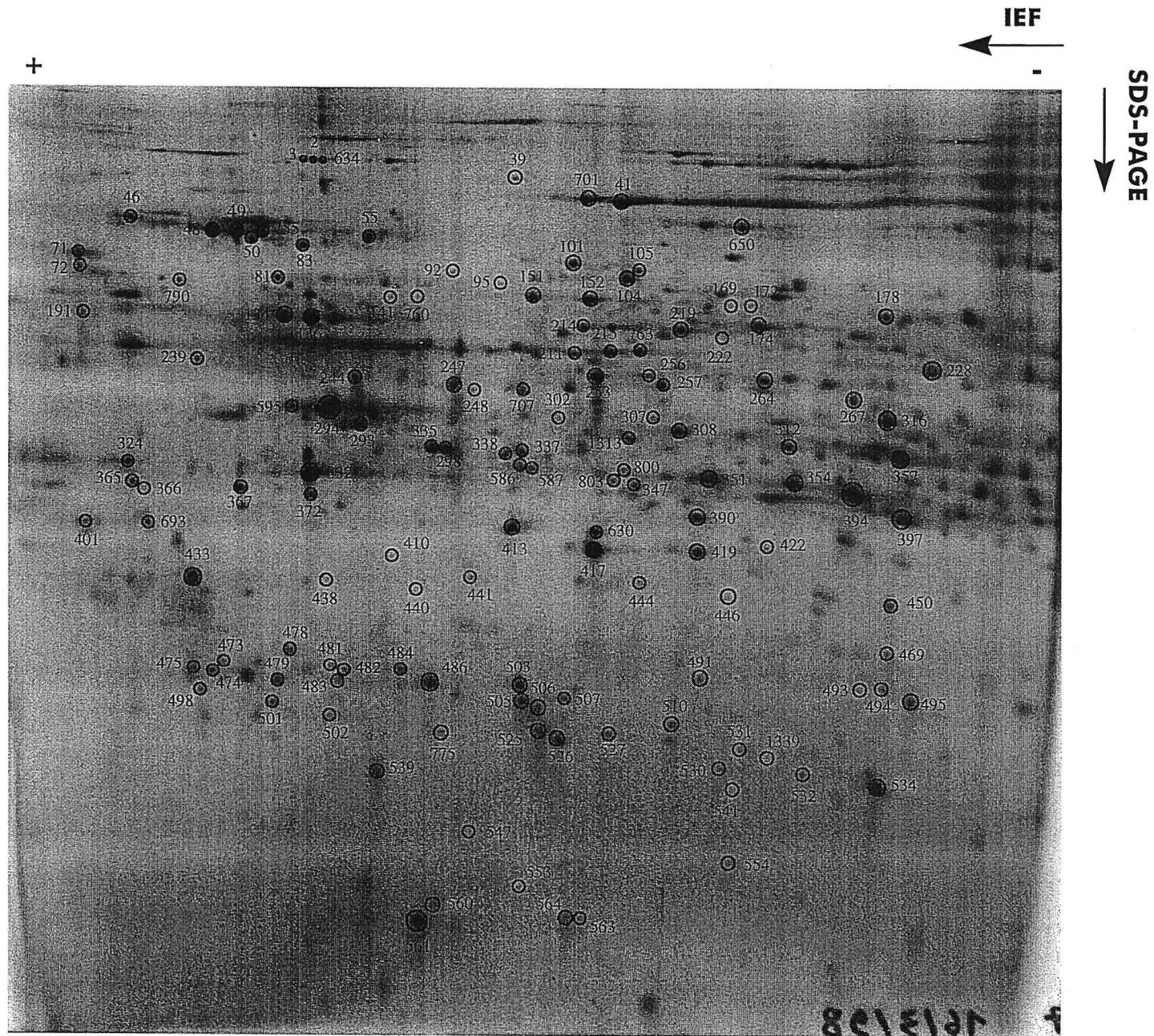


photo 3 : gel 2-D de protoxylème de pin maritime et localisation des 137 spots analysés (voir l'annexe 1 pour le code des spots)

Les programmes BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1990) et FASTA (PEARSON et LIPMAN, 1988) ont été utilisés pour la recherche d'homologies entre nos séquences d'environ 15 acides aminés et les séquences des banques précédemment décrites.

Récemment, COSTA *et al* (1998a et 1998b) ont obtenu des microséquences sur une quarantaine de spots à partir de gels 2-D d'aiguilles de pin maritime. Un gel 2-D d'aiguilles ainsi que la localisation sur ce gel des spots analysés et identifiés ou non par microséquençage ou spectrométrie de masse sont visibles à l'URL suivante : <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/microsequenced.html>. Un grand nombre de spots protéiques sur les gels 2-D de protoxylème et les gels 2-D d'aiguilles présentaient des similitudes de *pI* et de masse moléculaire apparente (*Mr*). Pour vérifier ces similitudes, nous avons réalisé un gel 2-D dans lequel ont comigré à la fois les protéines de protoxylème et les protéines d'aiguilles. Lorsqu'un spot sur gel 2-D de protoxylème et le spot situé au même endroit sur gel 2-D d'aiguilles (c'est-à-dire ayant le même *pI* et la même *Mr*) se confondaient sur le gel 2-D de comigration, nous avons admis que les deux spots correspondaient et qu'ils avaient la même identité. Les données obtenues par COSTA *et al* (1998a et 1998b) ont ainsi été utilisées pour identifier indirectement quelques protéines de protoxylème.

Par ailleurs, grâce au gel 2-D de comigration, la spécificité tissulaire pour toutes les protéines a également été étudiée en superposant un gel 2-D d'aiguilles ou un gel 2-D protoxylème au gel 2-D de comigration. Les protéines présentes sur le gel 2-D de comigration mais absentes sur le gel 2-D d'aiguilles ont été considérées comme spécifiques du protoxylème et vice-versa.

2-9 ANALYSE STATISTIQUE DES GELS 2-D DE PROTOXYLEME

Les gels 2-D ont été scannés et analysés grâce au logiciel BioImage 2-D Analyser, version 6.0.3 (BioImage Products, Millipore/Biosearch, Ann Arbor, MI). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Splus. La quantité de 137 spots protéiques de protoxylème de pin maritime (photo 3) et de 140 spots protéiques de protoxylème d'*Eucalyptus gunnii* (photo 4) a été étudiée. Ces spots répartis sur toute la surface des gels ont été choisis parmi les 600 et 800 spots protéiques observés en moyenne chez le pin maritime et l'*Eucalyptus gunnii* respectivement.

L'intensité intégrée d'un spot, c'est-à-dire la somme des valeurs des pixels à l'intérieur du contour du spot ajustées au bruit de fond, détermine la quantité relative de la protéine correspondante. La variation de l'intensité intégrée d'un même spot entre différents gels, c'est-à-dire entre les différents prélèvements, peut donc être attribuée à la variation de la quantité de la protéine à travers ces différents prélèvements. Cependant, il faut tenir compte des différences de coloration entre gels. En effet, l'étape de coloration au nitrate d'argent est la cause principale des variations expérimentales pour la quantification des spots protéiques, et tend à affecter tous les spots d'un gel de la même manière (BURSTIN *et al*, 1993). Il est donc nécessaire de s'affranchir de cette source de variation pour pouvoir comparer la quantité des protéines entre les différentes conditions ou prélèvements. Une correction linéaire a donc été appliquée à chacun des spots étudiés selon la méthode décrite par BURSTIN *et al* (1993). L'intensité intégrée de chaque spot *i* d'un gel *j* (Y_{ij}) a ainsi été corrigée par un facteur propre au gel *j* (K_j), défini comme le rapport entre la moyenne de l'intensité intégrée de tous les spots *i* pris sur tous les gels *j* ($Y_{..}$) et la moyenne de tous les spots *i* du gel *j* ($Y_{.j}$).

Formule de correction :

$$\hat{Y}_{ij} = Y_{ij} \times K_j \quad \text{avec} \quad K_j = Y_{..} / Y_{.j}$$

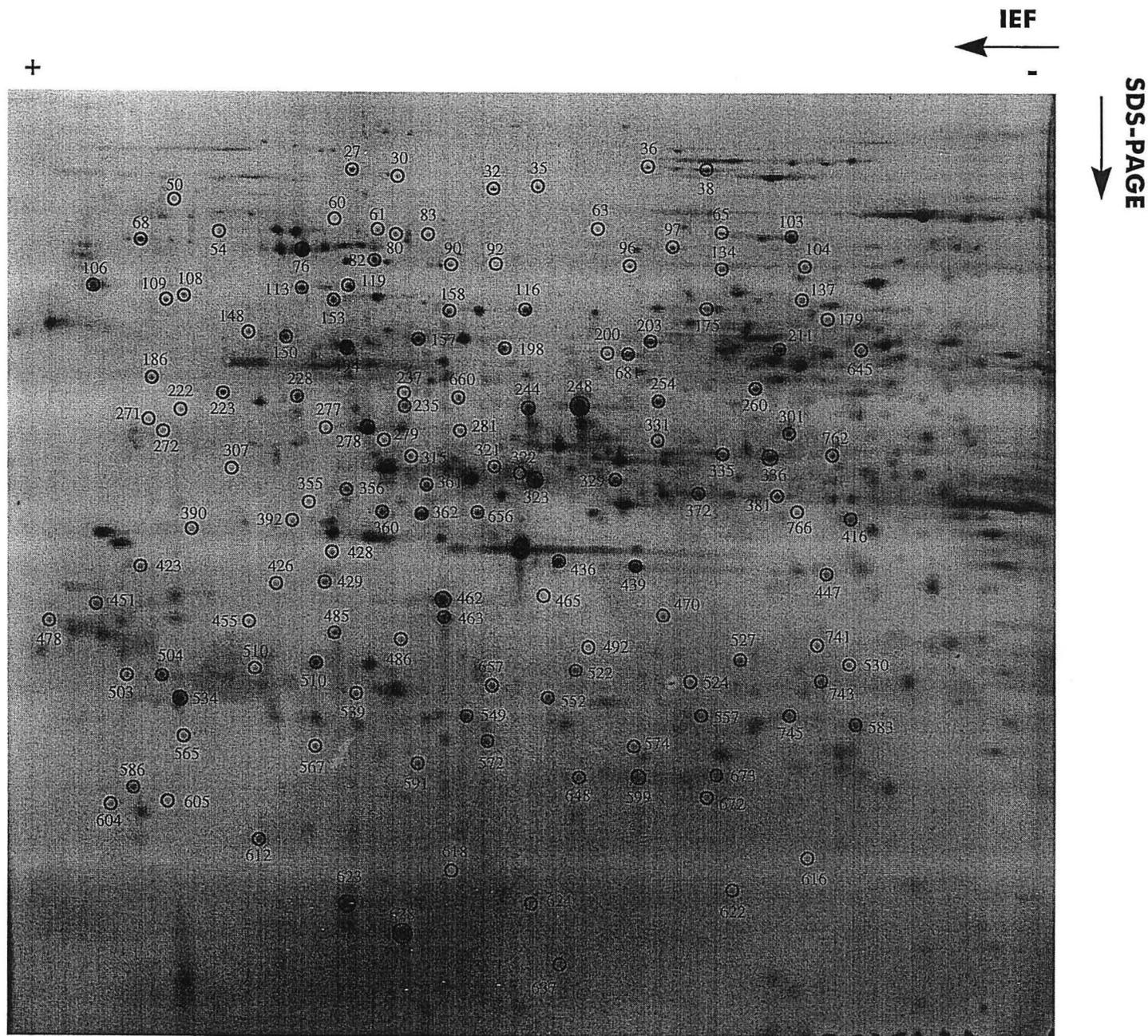


photo 4 : gel 2-D de protoxylème d'*Eucalyptus gunnii* et localisation des 140 spots analysés (voir l'annexe 2 pour le code des spots)

Après correction de l'intensité intégrée, l'effet DRLM chez le pin maritime a été testé selon le modèle suivant :

$$\hat{Y}_{ijkl} = \mu + D_k + \alpha_i \times \text{DRLM}_j + \epsilon_{ijkl} \quad [1]$$

où DRLM_j est la valeur de DRLM de l'échantillon j répété l fois (1 à 2 répétitions par gel). Nous avons ajusté l'effet D_k , c'est-à-dire l'effet date k (k=1 à 5) de la réalisation et numérisation des gels, au modèle, car malgré la correction réalisée précédemment, un effet global sur chaque groupe de gels lors de la coloration ou lors de la numérisation a été précédemment vérifié sur quelques spots. L'effet DRLM sur la quantité de la protéine a été considéré comme significatif au seuil de 5 %. Pour déterminer la part explicative de la DRLM sur la quantité des protéines, le coefficient de détermination du modèle (R^2) a été calculé dans le modèle linéaire suivant :

$$\hat{Y}_{ij} = \mu + \alpha_i \times \text{DRLM}_j + \epsilon_{ij} \quad [2]$$

où DRLM_j est la valeur de DRLM de l'échantillon j. La DRLM est ici le seul régresseur.

Pour l'*Eucalyptus gunnii*, comme on ne disposait pas de répétitions et que tous les gels ont été réalisés le même jour, l'effet DRLM a été testé selon le modèle linéaire suivant :

$$\hat{Y}_{ij} = \mu + \alpha_i \times \text{DRLM}_j + \epsilon_{ij} \quad [3]$$

où DRLM_j est la valeur de DRLM de l'échantillon j. L'effet DRLM sur la quantité de la protéine a été considéré comme significatif au seuil de 5 %. Le coefficient de détermination du modèle (R^2) a été calculé pour les protéines dont la quantité variait avec la DRLM.

2-10 ANALYSE STATISTIQUE DE GROUPES ("CLUSTERING")

Les profils de variation de la DRLM, du taux de lignines et de la quantité des 137 protéines de protoxylème de pin maritime ont été comparés en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et l'analyse statistique de groupes (MYERS *et al.*, 1997).

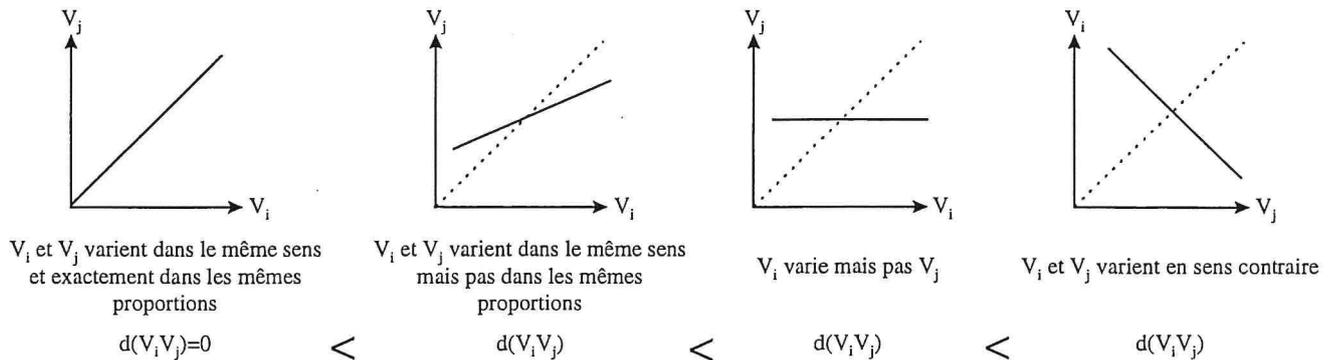
2-10-1 Analyse de groupes

A cause de l'incompatibilité des unités de mesures, les variables ont été d'abord centrées et réduites. Pour chaque couple de variables $V_i V_j$ ($V = \text{DRLM}$, taux de lignines ou quantité de protéine), la distance euclidienne $d(V_i V_j)$ a été calculée selon la formule ci-dessous :

$$d(V_i V_j) = \sqrt{\sum_{l=1}^{26} (V_{il} - V_{jl})^2}$$

A partir de la matrice de distances (139×139) ainsi construite, les variables ont été regroupées en groupes ou "clusters" suivant un algorithme basé sur des distances moyennes entre groupes de variables (initialement, chaque variable formait un groupe). Cette analyse est représentée graphiquement par un dendrogramme. Si deux variables présentent des profils de variation semblables, la distance entre ces deux variables sera faible : les deux variables seront alors proches dans le dendrogramme. Si au contraire ces deux variables présentent des profils

d'expression différents, leur distance sera élevée : elles seront alors éloignées dans le dendrogramme. La représentation suivante montre l'évolution de la distance entre deux variables selon la similarité des profils d'expression de ces deux variables :



Le dendrogramme ne permet pas cependant de bien différencier les cas intermédiaires.

2-10-2 Analyse de corrélations

Ici, les données brutes ont été utilisées. Pour chaque couple de variables $V_i V_j$, le coefficient de corrélation a été calculé ($r(V_i V_j)$) afin de former une matrice de corrélation (139×139). Cette matrice a été ordonnée en fonction du résultat de l'analyse de groupes. Une représentation graphique de cette matrice permet, comme le dendrogramme, de comparer les profils de variation entre les variables. Elle permet en plus de dire si deux variables sont éloignées à cause d'une variation contraire ou si elles sont éloignées à cause d'une variation dans le même sens mais pas dans les mêmes proportions. Grâce à la représentation graphique, on peut facilement comparer les groupes entre eux et bien caractériser leur profil de variation.

3- RESULTATS

3-1 COMPARAISON DES PROFILS DES GELS 2-D D'AIGUILLES ET DE PROTOXYLEME DE PIN MARITIME

L'identité de protéines de protoxylème (X pour « xylem », suivi du numéro d'analyse) et d'aiguilles (N pour « needles », suivi du numéro d'analyse) ayant les mêmes pI et Mr et confondues sur le gel de comigration a été validé par le microséquençage de 4 spots présumés identiques dans les 2 tissus. Pour chacune de ces 4 protéines, nous avons retrouvé la même identité (en bleu dans l'annexe 1) : il s'agit de l'actine (X9=N53), d'une HSP de faible poids moléculaire (X47=N98), d'une HSP de 70 kDa (X1=N164) et de la caféoyl Coenzyme A O-méthyltransférase (X46=N125). Ces résultats montrent donc que l'on peut identifier de façon quasi certaine des protéines de gels 2-D de protoxylème à partir de protéines de gels 2-D d'aiguilles déjà identifiées.

Le gel 2-D de comigration a été également utilisé pour déterminer ou non la spécificité tissulaire pour les protéines de protoxylème. Ainsi, 29,5 % des protéines sont spécifiques au xylème, la majeure partie des protéines de protoxylème étant retrouvée dans les aiguilles. Ce résultat est en accord avec ceux de BAHRMAN et PETIT (1995) qui avaient comparé des gels 2-D d'aiguilles, de pollen et de bourgeons de pin maritime, et qui avaient trouvé que la majeure partie des protéines révélées par l'électrophorèse bidimensionnelle était commune.

3-2 DESCRIPTION DES PROTEINES IDENTIFIEES DANS LE PROTOXYLEME DE PIN MARITIME

Sur les 137 protéines étudiées, 33 protéines ont pu être identifiées (tableau de l'annexe 1). Parmi ces 33 protéines, 25 ont été identifiées directement par microséquençage et recherche d'homologies dans les banques de données (en rouge et en bleu). Les 8 protéines restantes ont été identifiées indirectement à partir de protéines de gels 2-D d'aiguilles déjà identifiées (en vert). Les 33 protéines identifiées peuvent être classées en 5 grands groupes :

3-2-1 Enzymes de la voie de biosynthèse des lignines et enzymes associées

X46 est similaire à la caféoyl Coenzyme A *O*-méthyltransférase (CCoA-OMT) qui transforme le caféoyl-Coenzyme A en féruloyl Coenzyme A, un précurseur des monomères de lignines. X18 est similaire à l'acide caféique *O*-méthyltransférase (C-OMT) qui convertit l'acide caféique en acide férulique et l'acide 5-hydroxyférulique en acide sinapique, les deux acides produits étant également des précurseurs des monomères de lignines. Ces deux enzymes sont des méthyltransférases, c'est-à-dire qu'elles ajoutent un radical méthyle à leur substrat. Le radical méthyle provient de la *S*-adénylméthionine (SAM), coenzyme produit par la SAM synthétase à partir d'ATP et de méthionine. 5 protéines (X11, X12, X15, X21 et X30) sont similaires à des SAM synthétases.

3-2-2 Protéines induites lors de stress

Les protéines X47 et X97 sont similaires à des Heat Shock Protein (HSP) de faible poids moléculaire. Ces protéines sont synthétisées en grande quantité lors d'une élévation de température, d'où leur nom. Cette famille de protéines se divise en plusieurs classes selon la localisation cellulaire de ses membres. X47 et X97 appartiennent à la classe 1 car elles sont cytosoliques. La protéine X61 correspond à une protéine de *Pinus taeda* induite lors d'un stress hydrique et elle-même homologue à une protéine de tomate induite par l'ABA et exprimée dans la maturation des fruits (PADMANABHAN *et al*, 1997). Une autre protéine, X43, correspond également à une protéine de *Pinus taeda* mais induite par l'auxine. La protéine X41 est une isoflavone réductase, un enzyme-clé dans la synthèse des isoflavonoïdes. L'isoflavone réductase est impliquée dans la synthèse d'une phytoalexine en réponse à l'attaque de pathogènes.

3-3-3 Protéines chaperonnes

Plusieurs protéines sont similaires à des protéines dites chaperonnes. Ces protéines assurent un repliement correct des autres protéines. La protéine disulfide isomérase (X10 et X59) permet la formation des ponts disulfures S-S à l'intérieur des protéines. Les HSP 70 kDa (X1, X2 et X3), d'autres Heat Shock Protein mais de poids moléculaire élevé, se lient aux régions

Identification ^a	pI	Mr (kDa)	microséquences internes ^b	similarité aiguille ^c	protéine similaire ^d	identité	similarité	E.C.	voie métabolique	Mr attendue (kDa) ^e	espèce ^f	accession ^g
X1	5,3	75	SINPDEAVAYGA, EQVFSTYSDNQP et <u>VSAIR</u>	C (N164)	HSP 70 kDa	12/12 et 12/12	12/12 et 12/12	*	*			
X2	5,3	75	SINPDEAVAYGAAVQ et EQVFSTYSDNQPGVL	C (N165)	HSP 70 kDa	15/15 et 15/15	15/15 et 15/15	*	*	71,067	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Y17053
X3	5,4	75	TAGDTHLGGEDFDN	C (N166)	HSP 70 kDa	14/14	14/14	*	*			
X6	5,4	56	ATSDLLLVQSDLYTVEEGFV	C (N167)	UDP-glucose pyrophosphorylase	17/20	20/20	2.7.7.9	métabolisme de l'amidon et du saccharose, synthèse de la cellulose	51,585	<i>Pyrus pyrifolia</i>	AB013353 *
X9	5,5	41	DLYGN	C (N53)	actine	5/5	5/5	*	*	41,749	<i>Pinus contorta</i>	P24902
X10	5,6	38	DLGERYGVSGFPTLK	C (N168)	protéine disulfide isomérase	14/15	15/15	5.3.4.1	biosynthèse et dégradation des glycoprotéines	39,663	<i>Nicotiana tabacum</i>	Y11209
X11	5,6	44	YLDENTIFH et TNMVMVFGE	C (N127)	SAM synthétase	9/9 et 9/9	9/9 et 9/9					
X12	5,8	51	VLVNIEQQSPDIAQG	S	SAM synthétase	14/15	14/15					
X15	5,9	45	VLVNIEQQSPDIAQG	C (N155)	SAM synthétase	14/15	14/15	2.5.1.6	catabolisme de la méthionine	43,119	<i>Pinus banksiana</i>	P50300
X21	6,1	45	LCDQISDAVLDACT	S	SAM synthétase	14/15	15/15					
X30	6,3	46	RPEEIGAGDQGHMFG et NFDFRPGMMTINLDL	S	SAM synthétase	15/15 et 12/15	15/15 et 15/15					
X16	5,9	37	IIAEYIWIGSGMDI	C (N46)	glutamine synthétase	13/15	15/15	6.3.1.2	métabolisme de l'azote	39,48	<i>Pinus sylvestris</i>	X74429
X17	5,9	36	IIAEYIWIGSGMDI	C (N171)	glutamine synthétase	13/15	15/15	6.3.1.2				
X18	5,9	35	HVGGDMFDSVPSGQA	C (N177)	acide caféique O-méthyltransférase	11/15	15/15	2.1.1.68	biosynthèse des lignines	41,816	<i>Pinus radiata</i>	U70873
X33	6,2	38	QEMERLSTACQEGGF et LVDEHHPCLYRQFIH	S	ACC oxydase	7/15 et 11/15	12/15 et 14/15	*	synthèse de l'éthylène	34,134	<i>Picea glauca</i>	L42466
X41	6,1	32	LPANTLSFNELVALW	C (N75)	isoflavone réductase	12/15	14/15	1.3.1.-	métabolisme des isoflavonoïdes	35	<i>Pyrus communis</i>	AF071477 **
X43	5,5	35	EYGSIDVLEFGFPPV	C (N170)	EST de <i>Pinus taeda</i> "auxin-induced protein"	12/15 et 12/15	14/15 et 14/15	*	*	*	<i>Pinus taeda</i>	AA556564** A556410**
X45	5	31	TWWWHATDFSDGELK	C (N173)	protéine se liant aux protéines Ran	12/15	13/15	*	*	24,695	<i>Arabidopsis thaliana</i>	U62742
X46	5,2	30	VGGLI	C (N125)	caféoyl CoA O-méthyltransférase	5/5	5/5	2.1.1.104	biosynthèse des lignines	26,289	<i>Populus kitakamensis</i>	AB000408
X47	5,7	18	ASMENGV	C (N98)	HSP de faible poids moléculaire (classe 1)	7/7	7/7	*	*	17,454	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P19036
X48	5,8	26	DVFGHMLNDKEIVA	C (N175)	ascorbate peroxidase	13/15	14/15	1.11.1.11	métabolisme de l'ascorbate et de l'aldarate	27,43	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X80036*
X59	4,9	61	NHDPPIVLAK	C (N178)	protéine disulfide isomérase	9/10	9/10	5.3.4.1	biosynthèse et dégradation des glycoprotéines	57,032	<i>Zea mays</i>	P52588
X61	5,1	33	HKIEEVEAAAAVGG	C (N172)	EST de <i>Pinus taeda</i> "water-stress inducible protein : lp3-1" protéine de maturation des fruits "ABA stress ripening protein"	14/15 13/15	15/15 15/15	*	*	14,361 13,115	<i>Pinus taeda</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>	U52865 Q08655
X74	6,1	32	LIDVDVPPVGGHAGI	C (N159)	malate déshydrogénase	15/15	15/15	1.1.1.37	Cycle de Krebs	43,133	<i>Medicago sativa</i>	AF020273
X54	5,7	24	<u>GLAIAAISNSAVTH, QALDCVLSQPLNFA</u> et AYGAVCTPEFYLFK	C (N109)	gène flc A (facteur de transcription)	10/14	13/14	*	*	*	<i>Azospirillum brasilense</i>	Y12363
X19	5,9	34	AVVESLPENGLLVGG	S	non identifié							
X44	5	34	VSEEEVGLTGGADP	C (N169)	non identifié							
X60	4,9	59	EYFDGTLPPQFRSE	C (N152)	non identifié							

^a numéro du spot sur gel 2-D de protoxylème (voir photo 5)

^b souligné : microséquence n'ayant pas permis l'identification

^c C : protéine commune avec les aiguilles, S : protéine spécifique du protoxylème. Entre parenthèses : numéro du spot sur gel 2-D d'aiguilles

^d en gras : protéines dont la quantité varie avec la DRLM (voir annexe 1)

^e masse calculée à partir de la séquence homologue

^f espèce où a été trouvée la séquence homologue

^g dans la banque OWL. * : dans la banque EMBL. ** : dans la banque EMBLNEW

tableau 1 : microséquences du protoxylème de pin maritime

hydrophobes exposées. La peptidylprolyl cis-trans isomérase (X69) catalyse l'isomérisation cis-trans des liaisons entre la proline et un autre acide aminé.

3-2-4 Enzymes détruisant les radicaux oxygénés

Les radicaux oxygénés sont des composés normalement produits par les cellules, mais ils sont toxiques et doivent être rapidement éliminés. La Cu/Zn superoxyde dismutase (X101) détruit les radicaux O_2^- . L'ascorbate peroxydase (X48) détruit les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2).

3-2-5 Autres protéines

La protéine présente uniquement pour des DRLM positives (X33) est similaire à l'ACC oxydase, la dernière enzyme dans la voie de biosynthèse de l'éthylène. Cet enzyme (appelé aussi Ethylene Forming Enzyme, EFE) convertit l'acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique (ACC) en éthylène. La malate déshydrogénase (X74) intervient dans le cycle de Krebs. L'UDP-glucose pyrophosphorylase (X6) catalyse la formation d'UDP-glucose à partir d'UTP et de glucose. Cet enzyme est impliqué dans le métabolisme de l'amidon et du saccharose et fournit également le substrat pour la synthèse de la cellulose. 4 protéines sont similaires à la glutamine synthase (X13, X14, X16 et X17), enzyme qui assure l'incorporation de l'ion ammonium au glutamate pour former la glutamine. X45 est une protéine se liant aux protéines Ran ("Ran binding protein" en anglais). Cette protéine permet le transport de protéines du cytoplasme vers le noyau. X9 correspond à de l'actine, protéine produite durant la division cellulaire et l'élongation des cellules. X7 est similaire à la sous-unité β de l'ATP synthétase. L'ATP synthétase est un complexe transmembranaire assurant la synthèse d'ATP et impliqué dans les transports d'ions à travers les membranes. X102 est une protéase ATP-dépendante : elle participe à la dégradation des protéines dénaturées dans le chloroplaste. La protéine X51 est homologue à la triose phosphate isomérase, un enzyme de la glycolyse. Enfin, X54 présente des homologies avec un facteur de transcription bactérien qui contrôle l'agglomération et la colonisation des bactéries à la surface des racines de blé (PEREG-GERK *et al*, 1998).

Les microséquences réalisées à partir de 28 protéines de protoxylème de pin maritime sont présentées dans le tableau 1. La photo 5 montre la localisation des protéines microséquencées et identifiées. Sur ces 28 protéines, 3 protéines n'ont pu être identifiées après comparaison de leurs microséquences avec les banques de données. Parmi les 25 protéines identifiées, 12 protéines (soit 48 %) sont homologues avec des protéines déjà connues de conifères, dont 11 homologues avec des protéines d'espèces appartenant au genre *Pinus*. Les 13 autres protéines présentent des homologies avec des protéines d'angiospermes. Une seule protéine est analogue à une protéine bactérienne. Enfin, 5 protéines identifiées sont spécifiques du xylème : X12, X21 et X30, qui sont des SAM synthétases, X33 qui est l'ACC oxydase et X19, une protéine non identifiée.

3-3 RELATION ENTRE LA DRLM, LE TAUX DE LIGNINES ET LE TAUX DE CELLULOSE

Les valeurs de DRLM, les taux de cellulose et les taux de lignines correspondants sont donnés chez le pin maritime (pin courbé et pin λ) et l'*Eucalyptus gunnii* dans les tableaux 2 et 3 respectivement. Les relations entre la DRLM et ces deux caractéristiques du bois chez les deux espèces sont représentées dans les figures 9 et 10.

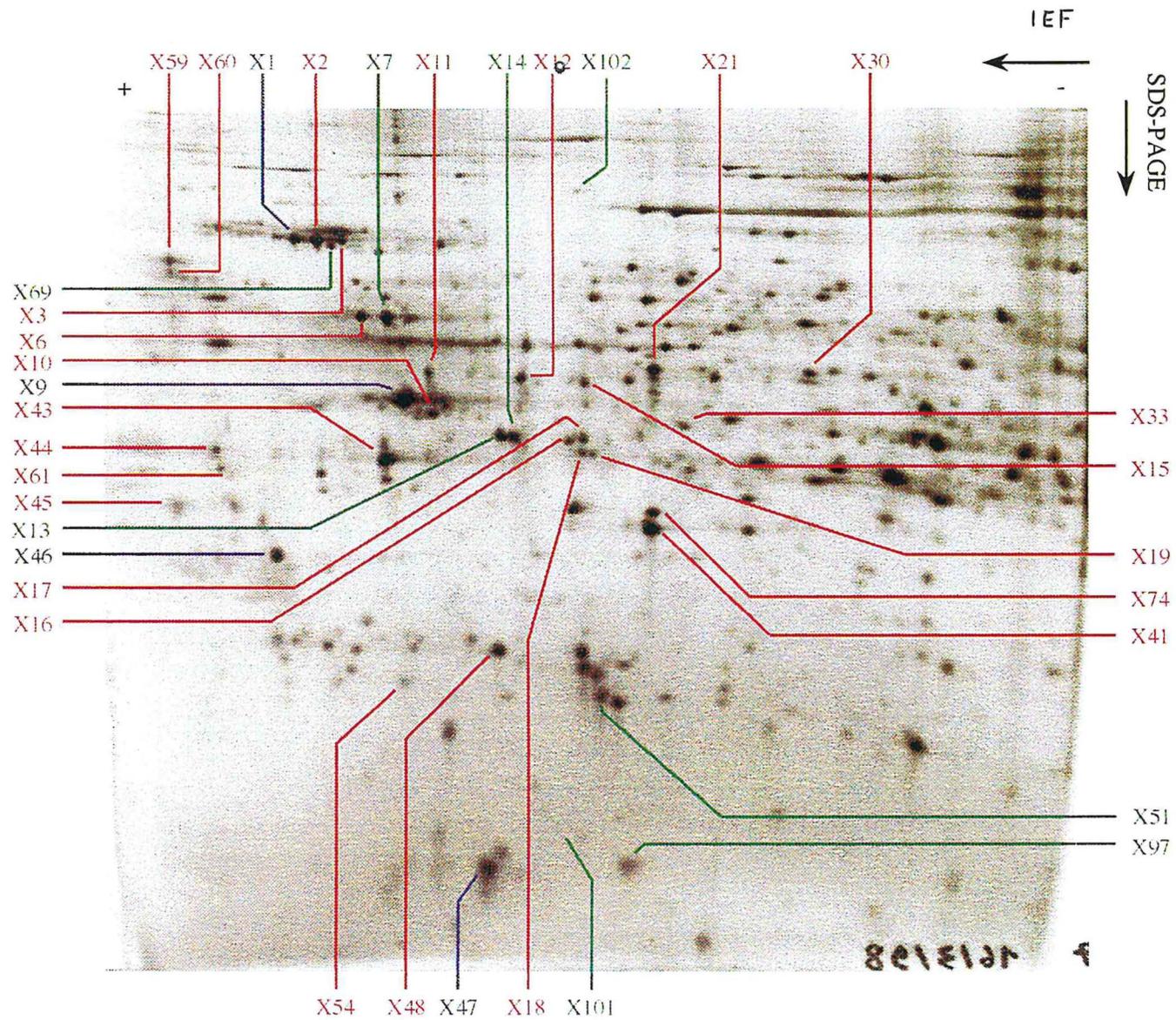


photo 5 : les protéines identifiées de protoxylème de pin maritime.

En bleu : spots séquencés à partir de gels 2-D d'aiguilles et de gels 2-D de protoxylème

En vert : spots identifiés par similarité de M_r et de pI à partir de gels 2-D d'aiguilles

En rouge : spots séquencés à partir de gels 2-D de protoxylème

3-3-1 Pin maritime

On observe une relation significative au seuil de 5 % et positive entre le taux de lignines et la DRLM. Le taux de lignines est élevé pour des valeurs de DRLM positives, c'est-à-dire lorsqu'on a du bois de compression. De plus, la DRLM explique environ 76 % de la variation du taux de lignines. Contrairement au taux de lignines, on observe une relation négative entre le taux de cellulose et la DRLM. Cependant, à cause du faible nombre de points mesurés, cette relation n'est significative qu'au seuil de 6,2 %.

3-3-2 Eucalyptus gunnii

Chez cette espèce, 3 mesures de DRLM sont positives. Une DRLM positive signifie la présence de bois de compression. Hors ce type de bois n'existe pas chez les eucalyptus : les valeurs positives mesurées ici sont des artefacts. On peut expliquer ces valeurs positives par le fait que le lieu de mesure de ces valeurs se situait à proximité de zones de bois très tendu. Dans ces zones, les forces de tension déjà relâchées par des mesures de DRLM ont comprimé le bois qu'elles entouraient. Cette interprétation est plausible car en plus, le diamètre du tronc était faible. Ces 3 valeurs n'ont pas été retenues pour la suite de cette étude.

Après avoir éliminé ces valeurs, on remarque une relation positive significative au seuil de 5 % entre la DRLM et le taux de lignines. Plus la DRLM diminue, c'est-à-dire plus le bois devient tendu, plus le taux de lignines diminue. La DRLM explique plus de 94 % de la variation du taux de lignines. Par contre, aucune relation significative n'est observée entre la DRLM et le taux de cellulose. Cette absence de corrélation est certainement due au faible nombre de points mesurés.

Toutes ces relations vont dans le sens des résultats déjà connus et décrits dans la littérature pour les gymnospermes et les angiospermes.

3-4 RELATION ENTRE LA DRLM ET LA QUANTITE DE PROTEINES

3-4-1 Pin maritime

Sur les 137 protéines analysées (photo 3), 26 varient de façon significative au seuil de 5 % avec la DRLM, soit environ 19 % (voir la partie supérieure du tableau de l'annexe 1). Parmi ces 26 protéines, 16 ont été microséquencées. 14 protéines sur les 16 ont été identifiées par homologies de séquence avec les banques de données (en rouge) dont 2 protéines aussi identifiées chez les aiguilles (en bleu). Les 2 protéines microséquencées restantes n'ont pu être identifiées. 21 protéines varient de façon positive avec la DRLM (81 %), dont les 5 SAM synthétases, une protéine disulfide isomérase, la malate déshydrogénase, le facteur de transcription bactérien (flcA), une glutamine synthase et les deux enzymes de la voie de biosynthèse des lignines (CCoA-OMT et C-OMT). 4 protéines varient de façon négative avec la DRLM (15 %), dont une HSP de faible poids moléculaire. Enfin, 1 protéine n'est présente que pour des valeurs positives de DRLM : il s'agit de l'ACC oxydase. Le coefficient de détermination des protéines variant avec la DRLM est compris entre 0,044 et 0,826. Enfin, 4 protéines montrent un effet date de la réalisation et de la numérisation des gels significatif au seuil de 1 %. Cet effet est attribué au fait que 3 échantillons sur les 4 correspondant aux

génotype	bloc de bois ^a	DRLM (en µdef)	taux de cellulose (en g pour 100g)	taux de lignines (en % du résidu pariétal)
pin courbé	1-1	-921	nd	nd
	1-2	279	28,90	28,16
	1-3	-564	nd	nd
	1-4	-907	33,85	22,00
	2-1	-950	nd	nd
	2-2	-1200	33,07	24,44
	2-3	64	nd	nd
	2-4	-793	nd	23,08
	3-1	-1064	nd	nd
	3-2	-1036	nd	23,99
	3-3	-836	nd	nd
	3-4	-693	nd	nd
	4-1	-250	nd	27,71
	4-4	-643	nd	22,66
	5-X	50	nd	28,67
pin λ	X-X	336	22,57	31,45
	X-X	-564	30,46	25,98

tableau 2 : valeurs de DRLM, taux de cellulose et taux de lignines chez le pin maritime (nd : dosage non effectué)

^a 1^{er} chiffre : niveau de prélèvement sur l'arbre, 2^{ème} chiffre : point cardinal de l'arbre (voir fig. 6). X : niveau ou point cardinal non déterminé

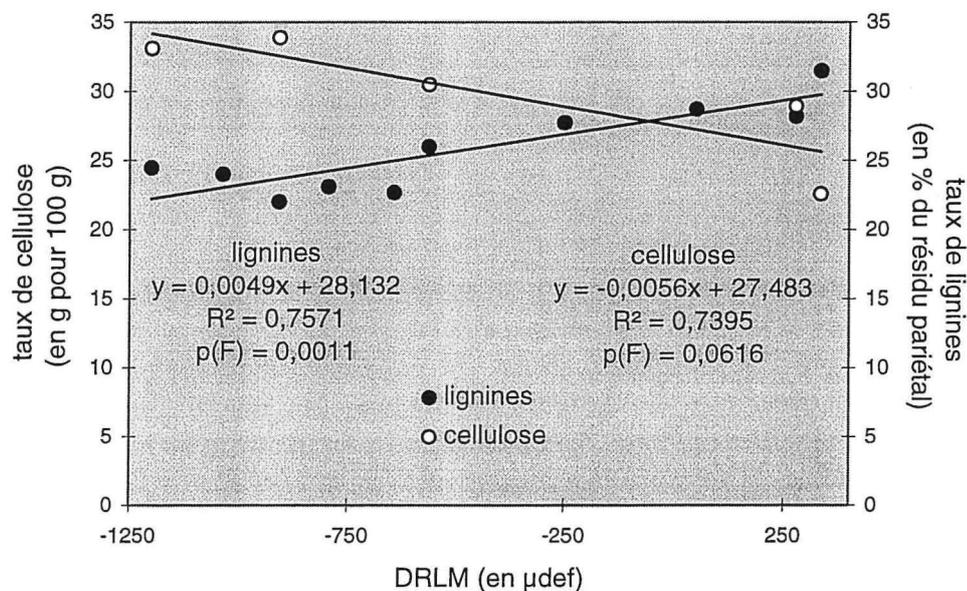


fig. 9 : relation entre la DRLM, le taux de cellulose et le taux de lignines chez le pin maritime. p(F) : probabilité du test F. R² : coefficient de détermination

valeurs positives de la DRLM ont été utilisés le même jour pour la réalisation des gels et la numérisation.

Parmi les protéines ne variant pas avec la DRLM (voir la partie inférieure du tableau de l'annexe 1), 12 ont été microséquencées. Sur ces 12 protéines, 11 ont été identifiées par homologies de séquence avec les banques de données (en rouge) dont 2 protéines également identifiées chez les aiguilles (en bleu). La protéine microséquencée restante n'a pu être identifiée. Enfin, 8 protéines ont été identifiées de façon indirecte à partir des protéines d'aiguilles connues (en vert). Certaines protéines ne variant pas avec la DRLM présentent un effet attribué à la date de réalisation et de numérisation des gels.

3-4-2 Eucalyptus gunnii

Sur les 140 protéines de protoxylème d'eucalyptus analysées (photo 4), 12 protéines varient de façon significative au seuil de 5 % avec la DRLM, soit environ 8,6 % (partie supérieure du tableau de l'annexe 2). Parmi ces protéines, 7 (58 %) varient de façon positive avec la DRLM et 5 (42 %) varient de façon négative avec la DRLM. Le coefficient de détermination des protéines variant avec la DRLM est compris entre 0,47 et 0,66. La plupart des protéines de protoxylème d'*Eucalyptus gunnii* (128 protéines soit 91,4 %) ne montre aucune variation vis-à-vis de la DRLM (partie inférieure du tableau de l'annexe 2).

3-5 ETUDES DES VARIATIONS SIMULTANÉES DES QUANTITÉS DES 137 PROTÉINES, DU TAUX DE LIGNINES ET DE LA DRLM CHEZ LE PIN MARITIME

Afin de pouvoir analyser conjointement les 137 protéines et les 2 caractères quantitatifs mesurant la nature du bois, deux analyses complémentaires ont été réalisées. Un dendrogramme ainsi qu'une représentation graphique de la matrice de corrélation (figures 11 et 12 respectivement) ont ainsi permis de regrouper les variables présentant un profil d'expression similaire. La représentation graphique de la matrice est symétrique de part et d'autre de la bissectrice. Un dégradé de couleur dans le rouge et le vert permet une analyse visuelle : plus la corrélation positive est forte, plus on se déplace vers le rouge foncé. Au contraire, plus la corrélation négative est élevée, plus on se déplace vers le vert foncé. Cependant, étant donné l'effectif analysé, seules les valeurs de corrélations supérieures en valeur absolue à 0,388 sont significatives, c'est-à-dire les couleurs rouge foncé ou vert foncé.

Les variables étant dans le même ordre, il est facile de comparer le dendrogramme et la figure 12. Sept groupes se distinguent dans le dendrogramme ainsi que dans la figure 12 où ces groupes se situent sur la bissectrice et se distinguent par une couleur rouge foncée. Les profils de variations des variables intra-groupe sont semblables : ils varient dans le même sens et dans des proportions similaires. Par ailleurs, les variables d'un groupe se comportent de façon semblable par rapport aux variables extra-groupe. A titre d'exemple, la DRLM, le taux de lignines et la quantité de l'ACC oxydase forment un groupe isolé (groupe n°4). Suivant la définition de groupe qui vient d'être énoncée, cela signifie que ces 3 variables varient dans le même sens, et dans des proportions très similaires. De plus, ces 3 variables se comportent globalement de la même façon face à toutes les autres variables.

Proches du groupe 4, les groupes 5, 6 et 7 rassemblent les autres protéines variant positivement avec la DRLM (figure 12). Ces protéines ne sont pas localisées dans le groupe 4 (figure 11), car elles ne

bloc de bois ^a	DRLM (en µdef)	taux de cellulose (en g pour 100g)	taux de lignines (en % du résidu pariétal)
1-1	-1164	29,64	17,88
1-2	-1150	nd	nd
1-3	-1679	28,57	14,00
1-4	<u>236</u>	nd	nd
2-1	-2007	31,78	9,20
2-2	-693	31,65	18,52
2-3	-1214	nd	nd
2-4	<u>407</u>	30,59	18,42
3-1	-1800	nd	nd
3-2	-1136	nd	nd
3-3	<u>171</u>	nd	15,68
3-4	-79	nd	24,08
ES	-1379	nd	14,08

tableau 3 : valeurs de DRLM, taux de cellulose et taux de lignines chez *Eucalyptus gunnii* (nd : dosage non effectué. Souligné : artefact de mesure)
^a 1^{er} chiffre : niveau de prélèvement sur l'arbre, 2^{ème} chiffre : point cardinal de l'arbre (voir fig. 6). ES : prélèvement supplémentaire

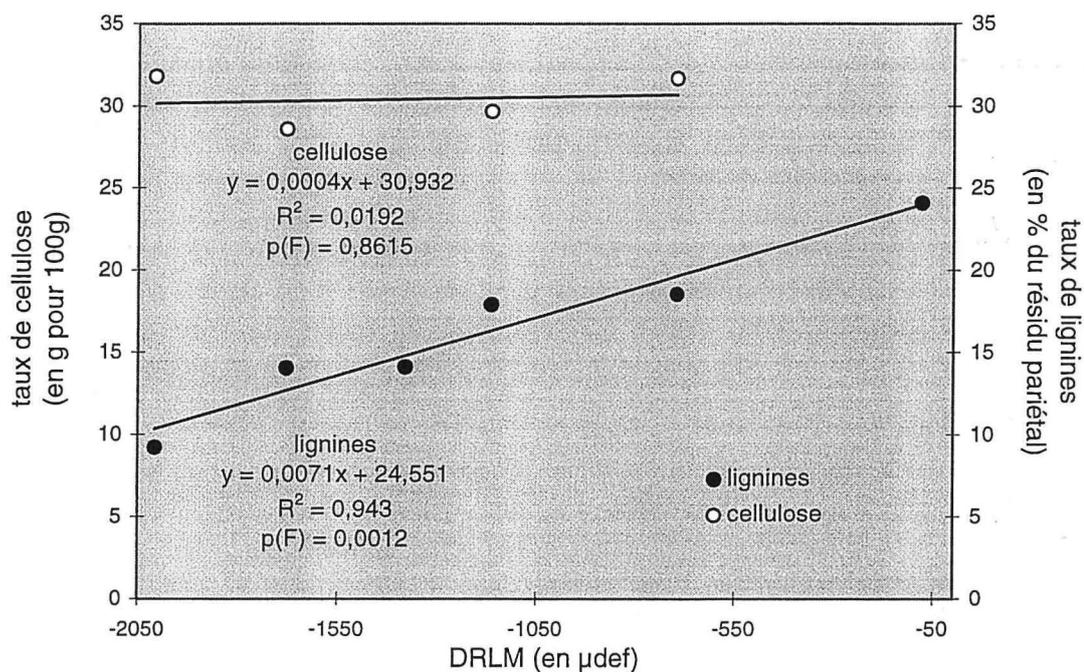


fig. 10 : relation entre la DRLM, le taux de cellulose et le taux de lignines chez *Eucalyptus gunnii*. p(F) : probabilité du test F. R² : coefficient de détermination

varient pas dans les mêmes proportions que la DRLM. Par ailleurs, la figure 12 montre que les groupes 4, 5, 6 et 7 peuvent être rassemblés en un seul groupe. Ainsi, toutes les variables de ce grand groupe varient entre elles dans le même sens, mais dans des proportions plus ou moins différentes. Il faut noter que l'on y retrouve un grand nombre de protéines n'ayant pas été reliées à la DRLM. Il faudra des expériences complémentaires pour voir si ces protéines présentent une liaison avec la DRLM... Parmi ces protéines on note par exemple la présence de 3 glutamine synthases (GS), proches de la GS variant avec la DRLM !

Les 4 protéines dont la quantité diminue avec la DRLM se situent dans un groupe marginal (groupe n°1), à gauche de l'arbre et très éloigné de la DRLM. Ceci n'est pas surprenant, car nous avons déjà montré qu'elles variaient en sens inverse de la DRLM (corrélation négative). Ces 4 protéines (une HSP de faible poids moléculaire et 3 protéines non identifiées) ont entre elles un profil d'expression très similaire et varient dans des proportions presque identiques.

Enfin, la figure 12 montre que les groupes "1, 2, 3, 4+5+6+7" sont globalement corrélés de façon négative. Ceci signifie qu'en dehors des groupes, la couleur verte prédomine.

4- DISCUSSION

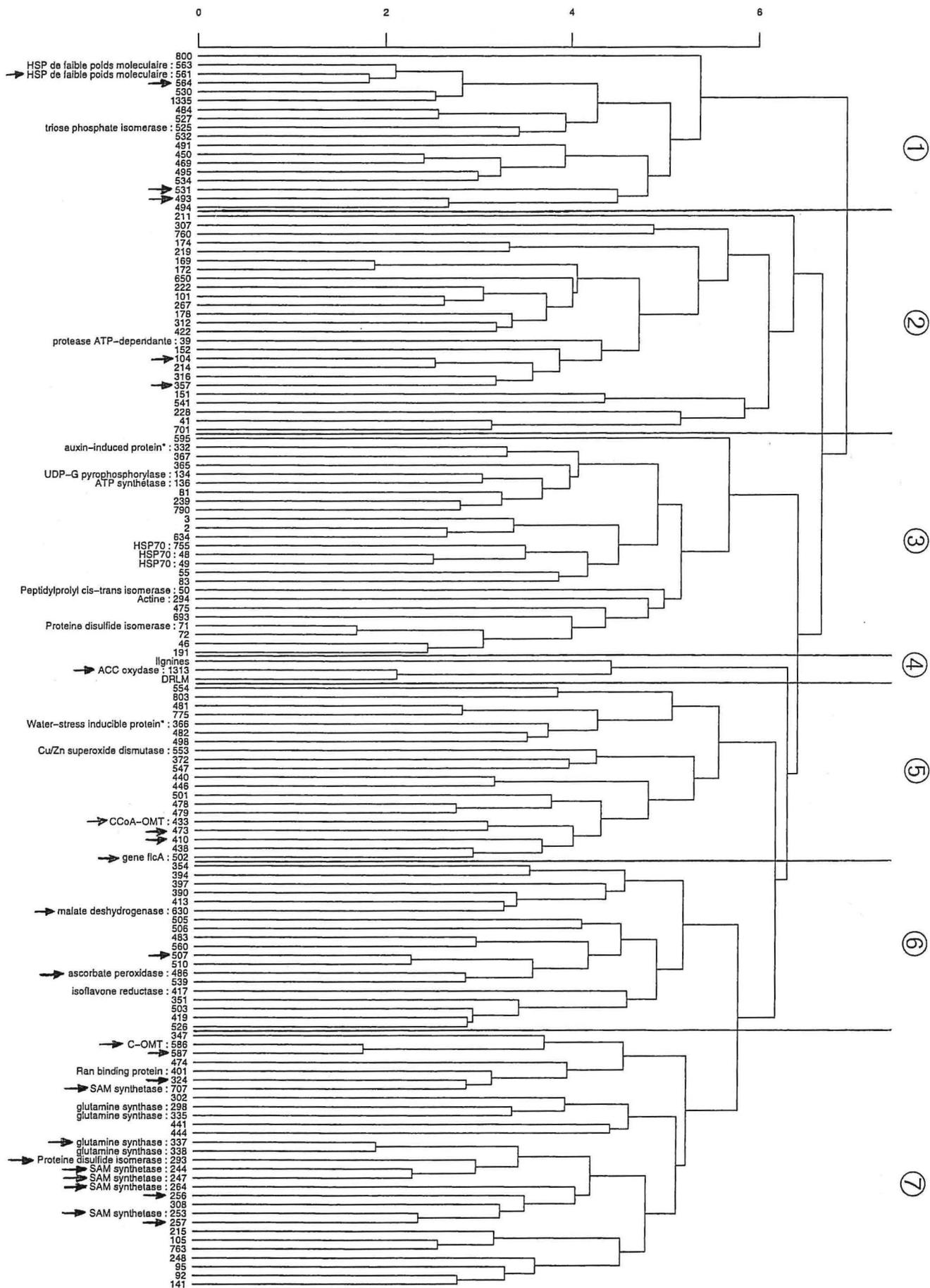
4-1 RELATION ENTRE DRLM ET CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU BOIS

Dans un premier temps, nous avons comparé les valeurs de DRLM aux données chimiques du bois. Nous avons observé chez le pin maritime que plus la DRLM augmentait, c'est-à-dire plus on allait vers un bois de compression, plus le taux de lignines augmentait. Ce résultat a déjà été décrit dans la littérature pour d'autres conifères (TIMELL, 1986), dont le pin maritime (COMBES *et al*, 1996). Dans notre étude, la probabilité du test F associé au modèle linéaire taux de cellulose en fonction de la DRLM est proche de 5 %. La tendance d'une diminution du taux de cellulose lorsque la DRLM augmente est admise chez d'autres conifères (SUGIYAMA *et al*, 1993). Il est donc fort probable que le pin maritime ait un comportement similaire, mais le faible nombre d'échantillons étudiés permet de mettre en évidence une relation significative qu'au seuil de 6,2 %.

Chez l'*Eucalyptus gunnii*, le taux de lignines décroît proportionnellement à la DRLM, c'est-à-dire que plus le bois devient tendu, moins il y a de lignines. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus sur d'autres espèces d'*Eucalyptus* (BAILLERES, 1994). A cause du faible nombre de mesures, nous n'avons pas retrouvé la relation DRLM-cellulose, à savoir que la cellulose augmente lorsque la DRLM diminue chez les angiospermes (OKUYAMA *et al*, 1992 ; SUGIYAMA *et al*, 1993).

La DRLM a été reliée à d'autres caractéristiques du bois de réaction, comme par exemple l'angle des microfibrilles de celluloses ou la composition monomérique des lignines (BAILLERES *et al*, 1995 ; COMBES *et al*, 1996). Les mesures de DRLM, reliées aux analyses chimiques, nous ont donc permis ici de déterminer sans équivoque et de façon quantitative le type de bois présent au niveau de chaque prélèvement, sur chacune des deux espèces. D'autres mesures (dosage des monomères H, G et S par thioacidolyse) sont en cours et compléteront ces observations.

Fig. 11 : dendrogramme des distances entre les 137 protéines de protoxylème, le taux de lignines et la DRLM chez le pin maritime
 (→ : protéines dont la quantité varie avec la DRLM)



4-2 RELATION DRLM ET QUANTITE DE PROTEINES PROTOXYLEMIENNES

Nous avons comparé dans un second temps le type de bois, déterminé par la variation quantitative de la DRLM, aux quantités des protéines du protoxylème, le tissu à l'origine du bois. Nous avons ainsi détecté des protéines dont la quantité augmentait ou au contraire diminuait au fur et à mesure que l'on passait d'un bois normal à un bois de réaction.

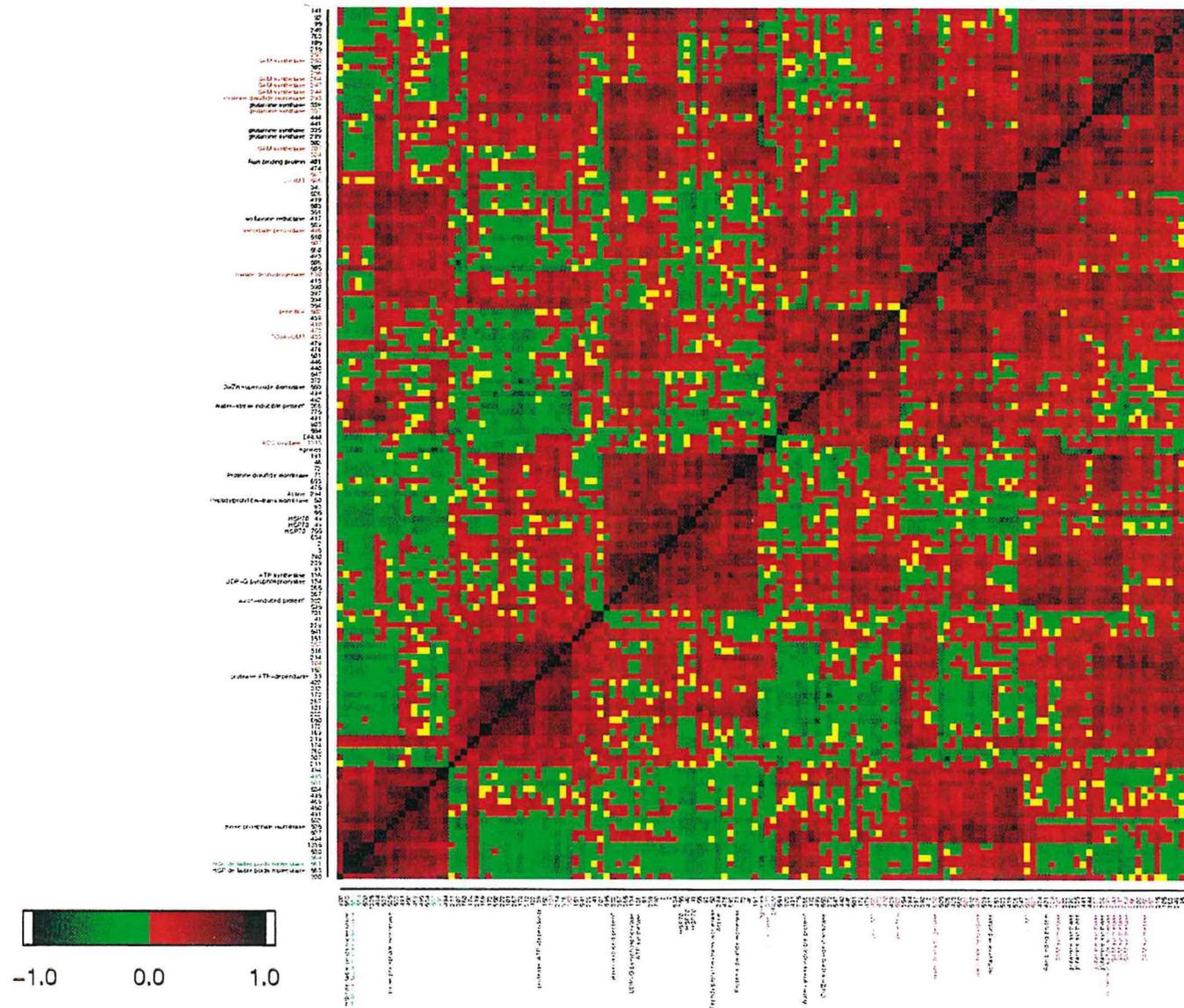
4-2-1 Pin maritime

Chez le pin maritime, certaines protéines réagissant à la DRLM ont pu être identifiées. Parmi les protéines dont la quantité augmente avec la DRLM, une protéine se détache nettement des autres par le fait qu'elle n'est détectable que pour des DRLM positives (bois de compression) : il s'agit de l'ACC oxydase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'éthylène à partir de l'ACC (figure 13). SAVIDGE *et al* (1983) ont montré que l'ACC s'accumulait seulement sur la face inférieure des branches de *Pinus contorta*, face où l'on trouve du bois de compression. LEOPOLD *et al* (1972) ont observé une augmentation significative du taux d'éthylène dans des branches de *Pinus strobus* artificiellement inclinées. On suppose depuis longtemps l'action de l'éthylène sur le gravitropisme des plantes (KAUFMAN *et al*, 1995) et sur la formation du bois de compression (TIMELL, 1986) dont le rôle est précisément de réorienter les axes inclinés. La formation du bois de compression a longtemps été associée à une accumulation d'auxines, mais cette hypothèse est fortement remise en cause. WILSON *et al* (1989) ont montré une différence significative de la concentration en acide 3-indole acétique (AIA) entre la face supérieure et la face inférieure de branches de *Pseudotsuga menziesii* artificiellement inclinées vers le bas, avec une teneur en AIA plus forte sur la face supérieure. Or le bois de compression n'est formé que sur la face inférieure de ces branches. Par ailleurs, sur des pousses âgées d'un an de *Pinus sylvestris*, SUNDBERG *et al* (1994) ont montré que l'application d'inhibiteurs du transport polarisé de l'AIA entraînait une baisse de la concentration en AIA non seulement en dessous du lieu d'application des inhibiteurs, mais aussi au-dessus où il ont observé en plus la formation de bois de compression. Cependant, ces auteurs pensent qu'une accumulation d'AIA très localisée, par exemple dans des cellules de la zone cambiale où il serait synthétisé (LITTLE et WAREING, 1981) mais non exporté (à cause des inhibiteurs), pourrait induire la formation de bois de compression. Cette hypothèse permet d'expliquer que l'application d'AIA exogène induit la formation de bois de compression (TIMELL, 1986). L'AIA exogène, en saturant les transporteurs de l'AIA des cellules cambiales, favoriserait l'accumulation d'auxines dans ces cellules, et donc la production de bois de compression.

Chez le pin maritime étudié ici, le spot protéique correspondant à l'ACC oxydase n'est détecté que dans le protoxylème associé au bois de compression. Ce résultat confirme une nouvelle fois l'implication de l'éthylène dans le gravitropisme et dans la formation du bois de compression. De plus, ce résultat suggère que la synthèse d'éthylène s'effectue dans le protoxylème associé au bois de compression mais pas dans celui associé au bois normal. Cependant, l'éthylène n'est certainement pas la seule phytohormone à intervenir dans la formation du bois de compression et une interaction entre l'éthylène et d'autres phytohormones, en particulier les auxines, est probablement à l'origine du bois de compression.

Parmi toutes les protéines identifiées, 5 se sont avérées être des SAM synthétases, et toutes voyaient leur quantité augmenter avec la DRLM. La SAM synthétase catalyse la formation du SAM, un coenzyme qui cède son groupement méthyle dans de nombreuses réactions métaboliques. A partir d'une banque d'ADNc réalisée à partir des ARNm du xylème en différenciation de *Pinus taeda*, ALLONA *et al* (1998) ont obtenu un nombre important de séquences EST correspondant à des méthionine synthases et à des glycine hydroxyméthyltransférases,

Figure 12 : Représentation graphique de la matrice de corrélations



Ecrites en rouge : protéines dont la quantité augmente avec la DRLM

Ecrites en vert : protéines dont la quantité diminue avec la DRLM

suggérant l'importance des réactions de méthylations dans le xylème en différenciation. Tout comme ces auteurs, l'abondance des SAM synthétases dans le protoxylème associé au bois de compression traduit certainement une demande cellulaire importante en coenzymes SAM pour des réactions de méthylation, en particulier les réactions de méthylation intervenant dans la voie de biosynthèse des lignines. En effet, de telles méthylations sont assurées par la C-OMT et la CCoA-OMT, deux protéines dont on a vu qu'elles étaient reliées à la DRLM. Chez *Arabidopsis thaliana*, PELEMAN *et al* (1989) ont montré qu'une SAM synthétase spécifique des tiges et des racines était préférentiellement exprimée dans les tissus vasculaires. Ces auteurs suggèrent également le rôle de cette SAM synthétase dans la biosynthèse des lignines. Nous avons montré que 3 des 5 SAM synthétases identifiées dans cette étude sont spécifiques du xylème (tableau 1). Ces résultats laissent supposer que ces 3 SAM synthétases sont probablement impliquées dans la biosynthèse des lignines.

Le coenzyme SAM est également un précurseur de l'éthylène : il est converti en ACC grâce à l'ACC synthase. L'ACC est ensuite transformé en éthylène grâce à l'ACC oxydase (figure 13). L'augmentation des SAM synthétases peut donc être aussi reliée à une production d'éthylène dans le protoxylème associé au bois de compression.

L'augmentation de la quantité des deux enzymes de la voie de biosynthèse des lignines, la C-OMT et la CCoA-OMT, dans le protoxylème associé au bois de compression peut être directement reliée à la lignification plus importante de ce type de bois. ZHANG *et al* (1997) ont montré chez *Pinus taeda* que l'activité *in vitro* de la C-OMT et de la 4-coumarate CoA ligase (4CL), une autre enzyme de la voie de biosynthèse des lignines, était plus élevée dans le xylème de bois de compression que dans le xylème de bois normal. Ces auteurs ont également observé un plus grand nombre d'ARNm pour C-OMT dans le xylème de bois de compression. Ce résultat est ici confirmé au niveau protéique.

La 4CL est une enzyme qui agit sur 3 substrats différents, le coumarate, le caféate et le ferulate, chez les gymnospermes pour donner respectivement le coumaroyl CoA, le caféoyl CoA et le féruloyl CoA (figure 14). ZHANG *et al* (1997) ont étudié *in vitro* la spécificité de la 4CL envers ses 3 substrats dans le xylème de bois normal et le xylème de bois de compression de *Pinus taeda*. Ils ont montré que la spécificité *in vitro* de l'enzyme envers ses 3 substrats était altérée dans le xylème de bois de compression, la 4CL utilisant plus de coumarate mais moins de caféate que dans le xylème de bois normal. Ils suggèrent qu'un tel mécanisme est responsable de l'augmentation du taux d'unités H dans le bois de compression, les unités H dérivant du coumarate. La 4CL dans le xylème en compression incorpore *in vitro* moins de caféate et produit donc *in vitro* moins de caféoyl CoA. On pourrait s'attendre alors à une baisse de l'activité et/ou de la quantité de la CCoA-OMT, le caféoyl CoA étant le substrat de la CCoA-OMT (figure 14). Or nous avons montré que la quantité de cette enzyme augmentait dans le protoxylème du bois de compression du pin maritime. Cependant, le caféoyl CoA est peut-être fourni par la coumaroyl CoA 3-hydroxylase (CCoA-3H) à partir du coumaroyl CoA. L'activité de cette enzyme a été démontrée dans des cultures de cellules de persil, après addition d'un éliciteur fongique (KNEUSEL *et al*, 1989) mais elle n'a pas été décrite chez les arbres. La CCoA-OMT et la CCoA-3H font partie d'une voie d'hydroxylation et de méthylation agissant sur les acides activés par le CoA (coumaroyl CoA, caféoyl CoA, 5-hydroxyferuloyl CoA et sinapoyl CoA), située en aval et parallèle à la voie d'hydroxylation et de méthylation considérée comme classique, agissant sur les acides non activés (coumarate, caféate, ferulate, 5-hydroxyferulate et sinapate). Ces deux enzymes sont activées à la suite de stress dus à l'attaque de pathogènes (KNEUSEL *et al*, 1989 ; KUHNL *et al*, 1989 ; PAKUSH *et al*, 1989). Nous montrons ici le rôle de la CCoA-OMT dans la formation du bois de compression, bois particulier induit en réponse à un stress gravitationnel.

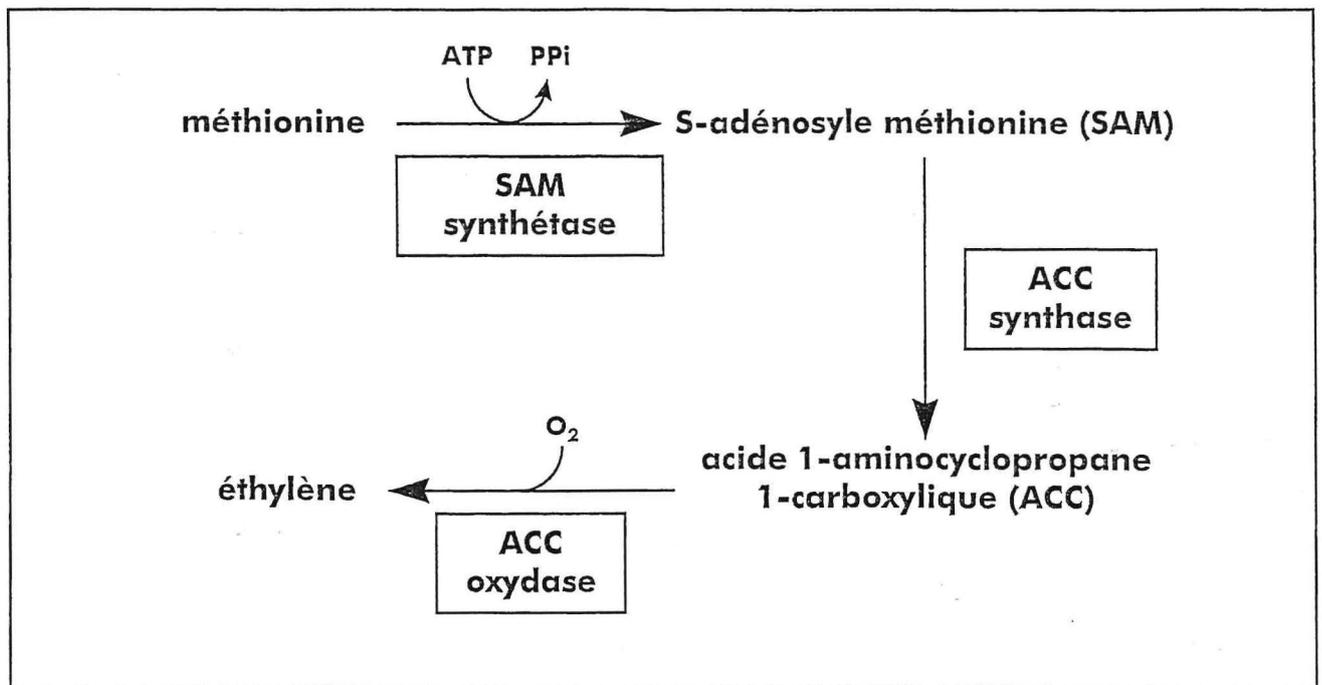


Fig. 13 : la chaîne de biosynthèse de l'éthylène

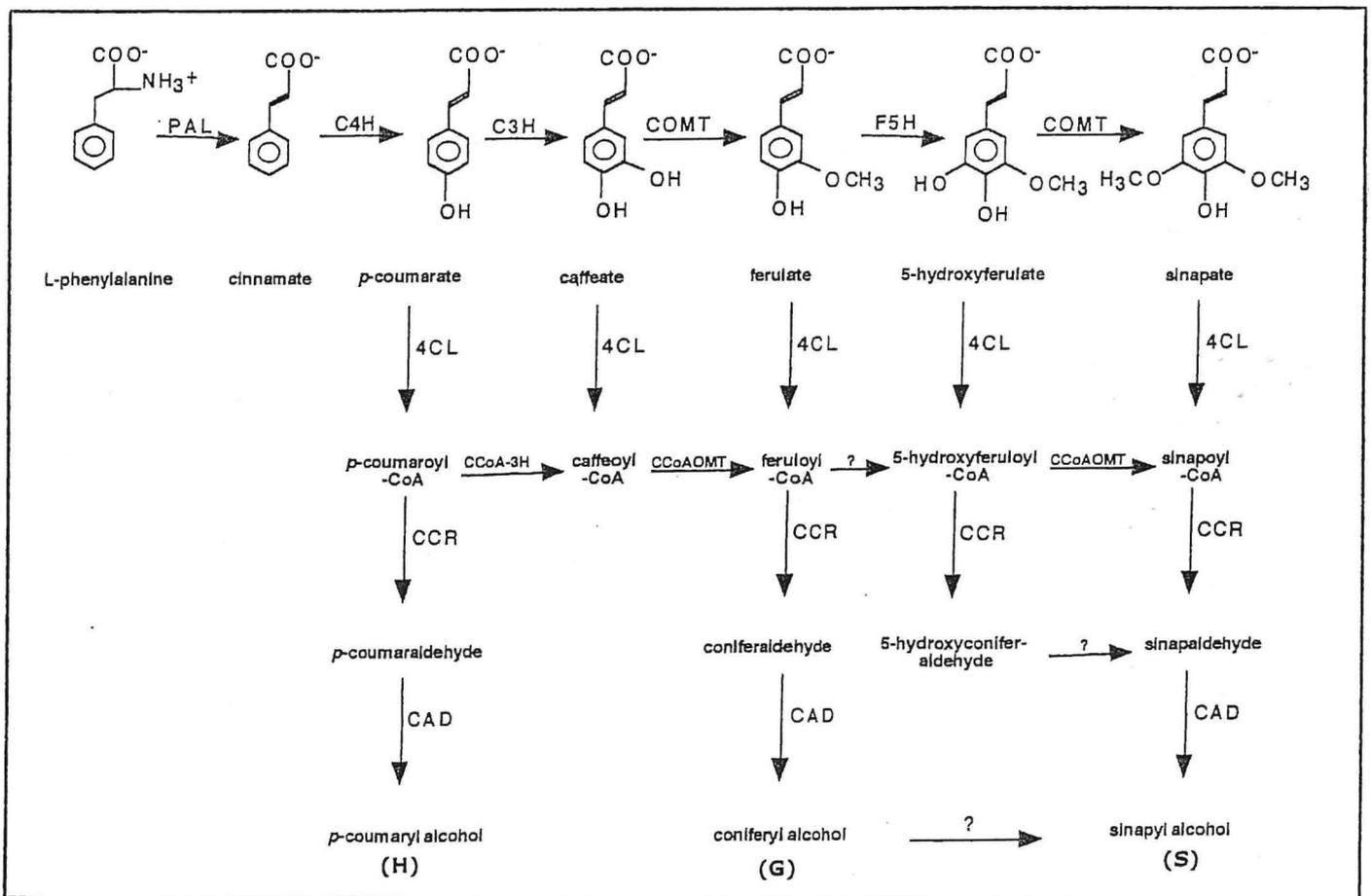


fig. 14 : la chaîne de biosynthèse des lignines. PAL : phénylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamate-4-hydroxylase, C3H : coumarate-3-hydroxylase, COMT : acide caféique O-méthyltransférase, F5H : ferulate-5-hydroxylase, 4CL : 4-coumarate CoA ligase, CCoA-3H : coumaroyl CoA 3-hydroxylase, CCoAOMT : caféoyl CoA O-méthyltransférase, CCR : cinnamoyl-CoA réductase, CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase (d'après BOUDET *et al*, 1996)

En conclusion, tous ces résultats suggèrent une augmentation de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des lignines dans le bois de compression, assurant ainsi une synthèse plus grande de lignines mais préférentielle envers les unités H.

Pour les autres protéines reliées à la DRLM, l'interprétation physiologique est plus difficile. Les HSP étant des protéines induites en général lors de stress, nous observons ici que la quantité d'une HSP de faible poids moléculaire diminue lorsque la DRLM augmente. Ceci semble en contradiction avec la règle générale si on considère que le bois de compression est le résultat d'un stress gravitationnel. L'augmentation de la malate déshydrogénase et de la glutamine synthase dans le protoxylème associé au bois de compression peut être interprétée par une augmentation générale du métabolisme primaire cellulaire, d'autant plus qu'on observe dans le bois de compression une croissance plus importante. Enfin, il est délicat de proposer une interprétation sur l'augmentation de la quantité de l'ascorbate peroxidase, de la protéine disulfide isomérase et du facteur de transcription bactérien dans le protoxylème associé au bois de compression.

4-2-2 *Eucalyptus gunnii*

Aucune protéine de protoxylème d'*Eucalyptus gunnii* n'a été caractérisée, si bien qu'aucune protéine reliée ou non à la DRLM n'a été identifiée. On peut cependant comparer la proportion de protéines qui augmentent avec le bois de réaction par rapport aux protéines variant avec la DRLM entre les deux espèces, dans le lot de protéines analysées ici. Chez le pin maritime, 85 % des protéines associées à la DRLM augmentent lorsque la DRLM augmente (bois de compression). Chez l'*Eucalyptus gunnii*, 42 % des protéines associées à la DRLM diminuent lorsque la DRLM augmente, ce qui revient à dire que 42 % des protéines augmentent lorsque la DRLM diminue (bois de tension). Cette différence a-t-elle une signification biologique ? Peut-elle expliquer les différences observées entre le bois de tension et le bois de compression, comme par exemple la moindre quantité de lignines dans le bois de tension par rapport au bois de compression ?

4-3 STIMULATION DE LA PRODUCTION DE BOIS DE COMPRESSION CHEZ LE PIN MARITIME

Dans notre étude, le protoxylème associé au bois de compression a été récupéré sur un arbre adulte tordu dont on supposait qu'il formait du bois de réaction. Cependant, nous avons pu remarquer que ce n'était pas dans les zones les plus flexueuses que les DRLM étaient les plus positives. En fait, au moment des prélèvements, l'arbre adulte a pu très bien atteindre une position d'équilibre et ne plus former de bois de réaction dans les parties courbées du tronc. Il nous est donc apparu essentiel de mener des expériences complémentaires afin d'obtenir facilement et en grande quantité du bois de compression et ainsi de s'affranchir de prélèvements hasardeux. Nous avons expérimenté deux situations provoquant l'apparition de bois de réaction et inspecté visuellement sa présence (couleur brun-rouge du tronc dans la partie en compression).

4-3-1 Expérience 1 : flexion d'arbres adultes à l'aide de câbles (figure 15)

Les arbres ont été fléchis le 11 mai 1998 à l'aide de câbles en acier. L'intensité de la flexion était de 350 μ def (mesurée à 1m30). Le matériel génétique était constitué de 4 clones d'origine corse âgés de 12 ans. Les observations ont été réalisées au-dessus et en dessous du point de fixation du câble, sur les parties inférieures et supérieures du fût, et ont été étalées dans le temps (48 heures,

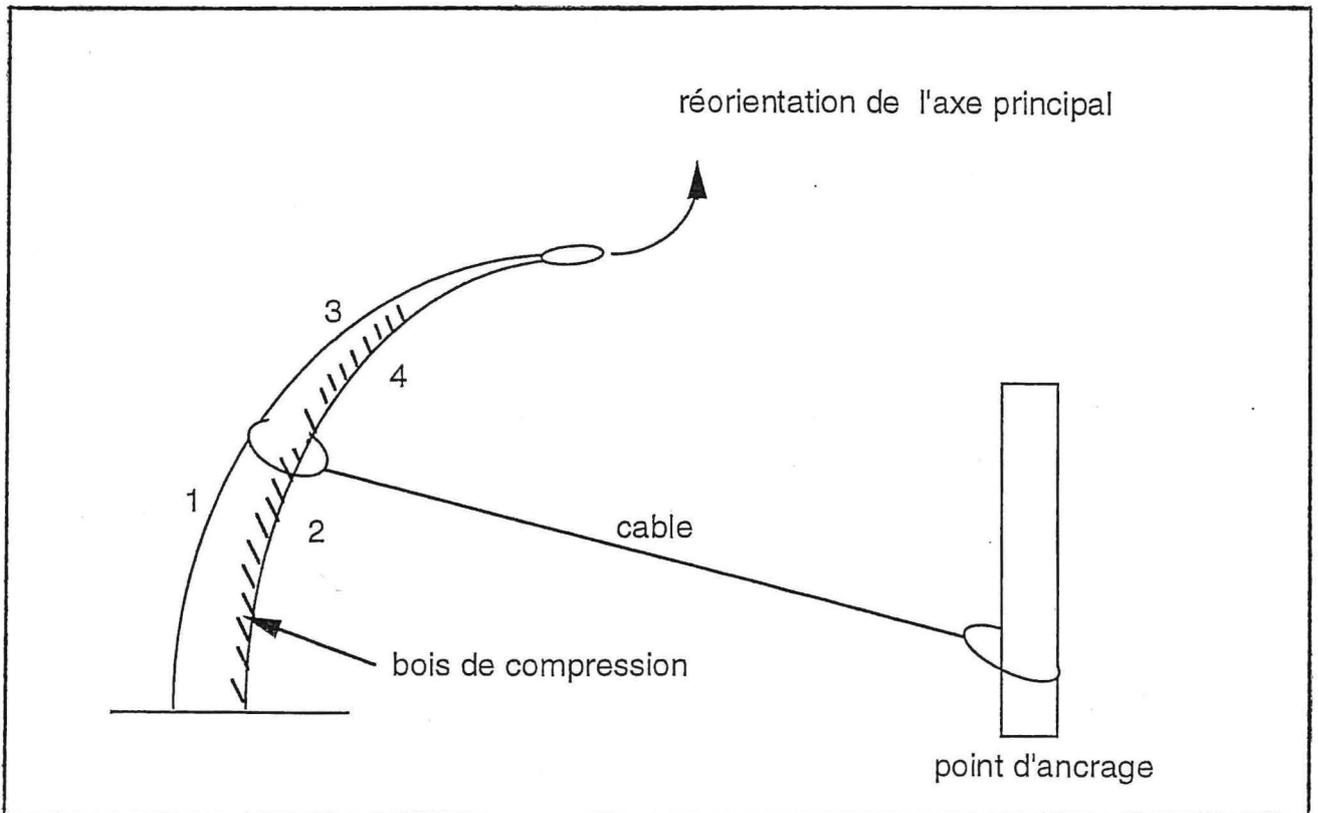


fig. 15 : flexion d'arbres adultes à l'aide de cables

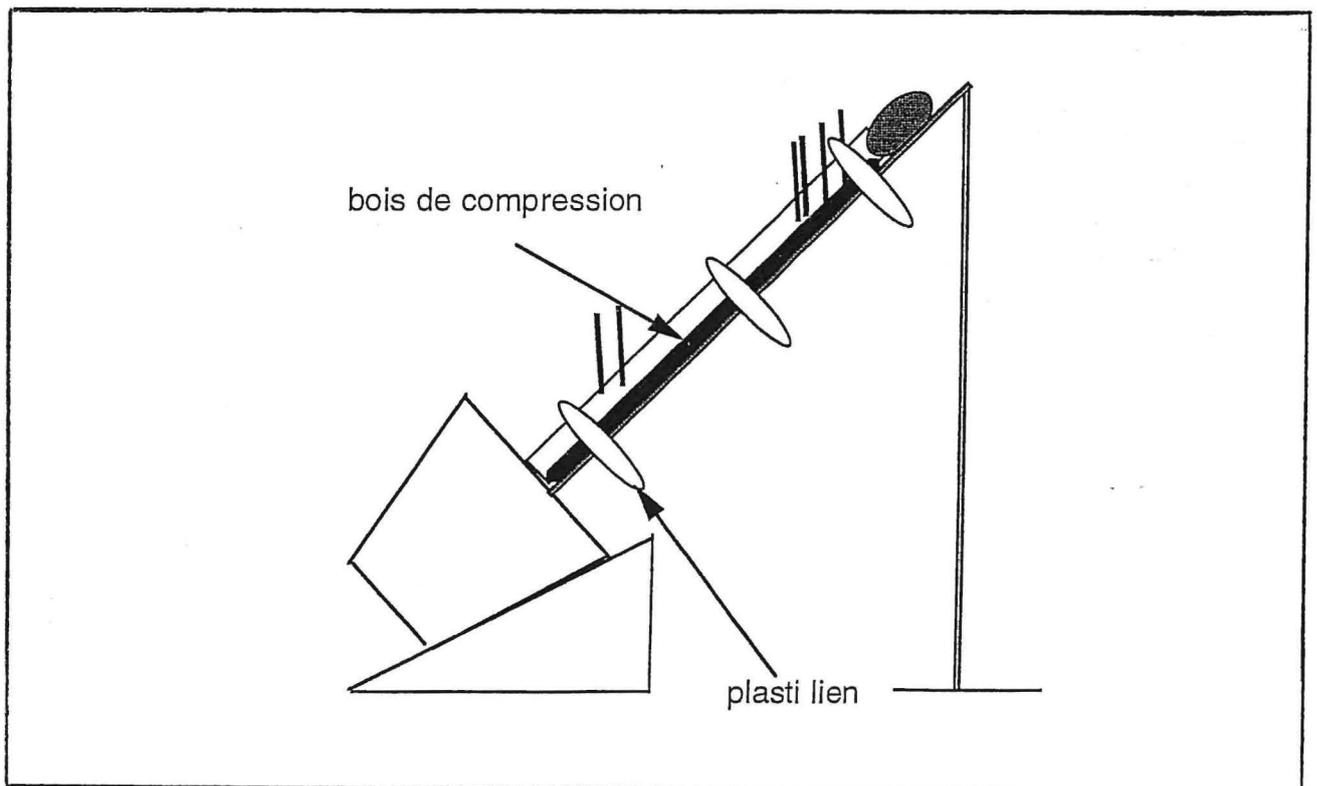


fig 16 : accrochage d'arbres jeunes sur un tuteur incliné

1 semaine, 1 mois et 2 mois après la torsion). Nous avons également profité de ces observations pour récolter 4 échantillons de protoxylème à chacune de ces dates.

Comme on pouvait s'y attendre, le bois de compression était visible sur la face inférieure du tronc (niveaux 2 et 4), et ce, à partir de la troisième observation (au bout d'un mois). Un écorçage complet de l'arbre à la quatrième observation a confirmé ce résultat et a mis en évidence une couleur brun-rouge sur toute la face inférieure, comme si il y avait eu une "coulée" de bois de réaction.

4-3-2 Expérience 2 : accrochage d'arbres jeunes sur un tuteur incliné (figure 16)

Il s'agissait ici d'induire la formation de bois de compression chez des jeunes plants âgés de 3 ans et d'essayer d'apporter des éléments de réponse quant au lieu de la synthèse du ou des composés biochimiques (vraisemblablement des phytohormones : éthylène et/ou auxines que nous appellerons facteur X par la suite) déclenchant la formation du bois de compression. Nous avons pour cela adopté le protocole décrit par FOURNIER *et al* (1994a) avec de légères modifications :

- croissance en lumière continue afin d'obtenir une croissance en diamètre importante,
- et fixation des axes principaux sur un tuteur incliné à 45°.

La présence de bois de compression (notée P dans le tableau 4) c'est faite par inspection visuelle sur les deux faces du tronc, après écorçage sur toute sa longueur. Les observations ont été étalées sur 2 mois. Quatre groupes de plants ont été constitués :

- le groupe 1 était constitué de plants entiers sur lesquels le bois de compression était visible sur la face inférieure du tronc au bout d'un mois de stress gravitationnel. Les témoins droits n'ont pas formé de bois de réaction (noté par un A dans le tableau 4).
- les groupes 2 et 3 avaient pour but de voir si la présence de bourgeons (lieux de synthèse des auxines) était nécessaire à la formation du bois de réaction. Pour cela les bourgeons ont été supprimés. Les résultats montrent là aussi l'apparition de bois de compression au bout d'un mois. Il semble que le signal initial dû à une modification de la gravité ne soit pas perçu par ces structures. Ce sont néanmoins les premières à réagir en se réorientant vers le haut sur un plant entier lié au tuteur. Les cellules cambiales sont peut-être de bons candidats pour leur sensibilité à la gravité. Par ailleurs, il semblerait que les cellules cambiales soient capables de synthétiser des auxines (LITTLE et WAREING, 1981). Cependant, on ne peut pas tout à fait exclure une synthèse du facteur X au niveau des bourgeons et une redistribution dans la plante. Ainsi, un résidu de facteur X dans la plante pourrait alors entraîner la formation de bois de réaction même en l'absence de bourgeons.
- le groupe 4 visait à tester cette dernière hypothèse en essayant d'épuiser ou de purger le facteur X résiduel en ne tuteurant les plants "ébourgeonnés" qu'au bout d'une semaine. Mais là encore le bois de compression est observé à la face inférieure du tronc au bout d'un mois de stress.

Ces résultats confirment que la formation du bois de réaction est due à un stress gravitationnel et non à un stress mécanique. Ils tendent aussi à écarter les bourgeons comme lieu de perception du signal causé par une modification de la gravité et il est vraisemblable que les cellules cambiales soient réceptives à ce signal.

Tableau 4 : observation du bois de compression sur les différents groupes à différents temps

GROUPE	TRAITEMENT	PRELEVEMENT		
		24h	1 mois	2 mois
1. plants entiers	• témoin droit	A	A	A
	• arbre tuteuré	A	P	P
2. plants sans branches latérales	• arbre tuteuré	A	P	P
3. plants sans branches latérales et sans bourgeon apical	• arbre tuteuré	A	P	P
4. idem groupe 3 mais tuteurés après une semaine	• arbre tuteuré	A	P	non inspecté

4-4 PLACE DE L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE (EBD) DANS LES ETUDES D'EXPRESSION

De nombreuses techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence une expression différentielle des gènes ou des protéines. Au niveau des transcrits de l'ADN, les ARNm différentiellement exprimés peuvent être identifiés par criblage différentiel (hybridation soustractive) de banques d'ADNc (ex : ALLONA *et al*, 1998), par tri d'ARNm ("differential display", ex : LIANG *et al*, 1997), par séquençage systématique d'EST (Expressed Sequences Tagged), par l'application de la technique AFLP sur ARNm (BACHEM *et al*, 1996) et plus récemment par la technique des puces à ADN ou CHIPS (FODOR, 1997). Cette dernière technique permet d'étudier simultanément l'expression de centaines voire de milliers de transcrits. Ces techniques donnent une idée du niveau d'expression des ARNm. Or une fois synthétisés, les ARNm subissent des phénomènes de régulation dits post-transcriptionnels et il n'y a pas forcément de corrélation entre l'abondance de tel ou tel ARNm et la protéine correspondante (outil utilisé *in fine* par la cellule). Cette observation va en faveur d'études d'expression au niveau des protéines. La combinaison de la technique de séparation des protéines en deux dimensions, de techniques d'analyses d'images sophistiquées et de quantifications des taches protéiques, ainsi que la possibilité de caractériser les protéines par microséquençage ou spectrométrie de masse (HUMPHERY-SMITH *et al*, 1997) permet aujourd'hui une étude détaillée du protéome (PROTEIN complement of a genome, WILKINS *et al*, 1997).

Par rapport aux autres techniques d'étude d'expression des gènes basées sur l'ARN, l'EBD est relativement plus facile à mettre en oeuvre, donne une quantification précise des spots protéiques et permet l'observation simultanée de l'expression de divers gènes. L'analyse de groupes appliquée ici est une bonne illustration des capacités de l'EBD pour comparer les variations d'expression d'un grand nombre de gènes lors de l'application d'un stress. En regroupant les différents spots protéiques par leur profil de variation et avec l'information apportée par la caractérisation des protéines, nous espérons mieux comprendre l'expression différentielle de gènes lors de la réponse moléculaire de la plante face au stress étudié.

Les progrès récents dans l'EBD ont introduit l'IPG (Immobilized pH Gradient) pour remplacer l'IEF en première dimension. Cette nouvelle technique permet de stabiliser le gradient de pH lors de l'électrophorèse (absence de dérive cathodique) et de charger d'importantes quantités de protéines (DAMERVAL *et al*, 1993). Nul doute qu'une des prochaines étapes du développement de l'EBD au laboratoire de Pierroton sera de passer à ce nouveau procédé caractérisé par sa haute répétabilité. Néanmoins, LOPEZ *et al* (1997) avaient montré que l'IEF pouvait être aussi répétable que l'IPG, chacune des techniques ayant ses propres avantages et inconvénients.

5- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce stage de DEA s'est focalisé sur la recherche de protéines différentiellement exprimées entre le protoxylème associé au bois normal et le protoxylème associé au bois de réaction. L'idée de départ était de se dire que comme ces 2 types de bois ont des propriétés physiques et chimiques différentes, il est vraisemblable que ces différences résultent d'une expression différentielle des gènes et/ou des protéines du protoxylème, cette différence d'expression étant provoquée par un stress gravitationnel. Nous avons pu vérifier cette hypothèse et nous avons caractérisé quelques protéines répondant au stress. Des enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'éthylène ont notamment été identifiés (SAM synthétase, ACC-oxydase). Il faudra dans l'avenir valider l'expression différentielle de ces protéines dans des expériences complémentaires et continuer à les caractériser. Une telle étude est en cours (voir paragraphe 4-3). Aussi pour compléter ces analyses au niveau de l'ARNm, la technique AFLP-ADNc éprouvée à l'INRA d'Orléans sur le modèle "peuplier/bois de tension" pourrait être utilisée. Par ailleurs, des ADNc différentiellement exprimés entre bois normal et bois de compression ont été très récemment décrits chez le pin radiata et le pin teada. Leurs séquences sont disponibles dans les banques de biomolécules et les banques de clones aux Etats-Unis. Des études d'expression utilisant les techniques de RT-PCR ou d'hybridation (Northern) peuvent être là aussi envisagées.

La comparaison des protéines de xylème et d'aiguille, montre que 30 % environ des spots sont spécifiques au xylème. Le xylème secondaire (bois) est un tissu extrêmement différencié et il n'est pas surprenant que le xylème en voie de différenciation (protoxylème) exprime toute une kyrielle de gènes spécifiques. Un effort de séquençage orienté vers ces protéines devrait certainement apporter de nouveaux éléments quant aux processus biochimiques et moléculaires à l'origine de la genèse du bois.

L'effort de séquençage nécessaire à la poursuite de ce programme impliquera de passer à d'autres techniques de caractérisation des spots protéiques moins onéreuses et nécessitant peu de matériel. A titre d'exemple, le séquençage de 15 acides aminés d'une protéine de masse moléculaire moyenne (50 kDa) est réalisé à partir d'une vingtaine de spots récupérés sur 20 gels préparatifs, pour un coût HT de 4000 FF. L'avènement du séquençage utilisant la spectrométrie de masse (HUMPHERY *et al*, 1997) permettra certainement de remplir les futurs objectifs à moindre frais.

Enfin, mais pas des moindres, les gènes correspondant aux protéines différentiellement exprimées pourraient peut-être servir dans le cadre de la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM). L'utilisation de marqueurs moléculaires comme critère indirect de sélection a un intérêt certain pour la qualité du bois, caractère souvent coûteux à mesurer. A titre d'exemple, le coût HT d'une mesure du taux de lignines avoisine les 300 FF. Il faudra pour cela vérifier que ces gènes sont impliqués dans le contrôle de telle ou telle caractéristique chimique et/ou physiologique du bois. Dans un premier temps, une famille de plein-frères de pin maritime âgée de 16 ans pourrait être utilisée pour localiser ces gènes et vérifier si leur polymorphisme explique une partie de la variation des caractères liés à la qualité (taux des lignines, taux des monomères H et G, taux de cellulose et des hémicelluloses, propriétés papetières). Dans un second temps, il faudrait vérifier si un déséquilibre de liaison entre allèle au gène candidat *a priori* impliqué dans le contrôle du caractère et allèle au QTL (gène majeur) du caractère peut être détecté au sein de la population.

- Allona I., Quinn M., Shoop E., Swope K., Cyr S. St., Carlis J., Riedl J., Retzel E., Campbell M. M., Sederoff R., Whetten R. W., 1998. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 95. In press.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J Mol Biol 215 : 403-410.
- Bachem C. W. B., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M., Visser R. G. F., 1996. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP : analysis of gene expression during potato tuber development. The Plant Journal 9(5) : 745-753.
- Baillères H., 1994. Précontraintes de croissance et propriétés mécano-physiques de clones d'*Eucalyptus* (Pointe Noire, Congo) : hétérogénéité, corrélations et interprétations histologiques. Thèse en Sciences du Bois de l'Université de Bordeaux I, 161 p.
- Baillères H., Chanson B., Fournier M., Tollier M. T., Monties B., 1995. Structure, composition chimique et retraits de maturation du bois chez les clones d'*Eucalyptus*. Ann Sci For 52 : 157-172.
- Bahrman N. et Petit R. J., 1995. Genetic polymorphism in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) assessed by two-dimensional gel electrophoresis of needle, bud and pollen proteins. J Mol Evol 41 : 231-237.
- Bahrman N., Plomion C., Petit R. J., Kremer A., 1997. Contribution of two-dimensional electrophoresis of proteins to maritime pine genetics. Ann Sci For 54 : 225-236
- Boudet A. M., Goffner D. P., Grima-Pettenati J., 1996. Lignins and lignification : recent biochemical and biotechnological developments. C. R. Acad Sci Paris, Sciences de la Vie 319 : 317-331.
- Burstin J., Zivy M., de Vienne D., Damerval C., 1993. Analysis of scaling methods to minimize experimental variations in two-dimensional electrophoresis quantitative data : application to the comparison of maize inbred lines. Electrophoresis 14 : 1067-1073.
- Chen H., Chen H., Bjerknes M., 1993. One-step commasie brilliant blue R-250 staining of protein in polyacrylamide gels. Annal Biochem 212 : 295-296.
- Combes J. G., Sassus F., Baillères H., Chanson B., Fournier M., 1996. Les bois de réaction : relations entre la déformation longitudinale de maturation et les principales caractéristiques physico-mécaniques, anatomiques et chimiques. Proceedings of the 4th meeting " Sciences et industries du bois ", Nancy. Ed. ARBOLOR Nancy France.
- Costa P., Bahrman N., Frigério J. M., Kremer A., Plomion C., 1998a. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. Plant Molecular Biology, in press.

- Costa P., Pionneau C., Bauw G., Bahrman N., Kremer A., Frigerio J. M., Plomion C., 1998b. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. Soumis à Electrophoresis.
- Côté W. A., 1981. Ultrastructure - Critical Domain for Wood Behavior. Its Origins, Current Concepts, Future Potential. *Wood Sci Technol* 15(1) : 1-29.
- Damerval C., Le Guilloux M., Blaisonneau J., de Vienne D., 1987. Simplification of the Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis* 7 : 52-54.
- Damerval C., de Vienne D., Zivy M., Tarroux P., Vincens P., 1993. L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines. *Le Technoscope de Biofutur n° 58, Biofutur* 123.
- Effland M. J., 1977. Modified procedure to determinate acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI)* 60 (10) : 143-144.
- Fodor S. P. A., 1997. Massively parallel genomics. *Science* 277 : 393-394.
- Fournier M., Bailleres H., Chanson B., 1994. Tree biomechanics : Growth, cumulative prestresses and reorientation. *Biomimetics* 2(3) : 229-250.
- Fournier M., Chanson B., Thibaud B., Guitard D., 1994. Mesures des déformations résiduelles de croissance à la surface des arbres, en relation avec leur morphologies. Observations sur différentes espèces. *Ann Sci For* 51 : 249-266.
- Humphery-Smith I., Cordwell S. J., Blackstock W. P., 1997. Proteome research : complementary and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 18 : 1217-1242.
- IAWA, 1964. Multilingual Glossary of Terms used in Wood Anatomy Committee on Nomenclature - International Association of Wood Anatomists (IAWA secretary, ed.). Verlagsanstalt Buchdruckerei Konkordia Winterthur, Zurich, 186 p
- Kaufman P. B., Wu L. L., Brock T. G., Kim D., 1995. Hormones and the reorientation of growth. In *Plant Hormones*, P. J. Davies (ed.), 547-571. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Kawasaki H., Emori Y., Suzuki K., 1990. Production and separation of peptides from proteins stained with Coomassie Brilliant blue R-250 after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 191 : 332-336.
- Kawasaki H. and Susuki K., 1990. Separation of peptides dissolved in a sodium dodecyl sulfate solution by reversed-phase liquid chromatography : removal of sodium dodecyl sulfate from peptides using an ion-exchange precolumn. *Anal Biochem* 186 : 264-268.
- Kneusel R. E, Matern U., Nicolay K., 1989. Formation of trans-caffeoyl-CoA from trans-4-coumaroyl-CoA by Zn²⁺-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch Biochem Biophys* 269(2) : 455-462.
- Kühnl T., Koch U., Heller W., Wellmann E., 1989. Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine:caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Science* 60 : 21-25.

- Ladell J. L., Carmickael A. J., Thomas G. H., 1967. Current work in Ontario on Compression wood in black spruce in relation to pulp yield and quality. 8th Lake States For Tree Improv Conf (US For Serv Res Pap NC-23) : 52-60
- Lapierre C., Monties B., Rolando C., 1987. Degradation of various lignins and lignin model compounds by thioacidolysis. 4th Int Symp Wood Pulp Chem, Paris, Proc 2 : 431-435
- Leopold A.C., Brown K. M., Emerson F. H., 1972. Ethylene in the wood of stressed trees. Hortic Sci 7, 175 p.
- Liang P., Pardee A. B., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257(5072) : 967-971.
- Little C. H. A., Wareing P. F., 1981. Control of cambial activity and dormancy in *Picea sitchensis* by indol-3-ylacetic and abscissic acids. Can J Bot 59 : 1480-1493.
- Lopez M. F., Patton W. F., 1997. Reproducibility of polypeptide spot positions in two-dimensional gels run using carrier ampholytes in the isoelectric focusing dimension. Electrophoresis 18 : 338-343.
- Low A. J., 1964. Compression wood in conifers - A review of literature. Forestry Abstracts 25 : 1-14
- Myers T. G., Anderson N. L., Waltham M., Li G., Buolamwini J. K., Scudiero D. A., Paull K. D., Sausville E. A., Weinstein J. N., 1997. A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. Electrophoresis 18 : 647-653.
- O'Farrell P. H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry 250 : 4007-4021.
- Okuyama T., Yamamoto H., Yoshida M., Hattori Y., Archer R. R., 1992. Growth stress in tension wood of some hardwood species. Conférence IUFRO All division 5, Nancy, France, 12 p.
- Ona T., Watanabe Y., Fukazawa K., 1995. Lignin variations in wood quality - Characteristics of lignin in *Eucalyptus camaldulensis* and *E. globulus*. IUFRO XX World Congress, S5.01.02, Natural variations in wood quality, Tampere, Finland.
- Padmanabhan V., Dias D. M. A. L., Newton R. J., 1997. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. Plant Mol Biol 35(6) : 801-807.
- Pakusch A. E., Kneusel R. E., Matern U., 1989. S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension culture. Arch Biochem Biophys 271(2) : 488-494.
- Pearson W. R., Lipman D. J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc Natl Acad Sci USA 85 : 2444-2448.
- Peleman J., Boerjan W., Engler G., Seurinck J., Botterman J., Alliotte T., Van Montagu M., Inze D., 1989. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. Plant Cell 1(1) : 81-93.

- Pereg-Gerk L., Paquelin A., Gounon P., Kennedy I. R., Elmerich C., 1998. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, *flcA*, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp 7. *MPMP* vol 11 n°3 : 177-187.
- Rolando C., Monties B., Lapierre C., 1992. Thioacidolysis in *Methods in Lignin Chemistry* (SY Lin, CW Dence, eds), Springer series in wood science, Springer Verlag, Berlin, Allemagne
- Savidge R. A., Mutumba G. M. C., Heald J. K., Wareing P. F., 1983. Gas chromatography-mass spectroscopy identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in compression wood vascular cambium of *Pinus contorta* Dougl. *Plant Physiol* 71 : 434-436
- Sugiyama K., Okuyama T., Yamamoto H., Yoshida M., 1993. Generation process of growth stresses in cell walls : relation between longitudinal released strain and chemical composition . *Wood Science Technology* 27 : 257- 262.
- Sundberg B., Tuominen H., Little C. H. A., 1994. Effects of the Indole-3-Acetic Acid (IAA) transport inhibitors *N*-1-naphthylphthalamic acid and morphactin on endogenous IAA dynamics in relation to compression wood formation in 1-year-old *Pinus sylvestris* (L.) shoots. *Plant Physiol* 106 : 469-476.
- Timell T. E., 1986. *Compression wood in gymnosperms*. Springer-Verlag, Springer series in wood science, Editor : E. Timmell, 3 volumes, 2150 p
- de Vienne D., 1998. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Editions INRA.
- Watson A. J., Dadswell H. E., 1957. Paper making properties of compression wood from *Pinus radiata*. *J Aust Pulp Pap Ind Tech Assoc* 11(3) : 56-70
- Wilkins M. R., Williams K. L., Appel R. D., Hochstrasse D. F. (Eds), 1997. *Proteome research : new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag.
- Wilson B. F., Chien C. T., Zaerr J. B., 1989. Distribution of endogenous indole-3-acetic acid and compression wood formation in reoriented branches of Douglas-fir. *Plant Physiol* 91 : 338-344.
- Wooten T. E., 1968. The identification and properties of compression wood. *Mississippi For Prod Util Lab Inf Ser* 7, 7 p
- Zhang X. H., Chiang V.L., 1997. Molecular cloning of 4-coumarate:coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol* 113 : 65-74.

annexe 1 : les 137 spots analysés chez le pin maritime

annexe 2 : les 140 spots analysés chez l'*Eucalyptus gunnii*

annexe 3 : poster présenté au Workshop « Wood and wood fibers : properties and genetics improvement », Atlanta, GA, USA, 19-22 juillet 1998. Titre : « Differential expression of xylem proteins between normal and compression wood in Maritime pine (*Pinus pinaster*) ».

annexe 1 : les 137 spots analysés chez le pin maritime

spot analysé	effet manip ^a	effet DRLM ^b	R ² ^c	similarité aiguilles ³	identification ^o	protéine similaire ¹	comportement face à la DRLM ¹
1313	0,000	0,000	0,826	S	X33	ACC oxydase	présent uniquement pour des DRLM > 0
630	0,009	0,000	0,458	C (N159)	X74	malate déshydrogénase	↗
244	0,011	0,006	0,063	C (N127)	X11	SAM synthétase	↗
247	0,043	0,001	0,196	S	X12	SAM synthétase	↗
253	0,153	0,012	0,125	S	X21	SAM synthétase	↗
264	0,184	0,004	0,228	S	X30	SAM synthétase	↗
707	0,257	0,001	0,337	C (N155)	X15	SAM synthétase	↗
293	0,321	0,001	0,273	C (N168)	X10	protéine disulfide isomérase	↗
337	0,053	0,011	0,148	C (N171)	X17	glutamine synthase	↗
486	0,053	0,046	0,095	C (N175)	X48	ascorbate peroxidase	↗
502	0,017	0,001	0,464	C (N109)	X54	gène fic A (facteur de transcription)	↗
586	0,02	0,005	0,241	C (N177)	X18	acide caféique O-méthyltransférase	↗
324	0,524	0,03	0,181	C (N169)	X44	*	↗
587	0,007	0,016	0,181	S	X19	*	↗
433	0,004	0,000	0,368	C (N125)	X46	caféoyl CoA O-méthyltransférase	↗
561	0,506	0,021	0,224	C (N98)	X47	HSP de faible poids moléculaire (classe 1)	↗
493	0,135	0,027	0,080	C			↗
531	0,027	0,026	0,121	S			↗
564	0,43	0,023	0,221	C			↗
104	0,28	0,031	0,119	S			↗
256	0,017	0,03	0,044	C (N34)			↗
257	0,171	0,01	0,120	C			↗
357	0,741	0,046	0,137	C			↗
410	0,072	0,003	0,425	C (N70)			↗
473	0,017	0,005	0,326	S			↗
507	0,073	0,013	0,191	C (N177)			↗
49	0,651	0,983		C (N165)	X2	HSP 70 kDa	
71	0,704	0,238		C (N178)	X59	protéine disulfide isomérase	
134	0,543	0,557		C (N167)	X6	UDP-glucose pyrophosphorylase	
332	0,08	0,161		C (N170)	X43	EST de <i>Pinus taeda</i> "auxin-induced protein" Accession : AA556564 et AA556410	
338	0,052	0,093		C (N46)	X16	glutamine synthase	
366	0,019	0,17		C (N172)	X61	EST de <i>Pinus taeda</i> "water-stress inducible protein : Ip3-1". Accession : U52865 protéine de maturation des fruits "ABA stress ripening protein". Accession : Q08655	
401	0,057	0,052		C (N173)	X45	protéine se liant aux protéines Ran	
417	0,004	0,449		C (N75)	X41	isoflavone réductase	
755	0,826	0,178		C (N166)	X3	HSP 70 kDa	
72	0,335	0,082		C (N152)	X60	*	
48	0,947	0,747		C (N164)	X1	HSP 70 kDa	
294	0,822	0,888		C (N53)	X9	actine	
39	0,072	0,576		C (N9)	X102	protéase ATP-dépendante	
50	0,24	0,287		C (N1)	X69	peptidylprolyl cis-trans isomérase	
136	0,411	0,788		C (N153)	X7	ATP synthetase sous-unité f ₁	
298	0,083	0,278		C (N47)	X14	glutamine synthase	
335	0,004	0,772		C (N48)	X13	glutamine synthase	
525	0,067	0,458		C (N139)	X51	triose phosphate isomérase	
553	0,013	0,542		C (N95)	X101	Cu/Zn superoxide dismutase	
563	0,961	0,06		C (N144)	X97	HSP de faible poids moléculaire (classe 1)	
2	0,376	0,764		C			
3	0,232	0,866		C			
41	0,017	0,161		C			
46	0,06	0,894		C			
55	0,615	0,534		C (N6)			
81	0,229	0,863		C			
83	0,995	0,901		C			
92	0,025	0,075		C			
95	0,01	0,731		C			
101	0,225	0,584		C (N16)			
105	0,093	0,827		C			
141	0,031	0,164		C			
151	0,046	0,357		C			
152	0,308	0,327		C			
169	0,249	0,819		C			
172	0,055	0,703		C			
174	0,042	0,617		C			
178	0,017	0,376		C			
191	0,003	0,129		C			
211	0,09	0,131		C			
214	0,507	0,056		S			
215	0,205	0,656		C (N37)			
219	0,008	0,439		C			
222	0,059	0,806		nd			
228	0,939	0,901		C			
239	0,053	0,467		C (N59)			
248	0,04	0,448		S			
267	0,037	0,985		C			
302	0,001	0,694		C			
307	0,151	0,896		C (N44)			
308	0,218	0,171		C			
312	0,052	0,516		C			
316	0,47	0,242		C			
347	0,001	0,372		C (N42)			
351	0,079	0,909		C			
354	0,294	0,27		C			
365	0,074	0,363		S			
367	0,123	0,701		C (N60)			
372	0,000	0,995		S			

annexe 1 (suite)

390	0,126	0,23		C (N158)		
394	0,045	0,124		C		
397	0,165	0,081		C (N174)		
413	0,068	0,268		C		
419	0,133	0,728		C		
422	0,179	0,921		C		
438	0,034	0,133		C		
440	0,003	0,86		C		
441	0,066	0,823		C (N69)		
444	0,049	0,276		C		
446	0,008	0,985				
450	0,121	0,293		C (N86)		
469	0,043	0,791		C (N133)		
474	0,039	0,236		C		
475	0,169	0,461		C		
478	0,004	0,707		C		
479	0,066	0,362		C		
481	0,698	0,64		C		
482	0,04	0,08		C		
483	0,077	0,184		C		
484	0,089	0,137		C		
491	0,015	0,737		C (N83)		
494	0,051	0,307		C		
495	0,282	0,697		C		
498	0,021	0,85		C (N113)		
501	0,06	0,067		C (N110)		
503	0,188	0,832		C		
505	0,255	0,751		S		
506	0,055	0,054		S		
510	0,036	0,277		C		
526	0,042	0,561		C		
527	0,355	0,253		C		
530	0,898	0,247		S		
532	0,723	0,632		C		
534	0,023	0,818		C		
539	0,003	0,074		C (N105)		
541	0,28	0,822		C		
547	0,001	0,601		C		
554	0,000	0,693		C		
560	0,77	0,079		C (N97)		
595	0,27	0,928		C		
634	0,45	0,596		C		
650	0,107	0,777		C		
693	0,349	0,329		C		
701	0,049	0,189		C		
760	0,349	0,192		S		
763	0,203	0,242		C (N36)		
775	0,193	0,364		C (N108)		
790	0,313	0,103		C (N4)		
800	0,074	0,158		S		
803	0,000	0,834		S		
1335	0,756	0,253		S		

^a valeur de Pr(F). En gras et en italique : effet de la date de réalisation et de numérisation des gels significatif au seuil de 1% (modèle [1]).

^b valeur de Pr(F). En gras et en italique : effet DRLM significatif au seuil de 5% (modèle [1]).

^c coefficient de détermination du modèle [2]

^d C : spots communs avec les aiguilles (le numéro entre parenthèses renvoie au numéro du spot sur gel 2-D d'aiguilles), S : spots spécifiques du protoxylème, nd : non déterminé.

^e numéro des spots de protoxylème identifiés (voir photo 5)

^f en vert : spots identifiés par similarité de *Mr* et de *pI* à partir de gels 2-D d'aiguilles. En bleu : spots séquencés à partir de gels 2-D d'aiguilles et de gels 2-D de protoxylème. En rouge : spots séquencés à partir de gels 2-D de protoxylème (* : non identifié).

^g ↗ : la quantité de la protéine augmente avec la DRLM, ↘ : la quantité de la protéine diminue avec la DRLM.

annexe 2 : les 140 spots analysés chez *Eucalyptus gunnii*

spot analysé	effet DRLM ^a	R ^{2b}	comportement face à la DRLM ^c
80	<i>0,024</i>	0,541	↗
82	<i>0,027</i>	0,528	↗
83	<i>0,008</i>	0,657	↗
90	<i>0,034</i>	0,496	↗
222	<i>0,009</i>	0,649	↗
572	<i>0,017</i>	0,582	↗
624	<i>0,050</i>	0,658	↗
175	<i>0,040</i>	0,475	↘
321	<i>0,034</i>	0,497	↘
447	<i>0,012</i>	0,615	↘
522	<i>0,026</i>	0,533	↘
657	<i>0,025</i>	0,535	↘
27	0,375		
30	0,170		
32	0,793		
35	0,965		
36	0,568		
38	0,892		
50	0,097		
54	0,464		
60	0,090		
61	0,751		
63	0,622		
65	0,450		
68	0,141		
76	0,841		
92	0,434		
96	0,503		
97	0,447		
103	0,477		
104	0,797		
106	0,120		
108	0,559		
109	0,383		
113	0,751		
119	0,427		
134	0,915		
137	0,516		
148	0,617		
150	0,916		
153	0,603		
157	0,948		
158	0,737		
166	0,870		
179	0,102		
186	0,191		
194	0,721		
198	0,570		
200	0,067		
203	0,213		
211	0,321		
223	0,561		
228	0,709		
235	0,541		
237	0,366		
244	0,960		
248	0,279		
254	0,310		
260	0,727		
271	0,110		
272	0,696		
277	0,677		
278	0,387		
279	0,068		
281	0,628		
301	0,688		
307	0,056		
315	0,713		
322	0,700		
323	0,214		

spot analysé	effet DRLM ^a	R ^{2b}	comportement face à la DRLM ^c
329	0,189		
331	0,972		
335	0,223		
336	0,198		
355	0,527		
356	0,799		
360	0,714		
361	0,436		
362	0,073		
372	0,762		
381	0,845		
390	0,128		
392	0,780		
416	0,098		
423	0,486		
426	0,366		
428	0,996		
429	0,959		
436	0,936		
439	0,665		
451	0,355		
455	0,928		
462	0,882		
463	0,775		
465	0,164		
470	0,618		
478	0,721		
485	0,279		
486	0,454		
492	0,676		
503	0,344		
504	0,783		
508	0,646		
510	0,372		
524	0,681		
527	0,286		
530	0,082		
534	0,450		
539	0,590		
549	0,052		
552	0,602		
557	0,365		
565	0,631		
567	0,630		
574	0,838		
583	0,528		
586	0,983		
591	0,214		
599	0,964		
604	0,982		
605	0,272		
612	0,515		
616	0,090		
618	0,454		
622	0,074		
623	0,962		
628	0,892		
637	0,900		
645	0,371		
648	0,751		
656	0,515		
660	0,598		
672	0,685		
673	0,773		
681	0,436		
741	0,699		
743	0,784		
745	0,957		
762	0,072		
766	0,520		

^a valeur de Pr(F). En gras et en italique : effet DRLM significatif au seuil de 5%

^b coefficient de détermination du modèle [3]

^c ↗ : la quantité de la protéine augmente avec la DRLM, ↘ : la quantité de la protéine diminue avec la DRLM.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF XYLEM PROTEINS BETWEEN NORMAL AND COMPRESSION WOOD IN MARITIME PINE (*PINUS PINASTER*)

C. PIONNEAU¹, H. BAILLERES², G. CHANTRE³, P. COSTA¹ and C. PLOMION¹



1- INRA, Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, BP45 33610 Cestas, France (plomion@pierroton.inra.fr)
 2- CIRAD-Forêt, Programme Bois, Maison de la Technologie, 73 rue JF Breton, BP 5035, Montpellier Cédex 01, France
 3- AFOCEL, Domaine de l'étançon, 77370 Nangis, France

INTRODUCTION

Differences in wood quality within a single tree is a common feature. Indeed, when a tree is not growing vertically, reaction wood (also called compression wood in gymnosperm and tension wood in angiosperm) is mainly produced in reaction to external stresses (gravitation, wind, obstacle...). Reaction and regular wood differ in terms of chemical, physical and anatomical properties (FIG. 1). Our testing hypothesis is that these differences reflect a differential gene or protein expression in xylem during its differentiation in wood. In this study, we looked for PROTEINS that are DIFFERENTIALLY EXPRESSED in xylem collected from NORMAL and from COMPRESSION WOOD in Maritime pine. This conifer species is widely used in intensive monospecific stands and covers more than 4 million hectares in southwest Europe (France, Italy, Spain, Portugal). A breeding programme for southwestern France began in the early 1960s and has now reached its third generation.

MATERIAL AND METHODS

Sampling procedure

- 14 samples of differentiating xylem were taken from a crooked 22-year old tree at four heights up the tree and at four positions around the trunk, corresponding to due north, south, east and west (FIG. 2).

Physical and chemical analysis

- Growth strains (GS) at the stem surface, as well as lignin and cellulose content of small wood pieces were measured for each sample. A strong linear relationship between GS and lignin content was observed (FIG. 3), and we further used GS to quantitatively classify our xylem protein samples from normal to compression wood.

Two-Dimensional electrophoresis of proteins

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) was used to separate total proteins from the 14 xylem samples. Gels were replicated twice. An average of 700 protein spots were revealed by silver staining. We concentrated our analysis on 135 spots distributed throughout the gels. Their amounts were estimated with a computer-assisted system for spot quantification. Some spots were characterized by microsequencing. These spots corresponded to proteins that were differentially expressed between normal and compression wood as well as abundantly expressed proteins.

RESULTS AND DISCUSSION

A statistical model: $Y_{ij} = \mu + GS_j + e_{ij}$, was designed to detect protein variations according to mechanical stress as revealed by the growth strain (GS values).

Y_{ij} is the intensity of spot i ($i=1-135$) in gel k ($k=1-7$), belonging to one of the j^{th} ($j=1-4$) class of GS. From the 135 studied proteins, 18 (13%) responding to GS effect ($P < 0.05$), i.e. their accumulation varied according to GS, while 117 (77%) spots were not affected by the mechanical stress. Briefly:

- 14 proteins were characterized by increase of intensity with GS
- 3 decreased in intensity with GS
- 1 spot (FIG. 4) was either totally absent when GS was <0 (mostly normal wood) and highly accumulated when GS was >0 (compression wood).

Modification of the amount of protein could result from changes in the abundance of corresponding mRNA molecules or else from changes in their translation efficiency or post-translational regulation. But we can not distinguish between these possibilities.

Microsequences were obtained from some spots (their location in 2D gels is indicated in FIG. 5). The amino acid sequences were compared to the sequences of international databases and functions could be assigned for almost all of them.

- Example of up-regulated proteins concern disulfide isomerase (#10), COMT (#18) and C-CoA-OMT (#46), two lignification genes. This suggests that biosynthesis of lignin was affected during reaction wood formation. This result was expected and fits well with the relation established between GS and lignin content (see FIG. 3).

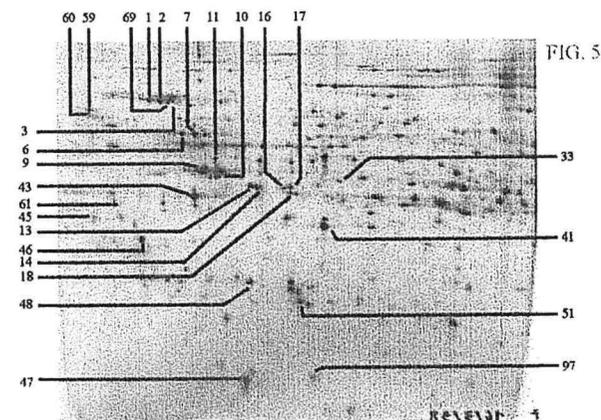
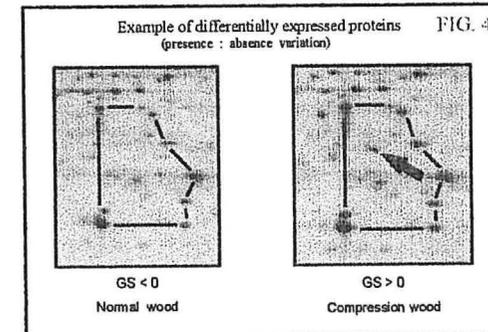
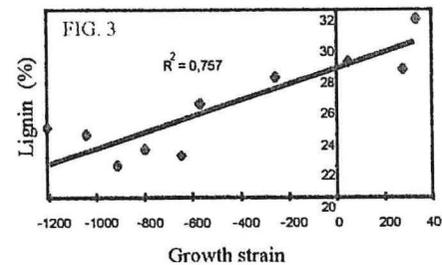
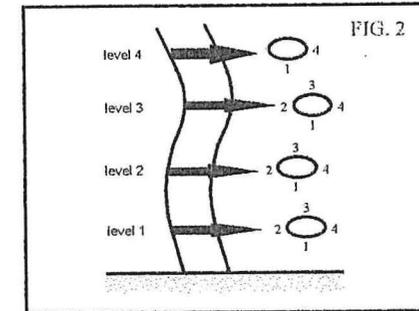
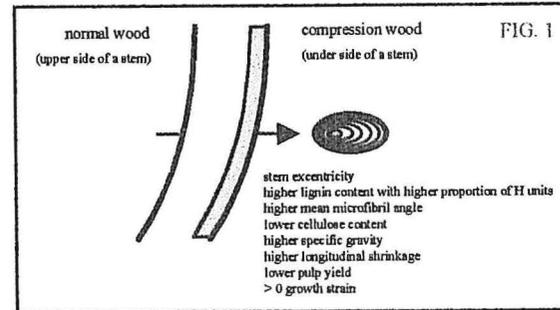
- Examples of down-regulated proteins concern two low molecular weight HSP (#47, #97).

- *de novo* synthesized proteins was observed for 1 spot (#33). From 3 microsequences of 15 amino acids each, obtained for this protein, one showed strong homology with an ethylene forming enzyme. This may indicate the importance of this plant hormone in reaction wood formation.

Other spots were equally expressed in differentiating xylem sampled from both normal and compression wood, e.g.: ascorbate peroxidase (#48), isoflavone reductase (#41), SAM synthetase (#11), actin (#9), water stress inducible proteins (#61), HSP 70KD (#1,2,3), ran binding protein (#45), glutamine synthase (#13, 14, 16,17), ATP synthase β -sub unit (#7), UDP-glucose pyrophosphorylase (#6), triose phosphatase isomerase (#31), peptidylprolyl cis-trans isomerase (#69), and two other disulfide isomerase precursor (#59, #60). One spot (#43) was abundantly expressed in both normal and compression wood but could not be identified. This may indicate a novel protein specifically involved in wood formation.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Using 2D-PAGE, we were able to detect proteins that differentially accumulated in xylem collected from normal and compression wood. The function of some of them was described and new ones are under analysis. Our results also showed that these proteins could affect chemical and physical wood properties. The corresponding genes of these proteins could provide useful candidate genes for marker-assisted selection of wood quality. This research is part of a European Union funded project aiming at improving selection efficiency of wood quality traits (FAIR CT98/3953). We also thank findings from the Aquitaine Region, INRA and CIRAD.



RESUME

Dans cette étude, nous avons recherché des protéines spécifiques du bois de réaction chez un résineux, *Pinus pinaster*, et chez un feuillu, *Eucalyptus gunnii*. Pour chaque espèce, nous avons effectué des prélèvements de xylème en différenciation (protoxylème), ainsi que des prélèvements de blocs de bois sur un arbre naturellement courbé. La Déformation Résiduelle Longitudinale de Maturation (DRLM), mesurée au niveau de chaque prélèvement, et les analyses chimiques (taux de lignines et taux de cellulose) effectuées sur les blocs de bois nous ont permis de caractériser sans ambiguïté le type de bois présent à la surface des arbres. La technique de l'électrophorèse bidimensionnelle a été utilisée pour séparer et étudier de façon quantitative les protéines de protoxylème. Nous avons étudié la variation de la quantité de 137 protéines du protoxylème de pin maritime et de 140 protéines du protoxylème d'*Eucalyptus gunnii*, en fonction de la valeur de la DRLM. Des protéines impliquées dans la formation du bois de réaction ont été ainsi détectées. Chez le pin maritime, 19 % des protéines analysées sont reliées à la DRLM, dont 81 % de façon positive. Chez l'*Eucalyptus gunnii*, 8,6 % des protéines analysées sont reliées à la DRLM, dont 42 % de façon négative. Chez le pin maritime, certaines protéines reliées à la DRLM ont été caractérisées et identifiées par microséquençage, en particulier l'ACC oxydase, l'enzyme assurant la synthèse de l'éthylène, deux enzymes de la voie de biosynthèse des lignines, CCoA-OMT et C-OMT, ainsi que plusieurs SAM synthétases qui catalysent la formation du coenzyme SAM à partir de la méthionine. Cette étude s'intègre dans un programme de recherche visant à étudier la qualité du bois au niveau de son déterminisme génétique (variabilité, héritabilité, recherche de QTL) et de son contrôle moléculaire (gènes et protéines impliquées dans la qualité).

CIRAD-Dist

UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
BAILLARGUET

ABSTRACT

In this study, we investigated for specific proteins of wood reaction from the differentiating xylem of two species, a softwood tree, *Pinus pinaster*, and a hardwood tree, *Eucalyptus gunnii*. For each species, we harvested the differentiating xylem and wood samples from one naturally bent tree. At each harvest location, the nature of wood was unambiguously assessed by measuring the growth strain (GS) and the lignin and cellulose contents of the wood samples. Two-dimensional electrophoresis was performed to separate the protein mixture and to estimate the quantity of the protein spots of differentiating xylem. The quantities of 137 and 140 protein spots from the immature xylem of maritime pine and *Eucalyptus gunnii* respectively, were compared to the values of GS. Such analysis allowed us to detect protein implicated in the synthesis of reaction wood. For the maritime pine, 19 % of the analysed proteins were related to GS from which 81 % increased as the GS increased. For *Eucalyptus gunni*, 8,6 % of the analysed proteins were related to the GS, and 42 % of this proteins were increased as GS decreased. Some GS related proteins were characterised in maritime pine. These are ACC oxydase which forms ethylene, 2 enzymes of the lignin biosynthetic pathway, CCoA-OMT and C-OMT, and five SAM synthetases which catalyse the formation of the coenzyme SAM from methionin. This study takes place in a research program that attempts to investigate the genetic determinism of wood quality (variability, heritability, QTL detection) and its molecular control (genes and proteins implied in quality).