

Thèse de Doctorat

Séverine HO-YUE-KUANG

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : INRA Centre Angers-Nantes, INRA Centre de Versailles

Soutenue le 20 octobre 2015

Exploration des voies de biosynthèse de l'acide férulique dans les grains et tiges de *Brachypodium distachyon*

JURY

Rapporteurs :	Yves BARRIERE , Directeur de recherche, INRA Centre Poitou-Charentes Gilles PILATE , Directeur de recherche, INRA Centre Val de Loire
Examineurs :	Philippe DELAVault , Professeur, Université de Nantes Marie DUFRESNE , Maître de conférences, Université Paris Sud Catherine LAPIERRE , Professeur, INRA Centre Versailles-Grignon
Invitée :	Anne-Laure CHATEIGNER-BOUTIN , Chargée de recherche, INRA Centre Angers-Nantes
Directeur de Thèse :	Luc SAULNIER , Directeur de recherche, INRA Centre Angers-Nantes

Exploration des voies de biosynthèse de l'acide férulique dans les grains et les tiges de *Brachypodium distachyon*

Séverine Ho-Yue-Kuang

École doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Unité de recherche : INRA Centre Angers-Nantes, INRA Centre de Versailles

Soutenue le 20 octobre 2015

Rapporteurs : **Yves BARRIERE**, Directeur de recherche, INRA Centre Poitou-Charentes

Gilles PILATE, Directeur de recherche, INRA Centre Val de Loire

Examineurs : **Philippe DELAVault**, Professeur, Université de Nantes

Marie DUFRESNE, Maître de conférences, Université Paris Sud

Catherine LAPIERRE, Professeur, INRA Centre Versailles-Grignon

Invitée : **Anne-Laure CHATEIGNER-BOUTIN**, Chargée de recherche, INRA Centre Angers-Nantes

Directeur de Thèse : **Luc SAULNIER**, Directeur de recherche, INRA Centre Angers-Nantes

Résumé :

L'acide férulique joue un rôle clé dans les parois cellulaires des *Poaceae* en permettant la réticulation des chaînes de polysaccharides entre elles et avec les lignines. La connaissance de sa biosynthèse peut améliorer l'usage des céréales en permettant de moduler les propriétés mécaniques des parois et leur digestibilité enzymatique. La plante modèle des *Poaceae*, *Brachypodium distachyon*, a été utilisée pour explorer les voies de synthèse de l'acide férulique. Une stratégie de génétique inverse a été mise en place afin d'étudier deux enzymes candidates, la COMT et la CCoAOMT sélectionnées pour leur capacité à produire *in vitro* respectivement l'acide férulique et le féruloylCoA. Ces OMT étant codées par des familles multigéniques, la sélection des gènes candidats a été basée sur des analyses phylogénétiques et transcriptomiques. Des lignées mutantes ont été obtenues par mutagenèse chimique et identifiées par TILLING pour le gène *BdCOMT6*. L'analyse de ces lignées a montré que *BdCOMT6* est une COMT impliquée dans la synthèse des lignines des tiges et des grains de *B. distachyon*. Elle ne serait pas impliquée dans la synthèse de l'acide férulique lié aux parois. Des lignées d'interférence ARN ciblant cinq gènes *CCoAOMT* appartenant à un clade spécifique des *Poaceae* ont été générées. De l'acide férulique lié aux parois a été détecté dans les tiges des plantes régénérées. L'analyse des générations suivantes est en cours pour déterminer la fonction de ces gènes. Les lignines des tiges de *B. distachyon* ont été étudiées en détail ces dernières années, ce travail de doctorat a permis de caractériser pour la première fois les structures des lignines présentes dans les grains.

Abstract :

Ferulic acid plays a key role in grass cell walls, allowing the reticulation between chains of polysaccharides and with lignins. The understanding of its biosynthesis could improve cereals end-uses in allowing the modulation of the cell wall mechanical properties and enzymatical digestibility. The model plant of *Poaceae*, *Brachypodium distachyon*, was used to explore the ferulic acid biosynthesis pathways. A reverse genetic strategy has been established to study two candidate enzymes, the COMT and the CCoAOMT selected for their capacity to produce *in vitro* ferulic acid and feruloylCoA respectively. Since these OMTs are encoded by multigenic families, a selection of candidate genes has been performed based on phylogenetic and transcriptomic analyses. Mutant lines have been obtained through chemical mutagenesis and identified by TILLING for the *BdCOMT6* gene. The analysis of these lines showed that *BdCOMT6* is a COMT involved in lignin biosynthesis in *B. distachyon* stems and grains. However it would not produce the ferulic acid linked to cell walls. RNA interference lines targeting five *CCoAOMT* genes belonging to a *Poaceae* specific clade have been generated. Ferulic acid linked to stem cell walls was detected by preliminary analyses of the regenerated plants. Complementary analyses of the next generations are in progress, they will allow to determine if these *CCoAOMT* genes have a role in the biosynthesis of ferulic acid linked to cell wall. Lignins have been studied in details over the last few years, only stem lignins were characterized in *B. distachyon*, this doctoral work allowed to precisely characterize, and for the first time, the structure of the grain lignins.

Remerciements :

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon directeur de thèse, Luc Saulnier, et à mes encadrants, Anne-Laure Chateigner-Boutin et Richard Sibout, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et soutenue durant ces dernières années.

Je remercie tout particulièrement Camille Alvarado, Sébastien Antelme, Brigitte Bouchet, Axelle Boudier, Sylviane Daniel et Philippe Le Bris pour leur aide plus que précieuse.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe Paroi secondaire : Adeline Voxeur, Lise Jouanin et Yin Wang, et de l'équipe Paroi végétale et Polysaccharides pariétaux : Mathilde Allami, Estelle Bonnin, Marie-Jeanne Crépeau, Marie-Françoise Devaux, Sylvie Durand, Fabienne Guillon, Laurent Helary, Marc Lahaye, Bernard Quemener, Marie-Christine Ralet, Paul Robert et Jacqueline Vigouroux pour leurs conseils techniques et leurs encouragements.

Je tiens à remercier tout particulièrement Catherine Lapierre pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ; Laurent Cézard et Frédéric Légée pour les nombreux échanges que nous avons eus sur les analyses de lignines et de composés phénoliques.

Je remercie Oumaya Bouchabke-Coussa et Camille Soulhat pour leur participation active et leurs préconisations lors de la transformation de *Brachypodium distachyon*.

Un grand merci à l'équipe d'Abdel Bendamane du Génopôle d'Évry et à Marion Dalmais pour la mise au point et l'exploitation du TILLING sur la collection de mutants *Brachypodium distachyon* de l'INRA de Versailles.

Je remercie Valérie Echasserieau-Laporte, Laurence Lallemand et Olivier Tranquet pour nos discussions concernant la production de protéines recombinantes et les activités enzymatiques.

Merci à Hervé Ferry pour avoir pris soin de mes plantes en serre et à Halima Morin de la plateforme de cytologie de l'INRA de Versailles pour ses conseils et son assistance.

Un grand merci à Maryse Owen pour sa disponibilité et son aide administrative.

Je remercie mes parents, Céline et Patrick, mon frère, Kévin, et Matthieu, pour leur soutien moral, pour leur empathie et leur compréhension.

Je remercie mes collègues : Myriam Amami, Davy Baratiny, Madeleine Bouvier d'Yvoire, Fanny Buffetto, Richard Chazal, Emmanuelle Dheilily, Floriane Gouin-Picq, Merve Kaya, Charlène Laynay, Sayani Ray, Aurélie Scagnelli, Alexandre Thébaud, Yves Verherbruggen, Pauline Videcoq et Nadia Yacoubi, qui ont formé à mon égard une véritable seconde famille.

Enfin, merci aux membres de mon comité de thèse, Jacqueline Grima-Pettenati et Herman Höfte, ainsi qu'à Yves Barrière, Philippe Delavault, Marie Dufresne et Giles Pilate pour leur participation à mon jury de thèse.

Table des matières :

Chapitre 1 : Introduction générale

Introduction générale

Synthèse bibliographique

1.1 Généralités sur les Poacées

1.1.1. Intérêt de l'étude des Poacées

1.1.1.1. La production de céréales dans le monde

1.1.1.2. L'utilisation des céréales dans le monde

1.1.1.3. Vers une modification de l'utilisation des céréales

1.1.2. Généralités sur les parois végétales

1.1.3. Différences entre les parois des Angiospermes Eudicotylédones et des Poacées

1.2. Le choix de la plante modèle *Brachypodium distachyon*

1.2.2. Description de l'anatomie et de la physiologie de *B. distachyon*

1.2.2.1. L'anatomie et la composition de la tige de *B. distachyon*

1.2.2.2. L'anatomie et la composition du grain de *B. distachyon*

1.2.3. *B. distachyon* comme modèle d'études des céréales : les outils disponibles

1.3. Composition des parois cellulaires et particularités des parois de Poacées

1.3.1. La cellulose

1.3.2. Les pectines

1.3.3. Les protéines pariétales

1.3.4. La silice, la cuticule et les cires, des composants des parois des épidermes

1.3.5. Les hémicelluloses

1.3.5.1. Les xyloglucanes

1.3.5.2. Les mannanes

1.3.5.3. Les β -glucanes mixtes

1.3.5.4. Les xylanes

1.3.1.5.4.1. Structure des xylanes de Poacées

1.3.1.5.4.2. Synthèse des xylanes chez les Poacées

1.3.1.5.4.3. Fonction des xylanes dans les parois des Poacées

1.3.6. Les lignines

1.3.6.1. Structure des lignines dans les parois

1.3.6.2. Synthèse des monolignols

- 1.3.6.3. Transport et polymérisation des monolignols
- 1.3.6.4. Fonction des lignines dans la paroi des Poacées
- 1.3.7. Les acides hydroxycinnamiques
 - 1.3.3.7.1. Liaisons des acides hydroxycinnamiques dans les parois
 - 1.3.7.2. Synthèse des acides férulique et *p*-coumarique chez les Poacées et transfert sur les xylanes et les lignines
 - 1.3.7.3. Fonction des acides férulique et *p*-coumarique dans les parois des Poacées
- 1.3.8. Les *O*-méthyltransférases impliquées dans la synthèse des lignines
 - 1.3.8.1. Mécanisme de fonctionnement des *O*-méthyltransférases
 - 1.3.8.2. La COMT
 - 1.3.8.3. La CCoAOMT
- 1.4. Stratégie mise en place lors de la thèse**

Chapitre 2 : Description du matériel d'étude, le grain et la tige de *B. distachyon*, géotype Bd21-3

2.1. Caractérisation morphologique de la tige et du grain de Bd21-3

- 2.1.1. Caractérisation morphologique de la tige de Bd21-3
 - 2.1.1.1. Description de la tige et de ses différents tissus
 - 2.1.1.2. Stades et méthodes de prélèvements des tiges
- 2.1.2. Caractérisation morphologique du grain (mature) de Bd21-3.
 - 2.1.2.1. Description du grain et de ses différents tissus
 - 2.1.2.2. Méthodes de prélèvements des grains secs entiers et des albumens décortiqués

2.2. Le grain de *B. distachyon* au cours de son développement

2.3. Caractérisation chimique des parois de la tige et du grain de Bd21-3

- 2.3.1. Quantification des lignines dans les tiges et les grains secs
- 2.3.2. Détermination de la composition des lignines dans les pailles et les grains secs
- 2.3.3. Détermination de la composition en acides hydroxycinnamiques des pailles et des grains secs
- 2.3.4. Détermination de la composition en amidon des grains secs

2.4. Caractérisation par (immuno)histochimie des lignines et des acides hydroxycinnamiques des grains et de la tige de *B. distachyon* (Bd21-3)

- 2.4.1. Distribution des lignines dans les tiges et les grains
- 2.4.2. Distribution des arabinoxylanes féruloylés et des acides hydroxycinnamiques

2.5. Conclusions

Chapitre 3 : Etude de la COMT chez *Brachypodium distachyon*

3.1. Analyse phylogénétique des COMT : choix de BdCOMT6

3.2. Analyse des séquences protéiques

3.3. Structure des gènes et confirmation des séquences codantes

3.4. Profil d'expression des gènes codant pour une COMT dans différents organes de *B. distachyon*

3.5. La méthode du Targeted Induced Local Lesions in Genomes, ou TILLING, appliquée à *B. distachyon*

3.6. Analyse des mutants identifiés par TILLING

3.6.1. Analyse histochimique des mutants par coloration de Maïle et au phloroglucinol-HCl

3.6.2 Analyses chimiques des mutants

3.6.2.1. Analyse de la composition en lignines des pailles des mutants par Lignine Klason

3.6.2.2. Distribution des monomères de lignines dans les pailles des mutants par thioacidolyse

3.6.2.3. Dosage des acides hydroxycinnamiques contenus dans les pailles des mutants

3.7. Etude approfondie de la lignée 5139

3.7.1. Analyse de la composition des résidus pariétaux des pailles et des grains secs en lignines et dérivés

3.7.2. Analyse de la composition en acides hydroxycinnamiques des résidus pariétaux de pailles et de grains

3.7.3. Analyse de la composition en polysaccharides des grains secs

3.7.3.1. Analyse de la composition en oses neutres des résidus pariétaux de grains

3.7.3.2. Analyse de la composition en amidon des grains entiers matures

3.7.4. Caractérisation de la lignée mutée 5139 par immunomarquages

3.7.5. Essais de saccharification sur les pailles du mutant BdCOMT6 5139

3.7.6. Caractérisation de l'expression des gènes codant pour des COMT potentielles dans la lignée mutée 5139

3.8. Production de la protéine BdCOMT6 recombinante et activité enzymatique

3.9. Transformation du mutant d'*Arabidopsis thaliana omt1* par les constructions BdCOMT6 sauvage et mutante 5139

3.10. Conclusions

Chapitre 4 : Etude de la famille CCoAOMT chez *B. distachyon*

4.1. Identification des gènes CCoAOMT de *Brachypodium distachyon*

4.2. Analyse phylogénétique des CCoAOMT de *Brachypodium distachyon*

4.3. Analyse des séquences protéiques prédites

4.4. Expression des gènes codant pour une CCoAOMT dans les différents tissus de *Brachypodium distachyon*

4.4.1. Données AFFYMETRIX

4.4.2. RT-PCR

4.5. Analyse de mutants d'insertion

4.6. Construction de mutants ciblant les CCoAOMT

4.7. Analyses préliminaires des plantes transgéniques amiARN5

4.7.1 Analyses de la lignification des tiges des lignées T0 par coloration au phoroglucinol-HCl

4.7.2. Analyse des acides hydroxycinnamiques des tiges des lignées T0

4.7.3. Expression du gène *BdCCoAOMT4* en présence du transgène amiARN5 dans les plantes de la génération T1

4.8. Conclusions

Chapitre 5 : Discussion générale

5.1. Détection et localisation des acides hydroxycinnamiques et des lignines dans le grain et dans la tige de *B. distachyon*

5.2. Identification de la COMT impliquée dans la synthèse des lignines chez *B. distachyon*

5.3. La COMT associée à la synthèse des monolignols n'est pas impliquée dans la synthèse de l'acide férulique lié aux xylanes

5.4. Critique du choix de la COMT

5.5. Obtention de plantes mutantes pour la CCoAOMT

5.6. Limites des méthodes employées

5.7. Autre proposition d'approches

5.8. Conclusion

Chapitre 6 : Matériel et méthode

6.1. Matériel végétal et bactérien utilisé et conditions de culture

6.1.1. Plantes et génotypes utilisés

6.1.2. Conditions de culture des plantes

6.1.3. Liste des souches bactériennes utilisées

6.1.4. Conditions de culture des bactéries

6.2. Bioinformatique

6.2.1. Construction des arbres phylogénétiques

6.2.2. Liste des numéros d'accessions des protéines

6.3. Matériel et protocoles de biologie moléculaire

6.3.1. Liste des plasmides utilisés

6.3.2. Extraction de l'ADN génomique de *Brachypodium distachyon*

6.3.3. Extraction d'ADN plasmidique

6.3.4. Extraction d'ARN totaux de grains de *B. distachyon* pour hybridation sur puces à ADN

6.3.5. Extraction d'ARN totaux de grains entiers, de grains décortiqués, de tiges, de feuilles, de partie aérienne de jeunes plantules et de partie racinaire de jeunes plantules avec le kit EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps de *Bio Basic Inc.*

6.3.6. Purification et concentration des ARN totaux extraits

6.3.7. Analyse de l'expression des gènes par puces AFFYMETRIX

6.3.8. Rétro-transcription

6.3.9. Amplification des ADN par PCR

6.3.9.1. PCR réalisée avec l'enzyme One Taq[®] Hot Start DNA Polymerase

6.3.9.2. PCR réalisée avec l'enzyme Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase

6.3.9.3. Liste des amorces utilisées en PCR ou en séquençage

6.3.10. Génotypage des lignées de *Brachypodium distachyon* « TILLEES » pour le locus Bradi3g16530

6.3.11. Culture et génotypage de lignées d'insertion T-DNA de *Brachypodium distachyon*

6.3.12. Purification de produits de PCR par l'utilisation du kit "EZ-10 Spin Column PCR Products Purification (*Bio Basic Inc.*)"

6.3.13. Electrophorèse en gel d'agarose

6.3.14. Purification d'ADN à partir de gel d'électrophorèse par l'utilisation du kit "EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (*Bio Basic Inc.*)"

6.3.15. Clonage par la méthode Gateway® (Invitrogen™ *life technologies*)

6.3.15.1. BP : transfert d'un fragment d'ADN dans le plasmide d'amplification pDONR207

6.3.15.2. LR : transfert d'un fragment d'ADN dans un plasmide d'expression

6.3.16. Construction d'un microARN artificiel

6.3.17. Modification d'un nucléotide par mutagenèse dirigée, utilisation du kit "QuickChange II Site-Directed Mutagenesis" de Agilent

6.4. Protocoles de transformations stables de bactéries et de plantes

6.4.1. Transformation des bactéries

6.4.1.1. Transformation de bactéries *E. coli* par électroporation

6.4.1.2. Transformation de bactéries *A. tumefaciens* (souche AGL1) par électroporation

6.4.1.3. Transformation de bactéries *E. coli* par choc thermique

6.4.1.4. Transformation de bactéries *A. tumefaciens* (souche C58) par choc thermique

6.4.2. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens*

6.4.3. Transformation stable de *Brachypodium distachyon* via *Agrobacterium tumefaciens*

6.5. Protocoles de cytologie

6.5.1. Coloration GUS

6.5.2. Coloration de Maïle (adapté de Lorenzen et al, 1996)

6.5.3. Coloration au phloroglucinol (réactif de Wiesner)

6.5.4. Immunohistochimie

6.5.4.1. Prélèvements et préparation des échantillons

6.5.4.2. Fixation des échantillons

6.5.4.3. Déshydratation

6.5.4.4. Imprégnation dans la résine

6.5.4.5. Inclusion dans la résine

6.5.4.6. Réalisation de coupes des échantillons pour observations en microscopie photonique

6.5.4.7. Immunomarquages

6.6. Protocoles d'analyse biochimique des polysaccharides pariétaux

6.6.1. Préparation de matériel insoluble à l'alcool (MIA)

6.6.2. Dosage des oses neutres

6.6.3. Dosage des oses acides

6.6.4. Dosage de l'amidon

6.7. Protocoles d'analyse biochimique des lignines et des composés hydroxycinnamiques

6.7.1. Obtention du résidu pariétal (RP)

6.7.2. Dosage des lignines par Lignine-Klason

6.7.3. Répartition des lignines par thioacidolyse

6.7.4. Dosage des composés hydroxycinnamiques par hydrolyse alcaline

6.7.5. Acidolyse

6.7.6. Pyrolyse alcaline

6.7.7. Dosage des acides phénoliques par HPLC

6.8. Protocoles d'analyse biochimique des protéines

6.8.1. Quantification de protéines par dosage "BCassays Protein Quantification" (Interchim.com)

6.8.2. Electrophorèse SDS PAGE

6.8.3. Production de protéines recombinantes

6.8.4. Purification d'une protéine recombinante par chromatographie d'affinité

6.8.4.1. Extraction des protéines recombinantes

6.8.4.2. Purification des protéines par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel

6.8.5. Dosage de l'activité enzymatique d'une COMT

6.8.5.1. Mesure d'activité enzymatique par fluorescence (adapté de Palmer et al 2010)

6.8.5.2. Dosage d'activité enzymatique par HPLC

Liste des figures :

Figure 1 : Les céréales les plus cultivées dans le monde (photographies : www.wikipedia.org)

Tableau 1 : Utilisation des céréales dans le monde

Tableau 2 : Utilisation du blé dans le monde

Tableau 3 : Utilisation du maïs dans le monde

Figure 2 : La production de bioéthanol de première génération

Figure 3 : La production de bioéthanol de seconde génération

Figure 4 : Les Poacées utilisées dans le processus de production du bioéthanol de seconde génération

Figure 5 : Paroi végétale de *Tsuga canadensis* observée au microscope électronique à transmission

Tableau 4 : Différences de composition entre la paroi primaire et secondaire des Poacées et des Eudicotylédones

Figure 6 : Place de *B. distachyon* au sein des *Poaceae*

Figure 7 : Relation de synténie entre les chromosomes de *B. distachyon* et ceux de céréales cultivées, le sorgho, l'orge et le blé

Figure 8 : Arbre phylogénétique représentant l'évolution des différentes espèces appartenant au genre *Brachypodium*

Figure 9 : Anatomie de *B. distachyon* au stade reproductif

Figure 10 : Les différents stades de développement de *B. distachyon* et leur durée dans les conditions de culture de l'IJPB de l'INRA de Versailles

Tableau 5 : Comparaison de différents caractères entre *B. distachyon*, *A. thaliana* et des céréales cultivées

Figure 11 : Section transversale d'une tige mature de *B. distachyon* schématisée

Figure 12 : Faisceau vasculaire de *B. distachyon* observé au microscope à épifluorescence

Tableau 6 : Composition de la paroi végétale des tiges matures de *B. distachyon* Bd21-3 en oses neutres

Figure 13 : L'épaisseur de la paroi des cellules et la détection des lignines augmentent avec l'élongation des entrenœuds des tiges

Figure 14 : Comparaison du grain de *B. distachyon* (génotype Bd21) et du grain de blé mature

Figure 15 : Section transversale du grain de *B. distachyon* (génotype Bd21-3) mature observée au microscope

Figure 16 : Comparaison schématique des grains secs de maïs, de riz et de *B. distachyon*

Tableau 7 : Composition des grains matures secs de *B. distachyon*

Figure 17 : Représentation de la structure d'une chaîne de cellulose

Figure 18 : Représentation de la synthèse de celluloses et de leur assemblage en microfibrilles par une rosette de CESA dans la membrane plasmique des cellules végétale

Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines pectiques connus et de leurs compositions

Figure 20 : Représentation schématique de la composition de différentes hémicelluloses rencontrées dans les parois végétales de diverses espèces

Figure 21 : Représentation schématique de la composition des xylanes des Eudicotylédones et des Poacées

Figure 22 : Structure des xylanes présents dans les différents tissus du grain de blé mature

Figure 23 : Synthèse des xylanes dans l'appareil de Golgi des Poacées

Tableau 8 : Structure des trois monomères de lignines

Figure 24 : Les différentes liaisons entre les monomères existant dans les lignines. R : H ou OCH₃

Figure 25: Voie de biosynthèse des lignines chez les Eudicotylédones et chez les Poacées

Figure 26 : Modèle de la structure chimique de lignines de Poacées

Figure 27 : Synthèse, transport et polymérisation des lignines au sein d'une cellule végétale.

Tableau 9 : Structure des principaux acides hydroxycinnamiques rencontrés dans les parois des végétaux

Figure 28 : Schéma de la paroi secondaire des Poacées et des différentes liaisons intervenant entre les acides hydroxycinnamiques, les lignines et les arabinoxylanes

Figure 29 : Synthèse de l'AF en parallèle de la synthèse des lignines

Figure 30 : Schéma de la synthèse des phénylpropanoïdes chez les plantes

Figure 31 : Plante Bd21-3 en cours d'épiaison

Figure 32 : Sections transversales de tiges de *B. distachyon* génotype Bd21-3 observées en fond clair au microscope optique

Figure 33 : photographies de plantes à 60 jours après semis et de plantes sèches en serre avant prélèvements ou récolte

Figure 34 : Grain mature sec de *B. distachyon*, génotype Bd21-3

Figure 35 : Grain de *B. distachyon* génotype Bd21-3 au cours de son développement

Figure 36 : Evolution de la masse du grain entier de *B. distachyon* de génotype Bd21 au cours de son développement en chambre de culture

Tableau 10 : Quantification des lignines des tiges de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par la méthode lignine-Klason réalisée sur plusieurs cultures issues de serres

Tableau 11 : Quantification des lignines contenues dans les grains matures secs, les enveloppes disséquées et les albumens décortiqués de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par dosage au bromure d'acétyle

Tableau 12 : Détermination de la composition des lignines par CPG-SM après thioacidolyse des RP de tiges matures et sèches de *B. distachyon* génotype Bd21-3 issues de différentes cultures

Tableau 13 : Détermination de la composition des lignines par CPG-SM après thioacidolyse des grains matures secs entiers, des enveloppes de grains matures secs entiers et des albumens décortiqués de *B. distachyon* génotype Bd21-3

Tableau 14 : Dosage des acides *p*-coumarique et férulique dans les tiges de plusieurs cultures de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par CPG-SM après thioacidolyse

Tableau 15 : Dosage des esters d'acides *p*-coumarique et férulique dans les tiges et dans les grains, enveloppes et albumens de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par HPLC après hydrolyse alcaline douce

Tableau 16 : Dosage des acides hydroxycinnamiques et liés aux arabinoses par acidolyse douce réalisée sur le grain entier de Bd21-3

Tableau 17 : Dosage d'amidon et de β -glucanes contenus dans les MIA des grains entiers secs matures de *B. distachyon* génotype Bd21-3

Figure 37 : sections transversales de tiges (40 JAG) de *B. distachyon* Bd21-3 observées en fond clair sans coloration à grossissements après coloration de Maïle à grossissements et après coloration au phloroglucinol

Figure 38 : sections transversales de grains matures de *B. distachyon* Bd21-3 observées sans coloration après coloration de Maïle, après coloration au phloroglucinol

Figure 39 : Détection des lignines dans les grains matures secs par immunomarquages avec les anticorps KM1 (a), KM2 (b) et KM3 (c).

Figure 40 : Sections transversales de grains de Bd21-3 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps AX1

Figure 41 : Section transversale de tiges de Bd 21-3 à 60 jours après semis marquée par l'anticorps AX1

Figure 42 : Sections transversales de grains de Bd21-3 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara

Figure 43 : Sections transversales de grains de Bd21-3 matures secs traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara

Figure 44 : Section transversale de tiges de Bd21-3 à 60 jours après semis marquée par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara

Figure 45 : Sections transversales de grain de Bd21-3 à 11, 21, 31 JAA et mature sec traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps INRA-COU1

Figure 46 : Section transversale de tige à 60 jours après semis marquée par l'anticorps INRA-COU1

Tableau 18 : Description de la nomenclature utilisée pour les COMT de *B. distachyon* et du nombre d'acides aminés composant la séquence protéique prédite

Figure 47 : Arbre phylogénétique des COMT contenant toutes les séquences codant pour une COMT chez *A. thaliana*, *O. sativa*, *B. distachyon* et les séquences de COMT de plantes connues comme étant impliquées dans la synthèse des lignines

Figure 48 : Alignement des séquences protéiques de COMT d'ivraie, de luzerne et de *B. distachyon*.

Tableau 19 : Conservation des résidus aminés importants dans l'activité enzymatique d'une COMT impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines chez les COMT identifiées chez *B. distachyon*

Figure 49 : Structure des ORF de *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3* et *BdCOMT6*

Figure 50 : Validation des ORF des gènes *COMT* et étude de leur expression dans la tige et le grain de Bd21-3

Figure 51 : Quantification de l'expression des gènes codant pour une COMT par hybridation sur puce Affymetrix dans les tiges et les grains de *B. distachyon* (Bd21)

Figure 52 : Schéma représentant les différentes étapes du TILLING

Tableau 20 : Mutants TILLING du gène *BdCOMT6*

Figure 53 : Chromatogrammes de séquençage de produits de PCR pour le génotypage de la lignée 6840

Tableau 21 : Récapitulatif des plantes homozygotes trouvées pour chaque lignée mutée

Figure 54 : Coupes des tiges de plantes sauvages (Bd21-3) et des mutants homozygote et azygote colorées au Maïle et au phloroglucinol-HCl

Tableau 22 : Teneur en lignine Klason mesurée sur les tiges des mutants *BdCOMT6* et de leurs témoins sauvages

Tableau 23 : Résultats de thioacidolyse réalisée sur les tiges des mutants de BdCOMT6 et de leurs contrôles sauvages

Tableau 24 : Teneurs en acides férulique et *p*-coumarique mesurées sur les tiges des mutants BdCOMT6 et de leurs contrôles sauvages par HPLC après hydrolyse alcaline douce

Tableau 25 : Dosage d'acides férulique et *p*-coumarique libérés après thioacidolyse et mesurés par GC-SM

Figure 55 : Comparaison du phénotype de Bd21-3 sauvage au mutant homozygote 5139 au stade floraison

Tableau 26 : Composition des résidus pariétaux des grains secs et des tiges de sauvage et du mutant 5139 obtenue après pyrolyse analytique couplée à une CPG-SM

Tableau 27 : Etude de la teneur et de la composition des lignines des tiges et des grains du mutant 5139 et de plantes sauvages par Lignine Klason et bromure d'acétyle, suivie d'une thioacidolyse

Tableau 28 : Composition des résidus pariétaux des grains secs et de tiges de plantes sauvages, de mutants 5139 et de mutants 7549 obtenue par hydrolyse alcaline couplée à une HPLC

Tableau 29 : Composition des résidus pariétaux des grains secs de témoins et de mutant 5139 obtenue après acidolyse douce

Tableau 30 : Dosage d'oses neutres totaux présents dans les résidus pariétaux des grains entiers secs de mutants 5139 et de *B. distachyon* (Bd21-3)

Tableau 31 : Distribution des oses neutres présents dans les résidus pariétaux de grains entiers secs des mutants 5139 et de la plante sauvage Bd21-3

Tableau 32 : Dosage amidon contenu dans les MIA de grains de Bd21-3 sauvage et mutant

Figure 55: Sections transversales de grain de mutant BdCOMT6 5139 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps AX1, reconnaissant les arabinoxylanes

Figure 56 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 JAG marquée par l'anticorps AX1, reconnaissant les arabinoxylanes

Figure 57 : Sections transversales de grain de mutant BdCOMT6 5139 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti 5-O-Fer-Ara, reconnaissant l'acide férulique lié aux arabinoxylanes

Figure 58 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 jours après semis marquée par l'anticorps anti 5-O-Fer-Ara, reconnaissant l'acide férulique liés aux arabinoxylanes

Figure 59 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 jours après semis marquée par l'anticorps INRA-COU1, reconnaissant l'acide *p*-coumarique

Figure 60 : Détection des lignines dans les grains matures secs mutant BdCOMT6 5139 par immunomarquages avec les anticorps KM1, KM2 et KM3

Tableau 33 : Dosage de la masse perdue et d'anhydroglucose libéré par saccharification réalisée sur MIA de tiges de *B. distachyon* sauvage et mutant 5139

Figure 61 : Expression des gènes codant pour une COMT dans la tige et dans le grain RT-PCR réalisées avec des amorces spécifiques aux gènes *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3*, *BdCOMT6*

Figure 62 : Schéma théorique de l'activité enzymatique COMT mesurée par fluorescence (Palmer et al, 2010)

Figure 63 : gels SDS PAGE des productions à 20°C et 37°C de la COMT sauvage et mutée 5139 colorés au bleu de Coomassie

Figure 64 : Exemple de chromatogramme obtenu lors d'une purification de la protéine BdCOMT6 recombinante sur colonne de Nickel en tampon Tris HCl avec gradient d'imidazole

Figure 65 : Exemple de résultat obtenu après suivi de l'activité enzymatique de la COMT sauvage et mutée par HPLC

Figure 66 : Alignement des séquences protéiques de COMT d'ivraie (Lp), de maïs (Zm), de sorgho (Sb), de miscanthus (Ms) et de *B. distachyon* (BdCOMT6)

Figure 67 : Sections transversales de tige d'*A. thaliana* sauvage, mutante *Atomt1* et *Atomt1* complémentées par BdCOMT6 sauvage et mutée observées après coloration de Maïle

Tableau 34 : Résultats de thioacidolyse réalisée sur les tiges sèches des *A. thaliana* sauvages (écotype Col-0), mutants *Atomt1* et mutants *Atomt1* complémentés par le gène *BdCOMT6* forme sauvage et mutée

Tableau 35 : Dosage de flavonoïdes réalisée sur des plantules de *A. thaliana* sauvages (Col-0), mutants *Atomt1* et mutants *Atomt1* complémentés par le gène *BdCOMT6* forme sauvage et mutée

Tableau 36 : Nomenclature utilisée pour nommer les CCoAOMT de *B. distachyon*

Figure 68 : Positionnement des loci des gènes codant pour une CCoAOMT sur le chromosome 3 de *B. distachyon*

Figure 69 : Représentation de la structure des gènes codant pour une CCoAOMT chez *B. distachyon*

Figure 70 : arbre phylogénétique des CCoAOMT de *A. thaliana*, de *B. distachyon*, de *O. sativa* et de maïs (Zm), de pin (Pr), de tabac (Nt), de faux-mimosa (Ll), de luzerne (Ms) et de peuplier (Pt)

Figure 71 : Alignement des séquences protéiques des CCoAOMT de *B. distachyon*, du peuplier (*Populus trichopora*) et du faux mimosa (*Leucaena leucocephala*) par CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Figure 72 : Quantification de l'expression des gènes codant pour une CCoAOMT par hybridation sur puce AFFYMETRIX dans la tige à 60 jours après germination, le grain entier et l'albumen à 11 et 31 jours après anthesis

Figure 73 : expression des sept CCoAOMT dans les différents organes de *B. distachyon* (Bd21-3)

Tableau 37 : Liste des lignées mutées identifiées pour les gènes codant pour une CCoAOMT chez *B. distachyon*

Figure 74 : Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée JJ10641 par PCR

Figure 75 : Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée JJ6117 par PCR

Figure 76 : Modification d'OsaMiR528 en amiARN1 et amiARN5

Figure 77 : Fonctionnement d'un miARN au sein d'une cellule végétale

Figure 78 : Localisation des régions ciblées par l'amiARN1 sur le gène *BdCCoAOMT7* (locus Bradi4g33340) et l'amiARN5 sur les gènes *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT5*, *BdCCoAOMT6* et *BdCCoAOMT1* (locus Bradi3g39380, Bradi3g39390, Bradi3g39400, Bradi3g39410 et Bradi3g39420)

Figure 79 : Racine, feuille, tige et grain de Bd21-3 contenant une construction GUS sous contrôle d'un promoteur BdGLU du gène codant une gluténine de *B. distachyon*

Figure 80 : transformation stable de *B. distachyon* par *A. tumefaciens*

Figure 81 : Observation de la lignification des tiges des individus T0 après coloration au phloroglucinol-HCl

Tableau 38 : Composition phénolique des tiges des lignées T0 amiARN5

Figure 82 : Expression du gène *BdCCoAOMT4* et du gène de ménage *BdSamDC* dans les tiges des lignées transformées avec amiARN5

Figure 83 : Sections de tige de lignées *B. distachyon* Bd21-3 sauvage et exprimant l'amiARN5 (543, 591 et 594) colorées au phloroglucinol

Tableau 39 : Liste des amorces utilisées

Figure 84 : Modification des séquences du miARN OsaMiR528

Figure 85 : Modification d'une séquence d'ADN par mutagenèse dirigée

Figure 86 : Photographies d'embryons de Bd21-3 à différents stades de croissances

Figure 87 : Photographies de cals embryogènes et non embryogènes

Figure 88 : Photographies de cals transformés et non transformés

Figure 89 : Photographie de plante en régénération

Figure 90 : Photographie de plantes en phase d'enracinement

Figure 91 : Photographie de plante transformée, régénérée et transférée en serre depuis trois semaines

Figure 92 : Rupture des liaisons ester et d'une partie des liaisons éther (β -O-4) par thioacidolyse

Figure 93 : Rupture des liaisons ester par hydrolyse alcaline douce

Liste des abréviations utilisées :

AF : Acide férulique

AX : Arabinoxylane

BAHD : BEAT pour benzyalcool O-acétyltransférase, AHCT pour anthocyanine O-hydroxycinnamoyltransférase, HCBT pour anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase et DAT pour déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase

CCoAOMT : cafféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase

COMT : acide cafféique/acide 5-hydroxyférulique O-méthyltransférase

CSL : Cellulose-synthases like

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

GAX : Glucurono-arabino-xylanes

GT : Glycosyltransférase

IFPEN : Institut Français du Pétrole-Energies Nouvelles

INSEE : Institut National des Statistiques et des Etudes Economiques

pAC : Acide *p*-coumarique

PARSE : Paroi Secondaire

PVPP : Paroi Secondaire et Polysaccharides Pariétaux

RFA : Renewable Fuel Association

SCEES : Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques

USDA-ARS : United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service

En Préambule :

Ce travail de doctorat a été réalisé dans deux équipes, l'équipe « Paroi Secondaire » (PARSE), localisée à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Versailles et l'équipe « Parois Végétales et Polysaccharides Pariétaux » (PVPP) localisée au sein de l'unité Biopolymères, Interactions et Assemblages (BIA) de l'INRA de Nantes. L'équipe PARSE s'intéresse à la croissance des plantes et la mise en place de la paroi dans les tissus lignifiés en particulier dans les tiges des Poacées, tandis que l'équipe PVPP s'intéresse à la mise en place des parois dans les organes à usage alimentaire et en particulier dans les grains des céréales.

Trois autres équipes ont également contribué à ce travail, l'équipe « Biopolymères Lignocellulosiques : des Assemblages Pariétaux aux Synthons pour la Chimie Verte » de l'IJPB à l'INRA de Versailles, l'équipe « Biologie Cellulaire et Régénération » de l'IJPB à l'INRA de Versailles et la plateforme de TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale d'Evry.

Chapitre 1 : Introduction générale

Introduction générale

Dans le monde, près de 700 millions d'hectares de céréales sont cultivés, ce qui représente plus de 15% de la surface agricole mondiale. Les céréales sont des plantes appartenant à la famille des Poacées, anciennement appelée Graminées. Elles sont cultivées majoritairement pour leurs grains et leur culture a fortement contribué à l'essor de la civilisation humaine. Les cellules végétales sont entourées par une paroi lignocellulosique dont la nature dépend de l'espèce, de l'organe, du type cellulaire et du stade de développement de la plante. Les caractéristiques des parois influencent grandement l'usage des productions végétales et l'amélioration de nos connaissances sur la paroi peut faciliter l'exploitation des ressources lignocellulosiques. Ce travail de thèse a donc consisté en l'étude de la synthèse de certains composés de la paroi, les acides hydroxycinnamiques qui partagent des étapes avec la production de lignines dans la plante. Plus particulièrement, notre intérêt s'est porté sur la synthèse de l'acide férulique (noté AF) chez les Poacées, composé ayant un rôle essentiel dans la structure et les propriétés des parois puisqu'il renforce la paroi en liant les xylanes aux lignines.

Les objectifs de cette thèse de doctorat sont de déterminer :

- quels sont le ou les gènes impliqués dans la synthèse de l'AF *in planta* ?
- est-ce que ces gènes sont les mêmes dans la tige et dans le grain des Poacées ?
- est-ce que ces gènes sont les mêmes que ceux impliqués dans la synthèse des monolignols ?

Pour répondre à ces questions, une stratégie de type génétique inverse a été mise en place.

Le premier chapitre de mon manuscrit de thèse dresse un état des lieux de la place occupée par les Poacées dans le monde. Il explique le choix de la plante modèle utilisée et des différents avantages qu'elle procure à cette étude. Ce chapitre fait le point des connaissances actuelles sur les parois de Poacées et plus précisément sur les hémicelluloses, les acides hydroxycinnamiques et les lignines.

Le second chapitre expose les résultats d'analyses obtenus à partir de grains et de tiges de la plante modèle *B. distachyon* dans le but d'explicitier le choix des différents stades de développement qui ont été étudiés au cours de ce travail.

Ce chapitre permet également de faire le point des connaissances sur les méthodes de culture, le développement et l'histologie de la plante modèle.

Le troisième chapitre répond à la question du rôle de la COMT dans la synthèse de l'AF chez la plante modèle *B. distachyon*. Le choix du gène candidat, la génération de mutants et leur analyse biochimique et cytologique y sont détaillés.

Le quatrième chapitre discute du rôle des CCoAOMT dans la synthèse de l'AF. Après avoir choisi les gènes candidats, différents mutants ont été analysés et générés. L'analyse préliminaire de ces derniers mutants y est discutée.

Finalement, une analyse critique de la stratégie menée et des résultats obtenus est présentée dans le cinquième chapitre.

Les différents protocoles utilisés et les informations techniques nécessaires à la réalisation de l'ensemble du travail expérimental sont regroupés en fin de manuscrit (Chapitre 6).

Par ailleurs, mon travail de thèse a fait l'objet de deux publications scientifiques dans des journaux à comité de lecture. Ces publications sont jointes en annexes.

1 - Dalmais M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, d'Yvoire MB, Cézard L, Légée F, Blondet E, Oria N, Brunaud V, Jouanin L, Höfte H, Bendahmane A, Lapierre C, Sibout R. A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. PloS One, 2013 June 19.

2 - Ho-Yue-Kuang S, Alvarado C, Antelme S, Bouchet B, Cézard L, Lebris P, Légée F, Maia-Grondard A, Yoshinaga A, Saulnier L, Guillon F, Lapierre C, Sibout R, Chateigner-Boutin A-L. Mutation in *Brachypodium* caffeic acid O-methyl transferase 6 alters stem and grain lignins and improves straw saccharification without deteriorating grain quality. *JExBot*, acceptée en octobre 2015.

Ce travail a également été présenté sous forme de posters et de communications orales à l'occasion de congrès nationaux et internationaux :

1- Journées de la Société française de biologie végétale, Tours, juin 2014 : Ho-Yue-Kuang S, Dalmais M, Antelme S, le Bris P, Lapierre C, Sibout R et Chateigner-Boutin AL.

Identification par TILLING et étude de mutants ponctuels de l'acide caféique O-méthyltransférase chez la plante modèle des céréales *Brachypodium distachyon*. Communication orale.

2- 10^{èmes} Journées du Réseau Français des Parois, Amiens 7-9 juillet 2014. Ho-Yue-Kuang S, Dalmais M, Antelme S, le Bris P, Lapierre C, Sibout R et Chateigner-Boutin AL. Identification par TILLING et étude de mutants ponctuels de l'acide caféique O-méthyltransférase chez la plante modèle des céréales *Brachypodium distachyon*. Communication orale (sélection).

3- 1st international Brachypodium conference, Modène Italie, 19-21 juin 2013 : Ho-Yue-Kuang S, Dalmais M, Bouvier d'Yvoire M, Antelme S, Chateigner-Boutin AL, Lapierre C, Jouanin L and Sibout R. Identification and study of *Brachypodium distachyon* COMT TILLING mutants. Poster.

4- XIII Cell wall meeting, Nantes, 7-12 juillet 2013 : Ho-Yue-Kuang S, Dalmais M, Bouvier d'Yvoire M, Antelme S, Chateigner-Boutin AL, Lapierre C, Jouanin L and Sibout R. Identification and study of *Brachypodium distachyon* COMT TILLING mutants. Poster.

Synthèse bibliographique

1.1. Généralités sur les Poacées

1.1.1. Intérêt de l'étude des Poacées

Les céréales sont des plantes appartenant à la famille des Poacées, anciennement appelée Graminées, cultivées majoritairement pour leurs grains. Ce sont des plantes annuelles dont les grains sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale sous forme entière ou de farines plus ou moins raffinées. Leurs pailles servent également de fourrage dans l'alimentation des ruminants, tout comme les céréales ensilées telles que certaines variétés de maïs, de sorgho et de triticales. La culture des céréales est l'une des premières activités agricoles menée par l'espèce humaine et a contribué à l'essor de la civilisation humaine. La domestication des Poacées suivie de la sélection variétale exercée par l'homme a entraîné l'amélioration et la création d'espèces qui sont à l'heure actuelle nos principales cultures et constituent la base de notre alimentation.

1.1.1.1. La production des céréales dans le monde

Dans le monde, 690 millions d'hectares de céréales sont cultivés, ce qui représente plus de 15% de la surface agricole mondiale. En 2014, plus de 2,5 milliards de tonnes de céréales ont été produites (source FAO). La Chine est le premier producteur de céréales au monde avec 457 millions de tonnes produites en 2011. Elle est suivie par les Etats-Unis avec 384 millions de tonnes et de l'Europe avec 287 millions de tonnes en 2011.

La France est le premier producteur de céréales au sein de l'Union Européenne et occupe la sixième position au niveau mondial. En 2014, La France a produit plus de 70 millions de tonnes de céréales principalement sous forme de blé (39 millions de tonnes), de maïs (16 millions de tonnes), d'orge (11,5 millions de tonnes), de triticale –amphiploïde de blé et de seigle- (2 millions de tonnes). La production d'avoine, de sorgho et de seigle est présente bien que moins importante avec un peu moins de 1 million de tonnes produites (source SCEES).

Le maïs (*Zea mays*) est la première céréale produite au monde (figure 1). Plus de un milliard de tonnes de maïs ont été produits en 2014 (source FAO).



Figure 1 : Les céréales les plus cultivées dans le monde (photographies : www.wikipedia.org).

Cette céréale est importante dans l'alimentation de nombreux pays mais est surtout utilisée pour l'alimentation animale (bovins, porcs, volailles). Elle possède en outre de nombreuses applications industrielles telles que la transformation en isoglucose (ou sirop de maïs fortement employé dans l'industrie agroalimentaire) ou encore la production de bioéthanol. Disposant d'une grande variabilité génétique, le maïs peut être cultivé sous des climats tropicaux, subtropicaux et également sous des climats tempérés.

Le blé (*Triticum aestivum*) est la deuxième céréale la plus cultivée dans le monde en 2014 (figure 1) avec une production de 716 millions de tonnes (source FAO). Le blé est la principale céréale cultivée en Europe. Il est en grande partie destiné à l'alimentation humaine et animale. Les utilisations non-alimentaires pour la production d'amidon et d'éthanol sont également importantes. La culture du blé peut se faire sous plusieurs types de climat (tempéré et subtropical) grâce à une grande variabilité génétique permettant une adaptation à diverses contraintes environnementales.

Le riz (*Oryza sativa*) est la troisième céréale la plus cultivée en 2014 avec une production mondiale atteignant 496 millions de tonnes (source FAO) (figure 1). Cette céréale constitue l'alimentation de base de la moitié de la population humaine mondiale. Elle est produite principalement en Asie (en Chine, en Inde, en Indonésie et au Pakistan) du fait des spécificités de sa culture. Elle nécessite en effet un milieu riche en eau et beaucoup de main d'œuvre par rapport aux autres céréales cultivées.

L'orge (*Hordeum vulgare*) est la quatrième céréale la plus cultivée au monde (figure 1). En 2013, 138 millions de tonnes ont été produites (source FAO) principalement en Europe et en Russie. Cette céréale des régions tempérées s'est également adaptée et est tolérante à une culture dans les zones arides et semi-arides de l'Asie, du Moyen-Orient et de l'Amérique du Nord. Ses utilisations principales sont l'alimentation humaine sous forme de farine, l'alimentation animale et la production de boissons alcoolisées sous la forme de malt.

Le sorgho (*Sorghum bicolor*) est la cinquième céréale la plus cultivée au monde (figure 1). En 2010, 62,4 millions de tonnes de sorgho ont été produites (source FAO). La majorité des variétés de sorgho tolère la chaleur et la sécheresse et redémarre mieux que les autres espèces de céréales après ces stress. Le sorgho peut donc être cultivé en climat tempéré, tropical et aride et sec.

Tableau 1 : Utilisation des céréales dans le monde (sources : FAO et Conseil International des Céréales, rapport du 26 mars 2015). Chiffres donnés en millions de tonnes.

Années	Alimentation humaine	Alimentation animale	Industrie	Utilisation mondiale	Production mondiale
2004/2005	968,3	744,5	316,1	2028,9	2065,3
2013/2014 (estimation)	646,3	843,3	316,9	1933,7	2334,6

Tableau 2 : Utilisation du blé dans le monde (sources : FAO et Conseil International des Céréales, rapport du 26 mars 2015). Chiffres donnés en millions de tonnes.

Années	Alimentation humaine)	Alimentation animale)	Industrie	Utilisation mondiale	Production mondiale
2004/2005	437,8	111,2	70,5	619,5	632,1
2013/2014 (estimation)	472,3	131,8	21,5	696,3	716,6

Tableau 3 : Utilisation du maïs dans le monde (sources : FAO et Conseil International des Céréales, rapport du 26 mars 2015). Chiffres donnés en millions de tonnes.

Années	Alimentation humaine	Alimentation animale	Industrie	Utilisation mondiale	Production mondiale
2004/2005	122,9	444,8	126,1	693,8	709,4
2013/2014 (estimation)	104,7	549,0	257,1	946,9	1121,4

Cette céréale est principalement cultivée dans les zones arides, il possède un niveau d'exploration et de prélèvements des réserves en eau du sol supérieur à celui du maïs bien que son besoin en eau soit similaire à celui du maïs. Le grain de sorgho est une ressource alimentaire importante en Afrique et en Asie et les variétés de sorghos sucriers sont également utilisées dans la production de boissons alcoolisées et de biocarburant par fermentation des tiges riches en saccharose.

1.1.1.2. L'utilisation des céréales dans le monde

En 2014, il a été produit plus de 2500 millions de tonnes de céréales. La production mondiale de céréales tend à augmenter, de même que la quantité utilisée (source FAO). Ces dernières années, l'utilisation des céréales a beaucoup changé. Alors qu'en 2004/2005, 47,7% de la consommation mondiale de céréales étaient liée à l'alimentation humaine, elle n'est plus que de 33,4% en 2013/2014. L'effet inverse est observé quant à l'utilisation des céréales consommées pour l'alimentation animale puisqu'elle passe de 36,7% en 2004/2005 à 43,6% en 2013/2014 ; ceci est sans doute lié à l'augmentation de la consommation de viande dans les pays émergents. En revanche, l'utilisation des céréales dans l'industrie tend à stagner à 16% des céréales utilisées (tableau 1).

Si l'on regarde les résultats de plus près, la répartition de l'utilisation du blé est modifiée (tableau 2). Une légère diminution de l'utilisation du blé pour l'alimentation humaine (meunerie, amidonnerie, semoulerie) est observée (de 70,6% en 2004/2005 à 67,8% en 2013/2014) et une légère augmentation de son utilisation dans l'alimentation animale (de 17,9% en 2004/2005 à 18,9% en 2013/2014). Dans ce dernier cas, il s'agit principalement de variétés de blé sélectionnées spécifiquement pour l'alimentation animale, possédant une forte productivité mais n'étant pas panifiables. Dans l'industrie non alimentaire, un fort recul de l'utilisation du blé est observé ces dernières années (11,4% en 2004/2005 et 3% en 2013/2014). L'utilisation du blé est ici principalement reliée à l'éthanolerie et à la production de biocarburant. L'usage du blé est petit à petit supplanté par celui du maïs qui fournit de meilleurs rendements dans ce domaine.

L'exploitation du maïs connaît également de grandes modifications. En dix années, son utilisation et sa production ont augmenté d'un tiers.

La part de la production dirigée vers l'alimentation humaine était en 2004/2005 de 17,7% la production, elle est de 11,1% en 2013/2014. Son utilisation dans l'alimentation animale a diminué puisqu'elle passe de 64,1% en 2004/2005 à 58% en 2013/2014. Son utilisation dans l'industrie non alimentaire a en revanche considérablement augmenté puisque de 18,2% utilisés dans ce domaine en 2004/2005, elle passe à 27,2% en 2013/2014. Ceci est en partie dû à la forte augmentation de la quantité de maïs cultivée et son utilisation dans la production de biocarburants.

L'augmentation de la production mondiale de céréales est essentiellement due à l'augmentation de la production du maïs et des céréales à visée non alimentaire (tableaux 1 et 3). La production de céréales pour l'alimentation humaine (le blé ou de riz) stagne voire diminue (tableaux 1 et 2).

1.1.1.3. Vers une modification de l'utilisation des céréales

Ces dernières décennies, les besoins énergétiques mondiaux n'ont cessé d'augmenter. Ceci s'explique par la croissance démographique mondiale, l'émergence des pays en développement et la croissance mondiale du besoin en énergie.

En 2014, nous étions plus de 7,2 milliards d'êtres humains et il est prédit une population de plus de 9,5 milliards en 2050 et plus de 11 milliards en 2100 (source INSEE). Cette croissance serait essentiellement due à l'augmentation de la population des pays asiatiques tels que l'Inde et la Chine et des pays africains tels que le Nigéria et l'Ethiopie. A cette augmentation de population s'ajoute une augmentation du niveau de vie, de la consommation et de l'activité économique de ces pays émergents contribuant à l'augmentation de la consommation d'énergie.

L'énergie utilisée actuellement provient en grande partie de ressources non renouvelables que sont le charbon, le pétrole, les gaz naturels et l'énergie nucléaire. Ces ressources sont amenées à diminuer au cours des décennies à venir, notamment dans le cas du pétrole où les estimations actuelles prévoient une pénurie dès 2050. L'énergie hydroélectrique est actuellement la seule énergie renouvelable largement exploitée.

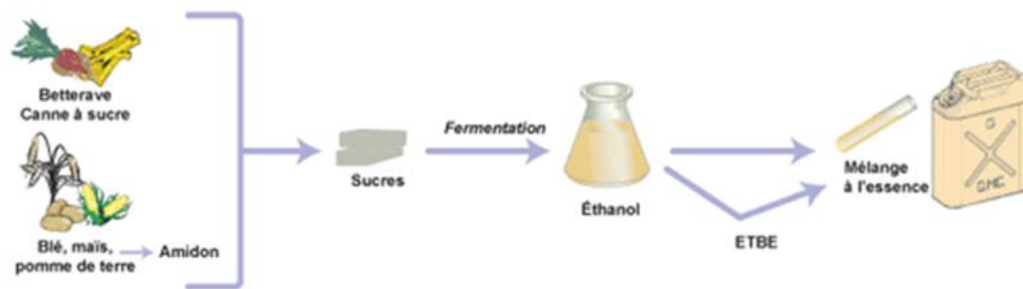


Figure 2 : La production de bioéthanol de première génération (d'après IFPEN).

Ces dernières années ont vu l'émergence de programmes de recherche et d'exploitation d'énergies alternatives afin de palier à ce problème de diminution voire de disparition des énergies fossiles. Bien que leur utilisation nécessite encore des améliorations de rentabilité, elles sont de plus en plus employées. Ces énergies alternatives comprennent l'énergie solaire qui est convertie par les cellules photovoltaïques en électricité, l'énergie du vent, des marées ou des vagues qui sont converties par des turbines en électricité, l'énergie géothermique et les bioénergies provenant de la conversion de matières végétales par incinération ou par transformation en biocarburants.

Parmi ces différentes sources d'énergie, les biocarburants pourraient remplacer les carburants fossiles actuellement utilisés pour les transports. Deux types de biocarburants co-existent, le bioéthanol et le biodiesel. Le bioéthanol est mélangé à de l'essence avant son utilisation et le biodiesel doit être mélangé au diesel sauf dans le cas de moteurs adaptés.

En effet, le bioéthanol et le biodiesel étant corrosifs, au-delà d'un mélange de 50%, il est nécessaire de procéder à une modification du moteur du véhicule en renforçant divers parties du moteur telles que la durite, le réservoir ou encore les conducteurs et autres mélangeurs. Dans ces conditions, il est possible d'utiliser 100% de bioéthanol ou de biodiesel. Des moteurs sont actuellement à l'étude.

En 2007, 49,5 milliards de litres de bioéthanol ont été produits. Cette production a doublé en 7 ans pour atteindre 93 milliards de litres en 2014 (sources Renewable Fuel Association). Les premiers producteurs sont les Etats-Unis d'Amérique suivis du Brésil puis de l'Europe parmi laquelle, la France occupe la première position (sources RFA). Plus de 58% de cette production provient des céréales et 38% de la betterave. La production de biodiesel est moins importante puisqu'en 2013, 6,8 milliards de litres de biodiesel ont été produits dans le monde, principalement en Europe (www.biodiesel.org et www.bp.com).

Le biodiesel est produit à partir des lipides contenus dans les graines de plantes oléagineuses telles que le colza, le soja et le tournesol. Ces lipides sont extraits puis transestérifiés par du méthanol afin de fournir du biodiesel. Ce biocarburant pose l'inconvénient d'être en compétition directe avec l'usage alimentaire des plantes utilisées. Sa production est par conséquent bien inférieure à celle du bioéthanol.

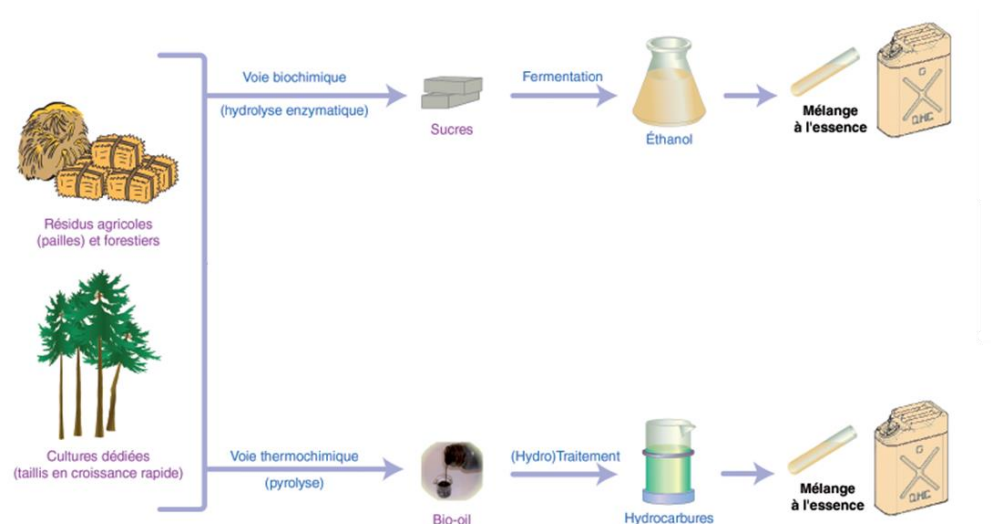


Figure 3 : La production de bioéthanol de seconde génération (d'après IFPEN).

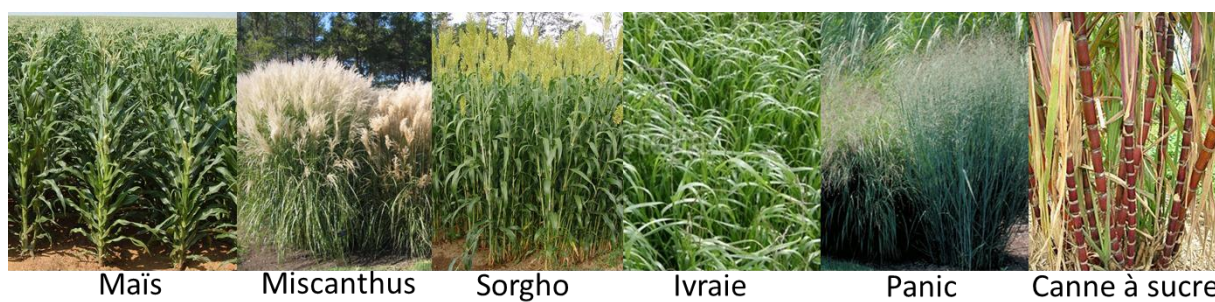


Figure 4 : Les Poacées utilisées dans le processus de production du bioéthanol de seconde génération (photographies : www.wikipedia.org).

Le bioéthanol (ou agroéthanol) de première génération est produit à partir des sucres issus des organes de réserve des plantes (figure 2). L'amidon de blé ou du maïs après hydrolyse en glucose et le saccharose de betterave ou de canne à sucre sont fermentés par des levures et aboutissent à la formation d'éthanol (Yuan et al, 2008). Cette première génération de bioéthanol est aussi sujette à controverse puisqu'elle pose le même problème que le biodiesel à savoir la compétition avec l'usage alimentaire des céréales.

Le bilan carbone est un indice permettant d'évaluer l'impact écologique de la production et de l'utilisation de carburant. Pour cela, on rapporte à un équivalent carbone tous les processus physiques qui y sont liés afin qu'ils soient convertis en production de gaz à effet de serre. Si un bilan carbone est positif alors le carburant employé est considéré comme produisant plus de polluants qu'il n'en recycle, son usage devra donc être limité. Si le bilan carbone est neutre alors le carburant recycle totalement les émissions de gaz à effet de serre. L'utilisation de biocarburant tend idéalement vers l'obtention de bilan carbone neutre voire négatif (Mathews, 2008). Dans le cas du biodiesel et du bioéthanol de première génération, les bilans carbonés sont positifs ce qui n'en font pas de bons substituts pour une utilisation à grande échelle (Yuan et al, 2008).

Le bioéthanol de seconde génération est produit à partir de la biomasse lignocellulosique (figure 3). A partir de résidus agricoles ou de cultures dédiées telles que le miscanthus, le maïs ou le peuplier (figure 4), deux méthodes permettent d'obtenir du bioéthanol. Au cours de la voie biochimique par hydrolyse enzymatique, les polysaccharides (principalement la cellulose mais aussi une partie des hémicelluloses) des parois végétales sont hydrolysés en glucose grâce à l'utilisation d'enzymes. Le glucose est ensuite fermenté en éthanol par l'action de levures (Carroll & Somerville, 2009). La seconde voie dite thermochimique permet d'obtenir du bio-oil après plusieurs étapes. Une pyrolyse, c'est-à-dire une décomposition de la biomasse lignocellulosique par la chaleur, est réalisée sur la biomasse à transformer. Cette étape est suivie d'une gazéification qui, en chauffant les résidus à plus de 1000°C en présence de vapeur d'eau ou d'oxygène, permet d'obtenir un gaz de synthèse constitué principalement de monoxyde de carbone et d'hydrogène. Un hydrotraitement est ensuite réalisé, il s'agit d'un procédé mis en place également lors du raffinage du pétrole et ayant pour but d'enlever le soufre, le dioxyde de carbone et certains métaux contenus dans les fractions usinées. La synthèse Fisher-Tropsch clôture le procédé en réalisant une transformation du gaz de synthèse purifié en bio-oil grâce à l'aide de catalyseurs.

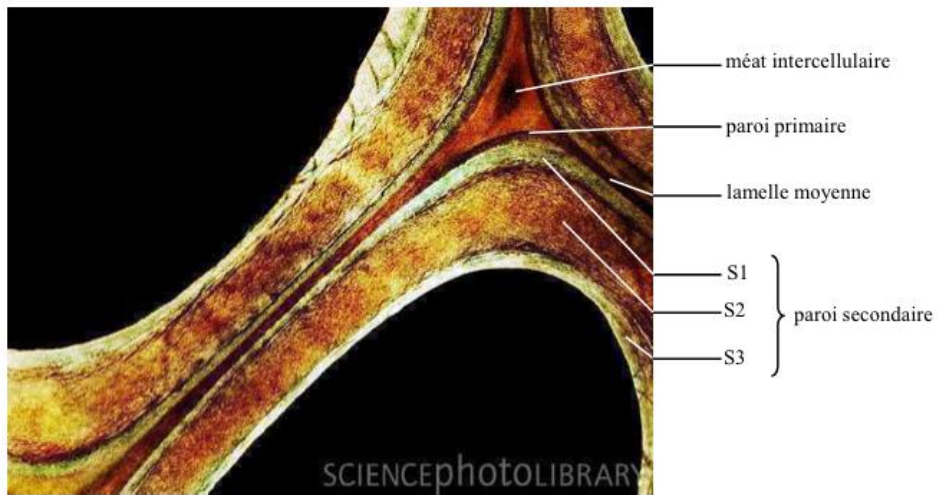


Figure 5 : Paroi végétale de *Tsuga canadensis* observée au microscope électronique à transmission (© NAS/Photo Researchers/OKAPIA).

La biomasse lignocellulosique est composée de polysaccharides pariétaux (cellulose, pectines et hémicelluloses) et de lignines. Il s'agit d'une ressource renouvelable pour la production de bioéthanol (Vanholme, 2010). L'utilisation de bioéthanol de seconde génération aurait un impact limité sur l'alimentation par rapport à l'utilisation de bioéthanol de première génération.

Enfin, le bioéthanol de troisième génération est issu de la conversion de la biomasse de micro-algues en sucres simples. Des problèmes techniques et financiers limitent encore l'utilisation industrielle de cette ressource. La génération de bioéthanol a contribué à bouleverser l'utilisation des céréales dans le monde ces dernières années. La production de céréales pour l'alimentation humaine (le blé ou le riz) stagne voire diminue actuellement au profit de la culture de céréales telles que le maïs fortement utilisé dans des procédés industriels.

1.1.2. Généralités sur les parois végétales

L'utilisation de la biomasse lignocellulosique des céréales pour la consommation comme fourrage des pailles par les animaux ou pour la production de produits dérivés tels que le bioéthanol a augmenté au cours de la dernière décennie. Afin d'en améliorer les usages, des recherches sont menées dans le but de mieux connaître la composition de la biomasse lignocellulosique issue de différentes sources et d'améliorer sa conversion en biocarburant. Les parois cellulaires végétales composent l'essentiel de la biomasse lignocellulosique.

La paroi est une spécificité structurale et fonctionnelle de la cellule végétale. Formant un cloisonnement polyédrique, la paroi est une structure rigide mais dynamique englobant les cellules végétales (figure 5). Il faudrait plutôt parler des parois végétales au pluriel puisqu'il existe une diversité de paroi selon l'espèce végétale considérée et également à l'intérieur d'une même espèce selon le type cellulaire et le stade de développement. La paroi se forme au moment de la cytodierèse, c'est-à-dire lors de la formation d'une cloison séparant deux cellules formées à la fin de la mitose.

La paroi végétale a un rôle structural majeur. Elle assure un support mécanique par son épaisseur (de 0,1 à 10 μm). Cette capacité est renforcée par la pression de turgescence qu'elle permet de maintenir. Elle confère aux cellules leur forme, leur taille et leur agencement. La paroi est également impliquée dans le phénomène de cohésion cellulaire.

De par ses propriétés mécaniques, la paroi permet aux plantes de maintenir leur port dressé. La paroi est l'une des premières barrières qui protègent la plante des agressions biotiques (attaques d'insectes, de microorganismes pathogènes) et abiotiques (stress hydrique, stress thermique). Elle revêt également un rôle de réserve dans certains organes spécifiques tels que les graines où elle sert de lieu de stockage de polysaccharides qui seront hydrolysés lors du processus de germination.

La composition générale de la paroi comprend des polysaccharides (cellulose, hémicelluloses et pectines), des protéines et dans certains tissus spécialisés des composés tels que les lignines. La composition de la paroi varie et ceci impacte directement ses caractéristiques physicochimiques (rigidité, imperméabilité) et la cohésion cellulaire.

La paroi d'une cellule se compose, de l'extérieur vers l'intérieur (voir figure 5), d'une lamelle moyenne riche en pectines et en protéines pariétales et d'une paroi primaire composée de microfibrilles de cellulose enchâssées dans une matrice de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines. Ces différentes strates se mettent en place de façon successive au cours de la croissance et du développement d'une cellule.

La lamelle moyenne se forme à la fin de la mitose, elle est donc la première strate pariétale à se mettre en place. Commune aux deux cellules filles mitoyennes, elle est issue du phragmoplaste (aussi appelé plaque cellulaire) initialement formée au moment de la télophase, lors de la division de la cellule mère. Composée essentiellement de pectines et de protéines, elle permet la cohésion entre les cellules adjacentes. Après la croissance et l'élongation cellulaire, la lamelle moyenne reste présente assurant un rôle de cohésion cellulaire.

La paroi primaire se met en place lors de la division cellulaire, où elle est synthétisée de chaque côté de la lamelle moyenne. Sa synthèse se poursuit durant l'expansion cellulaire, elle apporte renforcement, stabilité et extensibilité aux cellules en croissance (Sanchez-Rodriguez et al, 2010). Constituée de microfibrilles de cellulose enchâssées dans une matrice amorphe de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines, la paroi primaire est fortement hydrophile et élastique. Ses caractéristiques mécaniques permettent l'élongation cellulaire.

Il existe deux types de paroi primaire dans le règne végétal qui se distinguent principalement par leur teneur en pectines et leur composition en hémicelluloses. La paroi primaire de type I est caractéristique des plantes angiospermes eudicotylédones et monocotylédones à l'exception de la sous-classe des Commelinidées. Elles sont riches en pectines et en xyloglucanes (Yokoyama & Nishitani, 2004). Les céréales sont issues de la famille Poacées et font partie de ce dernier groupe. Leurs cellules possèdent une paroi primaire de type II pauvre en pectines et riches en xylanes et en glucanes mixtes (Vogel et al, 2008). L'existence d'une paroi primaire de type III, riche en mannanes et spécifiques des Ptéridophytes telles que les fougères, a été proposée (Silva et al, 2011).

La paroi primaire est retrouvée chez toutes les cellules, à l'exception de certaines cellules reproductrices comme les grains de pollen. Les cellules du parenchyme ou du collenchyme ne possèdent qu'une paroi primaire.

Chez certaines cellules possédant un rôle de soutien ou appartenant aux faisceaux conducteurs, une paroi secondaire se met en place. Autour des cellules du sclérenchyme ou du xylème par exemple, une paroi secondaire se met en place en fin d'élongation et au cours de la différenciation cellulaire. Composée de cellulose et d'hémicelluloses, la paroi secondaire vient augmenter la matrice extracellulaire et renforcer son rôle de soutien. Des lignines peuvent alors y être introduites rigidifiant l'ensemble et diminuant de façon drastique la flexibilité des parois. La paroi secondaire est constituée de plusieurs strates appelées S1, S2 et S3 qui se mettent en place successivement et sont distinguables par l'orientation des microfibrilles de cellulose qu'elles contiennent. Une fois lignifiée, la paroi secondaire est imperméable et inextensible, ne permettant plus la croissance ou l'élongation de la cellule.

Il existe deux types de paroi secondaire qui se distinguent par leur composition en hémicelluloses, en lignines et en acides hydroxycinnamiques. La paroi secondaire de type I est pauvre en pectines, riches en xylanes et en lignines. Elle contient également très peu d'acides hydroxycinnamiques. La paroi secondaire de type II est pauvre en pectines également, riches en xylanes, en lignines et en composés phénoliques (Vogel et al, 2008). D'autres polymères constitués majoritairement d'acides gras sont déposés dans les parois de certaines cellules, ce sont les cutines et les cires déposées sur la paroi de l'épiderme des feuilles et des fruits et la subérine déposée dans certaines parois des racines (Nawrath et al, 2013).

Tableau 4 : Différences de composition entre la paroi primaire de tissus en développement et la paroi secondaire des Poacées et des Eudicotylédones (issu de Vogel, 2008).

Constituants	Paroi primaire (% de matière sèche)		Paroi secondaire (% de matière sèche)	
	Poacées	Eudicotylédones	Poacées	Eudicotylédones
Cellulose	20-30	15-30	35-45	45-50
Hémicelluloses				
- Xylanes	20-40	5	40-50	20-30
- β -Glucanes mixtes	10-30	-	Mineur	-
- Xyloglucanes				
- Mannanes	1-5	20-25	Mineur	Mineur
	Mineur	5-10	Mineur	3-5
Pectines	5	20-35	0,1	0,1
Protéines structurales	1	10	Mineur	Mineur
Acides hydroxycinnamiques	1-5	Mineur (sauf chez les Caryophyllales)	0,5-1,5	Mineur (sauf chez les Caryophyllales)
Lignines	Mineur	Mineur	20	7-10
Silice	-	-	5-15	Variable

1.1.3. Différences entre les parois des Angiospermes Eudicotylédones et des Poacées

Les parois des Angiospermes Eudicotylédones sont de type I et celles des Poacées de type II. Si l'on compare la composition des parois des plantes Eudicotylédones à celles des Poacées (tableau 4), on constate que la teneur en cellulose varie peu. En revanche les teneurs en hémicelluloses, en pectines, en protéines structurales, en composés phénoliques et en lignines sont très variables (tableau 4). Les parois de type I et de type II diffèrent l'une de l'autre par leur composition en hémicelluloses. Chez les Eudicotylédones, ce sont les xyloglucanes qui sont majoritairement présents suivis des mannanes alors que chez les Poacées, ce sont les xylanes et les β -glucanes mixtes (O'Neil, 2003 ; Zablackis et al, 1995 ; Hatfield et al, 1999 ; Ebringerova et al, 2005 ; Saulnier et al, 2007 ; Vogel et al, 2008). Alors que les pectines sont des composants majoritaires des parois primaires des Eudicotylédones, elles sont peu présentes dans celles des Poacées (Ishii, 1997 ; O'Neil, 2003 ; Vogel, 2008). Il en va de même pour les protéines structurales (O'Neil, 2003 ; Zablackis et al, 1995 ; Vogel, 2008). En revanche, alors que dans les parois de type I, les acides phénoliques sont à l'état de traces, leur présence peut atteindre 5% de la masse sèche chez les Poacées (Ishii, 1997 ; O'Neil, 2003 ; Vogel, 2008). Il en va de même pour la teneur en lignines des parois de type II qui est beaucoup plus élevée que dans celle des parois de type I des Eudicotylédones (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008).

Les lignines et l'acide férulique sous forme de ponts diférulates ont été démontrées comme interférant fortement avec la conversion de la biomasse lignocellulosique (Lynd et al, 1991 ; Grabber et al, 2009). La teneur et la composition en lignines des parois et leur richesse en ponts diférulates affectent directement leur dégradation en limitant l'accès des enzymes de dégradation aux polysaccharides pariétaux (Chapple et al, 2007 ; Grabber et al, 2009 ; Vanholme et al, 2010). Afin d'améliorer les niveaux de conversion de la biomasse lignocellulosique en énergie, la diminution de la teneur en lignines et la modification des lignines sont deux pistes de recherche majeurs.

Toutes les plantes dédiées à l'alimentation humaine et animale ou à la production de bioéthanol précédemment citées appartiennent à la famille des Poacées et possèdent donc une paroi primaire de type II. Il en est de même pour la plante modèle *Brachypodium distachyon* que nous avons utilisée dans cette étude.

Brachypodium distachyon est utilisé comme plante modèle pour l'étude des céréales depuis plus d'une dizaine d'années (Draper, 2001 ; Bevan et al 2010). De plus en plus d'outils permettent l'exploitation aisée de cette plante comme modèle d'étude à grande échelle des céréales des régions tempérées.

1.2. Le choix de la plante modèle *Brachypodium distachyon*

B. distachyon (L.) P. Beauv. est une plante de la division des Angiospermes Monocotylédones appartenant au sous-clade des Commelinidées, à l'ordre des Poales, à la famille des Poacées (appelée auparavant Graminées) ou *Poaceae* en latin. *B. distachyon* appartient à la sous-famille des *Pooideae* et à l'infra-famille des *Brachypodieae*. L'infra-famille des *Brachypodieae* aurait divergé il y a 32 à 39 millions d'années des infra-familles formant le « cœur » des *Pooideae* avant leur radiation en quatre infra-familles, les *Triticeae*, à laquelle appartient le blé, les *Bromeae*, les *Aveneae* et les *Poeae* (Hsiao et al, 1994 ; Hsiao et al, 1995 ; Catalan et al, 1995 ; Catalan et al, 1997 ; Vogel et al, 2010 ; Wolny et al, 2011).

Le genre *Brachypodium* comporte quinze à dix-huit espèces dont quinze sont originaires d'Eurasie (principalement localisées dans le bassin méditerranéen) et trois sont originaires d'Amérique (principalement localisées au Mexique). Le climat de ces environnements est chaud, avec des étés secs et des hivers doux et humides.

1.2.1. Phylogénie et génomique comparative de *B. distachyon* et des céréales

La position de l'infra-famille *Brachypodieae* par rapport aux *Triticeae* et aux *Bromeae* a longtemps fait débat au sein de la communauté scientifique (Shippmann, 1991 ; Catalan et al, 1995 ; Catalan et al, 1997). Certains auteurs liaient *Brachypodium* à l'infra-famille des *Triticeae* du fait de caractères synapomorphiques, c'est-à-dire la possession de caractères dérivés partagés par plusieurs taxons, tels que la possession d'un caryopse allongé avec un hile linéaire, de grains d'amidon simples, de la présence d'une « barbe » à l'extrémité (de la glume) du grain ou d'inflorescences constituées d'épillets en forme de pointe (Dumortier, 1824 ; Ascherson & Graebner, 1901 ; Hilu & Wright, 1982 ; Clayton & Renvoize, 1986 ; Catalan et al, 1995). D'autres éléments comme la présence d'un caryopse étroitement elliptique ou la possession d'un nucelle composé d'une fine couche externe en poussaient d'autres à le lier à l'infra-famille des *Bromeae* (Harz, 1880-1882 ; Hayek, 1925).

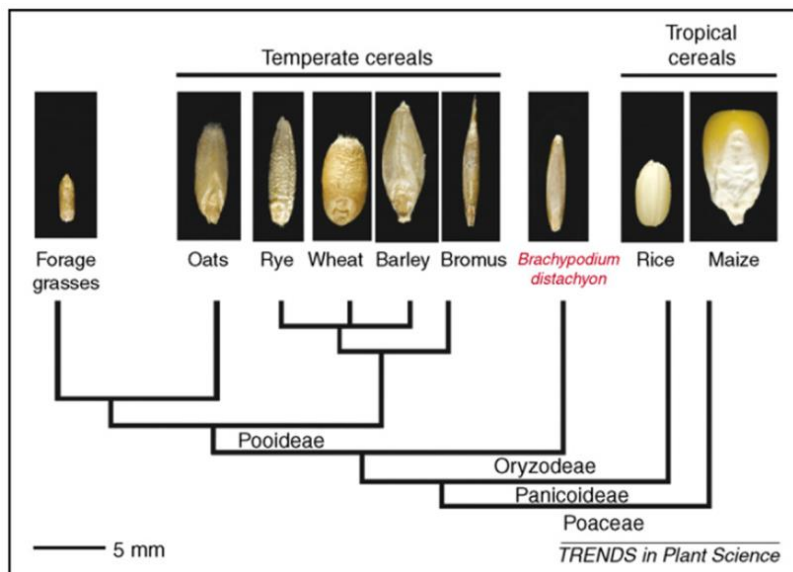


Figure 6 : Place de *B. distachyon* au sein des *Poaceae* (d'après Opanowicz et al, 2008).

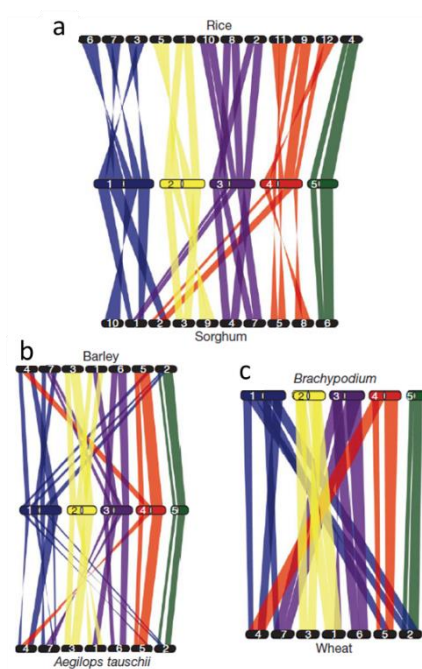


Figure 7 : Relation de synténie entre les chromosomes de *B. distachyon* et ceux de céréales cultivées, le sorgho, l'orge et le blé (issu de Vogel et al, 2010).

Les relations orthologues colinéaires sont représentées par des bandes de couleur suivant chaque chromosome de *Brachypodium* (bleu = chromosome 1 ; jaune = chromosome 2 ; violet= chromosome 3 ; rouge = chromosome 4 ; vert = chromosome 5) et les centromères sont représentés en blanc.

Cependant, des données complémentaires telles que les caryotypes, les compositions en polysaccharides, les protéines de réserve et le développement embryonnaire suggéraient que le genre *Brachypodium* appartenait à une infra-famille isolée (MacFerlane & Watson, 1982 ; Shippmann, 1991 ; Watson & Dallwitz, 1992). Ceci a été confirmé par des données moléculaires de séquences nucléaires et chloroplastiques permettant la production d'arbres phylogénétiques, remplaçant l'infra-famille des *Brachypodieae* comme un clade frère de ceux des *Triticeae* et des *Bromeae* (Soreng & Davis, 1990 ; Davis & Soreng, 1993 ; Hsiao et al, 1994 et 1995 ; Catalan et al, 1995 ; Catalan et al, 1997 ; Vogel et al, 2006).

B. distachyon se situe donc entre les céréales tropicales, telles le riz et le maïs, et les céréales des régions tempérées, telles que le blé et l'orge (figure 6). Son génome le rapproche cependant plus du blé que du riz (Huo et al. 2009 ; Vogel et al, 2010).

B. distachyon est le premier membre de l'infra-famille des *Pooideae* à être séquencé (Vogel et al, 2010). Il possède le plus petit génome reporté chez les *Poaceae* à ce jour (Draper et al, 2001 ; Vogel et al, 2010). Le génotype Bd21 ($2n = 2x = 10$) récolté en Irak, issu de la collection de lignées pures recombinantes de l'USDA-ARS (United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service) a été séquencé en 2010. Le génome nucléaire compte 272 Mpb ; il est très compact, possède un fort taux de recombinaison, et des rétrotransposons concentrés au niveau des centromères et des points de rupture de synténie, c'est-à-dire des points de rupture de la conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées (Draper et al, 2001 ; Huo et al, 2009 ; Vogel et al, 2010). Un total de 25 532 loci de gènes codants pour des protéines sont prédits (Vogel et al, 2010), ce qui est équivalent au génome du riz (Rice annotation project, 2008) et du sorgho (Paterson et al, 2009). Le taux d'éléments transposables compris dans le génome de *B. distachyon* semble être de 21%, ce qui est inférieur à celui du riz (26%), du sorgho (54%) et à celui du blé (80%, Bennetzen & Kellogg, 1997 ; Huo et al, 2009 ; Vogel et al, 2010). La comparaison du génome séquencé de *B. distachyon* à celui du sorgho, du riz et du blé représentant respectivement des membres des familles des *Panicoideae*, des *Ehrhartoideae* et des *Pooideae* montre que ce premier a divergé du blé il y a 32 à 39 million d'années, du riz il y a 40 à 53 millions d'années et du sorgho il y a 45 à 60 millions d'années (Catalan et al, 1997 ; Gaut, 2002 ; Bolot et al, 2009 ; Murat et al, 2010 ; Vogel et al, 2010 ; Wolny et al, 2011 ; Murat et al, 2014).

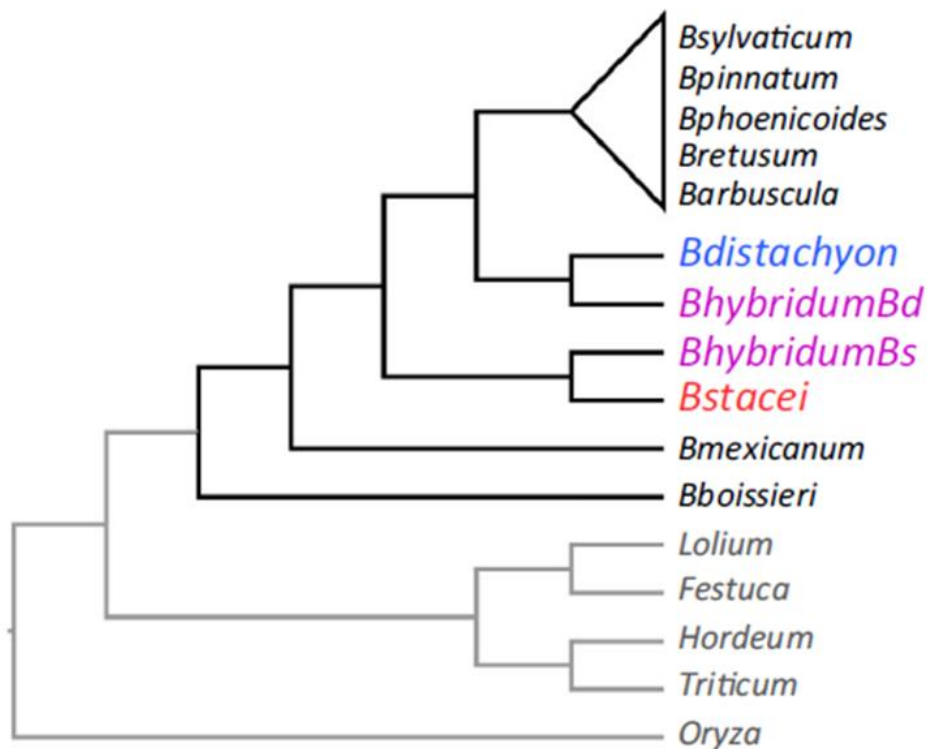


Figure 8 : Arbre phylogénétique représentant l'évolution des différentes espèces appartenant au genre *Brachypodium* (issu de Catalan et al, 2014).

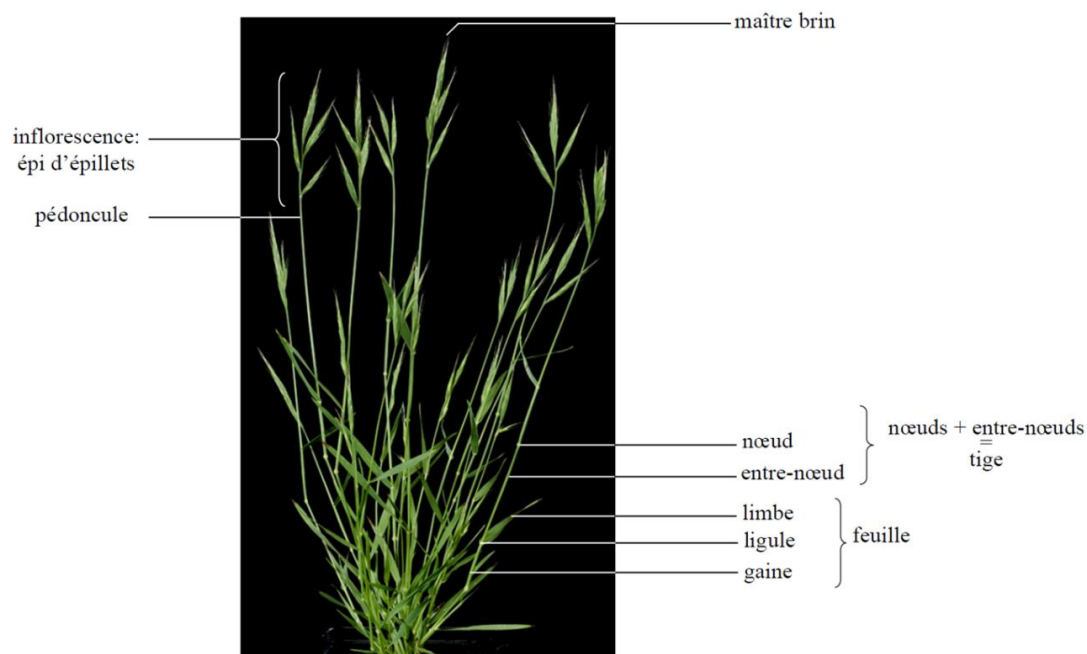


Figure 9 : Anatomie de *B. distachyon* au stade reproductif (issu de la thèse de Madeleine Bouvier d'Yvoire, 2011).

Les Poacées se répartissent en deux clades, les BEP auxquelles appartiennent les membres des Pooïdées comme le blé, l'orge et *B. distachyon* et les membres des Ehrhartoidées comme le riz et les PACCAD auxquelles appartiennent les Panicoidées comme le maïs ou le sorgho (Murat et al, 2014). Le degré de colinéarité correspondant à la synténie, c'est-à-dire au maintien de l'ordre des gènes entre les génomes de *B. distachyon* et celui du blé, du riz et du sorgho est élevé (figure 7) et a permis de retracer l'évolution des céréales et de confirmer une diversification des *Poaceae* à partir d'un ancêtre commun possédant 12 chromosomes il y a 65 millions d'années (Murat et al, 2014). Des analyses comparant les chromosomes de *B. distachyon* à ceux de l'orge ont montré des résultats similaires (Ma et al, 2010).

L'analyse de différentes espèces appartenant au genre *Brachypodium* a démontré qu'elles possèdent toutes un petit génome composé de petits chromosomes. Le nombre de chromosomes varie de $2n = 10$ pour *B. distachyon* à $2n = 38$ pour *B. retusum*. Il existe plusieurs génotypes allant de 18 à 28 chromosomes chez l'espèce *B. pinnatum*. Il a été démontré que le génotype *B. pinnatum* possédant 28 chromosomes serait un amphiploïde interspécifique entre *B. distachyon* ($2n = 10$) et *B. pinnatum* ($2n = 18$) (Wolny & Hasterok, 2009). Il était précédemment admis que l'espèce *B. distachyon* était composée de plantes annuelles de trois cytotypes différents ($2n = 10, 20, 30$) (Robertson, 1981) mais il a été démontré après analyse des chromosomes par différentes méthodes que le cytotype contenant $2n = 20$ provenait d'une lignée indépendante de celle contenant $2n = 10$ et que le cytotype contenant $2n = 30$ était leur amphiploïde (Hasterok et al, 2004 ; Catalan et al, 2012 ; Catalan et al, 2014 ; Betekhtin et al, 2014). Il s'agit donc d'espèces différentes avec *B. distachyon* pour le cytotype $2n = 10$, *B. stacei* pour le cytotype $2n = 20$ et *B. hybridum* pour le cytotype $2n = 30$ (Catalan et al, 2012 ; Catalan et al, 2014 ; Betekhtin et al, 2014) (figure 8).

1.2.2. Description de l'anatomie et de la physiologie de *B. distachyon*

B. distachyon est une poacée annuelle mesurant de 20 à 50 cm (figure 9) et au cycle de vie variant de 12 à 18 semaines suivant les conditions expérimentales. En serre et en jours longs (18h), la phase végétative correspondant à la mise en place et au développement des racines, des tiges et des feuilles dure sept semaines et est suivie de la phase reproductive d'une durée de 5 semaines (figure 10). La phase de maturation des grains et de séchage dure ensuite 6 semaines (figure 10).

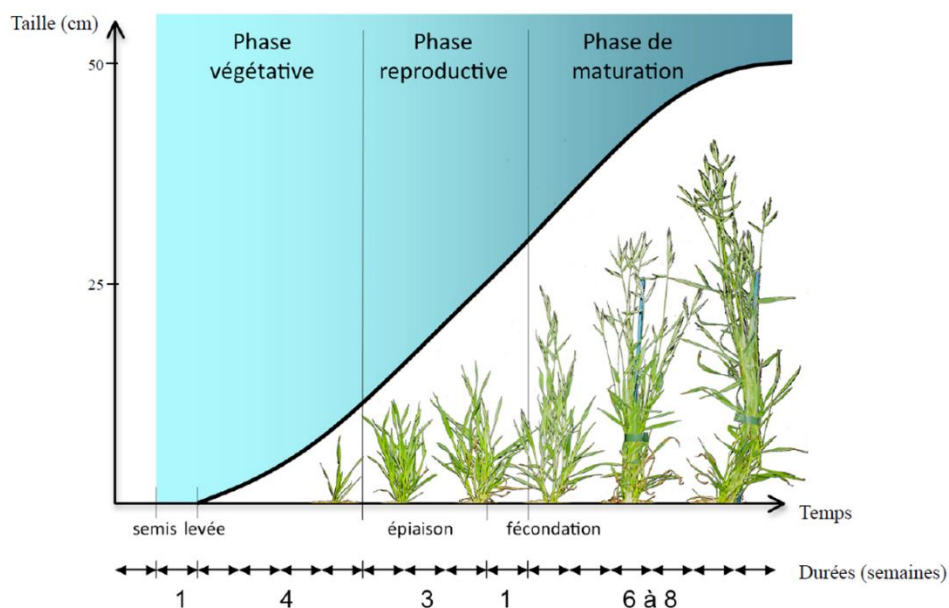


Figure 10 : Les différents stades de développement de *B. distachyon* et leur durée dans les conditions de culture de l'IJPB de l'INRA de Versailles (issu de la thèse de Madeleine Bouvier d'Yvoire, 2011).

Tableau 5 : Comparaison de différents caractères entre *B. distachyon*, *A. thaliana* et des céréales cultivées (adapté de Bevan et al, 2010 ; Murat et al, 2014).

	<i>B. distachyon</i>	<i>A. thaliana</i>	blé tendre	maïs	riz	sorgho
Hauteur (cm)	20-40	15-20	50	155-215	100	170-320
Temps de génération (semaines)	12-18	8-12	12	14-20	30	17
Densité (plantes/m²)	1000	2000	50	6	36	13
Reproduction	Autogame	Autogame	Auto-game	Allo-game	Auto-game	Allogame
Taille du génome (Mpb)	272	119	17000	2365	372	697
Ploïdie	2X	2X	6X	2X	2X	2X
Nombre de gènes codant des protéines	25500	27416	100000	32500	41000	34500
Type de paroi végétale	Type II	Type I	Type II	Type II	Type II	Type II
Photosynthèse	C3	C3	C3	C4	C3	C4

Les tiges sont composées d'une succession d'entrenœuds et de nœuds. Ils se développent de bas en haut. Les premiers entrenœuds se situant à la base de la plante sont donc les plus âgés. Le développement de chaque entrenœud est cependant de type acropétal, ce qui signifie que la croissance s'effectue à la base et que la partie la plus haute de l'entrenœud est la plus mature. Une feuille se positionne à chaque entrenœud. Chaque feuille est composée d'une gaine entourant la partie basale de l'entrenœud, d'une ligule et d'un limbe. La mise en place d'un pédoncule au niveau du dernier nœud d'une tige est suivie de la formation d'un épi composé de 3 à 7 épillets. Chaque épillet contient une dizaine de fleurs hermaphrodites qui deviendront des caryopses après autofécondation, *B. distachyon* étant une plante autogame.

La culture de *B. distachyon* à des fins de recherche scientifique est plus aisée que celle des céréales cultivées (tableau 5, Bablak et al, 1995 ; Draper et al 2001 ; Opanowicz et al, 2008 ; Bevan et al, 2010). Sous certaines conditions de culture contrôlée (20h de lumière, 25°C jour et 18°C nuit), *B. distachyon* est une plante de petite taille (20 à 30 centimètres) ce qui permet une densité de culture plus élevée par rapport aux céréales cultivées (jusqu'à 1000 plantes par m²). Sa taille peut être plus élevée sous d'autres conditions de culture impliquant moins d'ensoleillement journalier par exemple. Le temps de génération de *B. distachyon* est court (entre 12 et 18 semaines selon les conditions de culture) ce qui permet d'obtenir jusqu'à quatre générations par année ce qui n'est pas le cas pour le blé, le riz, le maïs ou le sorgho. *B. distachyon* est autogame ce qui facilite l'obtention de lignées homozygotes et sa culture ne nécessite pas de conditions de culture particulières contrairement au riz.

Constitué de cinq paires de chromosomes, le génome nucléaire de *B. distachyon* ne fait que 272 Mb ce qui est largement inférieur aux génomes du blé (de 4,7 Gb pour l'espèce diploïde *Triticum urartu* à 16,7 Gb pour le blé tendre hexaploïde *Triticum aestivum*), du riz (382 Mb), du maïs (2 Gb) ou du sorgho (758 Mb). Des mesures en cytométrie de flux et de microdensitométrie ont montré que *B. distachyon* possède le plus petit génome des Poacées reporté à ce jour (Draper et al, 2001 ; Hasterok et al, 2004 ; Vogel et al, 2004 ; Wolny & Hasterok, 2009). De plus, *B. distachyon* possède cinq paires de chromosomes aisément identifiables (Jenkins et al, 2005), les génotypes Bd21 et Bd21-3 sont diploïdes, $2n = 2x = 10$ chromosomes, ce qui facilite les croisements et les études de ségrégation des caractères (Catalan et al, 2012).

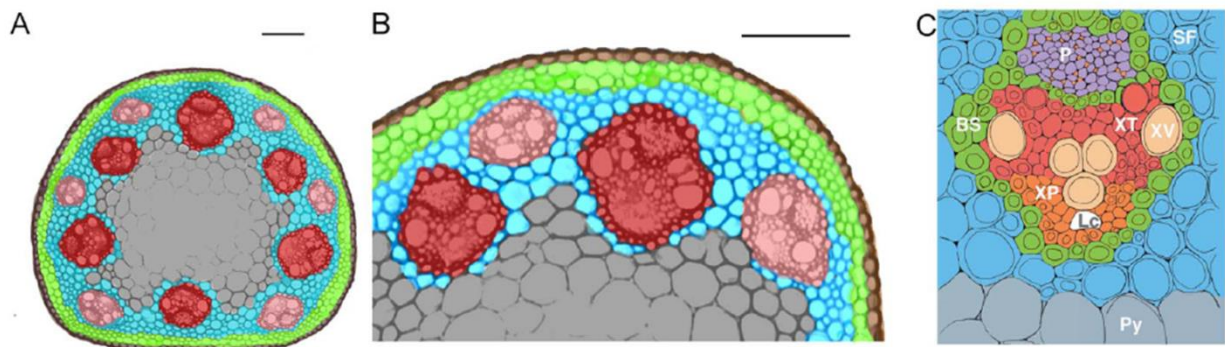


Figure 11 : Section transversale d'une tige mature de *B. distachyon* schématisée (issu de Matos et al, 2013).

A : section entière d'une tige ; B : zoom sur le premier entrenœud avec en rouge les faisceaux vasculaires internes, en rose les faisceaux vasculaires périphériques, en bleu la région interfasciculaire constituée surtout de fibres de sclérenchyme, en gris la moelle, en vert le chlorenchyme et le sclérenchyme du cortex, en marron l'épiderme ; C : faisceau vasculaire schématisé. py : parenchyme, sf : fibres de sclérenchyme, bs : gaine, p : phloème, xv : xylème, xp : cellules parenchymateuses du xylème, xt : trachéides, lc : lacune.

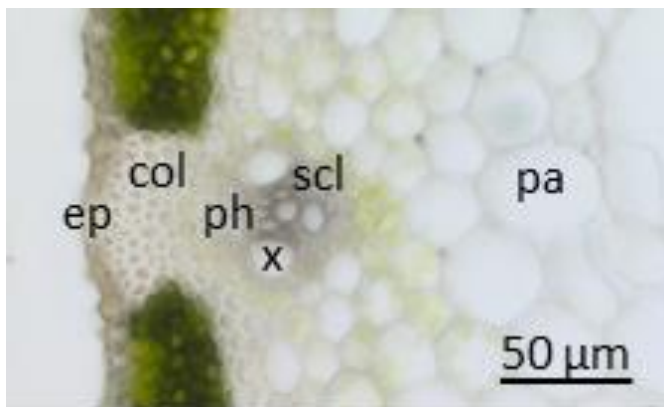


Figure 12 : Faisceau vasculaire de *B. distachyon* observé au microscope.

ep : épiderme, col : collenchyme, ph : phloème, x : xylème, scl : sclérenchyme, pa : parenchyme.

L'ensemble de ces constatations rapproche *B. distachyon* de la plante modèle des Angiospermes Eudicotylédones *Arabidopsis thaliana* (tableau 1, Bevan et al, 2010) mais *B. distachyon* est plus proche phylogénétiquement des céréales cultivées et possède une paroi lignocellulosique de type II ce qui en fait un meilleur modèle pour l'étude des parois chez les Poacées. *B. distachyon* possède un métabolisme en C3 comme le blé, l'orge et le riz et contrairement au maïs, à la canne à sucre ou au sorgho qui sont des plantes en C4. Cette différence métabolique a toutefois peu d'effets sur les composés structuraux, et *B. distachyon* reste un modèle pertinent pour l'étude de la biomasse des plantes en C4 dans le but de produire des biocarburants ainsi que pour l'amélioration de la digestibilité et de la valeur énergétique des maïs ensilages (Shen et al, 2009 ; Rancour et al, 2012).

1.2.2.1. L'anatomie et la composition de la tige de *B. distachyon*

La tige de *B. distachyon* est pleine en début de développement puis un méat apparaît au centre. La tige est principalement composée de parenchyme aux stades jeunes. Les faisceaux vasculaires y sont répartis en suivant un arrangement de type atactostèle, ils sont positionnés de façon régulière en cercle, à la périphérie de la tige. Composés de l'intérieur vers l'extérieur de fibres, de lacunes, du xylème de chaque côté des fibres et du phloème, les faisceaux vasculaires sont entourés d'une gaine de sclérenchyme lignifiée (figure 11).

Le xylème se compose de trachéïdes qui deviendront des cellules mortes et lignifiées à maturité (figures 11 et 12). La sève brute circule par capillarité dans ces cellules composées alors uniquement de parois lignifiées et ponctuées (Shane et al, 2000).

La composition des parois de tiges de *B. distachyon* a fait l'objet de plusieurs études (Christensen et al, 2010, Rancour et al, 2012, Meineke et al, 2014). Les polysaccharides pariétaux ont été évalués par leur composition en oses neutres après hydrolyse. Les polysaccharides pariétaux non-cellulosiques sont hydrolysables à l'acide en conditions ménagées alors que l'hydrolyse de la cellulose requière une étape supplémentaire d'hydrolyse. En utilisant de telles conditions, Christensen et al. (2010) ont étudié la composition en oses non cellulosiques de la paroi primaire de jeunes plantules (2 à 8 jours après germination) de *B. distachyon*, du blé et de l'orge. Ils ont montré que les oses majoritaires sont le xylose, l'arabinose et le glucose. Des résultats similaires ont été obtenus pour les parois primaires des plantules d'orge et de blé (Christensen et al, 2010).

Tableau 6 : Composition de la paroi végétale des tiges matures de *B. distachyon* Bd21-3 en oses neutres (adapté de Rancour et al, 2012). Les valeurs sont exprimées en mg/g de paroi.

Organe	Glucose	Xylose	Arabinose	Galactose	Rhamnose	Mannose	Fucose
Tige mature	354,3	212,4	24,7	4,9	2,7	1,8	1,2

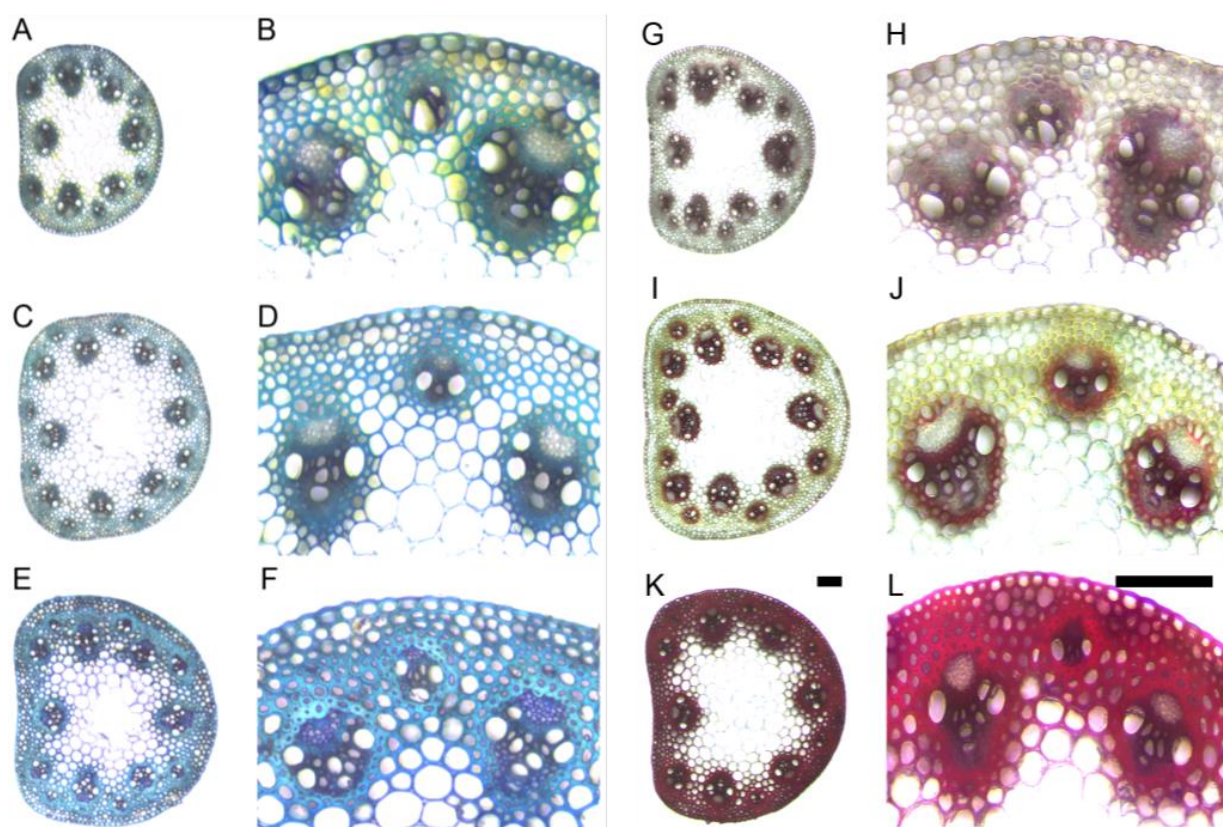


Figure 13 : L'épaisseur de la paroi des cellules et la détection des lignines augmentent avec l'élongation des entrenœuds des tiges (issu de Matos et al, 2013).

Sections transversales d'entrenœuds de tiges entières (A, C, E, G, I, K) et fort grossissement (B, D, F, H, J, L) de *B. distachyon* colorées avec du bleu de toluidine (A à F) ou le réactif de Wiesner (G à L). (A et B, G et H) phase d'élongation, (C et D, I et J) épiaison, et (E et F, K et L) sénescence. Les photographies ont été prises en utilisant un microscope en fond clair. Les barres d'échelle représentent 0,1 mm.

Les arabinoxylanes sont des polysaccharides composés d'une chaîne de xylanes, c'est-à-dire des résidus de xyloses sur lesquels viennent se substituer d'autres résidus dont majoritairement l'arabinose. Une estimation de la teneur en arabinoxylanes est possible en calculant la somme des teneurs en xylose et en arabinose. Les arabinoxylanes représenteraient 85% de la fraction non cellulosique des polysaccharidiques de la paroi primaire de plantules de *B. distachyon*, de blé et d'orge (Christensen et al, 2010). Ces auteurs ont également estimé la teneur des plantules de 2 jours après germination en β -glucanes mixtes, polymère de glucose, à 61 mg/g de matière sèche, une valeur comparable à celle de l'orge mais supérieure à celle du blé (54 mg/g de matière sèche ; Christensen et al, 2010). Rancour et al. (2012) ont étudié la composition des parois de différents tissus de *B. distachyon* (accessions Bd21 et Bd21-3) dans des plantules (12 jours après germination), et dans des plantes matures (stade remplissage des grains). La composition en oses des parois a montré que dans tous les organes et stades étudiés, le glucose d'origine principalement cellulosique est majoritaire. Dans les tiges matures, les oses principaux sont le glucose, le xylose et l'arabinose (tableau 6 ; Rancour et al, 2012).

La teneur en arabinoxylanes représentée par la somme des teneurs en xylose et en arabinose a été estimée à 44% de la fraction polysaccharidique des parois des tiges matures de *B. distachyon* (Rancour et al, 2012). Meineke et al. (2014) ont évalué la teneur en cellulose des pailles sèches du génotype Bd21 de *B. distachyon* à 40% de la paroi et celle des hémicelluloses à environ 30%. La teneur en lignines des parois des organes de *B. distachyon* a également été étudiée (Rancour et al, 2012). La teneur en lignines des parois de tiges matures du génotype Bd21-3 a été évaluée à 15,7% de la masse des parois (Rancour et al, 2012). Meineke et al. (2014) ont évalué la teneur en lignines des pailles sèches de *B. distachyon* Bd21 à 17% et l'ont comparé à la teneur en lignines des pailles de blé (21%) et de maïs (22%) pour montrer que les pailles de *B. distachyon* seraient moins lignifiées que les pailles de blé et les tiges sèches de maïs. Selon Rancour et al. (2012), les tiges matures sont les organes les plus lignifiés avec les inflorescences matures et les gaines. La quantité de lignines présente dans les tiges matures augmente avec la maturité des plantes. La lignification des entrenœuds des tiges de *B. distachyon* a été analysée par des colorants révélant les lignines. Cette étude a révélé que la lignification commençait dans les faisceaux vasculaires pendant l'élongation des entrenœuds, puis à l'émergence de l'inflorescence elle s'intensifie, et enfin au stade de sénescence, les faisceaux vasculaires et les régions interfasciculaires sont très lignifiées (figure 13, Matos et al, 2013).

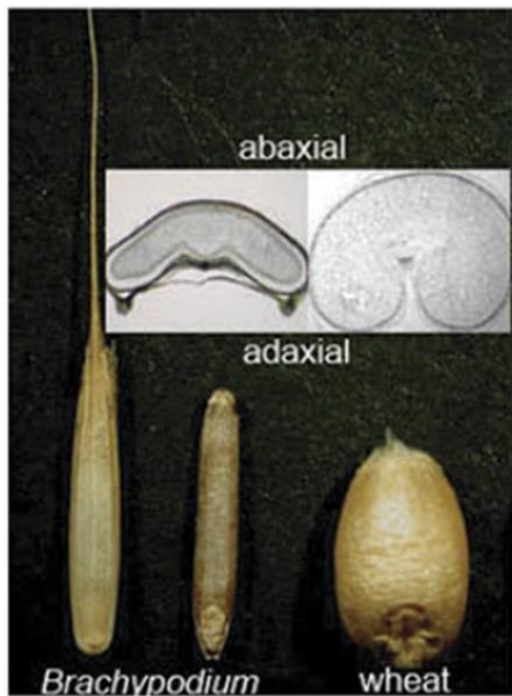


Figure 14 : Comparaison du grain de *B. distachyon* (génotype Bd21) et du grain de blé mature (issu de Opanowicz et al, 2011).

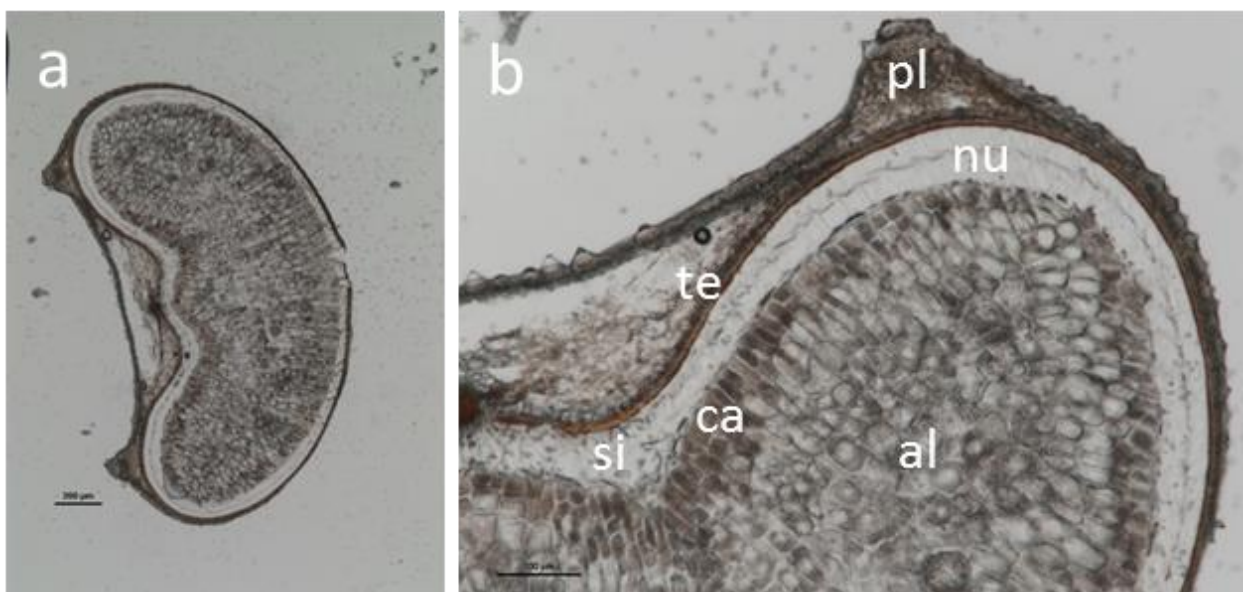


Figure 15 : Section transversale du grain de *B. distachyon* (génotype Bd21-3) mature observée au microscope.

pl : paléa, te : testa, si : sillon, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen de stockage.

Les lignines des tiges de *B. distachyon* sont composées principalement de monomères S, puis de monomères G et enfin, dans une moindre mesure, de monomères H (Bouvier d'Yvoire et al, 2013). Cette répartition est similaire à celle retrouvée dans les tiges matures des céréales cultivées. Les tiges matures de *B. distachyon* contiennent également des protéines (8% de la masse des parois) et des acides hydroxycinnamiques (acides *para*-coumarique 11,8 mg/g de paroi et AF 4,7 mg/g de paroi) (Christensen et al, 2010 ; Rancour et al, 2012, Bouvier d'Yvoire et al, 2013). L'analyse de la composition des parois de la tige mature de *B. distachyon* a permis de révéler la présence des mêmes constituants que ceux détectés chez les Poacées cultivées destinées à la production de biomasse, de fourrage ou d'intérêt agronomique. *B. distachyon* un bon modèle pour l'étude de la paroi des tiges de Poacées.

1.2.2.2. L'anatomie et la composition du grain de *B. distachyon*

Le grain de *B. distachyon* est un caryopse montrant une morphologie typique de caryopse de Poacées. Les tissus sont les mêmes que ceux retrouvés chez l'orge ou le blé. Le grain mature de *B. distachyon* est comparable à celui du blé pour sa longueur mais sa largeur et son épaisseur sont beaucoup plus réduites (figure 14). Il est en ce point plus comparable à celui de Poacées sauvages comme *Bromus inermis* puisqu'il ne représente que 17% de la taille d'un grain de blé (Garvin et al, 2008). Le grain mature de *B. distachyon* est long et plat, il possède un sillon peu profond. Le grain est composé de l'intérieur vers l'extérieur de la graine comprenant l'embryon, l'albumen de stockage, la couche à aleurones (une à trois assises cellulaires), l'épiderme du nucelle, et le tégument séminal ou testa (deux assises cellulaires dont une colorée et riche en composés phénoliques) et du péricarpe d'origine maternelle (figure 15 a et b). Chaque grain est ensuite entouré de deux glumelles la palea qui adhère au péricarpe et la lemma (figure 15 b). L'albumen représente 75% de la masse du grain alors que chez les céréales domestiquées, il représente près de 80% (Guillon et al, 2011 ; Kent & Evers, 1994 ; Hands & Drea, 2012).

Des différences indéniables entre le grain de *B. distachyon* et le grain de blé existent. Notamment l'albumen de *B. distachyon* a une forme de croissant et ne possède pas de cavité clairement différenciée (figure 16). L'épiderme du nucelle est très épais chez *B. distachyon* (de 50 à 60 μ m dans le grain sec) alors que chez le blé cette assise cellulaire est comprimée (figure 14, figure 15 et figure 16).

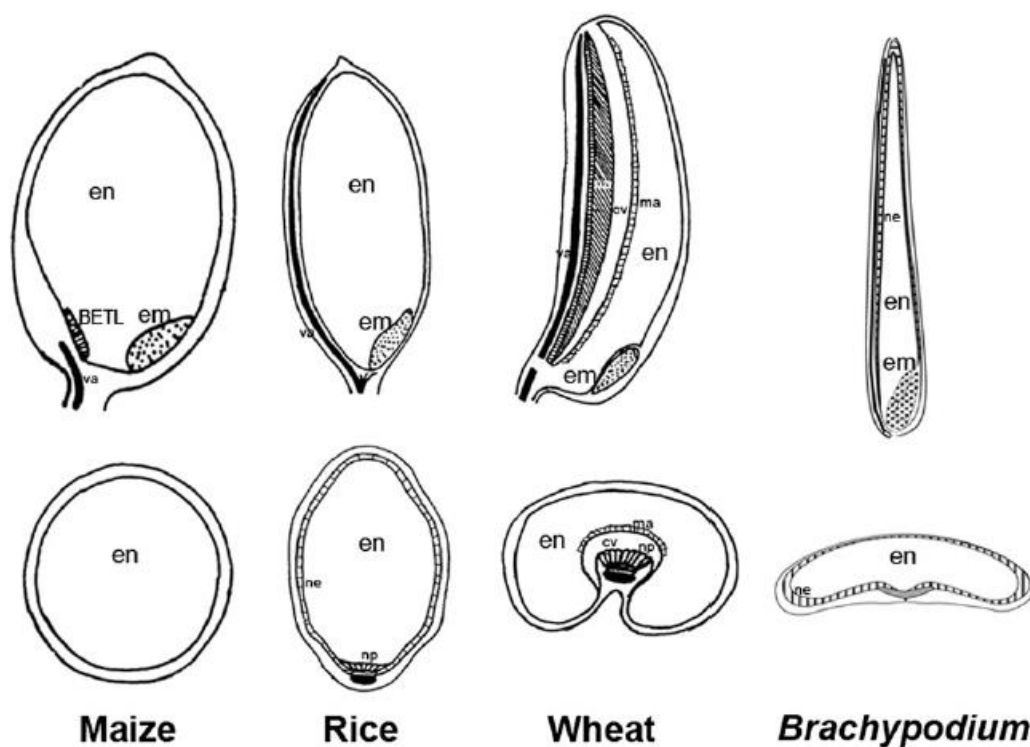


Figure 16 : Comparaison schématique des grains secs de maïs, de riz et de *B. distachyon* (issu de Hands & Drea, 2012).

Les dessins ne respectent pas les tailles des grains ni les proportions des tissus.

Coupes longitudinales en haut et transversales en bas. em : embryon, en : albumen, ma : couche à aleurones modifiée, cv : cavité, va : vaisseau, ne : épiderme du nucelle, np : projection nucellaire, BETL : cellules de transfert basales.

Le grain de riz possède également un épiderme de nucelle persistant où ces cellules sont spécialisées dans le transport de nutriments (Oparka & Gates, 1981 ; Ellis & Chaffey, 1987). Chez *B. distachyon*, il pourrait remplir une fonction de soutien, renforçant la résistance à la déformation (Opanowicz et al, 2011).

Dans le grain de *B. distachyon*, la couche à aleurone est irrégulière et entoure tout l'albumen de stockage (figure 16). Elle est constituée de plusieurs assises cellulaires chez *B. distachyon*, contrairement au blé, à l'avoine, au maïs ou au sorgho qui n'en possèdent qu'une seule bien définie ou encore à l'orge ou au riz qui en possèdent trois (Kent & Evers, 1994 ; Opanowicz et al, 2011 ; Guillon et al, 2011 ; Hands & Drea, 2012). Chez *B. distachyon*, la couche à aleurone reste accolée à l'albumen de stockage au cours de la maturation du grain, ce qui n'est pas le cas chez les Poacées cultivées (Opanowicz et al, 2011). Chez le blé par exemple, la couche à aleurone est adhérente aux tissus maternels et reste accrochée à ces derniers lors des étapes de fraisage (Opanowicz et al, 2011 ; Hands & Drea, 2012).

La composition du grain de *B. distachyon* a fait l'objet de plusieurs études. La teneur en protéines des grains est de 17% pour le génotype Bd21-3 (Larré et al, 2010 ; Guillon et al, 2011) avec la présence de nombreuses protéines de réserve telles que des globulines et des prolamines (Larré et al, 2010). Cette teneur en protéines est plus élevée que celle mesurée dans les grains de la plupart des céréales cultivées, elle est proche de la teneur mesurée pour l'avoine (*Avena sativa*) alors que le grain de blé a une teneur en protéines d'environ 14% (Larré et al, 2010 ; Guillon et al, 2011 ; Hands & Drea, 2012).

Le grain de *B. distachyon* est pauvre en amidon puisqu'il ne représente que 10% de la masse du grain mature alors qu'il représente 35 à 40% de cette masse chez les blés sauvages primitifs ou encore 50 à 70% chez les céréales domestiquées (Larré et al, 2010 ; Guillon et al, 2011).

En revanche, la teneur des grains de *B. distachyon* en polysaccharides pariétaux est très élevée. Elle représente près de 60% de la masse du grain mature soit 58% de l'albumen chez *B. distachyon* tandis qu'elle ne constitue que 10 à 20% chez les espèces domestiquées et cultivées comme le blé, l'orge ou l'avoine (Guillon et al, 2011 ; Barron et al, 2007 ; Manthey et al, 1999 ; Oscarsson et al, 1996).

Tableau 7 : Composition des grains matures secs de *B. distachyon* (issu de Guillon et al, 2011).

a : teneur en oses neutres individuels déterminée par CPG après dérivation en acétates d'alditols, b : teneur en acides uroniques déterminée par une méthode colorimétrique (Saulnier et al,1995), c : teneur en amidon et β -glucanes mixtes déterminés par des procédés enzymatiques (méthodes AOAC 996.11 et 995.16, respectivement), d : teneur en arabinoxylanes estimée comme étant la somme des résidus xylose et arabinose, e : teneur en cellulose estimée par la différence entre le glucose total déterminé par CPG des acétates d'alditols et le glucose déterminé par dosage enzymatique de l'amidon et des β -glucanes mixtes.

Composés analysés	Grain entier mg/100mg	Albumen mg/100mg	Couches externes mg/100mg
^a Arabinose	2,2	1,4	3,7
Xylose	2,5	1,3	5,5
Mannose	0,2	0,1	0,2
Galactose	0,5	0,5	0,4
Glucose	54,8	55,4	62,4
^b Acide Galacturonique	1,3	0,9	2,1
Acide glucuronique	0,2	trace	0,2
Total	60,1	58,6	72,1
^c Amidon	6,4	6,9	0,5
^c β -glucanes mistes	42,4	41,2	41,8
^d Arabinoxylanes	4,7	2,7	9,2
^d Cellulose	6,0	7,3	20,1

L'analyse de la composition des parois du grain mature de *B. distachyon* (tableau 7 ; Guillon et al, 2011) a permis de révéler la présence des mêmes constituants que ceux détectés chez les plantes cultivées comme le blé, le maïs et l'orge mais dans des proportions différentes (Larré et al, 2010 ; Guillon et al, 2011 ; Guillon et al, 2012).

Les parois des cellules du grain de *B. distachyon* sont riches en β -glucanes mixtes qui représentent 80% de la masse des parois de l'albumen (Opanowicz et al, 2011, Guillon et al, 2011, Hands et Drea, 2012, Trafford et al, 2013). Les β -glucanes apparaissent lors de l'élongation cellulaire, ils ont un rôle structural transitoire. Le glucose issu de l'hydrolyse des β -glucanes joue un rôle dans le mécanisme du recyclage des oses durant la croissance de la plantule chez le maïs (Gibeaut & Carpita, 1991). Ceci suggère que les β -glucanes auraient une fonction de réserve disponible et convertible en plus de son rôle structural (Burton et al, 2010, Guillon 2011, Trafford et al, 2013). Ceci expliquerait l'abondance de ce composé dans l'albumen de *B. distachyon*. Les parois des cellules de l'albumen des grains d'orge et d'avoine contiennent respectivement 75 et 70% de β -glucanes alors que les parois d'albumen amyloacé de grains de blé en contiennent 25%. *B. distachyon* est donc plus proche de ces deux premières plantes pour sa teneur en β -glucanes (Fincher & Stone, 1986 ; Guillon et al, 2011).

La teneur en arabinoxylanes de l'albumen de *B. distachyon* est similaire à celle de l'albumen du grain de blé ou d'orge soit environ 3% de la masse de l'albumen (Guillon et al, 2011). Des arabinoxylanes féruloylés ont été détectés dans les parois des cellules de l'albumen du grain mature de *B. distachyon* (Guillon et al, 2011). Les parois du grain contiennent des acides hydroxycinnamiques, majoritairement de l'AF (1,63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de grain) et de l'acide *p*-coumarique (noté pAC ; 0,09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de grain ; Guillon et al, 2011). La teneur en acides hydroxycinnamiques est plus importante dans les couches périphériques du grain mais ces acides phénoliques sont présents dans l'albumen avec 0,74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'albumen pour l'AF et 0,02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'albumen pour l'pAC ; Guillon et al, 2011). Les parois des cellules de l'albumen de *B. distachyon* contiennent également de la cellulose, des pectines et des mannanes, tout comme les parois du grain de blé (Guillon et al, 2011).

Le grain de *B. distachyon* comporte donc des éléments similaires à différentes céréales cultivées. Il possède un sillon comme le blé, l'orge et l'avoine, un épiderme de nucelle épais comme le riz, une teneur en globulines élevées utilisées comme protéines de réserve comme l'avoine et ses parois comportent une forte teneur en β -glucanes comme l'orge.

Cependant, la petite taille du grain de *B. distachyon*, sa couche à aleurone peu structurée, ou encore sa faible teneur en amidon le différencie des céréales cultivées. Les parois du grain de *B. distachyon* sont constituées des mêmes éléments que les parois des grains des céréales cultivées.

1.2.3. *B. distachyon* comme modèle d'études des céréales : les outils disponibles

Au fil des années, de nombreux outils sont venus faciliter l'utilisation de *B. distachyon* et renforcer sa place de plante modèle des céréales cultivées et des graminées fourragères.

Une étude complète avait d'abord été réalisée à l'Institut des Sciences Biologiques de l'Université des Pays de Galles en 2001. Les auteurs ont démontré que, en plus des avantages précédemment cités (voir paragraphe 2.1), la culture *in vitro* des tissus de *B. distachyon* est possible (Babla et al, 1995 ; Draper et al, 2001). Des embryons immatures issus de *B. distachyon* du génotype turque ABR1 et de génotypes diploïdes $2n = 2x = 10$ ont formé des cals embryogènes après une quinzaine de jours de culture en milieu inducteur de cals qui ont régénéré des plantes entières, même après transformation par bombardement de micro-projectiles chargés en plasmides (Draper et al, 2001). Les plantes régénérées exprimaient le transgène (Draper et al, 2001). De plus, tous les génotypes de *B. distachyon* testés lors de cette étude sont sensibles à certains agents pathogènes des céréales cultivées tels que *Puccinia recondita* f.sp. *hordei* et f. sp. *triticae* responsables de la rouille brune de l'orge et du blé ou *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* et f. sp. *triticae* responsables de la rouille jaune de l'orge et du blé ou encore *Blumeria graminis* agent pathogène de l'oïdium des céréales. Les auteurs ont montré une variabilité de réponse intéressante entre accessions pour l'étude des interactions entre plantes et pathogènes (Draper et al, 2001 ; Vogel & Bragg, 2009 ; Kazan et al, 2012 ; Schneebeli et al, 2015).

Une banque de chromosomes artificiels bactériens, plus communément appelée BAC, recouvrant trois fois le génome de *B. distachyon* a été créée en 2006 à partir de l'accession Bd21 (Huo et al, 2007 ; Huo et al, 2008 ; Febrer et al, 2010). Celle-ci a permis de générer 20440 marqueurs de séquences exprimées, ou EST pour « Expressed Sequence Tag », et la cartographie du génome de *B. distachyon* (Huo et al, 2007 ; Huo et al, 2009 ; Febrer et al, 2010). Une seconde banque de BAC a été créée à partir des écotypes diploïdes ($2n = 2x = 10$) de *B. distachyon* ABR1 d'origine turque et ABR5 d'origine espagnole (Hasterok et al, 2006).

Elle comporte 9100 clones dont la longueur moyenne des inserts est de 88 kb, ce qui représente l'équivalent de 2,22 génomes. Une troisième banque de BAC constituée à partir de l'accèsion Bd3-1 a été construite recouvrant dix fois le génome (Brkljacic et al, 2011).

Des banques d'EST séquencés correspondant à des banques d'ADNc réalisées à partir de différents tissus tels que les feuilles, les tiges, les racines, les cals embryonnaires et les grains en cours de développement ont été créées au DOE JGI (United States Department Of Energy - Joint Genome Institute) en Californie (Vogel et al, 2006 ; Vogel et al, 2010). Cette banque comptait 127000 clones en 2010. L'institut RIKKEN au Japon possède aussi 39000 clones d'ADNc pleines longueurs séquencées (K. Mochida). Une banque d'ADNc a également été construite au laboratoire Holt de l'université d'Oklahoma contenant des ADNc de *B. distachyon* issus de différentes conditions environnementales telles que différentes photopériodes ou différents traitements hormonaux (Cao et al, 2011).

Différentes méthodes de transformations ont été développées. Après la transformation par bombardement de microprojectiles aussi appelé biolistique (Draper et al, 2001 ; Christiansen et al, 2005), des méthodes de transformation utilisant le vecteur *Agrobacterium tumefaciens* ont vu le jour, utilisées sur plusieurs génotypes différents (Vogel et al, 2006 ; Vain et al, 2008 ; Pacurar et al, 2008 ; Vogel & Hill, 2008 ; Alves et al, 2009 ; Fursova et al, 2012). Pour comparaison, la transformation de la lignée BDR018 par biolistique a une efficacité de 5% (Christiansen et al, 2005). La lignée BDR018 montre une efficacité de transformation par *A. tumefaciens* de 55% (Pacurar et al, 2008). La transformation par *A. tumefaciens* de la lignée Bd21 a une efficacité de 17% alors que la lignée Bd21-3 a une efficacité qui peut atteindre 36% (Vogel & Hill, 2008). L'efficacité de transformation varie donc selon la méthode et le génotype employés mais selon les chiffres publiés, l'efficacité de transformation de *B. distachyon* est légèrement inférieure à celle du riz (36% d'efficacité pour Bd21-3 contre 47% d'efficacité pour le riz ; Tyagi & Mohanty, 2000).

Bien qu'autogame, il est possible d'effectuer des croisements entre deux individus de *B. distachyon* selon une méthode proposée par M. Steinwand et J. Vogel en 2010. Cette méthode est basée sur la récolte des anthères matures d'une fleur et sur l'utilisation dans les minutes qui suivent du pollen prélevé afin de féconder une fleur préalablement émasculée. *B. distachyon* étant une poacée non domestiquée, elle possède une grande variabilité naturelle (Bevan et al, 2010).

Cette caractéristique peut être utilisée afin d'étudier et de comprendre la fonction de certains gènes. Le développement de collections de RIL (lignées pures recombinantes) grâce à la maîtrise des croisements entre individus contribue à faire de *B. distachyon* un atout majeur pour l'étude de l'interaction entre l'environnement et l'expression des gènes. Plusieurs collections de RIL sont disponibles à l'USDA National Plant Germplasm System et à l'Université des pays de Galles à Aberystwyth (Jenkins et al, 2003 ; Vogel et al, 2006 ; Garvin, 2006 ; Vogel & Hill, 2008 ; Filiz et al, 2009, Vogel et al, 2010 ; Brkljacic et al, 2011). Les RIL issus de ces différentes collections ont montré des réponses différentes en cas de stress abiotiques tels que la sécheresse ou le froid (Luo et al, 2011 ; Li et al, 2012). L'équipe PARSE a également développé quatre populations RILs.

Le génome annoté de *B. distachyon* (génotypes Bd21 et Bd21-3) (Vogel et al, 2010 ; Bevan et al, 2010) est disponible en ligne sur des bases de données spécialisées (<http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium/>; http://www.plexdb.org/modules/PD_probeset/annotation.php?genechip=Brachypodium). Ces bases de données comportent des outils bioinformatiques qui permettent à l'utilisateur d'obtenir des informations sur l'annotation fonctionnelle et structurale de gènes. La base de données ELEMENT permet également la prédiction des séquences promotrices ainsi que celle des sites de liaison aux facteurs de transcription (Brkljacic et al, 2011). L'expression de divers « gènes de ménage » de *B. distachyon* a été analysée et ces gènes proposés comme gènes de référence pour la PCR quantitative (Hong et al, 2008). Le logiciel accessible sur l'internet QuantPrime (<http://www.quantprime.de/>) peut également être utilisé afin de dessiner des amorces utilisables en PCR quantitative chez *B. distachyon*. Depuis 2010, plusieurs variants naturels dont ABR6, ABR8, ABR9, Arn1 et Bd1-1 ont été séquencés par le DOE JGI dans le but d'étudier la diversité naturelle du génome de *B. distachyon*.

Une puce à ADN AFFYMETRIX a été créée au laboratoire Mockler à l'université de l'Oregon. Cette puce à ADN contient 2,55 millions de sondes couvrant tous les gènes prédits (incluant les exons et les introns) ainsi que 3,95 millions de sondes ciblant les régions intergéniques (<http://arrays.brachypodium.org/>). Une plateforme d'expression, PlaNet (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/>), regroupant les résultats d'hybridations Affymetrix obtenus à partir de différents tissus et des analyses de co-expression est disponible.

Après avoir démontré que la mutagenèse par agent chimique (azoture de sodium et méthanesulfonate d'éthyle communément abrégé en EMS) était possible chez *B. distachyon* (Engvild, 2005), des banques de mutants ponctuels ont été créées (Mur et al, 2011 ; Dalmais et al, 2013). Couplées à des méthodes d'analyse telles que le TILLING (abréviation de Targeting Induced Local Lesions in Genomes), il est à présent possible de retrouver parmi ces banques plusieurs lignées mutées dans un gène d'intérêt. Une banque de mutants azoture de sodium construite à partir du génotype Bd21-3 a notamment été créée à l'INRA de Versailles, en partenariat avec l'URGV d'Evry et sa plateforme de TILLING (McCallum et al, 2000 ; Till et al, 2007 ; Dalmais et al. 2013). Une banque de mutants EMS a été générée à l'Institut Boyce Thompson de l'université de Cornell. D'autres collections de mutants sont en cours de construction notamment des collections de mutants d'insertion d'ADN-T telles que les collections BrachyTag et WRRC T-DNA (Vain et al, 2008 ; Thole et al, 2010 ; Thole et al, 2011 ; Bragg et al, 2012). Les lignées mutées référencées sont indiquées sur le site Grain Genes (<http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/gbrowse/BrachV10/>).

D'autres méthodes de mutation telles que l'utilisation de VIGS (Virus Induced Gene Silencing) ont été démontrées comme efficaces sur *B. distachyon* (Olsen et al, 2006 ; Pacak et al, 2010 ; Demircan & Akkaya, 2009). L'utilisation de micro-ARN artificiel (amiARN) afin d'éteindre l'expression de gènes choisis a également été développée (Schwab et al, 2006 ; Ossowski et al, 2008 ; Budak & Akpinat, 2011) et une plateforme d'aide à la création des séquences amiARN est opérationnelle (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). L'utilisation de ces différentes méthodes a déjà permis d'obtenir des résultats intéressants que ce soit dans l'analyse de la paroi végétale telle que l'identification et l'obtention de mutants par TILLING pour le gène codant l'enzyme LACCASE5 impliquée dans la polymérisation des lignines et montrant une diminution ainsi qu'une modification de la teneur en lignines des parois (Wang et al, 2015) ; dans la synthèse de composés pariétaux comme la cellulose avec l'identification et la perturbation de l'expression de deux gènes codant pour des unités de synthèse de la cellulose (CESA 4 et CESA 7) par l'expression d'un microARN artificiel spécifique à ces deux gènes (Handakumbura et al, 2013) ; dans le fonctionnement des phytohormones avec l'obtention d'un mutant ADN-T pour le gène TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED 2 LIKE (TAR-2 like) de *B. distachyon* impliqué dans la synthèse de l'auxine et dont la réduction drastique de l'expression entraîne une modification de l'homéostasie hormonale racinaire (Pacheto-Villalobos et al, 2013).

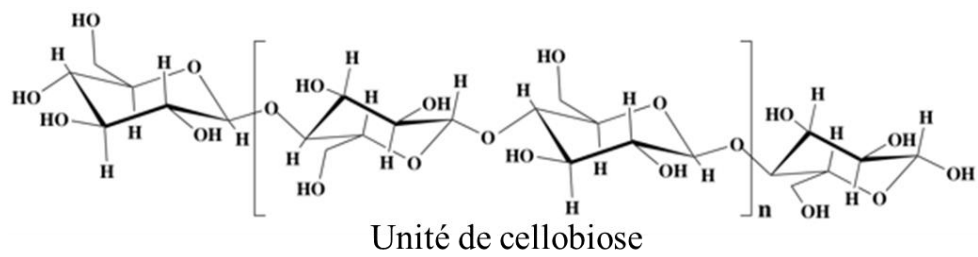


Figure 17 : Représentation de la structure d'une chaîne de cellulose (E. Jaspard, 2012)

Ces différents outils sont précieux et sont à présents associés à des plateformes en ligne afin d'être accessibles à tous. Les sites internet comme Phytozome, Gramene, CoGe, PlantGDB ou GrainGenes disposent à présent de modules spécifiques à *B. distachyon* (Brkljacic et al, 2011).

1.3. Composition des parois cellulaires et particularités des parois de Poacées

1.3.1. La cellulose

La cellulose est la biomolécule la plus abondante sur Terre et constitue de ce fait près de 50% de la biomasse terrestre. Commune à toutes les parois végétales, elle correspond à un polymère linéaire de résidus D-glucose liés par des liaisons glycosidiques de type β -(1,4) et dont l'unité de base est le cellobiose (figure 17). Les chaînes de cellulose sont insolubles et composées de 2000 à 25000 unités glucose. Elles représentent de 15 à 40% de la paroi primaire sèche (Caffall & Mohnen, 2009). Plusieurs chaînes de cellulose s'associent entre elles par des liaisons hydrogènes et forment des microfibrilles de 3 à 5 nm de diamètre et de plusieurs micromètres de longueur (Cosgrove, 2005 ; Somerville, 2006). Ces microfibrilles participent à la solidité de l'ensemble et sont formés de zones amorphes et cristallines.

C'est au niveau de la membrane plasmique que se déroule la synthèse de la cellulose dans des complexes protéiques enchâssés dans la membrane (figure 18). Ces complexes protéiques sont organisés en rosettes de celluloses synthases (ou CESA) (Doblin et al, 2002 ; Cosgrove 2005). Chaque CESA est une unité catalytique. La CESA polymérise une chaîne de cellulose en créant des liaisons osidiques β -(1,4) entre les monomères de glucose transportés sous forme d'UDP-glucose depuis le hyaloplasme. Au niveau d'une rosette, les chaînes de cellulose créées s'accolent et établissent des liaisons hydrogènes spontanées grâce à la présence de nombreux groupements hydroxyyles (Sugiyama et al, 1991 ; Cosgrove, 2005).

Des questions restent en suspens sur la composition des complexes de cellulose synthases et sur les différentes étapes de polymérisation de la cellulose. La structure publiée de cellulose synthases interagissant avec l'UDP-glucose et une chaîne de glucanes tend à prouver que chaque molécule de CESA est impliquée dans la formation d'une chaîne de glucanes (Morgan et al, 2013, Sethaphong et al, 2013).

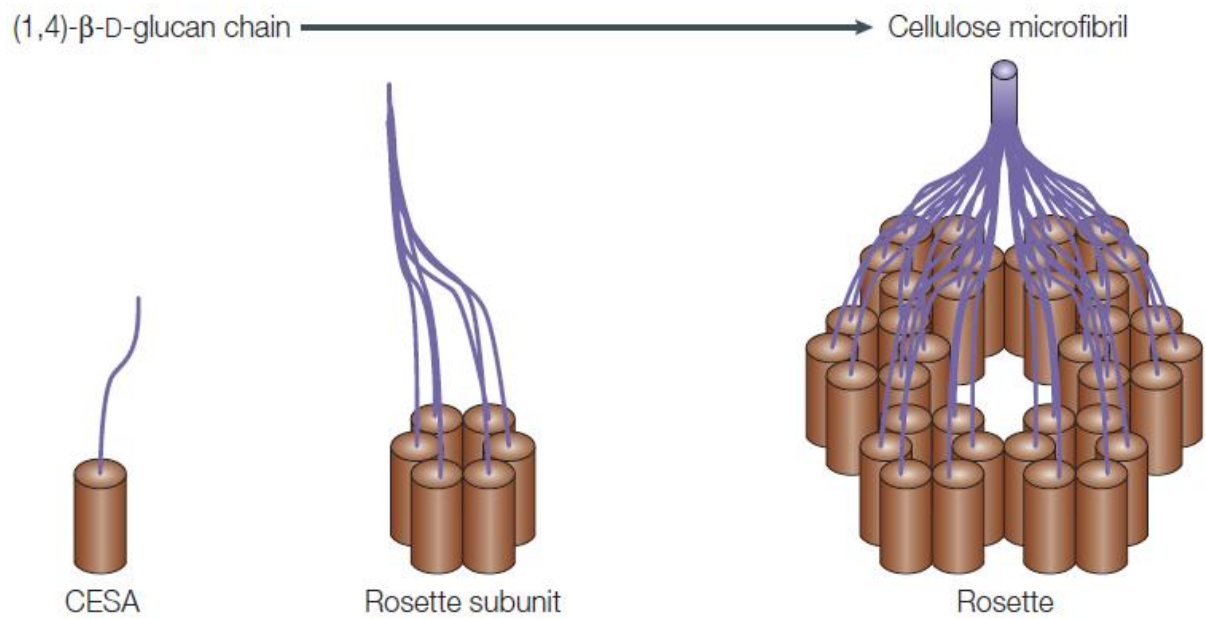


Figure 18 : Représentation de la synthèse de chaînes de cellulose et de leur assemblage en microfibrilles par une rosette de CESA dans la membrane plasmique des cellules végétale (issu de Cosgrove, 2005).

Enfin, la formation des rosettes, la composition des complexes CESA dépendent de l'espèce considérée, du type tissulaire et du stade de développement ainsi que du type de paroi (primaire ou secondaire).

La cellulose est le principal composé de la paroi ciblé comme source de glucose pour la production de biocarburant de seconde génération. La cristallinité de la cellulose est un facteur impactant négativement l'hydrolyse de la cellulose en glucose (Jorgensen et al, 2007). De plus, l'organisation de la paroi lignocellulosique, notamment la présence de lignines, limite la conversion de la cellulose en glucose.

1.3.2. Les pectines

Les pectines sont des macromolécules présentes dans toutes les couches de la paroi végétale mais en quantité variable. Surtout abondantes dans la lamelle moyenne et dans la paroi primaire non lignifiée des dicotylédones (jusqu'à 35% de matière sèche), elles représenteraient au maximum 5% de la paroi primaire des Poacées (Vogel et al, 2008). Dans la paroi secondaire et surtout en présence de lignines, elles ne sont détectées qu'à l'état de traces (Vogel et al, 2008). Il existe une grande variabilité de composition et de structure des pectines dépendante de l'espèce végétale et du tissu considéré.

De même le stade de développement du tissu ou de la cellule influence grandement la teneur et la composition des pectines des parois.

Les pectines sont des polysaccharides hétérogènes et complexes principalement composés d'acide galacturonique. Les pectines sont constituées de plusieurs domaines (figure 19) liés de façon covalente (Caffall & Mohnen, 2009 ; Harholt et al, 2010) :

- Les homogalacturonanes, homopolymères de résidus d'acide galacturonique liés en α -(1,4), et ses analogues, les xylogalacturonanes, les apiogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes II, possédant des chaînes latérales composées d'un seul résidu ou de courtes chaînes osidiques,
- les rhamnogalacturonanes I, polymères complexes dont la chaîne principale est composée d'une alternance de rhamnose et d'acide galacturonique liés en α -(1,2) et substituée en O-4 par des chaînes latérales de structure variée, et principalement constituées d'arabinose et/ou de galactose.

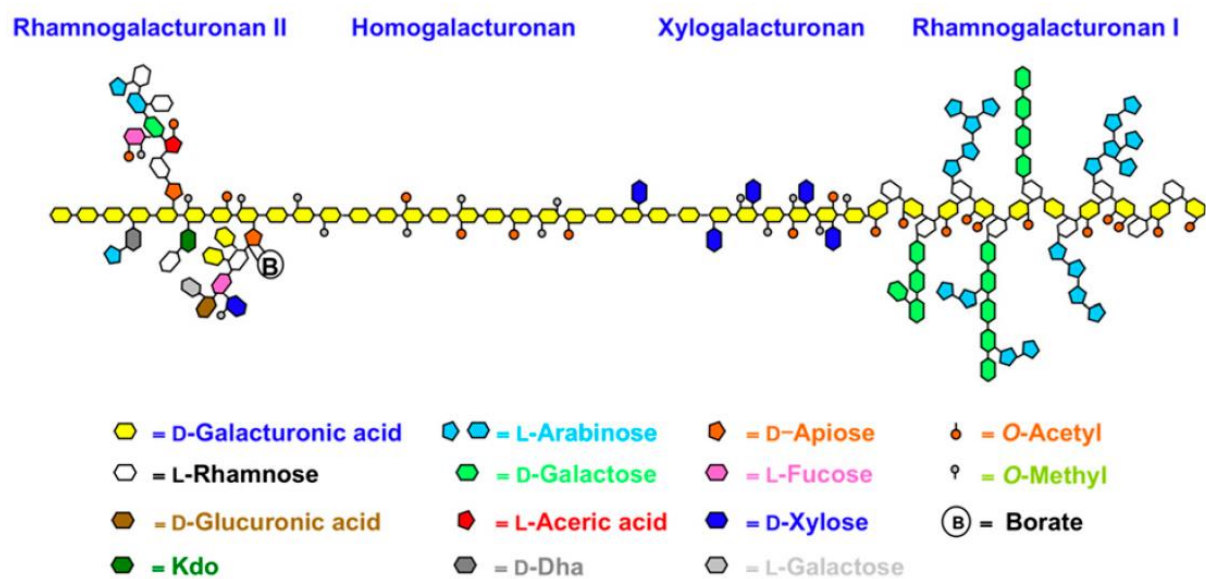


Figure 19 : Représentation schématique des différents domaines pectiques connus et de leurs compositions (d'après Harholt et al, 2010)

Les pectines constituent une matrice amorphe dans laquelle baignent les autres composants de la paroi. Elles ont un rôle important dans l'adhésion cellulaire (Carpita & Gibeaut, 1993 ; Willats et al, 2001, Jarvis et al, 2003). Elles seraient également impliquées dans la porosité, le pH et le niveau d'hydratation de la paroi végétale (Mohnen, 2008).

La synthèse des pectines est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses enzymes. Après activation des résidus osidiques dans le cytosol, ceux-ci sont transportés dans l'appareil de Golgi où a lieu la synthèse des pectines (Delmer, 1999). Les pectines sont ensuite transférées dans la paroi où elles s'associent à la matrice extracellulaire (Driouich et al, 1993). Une fois dans la paroi, les pectines peuvent encore être modifiées tout au long de la vie de la cellule par l'intervention de diverses enzymes de remodelage.

1.3.3. Les protéines pariétales

Les protéines représenteraient en général environ 10% de la masse de la paroi primaire des Eudicotylédones et 1% des parois de Poacées (Vogel et al, 2008). Elles sont séparées en deux catégories : les protéines structurales, qui contribuent à l'architecture de la paroi, et les protéines de remodelage de la paroi, qui interviennent dans les processus de modification des composés pariétaux.

Les protéines structurales sont majoritaires au sein de la paroi végétale. Elles interviennent dans l'assemblage, l'expansion, le niveau d'hydratation et la perméabilité mais n'ont pas de propriétés catalytiques. Les protéines structurales sont classées en plusieurs catégories : les protéines riches en hydroxyproline (HRGP), les protéines riches en glycine (GRP), les protéines riches en Proline et les arabinogalactanes protéines (AGP). Ces protéines ont une structure complexe caractérisées par des séquences répétées qui pourraient constituer chacune un domaine fonctionnel. Ce sont des protéines modifiées par des processus de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation et l'hydroxylation.

Les protéines de remodelage de la paroi sont principalement des enzymes de modification des constituants pariétaux. Elles contribuent à la plasticité pariétale en modifiant les composés polysaccharidiques qui constituent la paroi. Nombreuses et variées, elles sont impliquées dans le relâchement et l'extension de la paroi (les hydrolases telles que les cellulases, les pectines méthylestérases, les pectines acétylestérases ou encore les féruloylestérases), la polymérisation ou la dégradation de certains composés pariétaux (peroxydases, laccases, pectine lyases), la défense contre les organismes pathogènes, la signalisation cellulaire (Seifert & Roberts, 2007).

1.3.4. La silice, la cutine et les cires, des composants des parois des épidermes

La silice est abondante dans la paroi secondaire des Poacées (Vogel et al, 2008 ; Zhang et al, 2015). Elle permet l'augmentation de la rigidité et la résistance mécanique des parois lignocellulosiques. Elle favoriserait la défense des plantes envers les stress biotiques et abiotiques. Localisée sous forme d'inclusion dans des tissus spécifiques comme l'épiderme des tiges et des feuilles, elle empêcherait la pénétration des agents pathogènes. Des études suggèrent également que des apports en silice pourraient augmenter la production de biomasse mais que la silice gênerait la digestibilité des parois (Zhang et al, 2015). Les parois de l'épiderme peuvent accumuler également des polymères d'acides gras, la cutine formant la cuticule et les cires. Avec la silice, ces polymères forment une barrière physique (Ma & Yamaji, 2008). Il est connu que la cuticule comporte également des acides hydroxycinnamiques et plus précisément de l'AF et de l'acide *para*-coumarique (Rautengarten et al, 2012 ; Cheng et al, 2013).

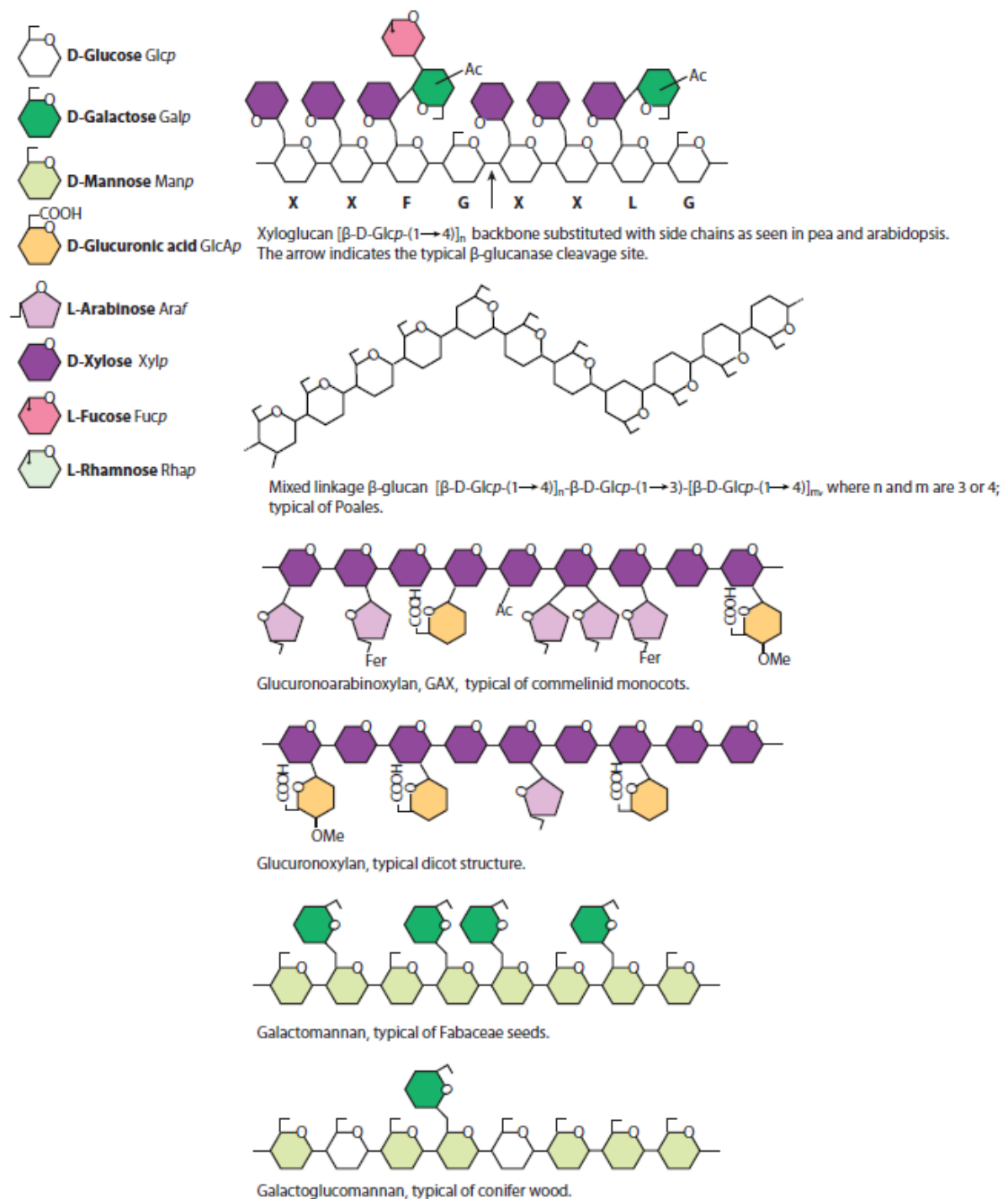


Figure 20 : Représentation schématique de la composition de différentes hémicelluloses rencontrées dans les parois végétales de diverses espèces (d'après Vibe-Scheller & Ulvskov, 2010)

1.3.5. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides complexes composées de 300 à 5000 oses, principalement du glucose, du galactose, du xylose, du rhamnose, du fucose et de l'arabinose (Vibe-Scheller & Ulvskov, 2010). Elles peuvent également contenir des oses acides tels que l'acide glucuronique. Lors de la dégradation de la matière lignocellulosique afin de produire des biocarburants, les hémicelluloses sont généralement peu exploitées (Yang & Wyman, 2004 ; Jeoh et al, 2007). En particulier dans le cas des *Poaceae*, elles sont composées majoritairement de pentoses qui ne sont pas métabolisés par les microorganismes comme les levures, réduisant ainsi l'efficacité de la fermentation des produits de saccharification des parois (Rennie & Vibe-Scheller, 2014).

Les hémicelluloses possèdent un rôle structural majeur. Elles apportent une certaine élasticité dans les parois jeunes et contribuent au renforcement des parois lignifiées grâce aux interactions qu'elles réalisent avec d'autres constituants pariétaux.

Les hémicelluloses sont classées en plusieurs catégories qui prennent en compte leur composition. On distingue les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes et les β -glucanes mixtes. Les xyloglucanes, les xylanes et les mannanes sont constitués d'une chaîne principale d'oses liés en β -(1,4) sur laquelle vient se positionner des substituants latéraux. La structure des différents hémicelluloses est schématisée en figure 20.

1.3.5.1. Les xyloglucanes

Les xyloglucanes sont constitués d'une chaîne linéaire de résidus glucose liés en β -(1,4) à laquelle vient se substituer du xylose en α -(1,3). Le xylose peut être lui-même substitué par des unités galactose, eux-mêmes pouvant être acétylés et/ou substitués par des unités de fucose (figure 20). Les xyloglucanes sont synthétisés dans l'appareil de Golgi avant d'être exportés vers la paroi cellulaire.

Les xyloglucanes sont principalement retrouvés dans les parois primaires des Angiospermes Eudicotylédones où leur conformation conférée par les liaisons β -(1,4) leur permettent de former des liaisons hydrogènes avec les microfibrilles de cellulose (Hayashi et al, 1987 ; McNeil et al, 1975 ; Vibe-Scheller & Ulvskov, 2010).

Ces liaisons hydrogène avec les microfibrilles de cellulose favorisent l'élasticité dans les parois primaires (Pauly et al, 1999 ; Somerville et al, 2004). Les xyloglucanes sont également présents en moindre quantité chez les Angiospermes Monocotylédones. La structure fine des xyloglucanes varie selon l'espèce considérée (Carpita, 1996).

1.3.5.2. Les mannanes

Les mannanes sont des hémicelluloses riches en mannose. On distingue les mannanes purs constitués d'une chaîne de mannoses liés en β -(1,4), les glucomannanes qui intègrent en plus des unités mannoses, des unités glucoses dans leur chaîne principale, et les galactomannanes et galactoglucomannanes dont la chaîne principale est substituée par des unités galactoses (figure 20). Les mannanes sont également synthétisés dans l'appareil de Golgi avant d'être exportés vers la paroi. Les mannanes sont abondants dans les parois des Gymnospermes et des Ptéridophytes. Chez les Angiospermes, ils sont faiblement représentés (Salmen & Olsson, 1998 ; Carpita, 1996).

1.3.5.3. Les β -glucanes mixtes

Les β -glucanes mixtes sont des hémicelluloses spécifiques des parois primaires des Poacées (Carpita & Gibeaut, 1993 ; Scheller & Ulvskov, 2010). Ce sont des β -(1,3 ; 1,4)-glucanes, composés d'une chaîne de résidus glucose où se succèdent des liaisons de type β -(1,3) et β -(1,4) (figure 20). Ces hémicelluloses ne sont pas ramifiées. Ils sont essentiellement constitués de blocs de trois à quatre résidus D-glucose liés en β -(1,4) séparés par une liaison β -(1,3) interrompant la régularité structurale de la chaîne et favorisant la flexibilité du polymère. Des blocs de degré de polymérisation (DP) supérieur (5, 6, 7 et plus) ont également été identifiés mais ne représentent qu'une faible proportion du polymère (Urbanowicz et al, 2004 ; Yokoyama & Nishitani, 2004 ; Burton & Fincher, 2009 ; Fincher, 2009).

Une controverse existe au sujet de la localisation subcellulaire de la biosynthèse des β -glucanes mixtes. Par immunomarquage avec des anticorps spécifiques des β -glucanes mixtes, plusieurs équipes n'ont pas réussi à obtenir de signal au niveau de l'appareil de Golgi (Philippe et al, 2006 ; Wilson et al, 2006 ; Fincher, 2009) alors que l'équipe de Carpita montraient la présence de β -glucanes mixtes au sein de l'appareil de Golgi dans des coléoptyles de maïs (Carpita et MacCann, 2010).

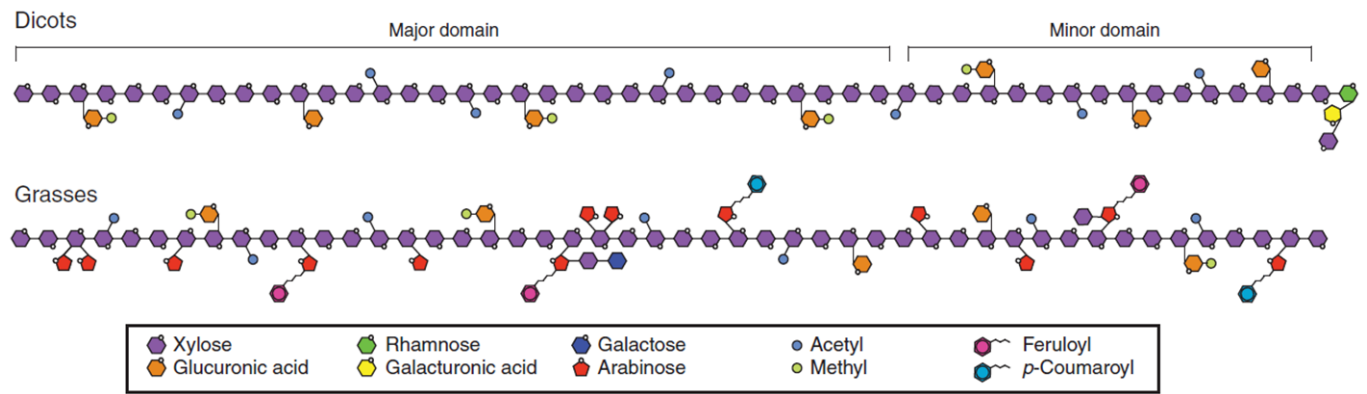


Figure 21 : Représentation schématique de la composition des xylanes des Eudicotylédones et des Poacées (issu de Rennie & Vibe-Scheller, 2014)

Une étude récente a permis de co-localiser par immunomarquage les β -glucanes mixtes et la protéine impliquée dans leur polymérisation, la CSLF6, dans la membrane plasmique, ces hémicelluloses seraient assemblés au niveau de la membrane plasmique (Wilson et al. 2015).

1.3.5.4. Les xylanes

Les xylanes sont une famille de polysaccharides constitués d'une chaîne linéaire d'unités de xylose liés en β -(1,4) sur lesquels viennent se substituer plusieurs types de résidus osidiques et non osidiques et dont la structure dépend des organes et de l'espèce végétale considérés (Ebringerova & Heinze, 2000 ; Saulnier et al, 2012). Chez les Angiospermes Eudicotylédones, les xylanes sont des glucuronoxylanes ; la chaîne de xylose est substituée par de l'acide glucuronique partiellement méthylé (Figure 21 ; Vibe-Scheller & Ulvskov, 2010).

Les (arabino)xylanes des grains de Poacées telles que le blé, le seigle et l'orge sont très étudiés car ils jouent un rôle important dans l'alimentation humaine et animale. Ils font partie des fibres alimentaires bénéfiques pour la santé humaine, par contre, ils ont un rôle néfaste sur les performances des animaux d'élevage, en particulier des volailles (Choct et al, 1999). Ces polysaccharides sont également importants pour les propriétés techno-fonctionnelles des grains de céréales et leur utilisation en panification, biscuiterie et brasserie (Saulnier et al, 2007).

1.3.5.4.1. Structure des xylanes de Poacées

Les xylanes sont constitués d'un squelette d'unités de xylose reliées en β -(1,4) sur lesquels viennent se greffer en O-2 et/ou en O-3 des unités monomériques d'arabinose (figure 21). La fonction alcool primaire en position O-5 de l'arabinose peut être estérifiée par de l'AF (AF) ou de l'pAC. D'autres substituants tels que l'acide glucuronique et son méthyl-ester, l'acide-4-O-méthyl-glucuronique, le xylose ou encore des groupements acétyles sont détectés (figure 21 ; Rennie & Vibe-Scheller, 2014).

La structure des xylanes dépend du tissu considéré (Saulnier et al, 2012). Par exemple, dans le grain de blé mature, les xylanes de l'albumen sont uniquement composés d'arabinose et de xylose.

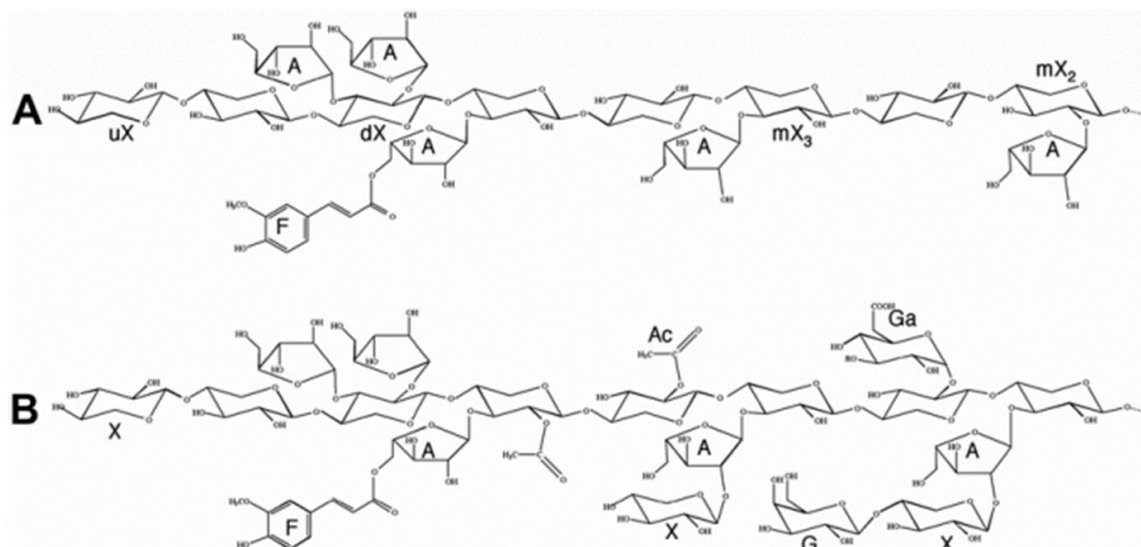


Figure 22a : Structure des xylanes présents dans les différents tissus du grain de blé mature (issu de Saulnier et al, 2012).

A : structure d'arabinoxylanes retrouvés dans l'albumen du grain de blé. B : Structure de xylanes retrouvés dans le péricarpe du grain de blé. X : xylose, G : galactose, Ga : acide glucuronique, F : AF, uX : xylose non-substitué, dX : xylose di-substitué, mX3 : xylose O-3 mono-substitué, mX2 : xylose O-2 mono-substitué.

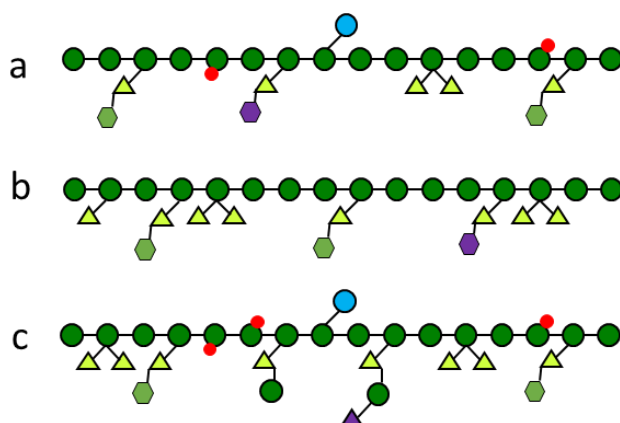


Figure 22b : Représentation schématique du niveau de substitution des xylanes de tige de blé (a), d'albumen de blé (b) et de péricarpe de blé (c).

● : xylose, ▲ : arabinose, ● : acide glucuronique, ▲ : galactose, ● : groupement acétyle, ● : acide férulique, ● : acide *p*-coumarique.

Ils sont donc décrits comme des arabinoxylanes (AX) avec une substitution de la chaîne linéaire de xylose par des unités monomériques d'arabinose majoritairement en α -(1,2) et α -(1,3) (figure 22a A). Certains résidus arabinose liés en α -(1,3) peuvent être estérifiés par l'AF. En revanche, les xylanes du péricarpe du grain de blé mature et, plus généralement, des enveloppes externes des grains de Poacées ont une structure beaucoup plus complexe et très fortement branchée. En plus des substitutions, la chaîne principale de xylose par des monomères d'arabinose et d'acide glucuronique, de courtes chaînes latérales de deux ou trois résidus comportant du xylose, de l'arabinose et parfois du galactose sont également présentes. De plus, des substituants non osidiques tels que les acides hydroxycinnamiques, principalement l'AF et en plus faible proportion l'pAC, sont présents sur l'arabinose des chaînes latérales ainsi que des groupements acétyles sur les résidus xylose du squelette principal (figure 22a B et 22b). La structure des xylanes des tiges est d'une complexité moindre avec un taux de substitution du squelette nettement plus faible mais qui reprend les mêmes éléments structuraux que ceux décrits pour les xylanes du péricarpe des grains à l'exception des chaînes latérales comportant deux ou 3 résidus d'oses neutres. Les xylanes des tiges sont décrits comme des glucurono-arabino-xylanes (GAX) et leur structure est schématiquement illustrée sur les figures 21 (grasses) et 22b.

1.3.5.4.2. Synthèse des xylanes chez les Poacées

Les xylanes sont synthétisés dans l'appareil de Golgi à partir de précurseurs qui sont les oses nucléotides sous l'action de plusieurs enzymes (figure 23). Il a longtemps été présumé que les xylanes étaient produits par des cellulose-synthases like (ou CSL) à l'image d'autres hémicelluloses synthétisées par des CSL (Richmond & Summerville, 2010 ; Dhugga et al, 2004 ; Burton et al, 2006 ; Doblin et al, 2009). Cependant, des études d'expression des gènes codant pour des glycosyltransférases (GT) pendant la formation des parois secondaires (Brown et al, 2005 ; Persson et al, 2005) ou dans l'albumen de grain de blé en développement (Mitchell et al, 2007 ; Zeng et al, 2010 ; Pellny et al, 2012) ont révélé l'abondance des transcrits de certains gènes de la famille des GT 43 et GT 47. Des lignées déficientes pour ces gènes ont été obtenues pour plusieurs espèces dont *A. thaliana* et le blé (Lee et al, 2007 ; Brown et al, 2007 ; Wu et al, 2009, Lovegrove et al, 2013). Ces lignées montrent des défauts de polymérisation de la chaîne principale de xylose (Lee et al, 2007 ; Brown et al, 2007 ; Wu et al, 2009 ; Lovegrove et al, 2013). Chez *A. thaliana*, les lignées altérées pour ces GT 43 et GT 47 montrent un phénotype particulier, le phénotype « irregular xylem ».

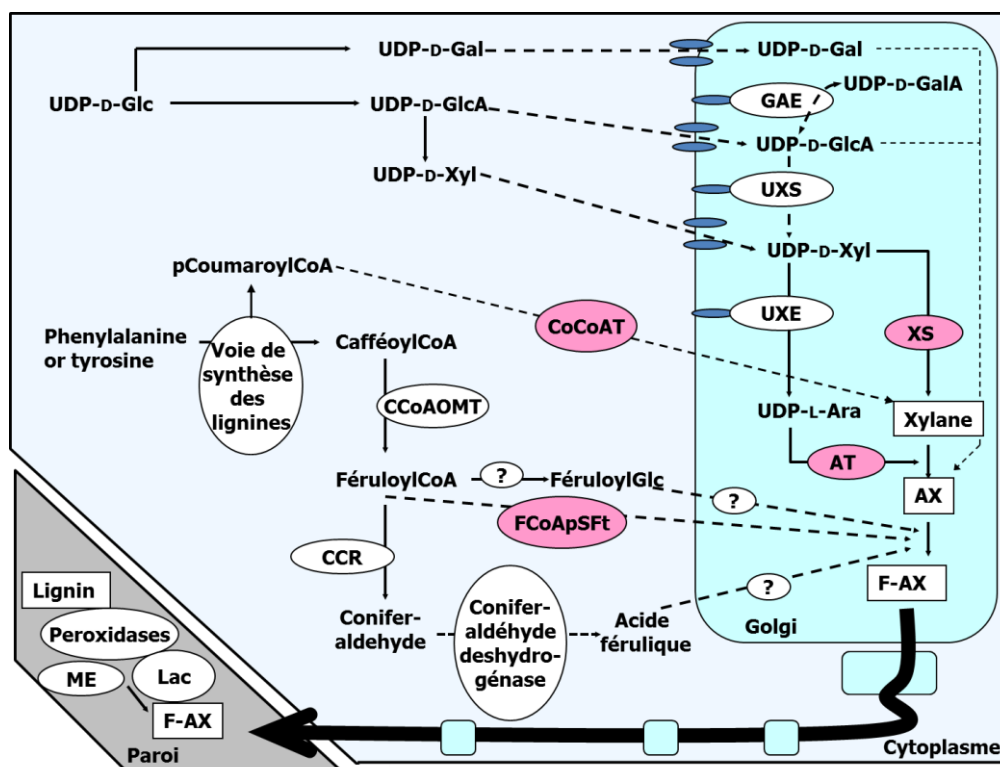


Figure 23 : Synthèse des xylanes dans l'appareil de Golgi des Poacées (adapté de Saulnier et al, 2007).

Les oses nucléotides sont transportés dans la lumière du Golgi par des transporteurs de type Nucleotide Sugar Transporters (ou NST) où un complexe protéique transmembranaire nommé XS pour xylane synthase et composé vraisemblablement des protéines IRX9, IRX10 et IRX14 assemble la chaîne principale. Les substituants sont ajoutés par d'autres enzymes comme par exemple l'arabinoxyltransférase XAT (xylane arabinoxyltransférase GT61). L'AF pourrait être ajouté aux arabinoxylanes sous forme de féruloylCoA ou d'AF ou encore de féruloyl-glucose. Le feruloyl-CoA, le substrat le moins controversé, serait ensuite transporté dans l'appareil de Golgi où il serait lié aux arabinoxylanes par des féruloyltransférases. L'identité moléculaire des féruloyltransférases n'est pas certaine même si un clade de la famille des BAHD acylCoA transférases nommée ici FCoApSft est actuellement considéré comme candidat probable. L'pAC est produit au cours de la synthèse des lignines. Il serait transféré aux xylanes sous forme de pAC-CoA par une acyltransférase, la CoCoAT. Les arabinoxylanes féruloylés seraient ensuite exportés dans la paroi en cours de construction par des vésicules golgiennes. Les précurseurs : UDP-D-Glc (glucose), UDP-D-GlcA (acide glucuronique), UDP-D-GalA (acide galacturonique), UDP-D-Xyl (xylose), UDP-L-Ara (arabinose) et UDP-D-Gal (galactose). Les enzymes : UXE : UDP-D-xylose 4-épimérase, GAE : UDP-D-acide glucuronique 4-épimérase, CoCoAT : coumaroyl-CoA transférase, FCoApSft : féruloyl-CoA - polysaccharide féruloyltransférase, CCR : cinnamoyl-CoA réductase, CCoAOMT: cafféoyl-CoA O-méthyltransférase, XS : xylane synthase, AT : arabinoxyltransférases, et ? : enzymes inconnues.

Il est caractérisé par le collapse des vaisseaux du xylème. C'est pourquoi les gènes correspondants ont été nommés *IRX9* et *IRX14*, gènes appartenant à la famille GT 43, et *IRX10*, gène appartenant à la famille GT 47 (Lee et al, 2007 ; Brown et al, 2007 ; Wu et al, 2009).

Prédites comme protéines membranaires possédant un seul ancrage à l'extrémité N-terminal pour certaines d'entre elles, ces enzymes fonctionneraient en complexes protéiques associées à d'autres enzymes impliquées dans la synthèse ou le transfert des substituants tels que l'UDP-arabinopyranomutase (de la famille GT 75) qui produit l'arabinofuranose (Vibe-Scheller & Ulvskov, 2010 ; Zheng et al, 2010 ; Rautengarten et al, 2011) ou la glucuronyltransférase, appelée aussi GUX (issue de la famille GT 8) qui transfère les résidus d'acide glucuronique (Mortimer et al, 2010 ; Rennie et al, 2012 ; Oikawa et al, 2010).

La famille GT 61 a été étudiée pour son rôle dans la synthèse des xylanes en raison de la différence d'expression de gènes appartenant à cette famille entre *A. thaliana*, dont les xylanes sont dépourvus d'arabinose, et le riz (Mitchell et al, 2007 ; Sado et al, 2009 ; Pellny et al, 2012). Des lignées de blé sous-exprimant une GT 61 ont été produites ; ces lignées montrent une diminution du taux de substitution en position O-3 des xylanes par l'arabinose. De plus, en transformant *A. thaliana* avec le gène GT 61 correspondant ces chercheurs ont fait produire par la plante des arabinoxylanes (Anders et al, 2012). Un second membre de cette famille GT 61 a été démontré comme impliqué dans le transfert de résidus de xylose sur le squelette principal des arabinoxylanes (Chiniquy et al, 2012).

Selon des études récentes, il se pourrait que l'ajout des esters d'AF et pAC aux résidus arabinose des AX et des GAX soit catalysé par des enzymes appartenant à la famille des BAHD (Bartley et al, 2013 ; Piston et al, 2010). Le nom BAHD provient des premières lettres des quatre enzymes caractérisées appartenant à cette famille d'enzymes, BEAT pour benzalcool O-acétyltransférase, AHCT pour anthocyanine O-hydroxycinnamoyltransférase, HCBT pour anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase et DAT pour déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase (Yang et al, 1997 ; Dudareva et al, 1998 ; Fujiwara et al, 1997 ; St Pierre et al, 1998 ; St Pierre & De Luca, 2000 ; D'Auria, 2006). La famille BAHD est donc composée d'enzymes de type acyltransférase catalysant la formation de composés du métabolisme secondaire des plantes à partir de thioesters coenzyme A (D'Auria, 2006).

Cette famille est multigénique et comprend plusieurs dizaines de membres classés en plusieurs clades (Withers et al, 2012). Ces enzymes ont d'abord été identifiées comme candidates impliquées dans le transfert d'AF sur les xylanes par l'analyse d'expression différentielle des familles de protéines entre *A.thaliana* et le riz (Mitchell et al, 2007). Ces auteurs se sont intéressés à un clade particulier des BAHD possédant un domaine PF02458. Des lignées où l'expression de gènes BAHD a été altérée ont été générées notamment chez le riz. Ainsi une lignée de riz sur-exprimant le gène BAHD *OsAT10* a montré une teneur en pAC estérifié aux xylanes trois fois plus importante que celle des plantes non transformées (Bartley et al, 2013). La sous-expression de plusieurs BAHD chez le riz a montré une légère diminution de la teneur en AF estérifié aux xylanes (Piston et al, 2010). Cependant, chez le blé et *B. distachyon*, la diminution de l'expression de gènes BAHD candidats similaires n'a pas montré d'effet significatif (Molinari et al, 2013).

Si le rôle des BAHD dans le transfert des acides hydroxycinnamiques sur les xylanes est avéré, des questions restent en suspens car ces enzymes sont cytoplasmiques. En effet, la polymérisation des xylanes et le transfert d'arabinose ont lieu dans l'appareil de Golgi et par immunomarquage avec un anticorps ciblant spécifiquement les arabinoxylanes féruloylés, il a été montré que ces composés étaient présents dans l'appareil de Golgi (Philippe et al, 2007). Un intermédiaire cytosolique tel que le féruloyl-UDP-arabinose a été proposé (Buanafina, 2009). Enfin, des études ont démontré que la féruloylation des xylanes pouvait également se dérouler dans la paroi (Mastrangelo et al, 2009).

Les xylanes formés au sein de l'appareil de Golgi sont ensuite exportés vers la paroi par des vésicules golgiennes. Au cours de leur maturation, les cellules végétales sont capables de modifier la structure des xylanes en produisant des enzymes de modification telles que des trans- β -xylanases, des xylosidases et des arabinofuranosidases (Frankova & Fry, 2011 ; Bosch et al, 2011 ; Renie & Vibe-Scheller, 2014).

1.3.5.4.3. Fonction des xylanes dans les parois des céréales

Les xylanes semblent ne réaliser que peu de liaisons hydrogène avec les chaînes de β -glucanes mixtes ou la cellulose du fait de la présence des résidus arabinose (Saulnier et al, 2012).

Tableau 8 : Structure des trois monomères de lignines

Nom	Structure
Alcool <i>p</i> -coumarylique (monomère H)	
Alcool coniférylique (monomère G)	
Alcool sinapylique (monomère S)	

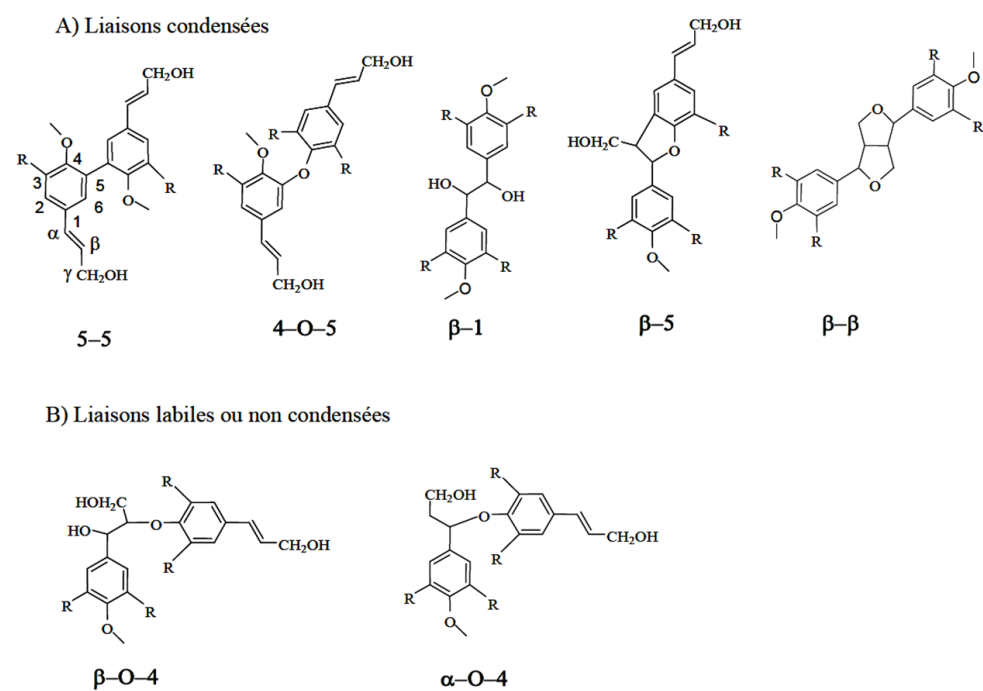


Figure 24 : Les différentes liaisons entre les monomères existant dans les lignines. R : H ou OCH₃ (Thèse de Barakat, 2007).

Ils forment cependant des liaisons covalentes avec d'autres chaînes de xylanes ou avec les lignines par l'intermédiaire des acides féruliques qu'ils ont incorporés (Saulnier et al, 2012). Ceci s'effectue selon un mécanisme de couplage oxydatif (voir paragraphe 3.7 ; Fry, 1986 ; Wallace et al, 1995). Les xylanes seraient donc impliqués dans l'assemblage de la paroi, la cohésion cellulaire et l'expansion cellulaire (Iiyama et al, 1994). Dans l'albumen des grains, les arabinoxylanes seraient impliqués dans le contrôle du niveau d'hydratation de la paroi (Saulnier et al, 2007 ; Saulnier et al, 2012).

1.3.6. Les lignines

Les lignines constituent le second biopolymère le plus représenté sur Terre, après la cellulose et représentent près de 30 % du carbone organique terrestre (Ralph et al, 2007). Elles forment un réseau très complexe et très stable puisqu'une fois en place, les lignines ne sont pas dégradées par la plante. Les lignines sont majoritairement composées de trois différents monomères formés après la polymérisation d'alcools appelés monolignols. Ces trois monolignols se distinguent les uns des autres par le degré de méthylation de leur noyau aromatique. L'alcool *p*-coumarylique qui formera le monomère H ou unité *p*-hydroxyphényle n'a pas de groupement méthoxyl, l'alcool coniférylique qui formera le monomère G ou unité guaïacyle en possède un et l'alcool sinapylique qui formera le monomère S ou unité syringyle en possède deux (tableau 8).

1.3.6.1. Structure des lignines dans les parois

Les lignines sont des polymères aromatiques tridimensionnels à la structure complexe et hétérogène (Monties, 1991). Les monomères de lignines sont liés entre eux par différents types de liaisons plus ou moins résistantes. Les liaisons carbone-carbone (liaisons 5-5, β -1, β -5 et β - β) et les liaisons diaryl éther (4-O-5) sont appelées liaisons « condensées » car elles sont résistantes aux différentes réactions de lyses chimiques communes (figure 24). Les liaisons de type éther (α -O-4, β -O-4) sont appelées liaisons « labiles » ou « non condensées » car elles sont aisément dégradables par des réactions chimiques usuelles comme lors de thioacidolyse (figure 24, Thèse de Catherine Lapierre, 1986). Parmi les liaisons dites « labiles », ce sont les liaisons de type β -O-4 qui sont le plus communément trouvées dans les lignines naturelles. Elles y représentent entre 40 et 60 % des liaisons (Adler, 1977).

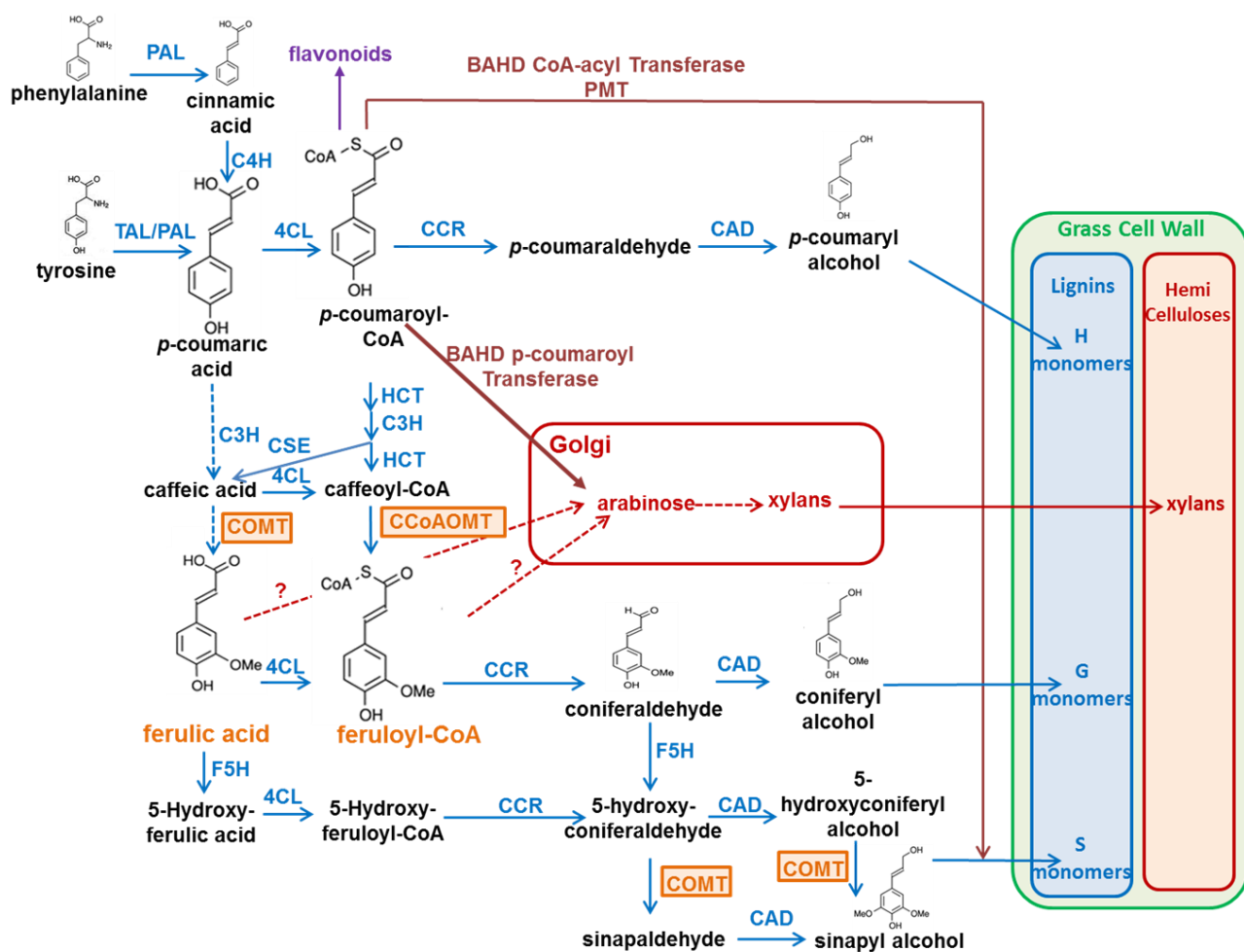


Figure 25 : Voie de biosynthèse des lignines chez les Poacées

PAL : phénylalanine ammonia-lyase, TAL : tyrosine ammonia-lyase, C4H : cinnamate 4-hydroxylase, 4CL : 4-coumarateCoA ligase, CCR : cinnamoyl-CoA réductase, C3H : coumarate 3-hydroxylase, HCT : *p*-hydroxycinnamoyl-CoA/shikimate *p*-hydroxycinnamoyl transférase, CSE : caffeoyl shikimate esterase, COMT : acide caféique/5hydroxyconiféraldéhyde *O*-méthyl-transférase, CCoAOMT : caféoylcoenzyme A *O*-méthyltransférase, CAD : alcool cinnamylique déshydrogénase, F5H : férulate 5-hydrolase, PMT : *p*-coumaroyl-méthyltransférase.

La teneur des lignines en liaisons « condensées » augmente avec la proportion en unités H et G puisqu'elles possèdent un carbone C5 libre permettant la formation de liaisons carbone-carbone. L'augmentation de la proportion d'unités S entraîne une élévation de la teneur en liaisons « non condensées » puisque les unités S sont méthoxylées en position C5.

1.3.6.2. Synthèse des monolignols

La synthèse des lignines a été étudiée chez plusieurs organismes comme *A. thaliana*, le peuplier, le maïs ou encore le sorgho. La voie de biosynthèse des monolignols comprend de nombreuses étapes, dont de nombreux schémas ont été proposés et remaniés ces dernières années (figure 25).

La biosynthèse des monolignols a lieu dans le cytosol des cellules végétales à partir de la phénylalanine ou de la tyrosine dans le cas des Poacées (figure 25 B) ou seulement de la phénylalanine dans le cas des Eudicotylédones (figure 25 A). Elle débute par une désamination de la chaîne latérale de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia-lyase (ou PAL). La cinnamate 4-hydroxylase (ou C4H) vient ensuite hydroxyler le cycle aromatique pour produire l'pAC. Dans le cas des Poacées, la tyrosine peut être transformée en pAC par une PAL à activité tyrosine ammonia-lyase (Roeler et al, 1997). L'pAC est thioestérifiée par la 4-coumarateCoA ligase (4CL). Cette étape aboutit à la formation de *p*-coumaroyl-CoA. Ce composé conduit à la synthèse des unités H après sa réduction réalisée par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) en *p*-coumaraldéhyde puis en l'alcool *p*-coumarylique par l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD). Le *p*-coumaroyl-CoA est également utilisé par la *p*-hydroxycinnamoyl-CoA/shikimate *p*-hydroxycinnamoyl transférase (HTC) et conduit aux acides shikimiques ou quiniques. Le *p*-coumaroyl-CoA peut enfin servir de substrat à la voie de synthèse aboutissant à la formation de différents phénylpropanoïdes tels que les flavonoïdes et les stilbènes (cette voie est différente de celle des lignines). À partir des acides shikimiques ou quiniques, la coumarate 3-hydroxylase (C3H) catalyse une hydroxylation donnant un substrat retraité par la HTC et aboutissant à la formation de cafféoyl-CoA (Hoffmann et al, 2004). La cafféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) intervient alors en O-méthylant en position trois le cycle aromatique de la cafféoyl-CoA produisant ainsi le féruloyl-CoA (Ye et al, 1994 ; Inoue et al, 1998). Ce composé est alors pris en charge par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) qui va le réduire en coniféraldéhyde.

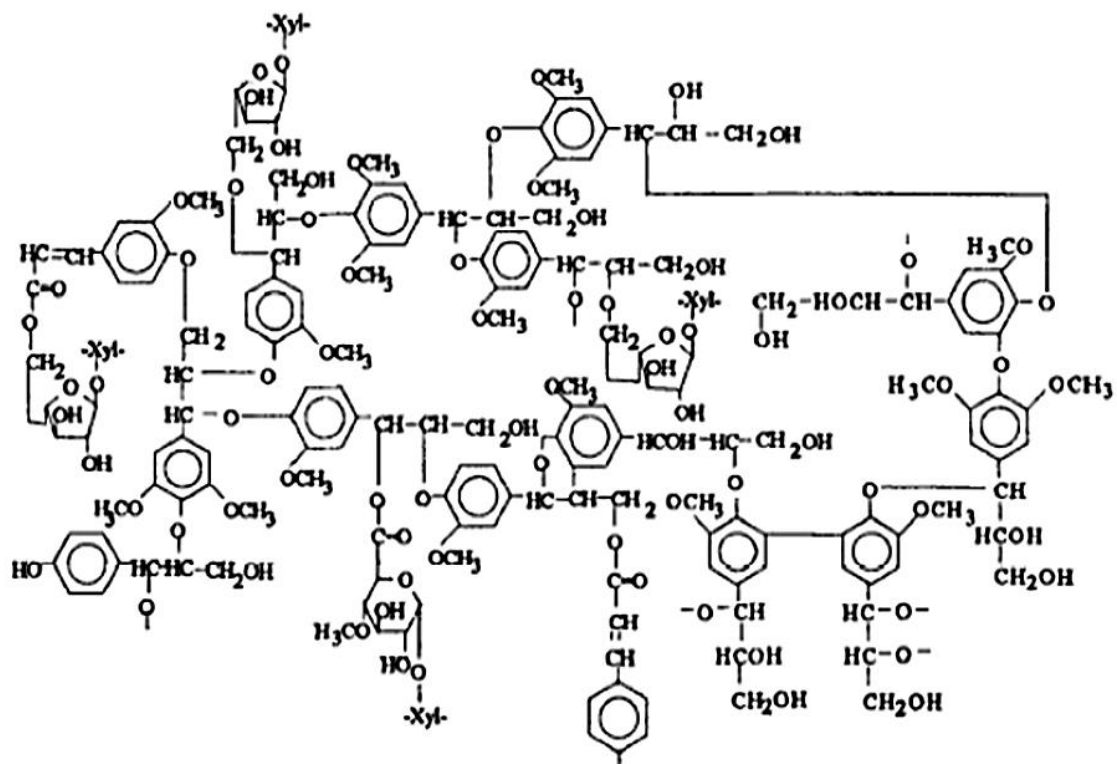


Figure 26 : Modèle de la structure chimique de lignines de Poacées (d'après Sun et al, 1997)

Le coniféraldéhyde peut être utilisé comme substrat par l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD) afin de produire de l'alcool coniférylique, c'est-à-dire le monomère G. Le coniféraldéhyde ainsi que l'alcool coniférylique peuvent également servir de substrat à la férulate 5-hydrolase (F5H) afin de fournir respectivement du 5-hydroxyconiféraldéhyde ou de l'alcool 5-hydroxyconiférylique. Ces deux composés sont ensuite pris en charge par l'acide caféique/acide 5-hydroxyférulique *O*-méthyltransférase (COMT) qui va les méthoxiler en position cinq du cycle aromatique produisant respectivement du sinapaldéhyde et l'alcool synapylique, c'est-à-dire le monomère S. Le sinapaldéhyde peut également, sous l'action de la CAD, se transformer en monomère S.

Les monolignols sont polymérisés en lignines mais peuvent être également couplés pour former des lignanes, composés phénoliques formés de deux unités monolignols (Schmidt et al, 2010 ; Wang et al, 2013). De plus, beaucoup d'enzymes et d'intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols sont impliqués dans la production de composés phénoliques divers (figure 30).

Des voies annexes ont été proposées notamment pour la synthèse de l'AF (voir paragraphe 1.3.7 et figure 25 B).

1.3.6.3. Transport et polymérisation des monolignols

Le dépôt de lignines s'effectue après l'arrêt de la croissance des cellules, lors de la mise en place de la paroi secondaire. La proportion de lignines dans une cellule augmente de la lamelle moyenne à la paroi secondaire (Hatfield & Vermerris, 2001). La composition en monomères H, G et S des lignines varie également suivant le type cellulaire, le tissu, le niveau de maturité de la plante mais aussi l'origine botanique (Lapierre et al, 1986 ; Billa & Monties, 1995 ; Chesson et al, 1997 ; Monties, 1998). Alors que les lignines de Gymnospermes sont principalement constituées de monomères G, celles d'Angiospermes possèdent en plus des monomères S (Thèse Catherine Lapierre, 1986 ; Vogel et al, 2008). Les lignines de Poacées sont composées principalement de monomères G et S et de façon minoritaire, de monomères H (figure 26, Sun et al, 1997 ; Vogel et al, 2008). La présence de ces monomères H en quantité non négligeable permettrait une plus grande fréquence des liaisons condensées dans la matrice de lignines (Lapierre, 1993).

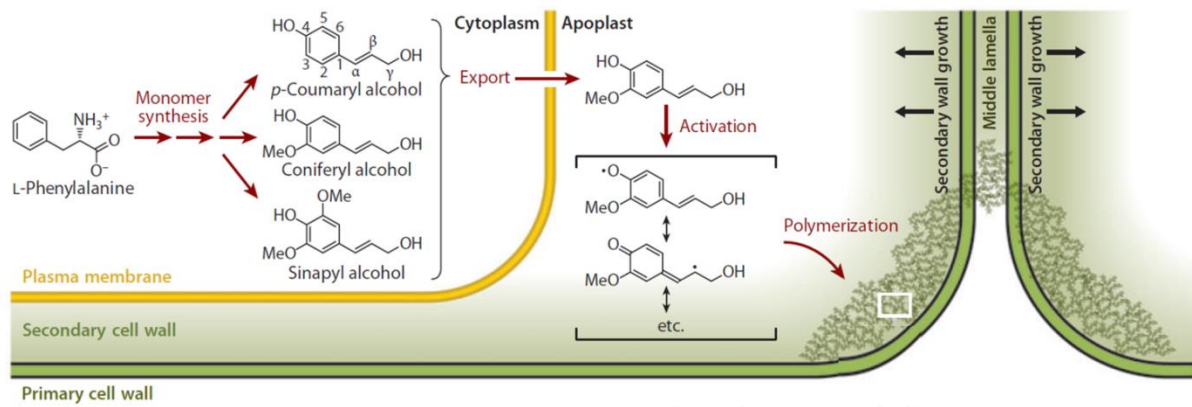


Figure 27 : Synthèse, transport et polymérisation des lignines au sein d'une cellule végétale.
(Issu de Bonawitz & Chapple, 2010)

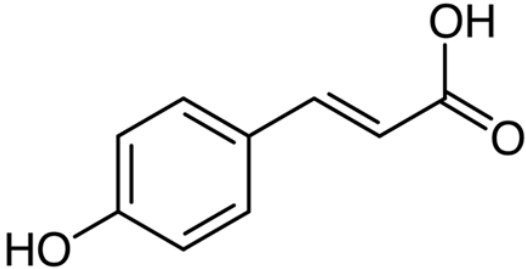
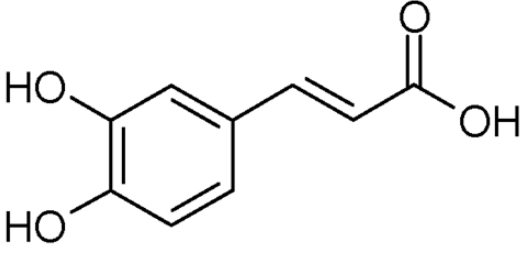
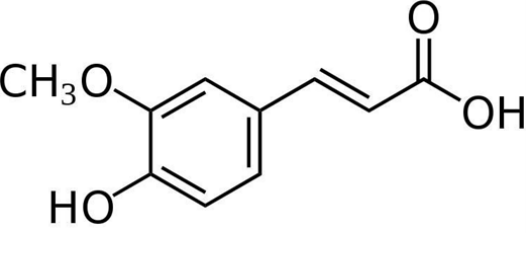
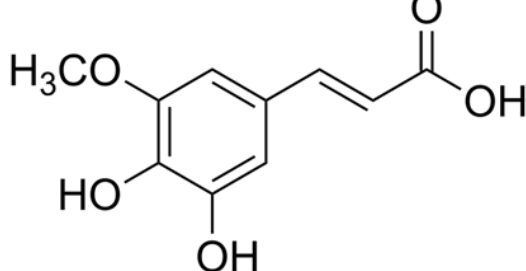
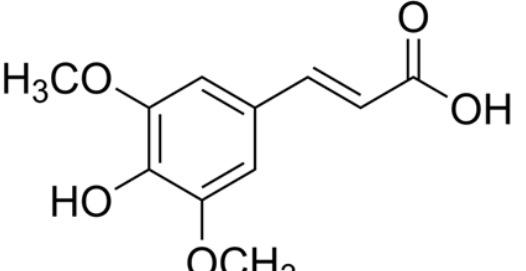
Les monolignols sont des composés toxiques et très réactifs. Il semblerait que, après leur synthèse dans le cytosol, les monolignols soient « inactivés » et stockés sous forme glycosylée par les glucosyltransférases UDP-dépendantes appelées communément UGT (Donaldson, 2001). Ils seraient ensuite transportés vers la paroi par des transporteurs ABC (figure 27 ; Samuels et al, 2002 ; Boerjan et al, 2003 ; Kaneda et al, 2008). Dans la paroi, ils seraient déglycosylés pour être activés sous l'action de glucosidases avant d'être polymérisés (figure 27 ; Bonawitz & Chapple, 2010). La polymérisation des monolignols activés a lieu par couplage radicalaire sous l'action de peroxydases et de polyphénol oxydases/laccases (Christensen et al, 2001 ; Boerjan et al, 2003).

La lignification des parois commence au niveau de la lamelle moyenne, se poursuit au sein de la paroi primaire avant d'atteindre la paroi secondaire. Elle débute au niveau des angles de la cellule avant de s'étendre au reste de la matrice de polymères (Donaldson, 2001). Elle commence par l'arrivée des précurseurs G et H qui diffuseraient dans la matrice extracellulaire avant d'être polymérisées sous l'action des peroxydases et des laccases. En fin de lignification, les précurseurs d'unités S sont intégrés à la matrice de lignines (He & Terashima, 1990 ; He & Terashima, 1991).

La distribution des monomères H, G et S dans la matrice de lignines est dépendante de l'espèce considérée ainsi que du stade de développement (Barrière et al, 2007). Les lignines sont apparues chez les Trachéophytes il y a 420 millions d'années et ont sans doute fortement contribué à l'adaptation des plantes à une vie en milieu terrestre (Weng & Chapple, 2010). Les lignines se sont petit à petit complexifiées avec l'apparition des Gymnospermes contenant principalement des monomères G et des traces de monomères H il y a 350 millions d'années, puis avec l'apparition des Angiospermes dicotylédones il y a 250 millions d'années contenant des quantités équivalentes de monomère G et S et des traces de monomères H. Les Poacées, apparues il y a 50 à 70 millions d'années, possèdent des lignines composées de ces trois unités (Weng & Chapple, 2010 ; Murat et al, 2012).

D'autres composés phénoliques tels que l'AF et l'pAC ou encore le coniféraldéhyde, le sinapaldéhyde et les lignanes peuvent être incorporés lors de la polymérisation des lignines, mais en proportion inférieure par rapport aux unités H, G et S.

Tableau 9 : Structure des principaux acides hydroxycinnamiques rencontrés dans les parois des végétaux

Nom	Structure
pAC	
Acide caféique	
AF	
Acide 5-hydroxyférulique	
Acide sinapique	

Le coniferaldéhyde et le sinapaldéhyde sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse des monolignols ainsi que l'pAC chez les Poacées. L'AF est un acide hydroxycinnamique proposé comme étant produit au cours ou en marge de la voie de biosynthèse des monolignols.

1.3.6.4. Fonction des lignines dans la paroi des Poacées

Les lignines constituent une matrice amorphe qui occupe la place laissée libre par les autres constituants de la paroi, venant renforcer celle-ci. Le caractère hydrophobe des constituants des lignines assurent également l'imperméabilité de la paroi lignifiée. Les lignines contribuent au port érigé de la plante. Une fois lignifiée, la forme d'une cellule ne sera plus modifiée par la pression de turgescence. Les lignines contribuent à la résistance des cellules aux contraintes mécaniques telles que la compression ou encore à la résistance des cellules du xylème qui assurent la conduction de la sève brute.

Le dépôt de lignines peut également intervenir en réponse à un stress biotique ou abiotique, les lignines permettant alors la diminution de la dégradabilité des parois.

Les lignines de Poacées possèdent plusieurs spécificités telles que des pAC acylés aux unités S (Ralph et al, 1994 ; Grabber, 1996), des liaisons entre les monomères G et les arabinoxyldes via des ponts d'AF (Jacquet et al, 1995) et une forte proportion en composés phénoliques libres (Lapierre, 1993). Les lignines de Poacées sont par conséquent aisément hydrolysables en milieu alcalin, contrairement aux lignines d'Angiospermes Eudicotylédones (Lapierre, 1993).

1.3.7. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques, tels que l'AF ou l'pAC, sont des composés phénoliques (tableau 9). La distribution en acides hydroxycinnamiques est dépendante de l'espèce et de l'organe étudiés. Dans les parois des Poacées, l'AF et l'pAC sont majoritaires, suivis de façon moins importante, des acides caféique, 5-hydroxyfêrulique et sinapique (Yamamoto et al, 1987, tableau 9).

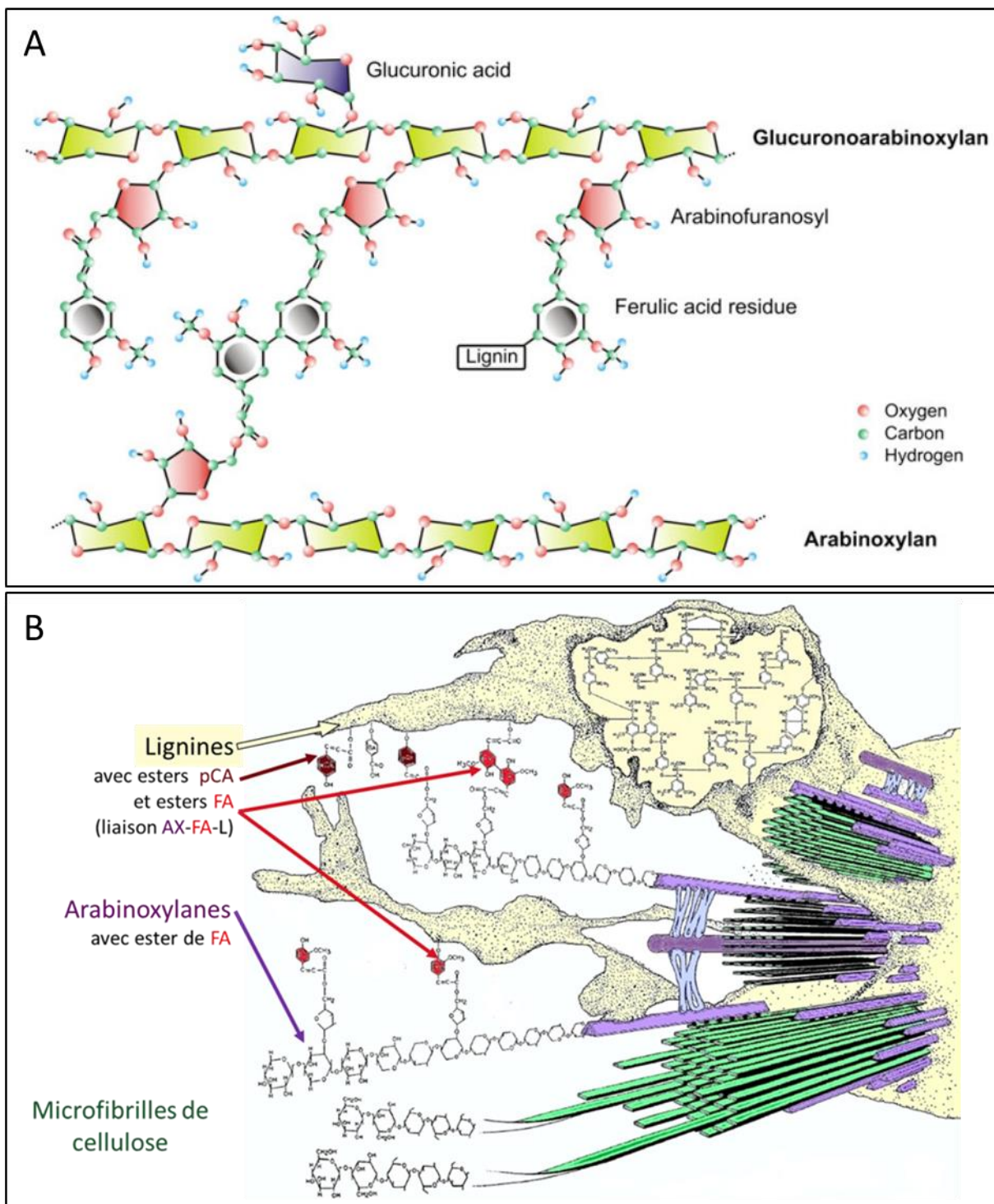


Figure 28 : Schéma de la paroi secondaire des Poacées et des différentes liaisons intervenant entre les acides hydroxycinnamiques, les lignines et les arabinoxylanes. A : issu de De Oliveira et al, 2014 ; B : adapté de Bidlack et al, 1992.

Les acides hydroxycinnamiques contribuent à l'architecture de la paroi et participent à l'établissement de pontages covalents entre les différents polymères pariétaux (Helm & Ralph, 1993 ; Ralph et al, 1994).

1.3.3.7.1. Liaisons des acides hydroxycinnamiques dans les parois

Les acides hydroxycinnamiques sont des molécules bi-fonctionnelles : elles sont capables d'engager leur fonction carboxylique dans une liaison ester et leurs groupements hydroxyphénols dans des liaisons éthers (Scalbert et al, 1985 ; Jacquet et al, 1995).

Dans les parois, l'AF est lié aux xylanes par une liaison de type ester (figure 28 A et 28 B). Il peut servir de pont entre les xylanes par formation de dimères d'AF ou ponts diférulates (figure 28 A). Ces dimères d'AF sont formés par couplage oxydatif suivant un mécanisme similaire à la dimérisation des monolignols. Des oxydases, dont les peroxydases, seraient impliquées dans ce processus (Burr & Fry, 2009). L'AF peut également être lié aux lignines par couplage radicalaire au niveau du carbone β des unités de lignines en formant une liaison éther sous l'action de peroxydases ou de polyphénol oxydases (figure 28 A et 28 B ; Iiyama et al, 1984, Lam et al, 1992 ; Jacquet et al, 1995). L'AF impliqué dans les liaisons éthers avec les lignines est également lié aux xylanes par des liaisons esters. Ces liaisons sont très importantes pour l'assemblage des parois et sont proposées comme le point de nucléation des lignines, c'est-à-dire le point de départ de la polymérisation des monolignols au sein des parois.

L'pAC est majoritairement lié aux unités S des lignines par des liaisons esters et est également lié à environ 10% des unités G chez le maïs (Ralph et al, 1994 ; Grabber et al, 1996) (figure 28). On peut également le retrouver estérifié aux arabinoxylanes dans les parois de certaines Poacées comme le blé (Saulnier et al, 2007 ; Vibe-Scheller & Ulvkov, 2010). Il n'a jamais été observé de dimères de pAC issus de couplage oxydatif *in planta* mais il existe des dimères issus de réactions photochimiques (catalysées par les UV) nommés acides truxillique et truxinique (Ralph et al, 1994 ; Krauze-Baranowska, 2002). Ces dimères seraient impliqués dans la défense contre les pathogènes (Hartley & Morrison, 1990 ; Bergvinson et al, 1994 ; Grayer & Harborne, 1994 ; Ralph et al, 1994). Ils devraient être capables de coupler des chaînes d'AX entre elles et un couplage AX-lignines ne sont pas à exclure (Hartley & Morrison, 1990 ; Krauze-Baranowska, 2002).

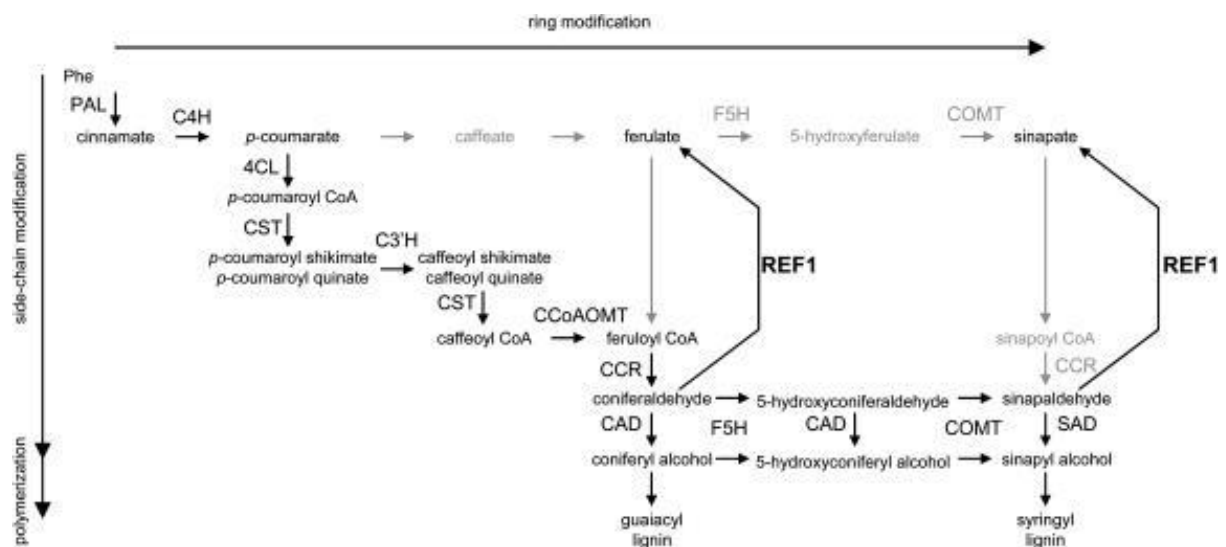


Figure 29 : Voies proposées pour la synthèse de l'AF en parallèle de la synthèse des lignines (Nair et al, 2004).

L'AF peut être intégré aux pectines de certaines Eudicotylédones de l'ordre des Caryophyllales auxquelles appartiennent plusieurs espèces d'intérêt agronomique telles que la betterave, la betterave sucrière, les épinards ou encore des plantes ornementales comme le bougainvillier. Au sein des parois primaires de ces plantes, l'AF serait lié aux résidus galactose et arabinose des chaînes latérales des pectines par des liaisons de type ester (Harris & Trethewey, 2010).

L'AF et l'pAC sont également intégrés à la cutine et à la subérine qui sont des polymères aliphatiques complexes présents au niveau des cellules de l'épiderme des plantes (Riley & Kolattukudy, 1975). Des BAHD ont été identifiées comme impliquées dans le transfert d'AF sur les cutines d'*A. thaliana* chez les mutants *Deficient in Cutin Ferulate* (Rautengarten et al, 2012).

1.3.7.2. Synthèse des acides férulique et *p*-coumarique chez les Poacées et transfert sur les xylanes et les lignines

Les acides hydroxycinnamiques sont issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui inclut la voie de biosynthèse des monolignols (voir paragraphe 1.3.6). Ils sont synthétisés dans le compartiment cytosolique des cellules végétales.

Il a été proposé que l'AF serait produit par la COMT par *O*-méthylation de l'acide caféique (Davin & Lewis, 1992 ; Humphreys et al, 1999 ; Osakabe et al, 1999 ; Li et al, 2000 ; Parvathi et al, 2001), mais cette hypothèse provenait du fait que *in vitro* des COMT catalysaient la transformation de l'acide caféique en AF. Par ailleurs, une association génétique significative entre un variant de gène codant pour une COMT et la teneur en arabinoxylanes féruloylés solubles du grain chez le blé a également été observée (Charmet et al, 2009 ; Ma & Xu, 2008). Cependant, l'analyse de mutants COMT de maïs et de sorgho a montré que, bien qu'affectés dans la synthèse de lignines, ces mutants ne sont pas altérés dans la teneur en ester ou éther d'AF (Vignols et al, 1995 ; Bout & Vermerris, 2003). Des travaux de dérégulation de la COMT ont conduit aux mêmes résultats chez le maïs et la canne à sucre (Piquemal et al, 2002 ; Jung et al, 2013). L'intervention d'une aldéhyde déshydrogénase a également été proposée pour former l'AF à partir du coniféraldéhyde chez les Eudicotylédones en raison d'une activité coniféraldéhyde déshydrogénase (et sinalpaldéhyde déshydrogénase) montrée par la protéine recombinante REF1 (figure 29 ; Nair et al, 2004).

Il est à noter que le mutant *ref1* n'était lui affecté que dans sa teneur en acide sinapique et donc pour l'activité sinapaldéhyde déshydrogénase (Nair et al, 2004). Le modèle proposé actuellement suggère que l'AF et l'pAC ne seraient pas directement transférés sur les xylanes et les lignines, mais que ce serait plutôt leurs esters-CoA, c'est-à-dire le féruloyl-CoA et le coumaroyl-CoA, qui seraient transférés. Ces deux molécules sont des intermédiaires dans la voie des monolignols, le coumaroyl-CoA provenant de l'action de la 4CL et le féruloyl-CoA de l'action de la CCoAOMT (voir paragraphe 1.3.6 ; voir figure 25).

Nous avons vu précédemment (voir paragraphes 1.3.5 et 1.3.6) que plusieurs hypothèses coexistent pour expliquer le transfert du féruloyl-CoA et du coumaroyl-CoA sur les xylanes et les lignines. La littérature récente implique des membres de la famille BAHD pour la féruloylation (Piston et al, 2010) et la coumaroylation des arabinoxylanes (Bartley et al, 2013). Cette même famille a été impliquée dans la féruloylation et la coumaroylation des lignines et de la cutine (Withers et al, 2012 ; Petrik et al, 2014 ; Molina et al, 2009 ; Rautengarten et al, 2012).

Si la coumaroylation de l'alcool sinapique se déroule dans le cytosol, la localisation subcellulaire de la féruloylation fait débat puisque, comme vu précédemment au paragraphe 1.3.5, elle pourrait avoir lieu dans le cytosol, dans l'appareil de Golgi et dans la paroi. L'accumulation d'AF et de pAC serait découplée dans le temps. L'AF s'accumulerait principalement durant la polymérisation des unités G alors que l'pAC serait intégré de façon plus tardive dans les parois, au moment de la polymérisation des unités S (He & Terashima, 1989).

1.3.7.3. Fonction des acides férulique et *p*-coumarique dans les parois des Poacées

Les acides hydroxycinnamiques et tout particulièrement l'AF possèdent un rôle essentiel et central au sein du réseau pariétal. Les parois des Poacées en sont d'ailleurs particulièrement riches.

Comme les lignines, les acides hydroxycinnamiques, essentiellement l'acide férulique, sont fortement impliqués dans le phénomène de récalcitrance des parois aux processus de dégradation, que ce soit en ce qui concerne la digestibilité des fourrages de maïs par exemple ou la saccharification de la biomasse lignocellulosique.

Il a été démontré chez le maïs notamment qu'une diminution de la teneur en AF des pailles aboutissait à une meilleure extractibilité des polysaccharides pariétaux (Casler & Jung, 1999 ; Lam et al, 2003 ; Grabber, 2005 ; Casler et al, 2008 ; Jung & Philips, 2010 ; Jung et al, 2011 ; Barros-Rios et al, 2012).

Dans les parois secondaires, l'AF, en servant de ponts entre les arabinoxylanes et les lignines, renforce les parois et compacte le réseau pariétal (Chesson et al, 1997). L'AF estérifié aux arabinoxylanes servirait également de point d'ancrage à la polymérisation et à la réticulation des lignines par des liaisons éther ou carbone - carbone renforçant ainsi la structure pariétale (Ralph et al, 1995 ; Grabber et al, 2000 ; Grabber et al, 2002).

1.3.8. Les O-méthyltransférases impliquées dans la synthèse des lignines

La biosynthèse des lignines fait intervenir des enzymes appartenant aux O-méthyltransférases. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux types d'O-méthyltransférases l'acide caféique/acide 5-hydroxyférulique O-méthyltransférase (COMT) et la cafféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT).

1.3.8.1. Mécanisme de fonctionnement des O-méthyltransférases

Les O-méthyltransférases sont des enzymes capables, en présence d'un co-facteur tel que le S-adénosylméthionine (SAM), de transférer un groupement méthyl à un oxygène. Les O-méthyltransférases sont classées en deux familles, l'une est composée d'enzymes agissant sur divers métabolites tels que les acides hydroxycinnamiques, les flavonoïdes et les alcaloïdes alors que l'autre contient des enzymes telles que les CCoAOMT et les OMT capables de méthyler les groupes carboxyles aliphatiques (Lam et al, 2007).

1.3.8.2. La COMT

L'acide caféique/acide 5-hydroxyférulique O-méthyltransférase (COMT, EC 2.1.1.68) est une enzyme appartenant au type-1 de la famille des O-méthyltransférases S-adénosylméthionine (SAM)-dépendante (Noel et al, 2003 ; Roje et al, 2006).

Cette enzyme d'environ 360 acides aminés de longueur possède un site de dimérisation localisé dans son domaine N-terminal et ne nécessite pas la présence de cations divalents pour fonctionner (Kagan & Clarke, 1993 ; Joshi & Chiant, 1998 ; Noel et al, 2003 ; Roje et al 2006). Ces caractéristiques permettent de distinguer les OMT de type 1, auquel appartient la COMT, des OMT de type 2, auquel appartient la CCoAOMT (Lam et al, 2007 ; Louie et al, 2010). La COMT est impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines. Dans le cytoplasme, elle catalyse des réactions d'*O*-méthylation en position 3 ou 5 du carbone du cycle mais ne possède aucune activité sur la position 4 du carbone (Bhuiya & Liu, 2010, Louie et al, 2010).

Des expériences *in vitro* ont démontré que la COMT peut utiliser différents types de substrats. La COMT de luzerne, de blé et de tremble se sont montrées capables d'utiliser par ordre de préférence le 5-hydroxyconiféraldéhyde, le caféoyldéhyde, l'alcool 5-hydroxyconiférylique, le caféoyl alcool, l'acide 5-hydroxyférulique et l'acide caféique (Davin & Lewis 1992 ; Humphreys et al. 1999 ; Osakabe et al. 1999 ; Li et al, 2000 ; Parvathi et al, 2001 ; Zubieta et al 2002, Ma & Xu, 2008).

Le substrat *in vivo* de la COMT serait le 5-hydroxyconiféraldéhyde (Figure 9) (Zubieta et al., 2002; Louie et al., 2010; Green et al., 2014), précurseur des unités S de lignines.

Des études de séquences protéiques d'OMT de plantes avaient permis d'identifier des motifs retrouvés chez les COMT de plantes (Kagan & Clarke, 1993 ; Joshi & Chiant, 1998 ; Noel et al, 2003 ; Lam et al, 2007) que l'on soupçonnait comme impliqués notamment dans la dimérisation de la protéine ou sa liaison au co-facteur SAM. La cristallisation de la COMT de la luzerne (Zubieta et al, 2002) puis celle plus récente de l'ivraie (Louie et al, 2010) ont permis d'identifier les motifs nécessaires à l'activité enzymatique.

L'analyse du génome d'*A. thaliana* et du riz a mis en évidence 17 et 11 gènes COMT-like. Plusieurs mutants affectés pour la COMT ont été décrits. Les mutants COMT du maïs (*bm 3*) et du sorgho (*bmr 12*, *bmr 18* et *bmr 26*) présentent une coloration brune localisée au niveau de la nervure centrale des feuilles (Vignols et al, 1995 ; Bout & Vermerris, 2003) et celui du peuplier, une coloration rose des tiges (Jouanin et al, 2000). Il s'agit du phénotype "brown midrib", dû à l'accumulation d'unités 5-hydroxyguaiacyl oxydés (5-OHG) dans la paroi végétale des tiges et des feuilles.

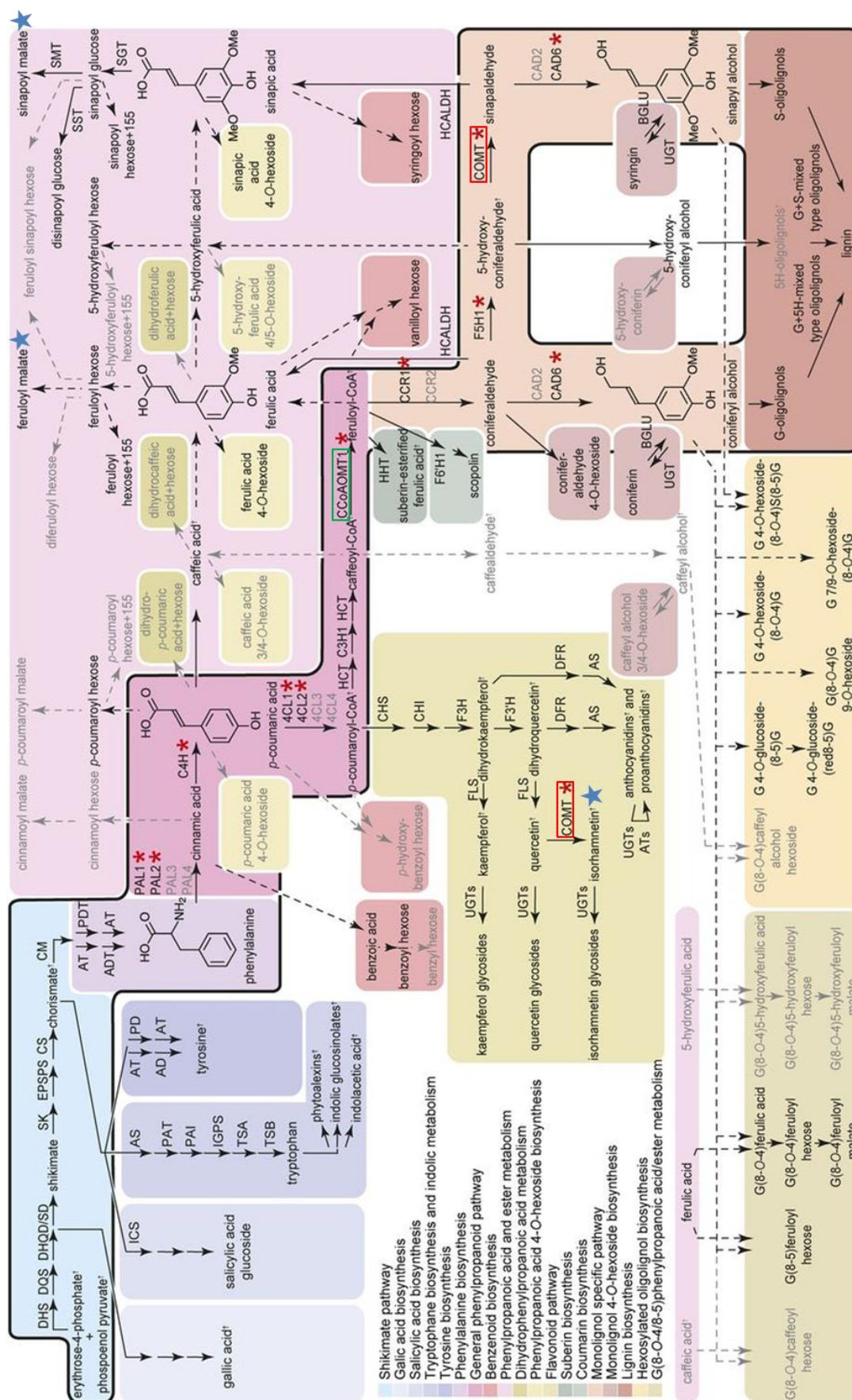


Figure 30 : Schéma de la synthèse des phénylpropanoïdes chez les plantes (issu de Vanholme et al, 2012).

Ce phénotype n'est pas observé chez le mutant COMT *omt1* d'*A. thaliana* (Goujon et al, 2003) et les tabacs comportant une construction RNAi ciblant la COMT (Atanassova et al, 1995). Les mutants COMT montrent en général une diminution de la teneur en lignines modérée par rapport à d'autres mutants affectés pour d'autres enzymes de la voie de synthèse des monolignols comme la C4H et l'HCT (Chen et Dixon 2007). Chez tous ces mutants, il est observé une diminution (ex: *bm3*) voire une absence (ex: *omt1* d'*Arabidopsis*) d'unité S de lignines dans les tiges.

La présence de résidus 5-OHG ainsi que le fait que ces plantes soient de simples mutants suggèrent qu'une seule COMT agit dans la biosynthèse des unités S de lignines chez *A. thaliana*. Chez le maïs, 40% des monomères S de lignines sont encore présents chez les lignées *bm3*, ne permettant pas une telle conclusion bien qu'il y ait également une accumulation de résidus 5-OHG. Les résidus 5-OHG sont considérés comme étant un indicateur d'une déficience ou d'une absence de COMT (Piquemal et al, 2002). Il est également constaté chez ces plantes une diminution de la quantité de pAC lié à la paroi vraisemblablement parce que l'pAC est majoritairement lié aux unités S. Peu voir aucun impact sur la quantité d'AF lié aux parois des tiges n'a été montré dans les mutants comme *bm3* où la teneur en AF a été analysé (Piquemal et al, 2002 ; Barrière et al, 2004). Chez *A. thaliana*, le mutant *omt1* est également altéré dans la synthèse de composés phénoliques solubles (tels que le sinapoylmalate) et dans la teneur en isorhamnétine glycosides (Goujon 2003 ; Do 2007). Ces résultats ont montré que l'AtCOMT1 était impliquée dans la synthèse des lignines et également dans la synthèse du sinapoyl malate et des dérivés de l'isorhamnétine. Les composés phénoliques solubles, sont issus du métabolisme secondaire végétal et constituent un groupe vaste et complexe de molécules possédant comme point commun la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques ainsi qu'un ou plusieurs groupements hydroxyles. Les coumarines, les stillbénoides, les flavonoides, les anthocyanes font partis des composés phénoliques solubles. Au cours de ces processus de synthèse, certaines enzymes également impliquées dans la synthèse des lignines entrent en jeu, comme c'est le cas pour la COMT (figure 30 ; Vanholme et al, 2012).

Un gène codant une COMT impliquée dans la synthèse des monolignols a donc été identifié chez plusieurs espèces.

La voie de synthèse principale est encadrée de noir. Les enzymes identifiées avec un astérisque possèdent des mutants identifiés. AD : arogénate déshydrogénase ; ADT : arogénate déshydratase ; AS : anthranilate Synthase ; AS : anthocyanidine synthase ; AT : amino-transférase ; ATs : acyltransférases ; CHI : chalcone isomérase ; CHS : chalcone synthase ; CM : chorismate Mutase ; CS : chorismate synthase ; DFR : dihydroflavonol 4-réductase ; DHS : 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase ; DHQD/

SD : 3-déshydroquinate déshydratase/shikimate déshydrogénase ; DQS : 3-déshydroquinate synthase ; EPSPS : 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase ; F3H : naringénine 3-dioxygénase ; F39H : flavonoïde 3-hydroxylase ; F69H : féruloyl-CoA 6-hydroxylase ; FLS : flavonol synthase ; HCALDH : hydroxycinnamaldéhyde Déshydrogénase ; ICS : isochorismate synthase ; IGPS : indole-3-glycérol phosphate synthase ; PAI : phosphoribosylanthranilate Isomérase ; PAT : phosphoribosylanthranilate transférase ; PD : préphénate déshydrogénase ; SGT : sinapate 1-glucosyltransférase ; SK : shikimate kinase ; SMT : sinapoylglucose:malate sinapoyltransférase ; SST : sinapoylglucose:sinapoylglucose sinapoylglucosetransférase ; TSA : tryptophane synthase sous-unité A ; TSB : tryptophane synthase sous-unité B ; UGT : UDP-glucosyltransférase.

La COMT est encadrée en rouge, la CCoAOMT est encadrée en bleu. Les composés phénoliques solubles mesurés lors du dosage des flavonoïdes sont indiqués par une étoile bleue.

1.3.8.3. La CCoAOMT

La cafféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) est une enzyme appartenant au type-2 de la famille des O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104). De plus petite taille que la COMT, elle possède un site de liaison au SAM, un site de dimérisation et son activité catalytique nécessite la présence de cations divalents Ca^{2+} (Vidgren et al, 1994 ; Ibrahim et al, 1998 ; Martin & McMillan, 2002 ; Ferrer et al, 2005). De par son mécanisme d'action, cette enzyme est plus proche de la catéchol-OMT de mammifère que de la COMT (Salminen et al, 1990 ; Bertocci et al, 1991). La CCoAOMT est impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines (Ye et al, 1994). Dans le cytoplasme, elle catalyse la première réaction d'O-méthylation qui a lieu en position 3 du cycle aromatique du cafféoyl-coA et le 5-hydroxyféruloyl-coA aboutissant à la formation du féruloyl-coA et du sinapoyl-coA.

In vitro, il a été démontré une préférence de l'enzyme pour le caféoyl-coA chez différentes espèces telles que *A. thaliana*, la luzerne, le peuplier, le tabac, le riz et le blé (Inoue et al, 1998 ; Maury et al, 1999 ; Meyermans et al, 2000 ; Parvathi et al, 2001, Goujon et al, 2003 ; Zhao et al, 2004 ; Do et al, 2007 ; Zhang et al, 2015).

Les séquences protéiques de plusieurs CCoAOMT ont été étudiées notamment celle du peuplier et du faux-mimosa (Pagadala et al, 2009, Phogat et al, 2010). Ces études ont mis en évidence les sites de liaisons avec leurs substrats.

L'analyse du génome d'*A. thaliana* et du riz a mis en évidence 10 et 9 gènes CCoAOMT-like (Goujon et al ; 2003, Yokoyama et Nishitani, 2004). Le mutant *ccomt-1* d'*A. thaliana* montre par rapport au sauvage une différence minime dans sa quantité de lignines globale. Il y est cependant mesuré plus d'unités H et S et moins d'unités G conduisant à une légère augmentation du ratio S/G. La teneur en composés phénoliques solubles est modifiée chez ce mutant. La teneur en isorhamnétine 3-O-glucoside 7-O-rhamnoside est diminué de 50% et en sinapoyl malate de 80%. Les vaisseaux du xylème sont collapsés (Do et al, 2007). Il a été observé chez des peupliers, des tabacs et dans les pailles de maïs transgéniques contenant des constructions d'interférence ARN ciblant la CCoAOMT une diminution de la quantité de lignines et une augmentation du rapport S/G (Meyermans et al, 2000 ; Wei et al, 2008 ; Zhong, 1998, Zhong, 2000 ; Li et al, 2013). Un gène codant une CCoAOMT impliquée dans la synthèse des monolignols a donc été identifié chez plusieurs espèces.

1.4. Objectifs de la thèse et stratégie mise en place

A l'origine, le projet de thèse avait pour objectif d'améliorer la compréhension des voies de synthèse des acides hydroxycinnamiques qui sont des composés phénoliques liés aux polymères dans les parois végétales. Plus particulièrement, notre intérêt s'est porté sur la synthèse de l'AF chez les Poacées. Dans les parois des Poacées, l'AF est impliqué dans les liaisons avec différents polymères pariétaux comme les lignines, les arabinoxyanes, la cutine. Dans les tiges et les organes lignifiés, les acides féruliques permettent notamment la formation de ponts entre les arabinoxyanes et les lignines, renforçant la structure pariétale (Jacquet et al, 1995). L'AF est supposé être un point d'amorce à la polymérisation des lignines dans les parois (Ralph et al, 1995 ; Grabber et al, 2000 ; Grabber et al, 2002). Dans les albumens de grains de Poacées, organes peu lignifiés, les acides féruliques sont liés aux arabinoxyanes et sont impliqués dans l'établissement de liaisons entre chaînes d'arabinoxyanes. La synthèse de l'AF est encore mal connue *in vivo*. Sur la base d'études réalisées *in vitro*, il a été proposé qu'il serait formé par O-méthylation de l'acide caféique par la COMT, enzyme également impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines (Davin & Lewis, 1992 ; Humphreys et al, 1999 ; Osakabe et al, 1999 ; Li et al, 2000 ; Parvathi et al, 2001). En faveur de cette hypothèse, une corrélation avait été observée entre un allèle COMT de blé et la teneur en arabinoxyanes féruloylés de l'albumen de grains (Charmet et al, 2009). Toutefois, des analyses réalisées sur des mutants COMT ont révélé que ces mutants ne sont pas affectés dans leur teneur en AF lié aux parois des tiges (Vignols et al, 1995 ; Bout & Vermerris, 2003 ; Barrière et al, 2004). L'albumen des grains des Poacées est un organe pauvre en lignines mais ses parois contiennent des acides féruliques. Quels sont le ou les gènes *OMT* impliqués dans la synthèse de l'AF *in planta* ? Est-ce que ces gènes sont les mêmes dans la tige et dans le grain des Poacées ? Est-ce que ces gènes sont les mêmes que ceux impliqués dans la synthèse des monolignols ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à deux activités enzymatiques, la COMT et la CCoAOMT. La COMT catalyse des réactions d'O-méthylation en position 3 ou 5 du carbone du cycle mais ne possède aucune activité sur la position 4 du carbone (Bhuiya & Liu, 2010 ; Louie et al, 2010). Sa réaction privilégiée est la conversion du 5-hydroxyconiféraldéhyde en sinapaldéhyde, le précurseur des unités S de lignines.

La CCoAOMT est impliquée dans la première étape de méthylation de la voie de biosynthèse des lignines. Elle méthyle en position 3 le cycle aromatique du caféoylCoA ou du 5-hydroxyféruloylCoA, produisant respectivement le féruloylCoA et le sinapoylCoA, bien qu'elle montre *in vitro* une préférence pour la première réaction (Parvathi et al, 2000).

Nous avons choisi d'utiliser comme objet d'étude la plante modèle des Poacées des régions tempérées *Brachypodium distachyon*. Elle possède plusieurs avantages comme un génome de petite taille, séquencé et annoté. Plusieurs outils facilitant l'étude de *B. distachyon* sont d'ailleurs disponibles comme l'existence de banques de mutants, de puces à ADN ou encore la possibilité de créer des plantes transgéniques stables (pour plus de détails, se référer à la partie 2 de l'introduction).

Dans un premier temps, nous avons procédé à une analyse des composants des parois, notamment de la composition et de la distribution des lignines et des arabinoxylanes féruloylés, dans les tiges et les grains de *Brachypodium distachyon* (voir le chapitre 2 du manuscrit).

Nous avons ensuite identifié plusieurs gènes codant des COMT et CCoAOMT potentielles dans le génome de *Brachypodium distachyon*. Nous nous sommes attelés à déterminer parmi les gènes codant pour une O-méthyltransférase ceux qui étaient potentiellement impliqués dans la synthèse de l'AF lié aux arabinoxylanes. Des gènes candidats *COMT* puis *CCoAOMT* ont été identifiés par comparaison des séquences génétiques grâce à la réalisation d'arbres phylogénétiques incluant des gènes codant pour des *COMT* et *CCoAOMT* caractérisées et par des analyses transcriptomiques effectuées sur différents tissus comme le grain, l'albumen disséqué de grain et la tige de la plante modèle.

A partir de ces choix, des plantes mutantes issues de la collection de l'IJPB ont été obtenues pour le candidat *COMT* à partir d'une identification par TILLING et, pour le candidat *CCOAOMT*, des lignées mutées ont été commandées dans des collections disponibles de mutants T-DNA et des plantes transgéniques de type interférence ARN (RNAi) ont été générées. L'étude des gènes *COMT* et *CCOAOMT* est l'objet des chapitres 3 et 4 de ce manuscrit.

Finalement, l'analyse des plantes mutantes pour le gène *COMT* ciblé a démontré que la teneur et la composition en lignines sont affectées mais pas la teneur en AF et ce dans les tiges comme dans les grains. La *COMT* impliquée dans la synthèse des monolignols ne serait donc pas responsable de la synthèse des acides féruliques liés aux arabinoxylanes. L'analyse des plantes exprimant un RNAi ciblant les gènes *CCoAOMT* est en cours, des résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre 4.

Chapitre 2 : Description du matériel d'étude, le grain et la tige de *B. distachyon*, génotype Bd21-3

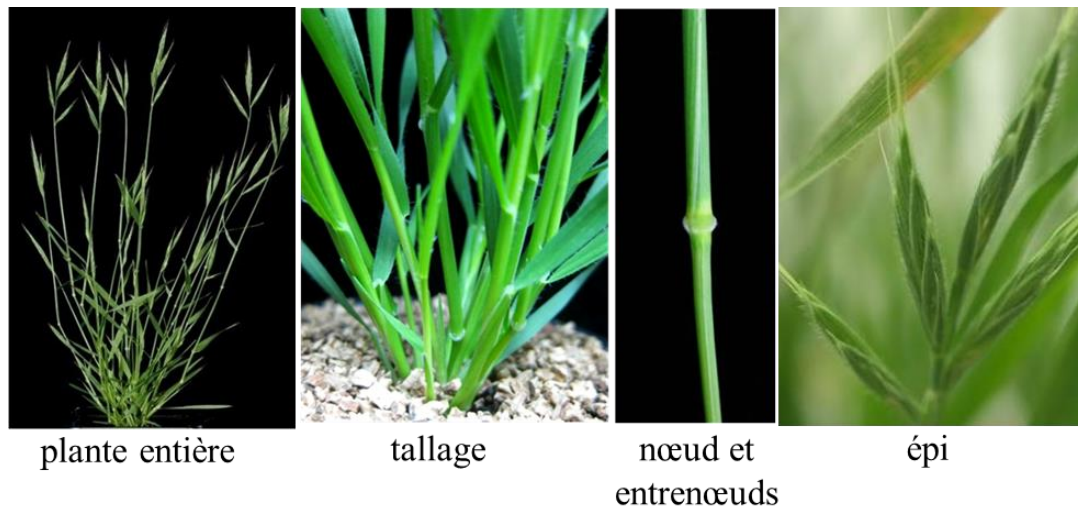


Figure 31 : photographies de plante Bd21-3 en cours d'épiaison.

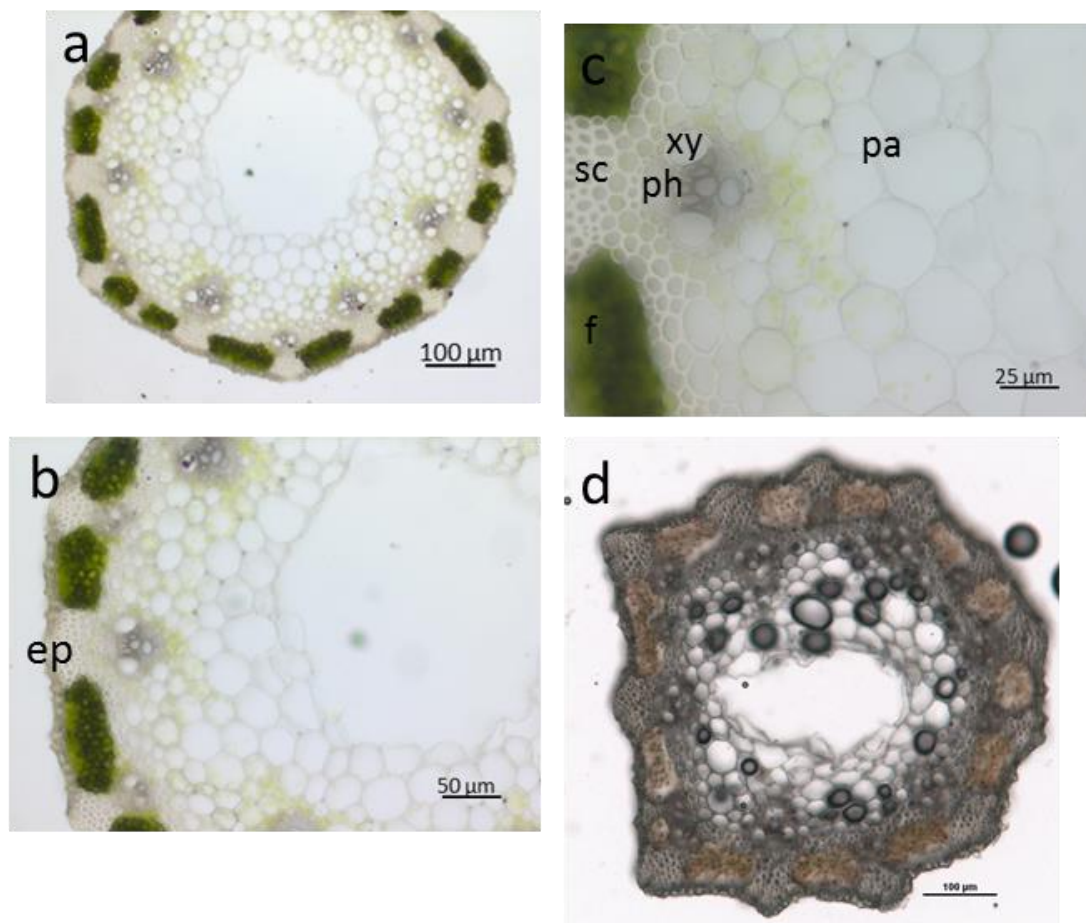


Figure 32 : sections transversales de tiges de *B. distachyon* génotype Bd21-3 observées en fond clair au microscope optique.

a, b et c : section transversale de tige à 60 jours après semis, d : section transversale de tige sèche. ep : épiderme, sc : sclérenchyme, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme, f : fibres.

En préambule de l'analyse des gènes impliqués dans la biosynthèse des parois, nous avons caractérisé la tige et le grain de *B. distachyon*. Nous avons de plus réalisé une étude du développement du grain.

Deux génotypes de *B. distachyon* ont été utilisés. Le génotype Bd21 était le génotype choisi pour réaliser des analyses d'expression de gènes par transcriptomique sur puce Affymetrix. Ces analyses ont été réalisées dans le cadre du projet KBBE « Cell Wall » par l'équipe de Staffan Persson (Max Planck Institute) en collaboration avec l'IJPB et sont intégrées dans la plateforme d'expression en ligne PlaNet (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/>).

Le génotype Bd21-3 a été utilisé pour la plupart des expériences notamment pour l'obtention de mutants et de transformants. En effet, la banque de mutants de l'INRA de Versailles a été réalisée sur ce génotype (Dalmais et al, 2013) et la transformation stable de *B. distachyon* est préférentiellement réalisée à partir des embryons du génotype Bd21-3 car les embryons de Bd21-3 sont plus embryogènes que ceux de Bd21 (Vogel & Hill, 2008).

L'écotype Bd21-3 est de taille légèrement supérieure à Bd21. Comme Bd21, l'écotype Bd21-3 possède un cycle de vie de 12 à 18 semaines suivant les conditions expérimentales utilisées. Les tiges des deux génotypes sont constituées d'entrenœuds ponctués de nœuds et sont à croissance acropétale. Tout comme chez Bd21, l'entrenœud le plus bas est le plus ancien et la partie la plus haute de l'entrenœud est la plus ancienne.

La phase reproductrice démarre avec l'apparition d'un premier épi au niveau du brin maître de la plante. Les autres brins développent alors également des épis. Chaque épi est composé de trois à sept épillets chez Bd21-3, tout comme chez Bd21. Au sein de chaque épi, l'épillet basal est le plus ancien. Les grains les plus âgés sont positionnés à la base des épillets. Une différence de plusieurs jours de développement peut être observée entre les grains d'un même épillet (figure 31).

2.1. Caractérisation morphologique de la tige et du grain de Bd21-3

La morphologie de la tige et du grain du génotype Bd21-3 est similaire à celle observée chez Bd21. Elle sera détaillée dans les paragraphes suivants.

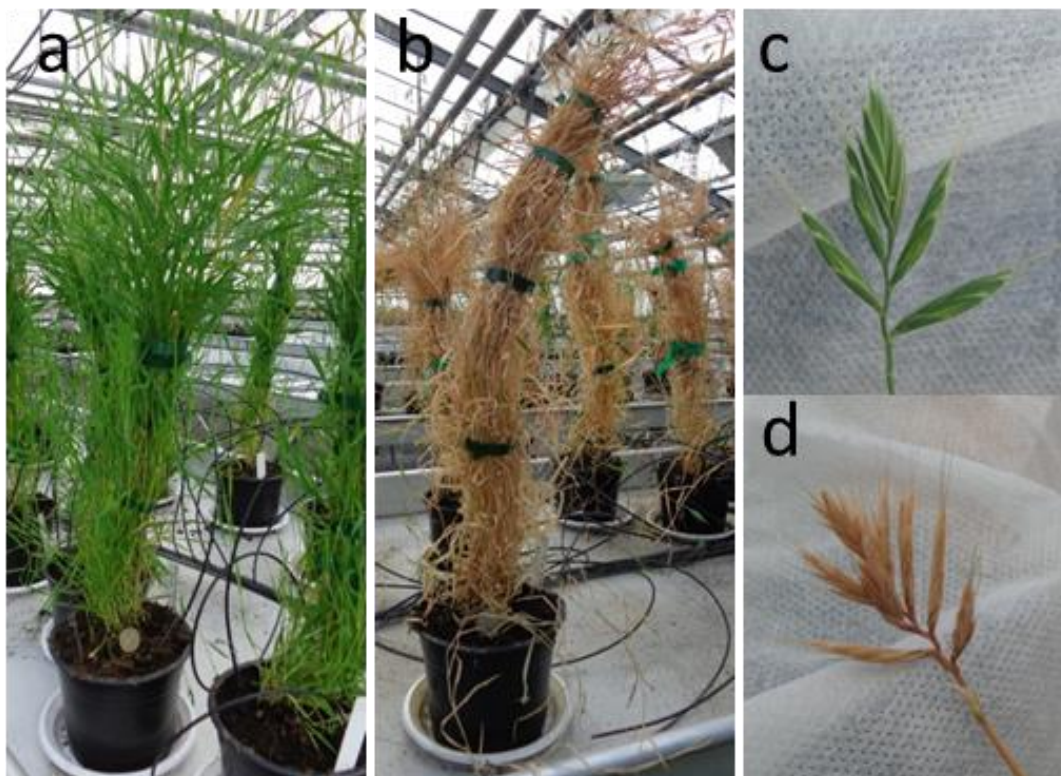


Figure 33 : photographies de plantes Bd21-3 à 60 jours après semis et de plantes sèches en serre avant prélèvements ou récolte.

a : plante à 60 jours après semis, b : plante sèche, c : épi à 21 jours après anthèse (JAA), d : épi mature sec.

2.1.1. Caractérisation morphologique de la tige de Bd21-3

2.1.1.1. Description de la tige et de ses différents tissus

La section transversale d'une tige de Bd21-3 laisse apparaître plusieurs tissus (figure 32). La tige est composée d'un parenchyme dans lequel sont retrouvés des faisceaux conducteurs de sève (xylème et phloème), renforcés par un sclérenchyme et des fibres et protégés par un épiderme (figures 32 b et 32 c).

Ces structures sont retrouvées dans les tiges en phase de croissance (figures 32 a, 32 b et 32 c) et sont maintenues dans les tiges sèches de la plante (figure 32 d).

2.1.1.2. Stades et méthodes de prélèvements des tiges

Afin de réaliser des extractions d'ADN génomique ou d'ARN totaux, des sections de 2 cm du second entrenœud à partir de la base de plantes âgées de 60 jours après semis (figure 33 a) ont été prélevées et plongées dans de l'azote liquide avant d'être utilisés ou conservés à -80°C.

Dans le but de réaliser des analyses de lignines, les tiges sèches (figure 33 b) ont été prélevées en prenant soin d'ôter toutes les feuilles. Les tiges sont ensuite broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur à azote liquide.

2.1.2. Caractérisation morphologique du grain mature de Bd21-3.

2.1.2.1. Description du grain et de ses différents tissus

Le grain entier de Bd21-3 est entouré de deux enveloppes protectrices, la lemma et la palea cette dernière devient adhérente au grain une fois celui-ci mature et sec (figure 34 a).

Des sections transversales du grain entier sec montrent qu'il est composé en plus de ces deux enveloppes, du péricarpe et de la testa (ou tégument séminal), de l'épiderme du nucelle, de l'albumen et de l'embryon (figures 34 b à 34 g). L'albumen représente près de 75% de la superficie du grain (Guillon et al, 2011). L'albumen dit de stockage est délimité par la couche à aleurone. L'embryon se situe dans la partie basale de la face opposée au sillon du grain.

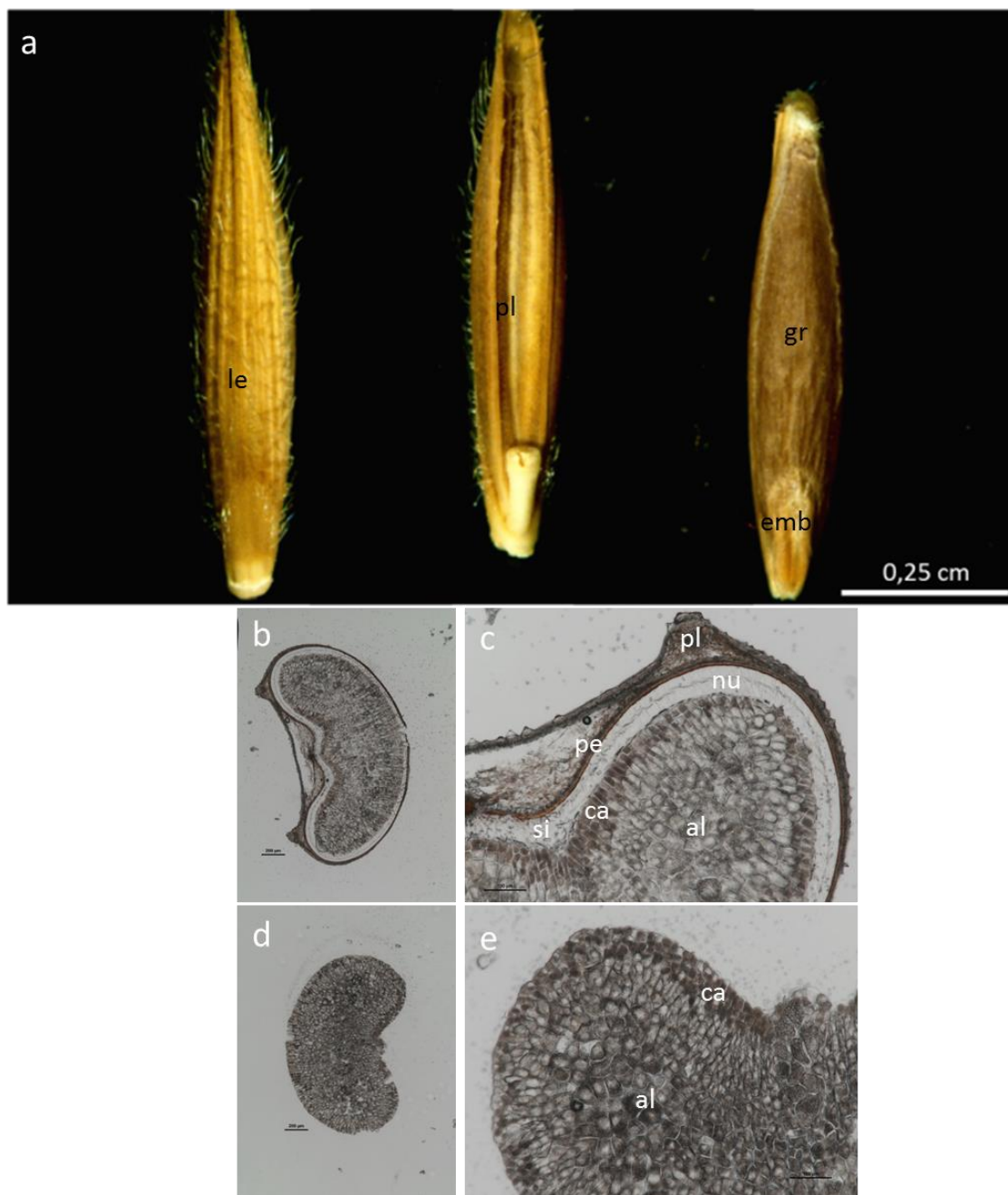


Figure 34 : grains matures secs de *B. distachyon*, génotype Bd21-3.

a : grain entier avec lemma, palea et sans lemma, b et c : section transversale de grain sec mature observée en fond clair, d et e : section transversale d'albumen décortiqué observée en fond clair. le : lemma, pl : palea, gr : grain entier, emb : embryon, pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon

2.1.2.2. Méthodes de prélèvements des grains secs entiers et des albumens décortiqués

Les grains secs (figure 33 d) sont été récoltés 12 à 18 semaines après semis. Ils sont conservés à l'abri de la lumière dans une chambre à 4°C et à 20% d'hygrométrie.

Afin d'analyser l'albumen des grains secs, il a été nécessaire de les disséquer. Pour cela, les embryons sont éliminés en coupant l'extrémité du grain ce qui a pour effet de détacher également la lemma. Les grains sont ensuite placés dans de l'eau à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 12h. Les enveloppes, comprenant la palea, le péricarpe, la testa et l'épiderme du nucelle, sont enlevées à l'aide de pinces et d'un scalpel sous une loupe binoculaire. Les albumens décortiqués (figure 34 e et 34 g) et les enveloppes ainsi prélevés sont ensuite séchés avant d'être broyés.

Par la suite, je parlerai de grain entier lorsqu'il s'agira du grain non disséqué comprenant la palea mais pas la lemma. Les albumens décortiqués et les enveloppes disséqués feront référence aux tissus prélevés comme décrit ci-dessus.

2.2. Le grain de *B. distachyon* au cours de son développement

Des prélèvements ont été réalisés au cours du développement du grain de *B. distachyon*. Ces prélèvements ont été effectués à partir de plantes de génotype Bd21 dans le cadre du projet « Cell Wall » dont le but est d'analyser l'expression des gènes de plusieurs tissus à divers stades de développement grâce à l'utilisation de puces Affymetrix. D'autres analyses, notamment l'étude du dépôt des arabinoxylanes féruloylés pendant le développement du grain, ont été conduites sur le génotype Bd21-3.

Des études préliminaires ont été réalisées pour les deux génotypes en chambre de culture à température, luminosité et hygrométrie contrôlées. Dans les conditions utilisées, la germination a lieu quatre à sept jours après le semis et l'épiaison, un mois et une semaine après la germination. L'anthèse, correspondant à la libération de grains de pollen matures par les étamines, a lieu sept jours après l'épiaison. L'anthèse est un processus visible contrairement à la fécondation. Elle permet de situer la fécondation qui intervient un à deux jours suivant l'anthèse.

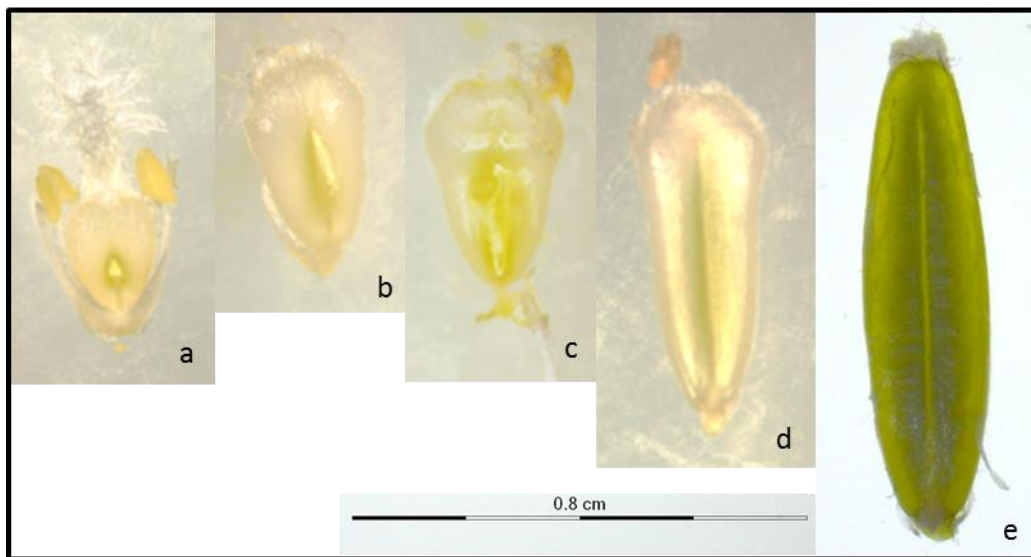
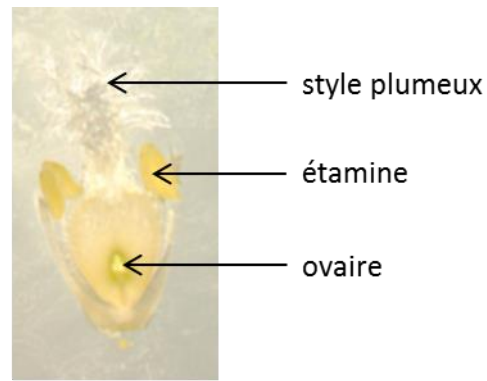


Figure 5 : photographies de grains de *B. distachyon* génotype Bd21-3 au cours de son développement observés au macroscopie.

a : fleur non fécondée, b : grain 3 JAA, c : grain 5 JAA, d : grain 11 JAA, e : grain 21 JAA.

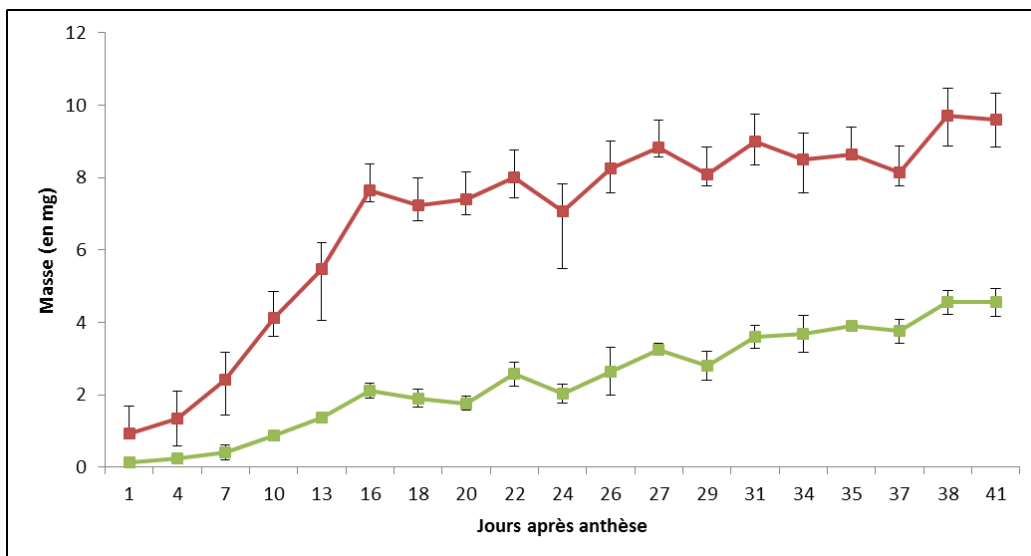


Figure 36 : Evolution de la masse du grain entier de *B. distachyon* de génotype Bd21 au cours de son développement en chambre de culture (23°C jour, 18°C nuit, 20h de lumière).

En rouge : masse de la matière fraîche ; en vert : masse de la matière sèche. Barres d'erreur : écart type standard.

Les épis sont annotés dès l'épiaison qui s'étale sur plusieurs jours, il convient de vérifier et annoter les tiges ayant épié chaque jour (figure 35). Il faut noter que l'anthèse est décalée au sein d'un même épi.

Afin de déterminer les stades de développement du grain dans nos conditions de culture par rapport à l'étude réalisée par Guillon et al en 2012, des grains ont été prélevés sur trois plantes de génotype Bd21 à plusieurs stades précisés sur la figure 36 et ont été pesés. Les grains ont ensuite été placés au four à 60°C afin d'être déshydratés avant d'être pesés à nouveau deux jours après. Une courbe correspondant à la masse moyenne des grains de *B. distachyon* de génotype Bd21 au cours de leur développement et maturation est obtenue. Cette courbe permet de distinguer deux phases distinctes de développement (figure 36).

De 0 à 15 Jours Après Anthèse (noté JAA par la suite), une première étape de croissance rapide est visible. Elle correspond à la phase de croissance du grain. Cette phase correspond à la mise en place des différents organes du grain tels que l'embryon et l'albumen.

A partir de 15 JAA, une phase plus lente d'évolution de la masse du grain est observée. Il s'agit de la phase d'accumulation des réserves ou phase de remplissage. Lors de cette phase, l'albumen est bien formé et des molécules de réserve qui permettront plus tard la germination du grain s'accumulent. Chez *B. distachyon*, le composant de réserve majoritaire est un polysaccharide pariétal, les β -glucanes mixtes (Guillon et al, 2011).

A partir de ces résultats, trois stades de prélèvement ont été sélectionnés. Le stade 11 JAA a été choisi afin d'étudier les grains en phase de croissance, les stades 21 JAA et 31 JAA ont été sélectionnés afin d'étudier les grains au début et en cours de phase de remplissage. Les mêmes stades ont été choisis pour le génotype Bd21-3 après vérification sur une culture que ces stades correspondaient bien à la croissance pour 11 JAA, au début du remplissage pour 21 JAA et au remplissage pour 31 JAA.

Une étude de la composition de la tige, du grain mature et sec a été ensuite réalisée. Nous avons réalisé une étude de la composition pariétale de ces deux organes pour le génotype Bd21-3.

Tableau 10 : Quantification des lignines des tiges de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par la méthode lignine-Klason (LK) réalisée sur plusieurs cultures issues de serres. Valeurs données en pourcentage de résidu pariétal (RP).

Cultures	% LK moyen
1	17,45 ± 0,06
2	17,82 ± 0,77
3	17,32 ± 0,86
4	18,75 ± 0,19
5	16,89 ± 0,43
6	17,56 ± 0,45
7	15,39 ± 0,57
8	15,14 ± 1,02
Valeur moyenne	17,04 ± 1,22

2.3. Caractérisation chimique des parois de la tige et du grain de Bd21-3

Le matériel pariétal des tiges, des grains secs entiers et des grains disséqués de *B. distachyon* (Bd21-3) a été produit après élimination des composés solubles des échantillons.

Le matériel pariétal des grains est obtenu par lavages à l'alcool pour générer le matériel insoluble à l'alcool (MIA) et permet d'éliminer notamment tous les sucres solubles et les pigments. Cette méthode permet également l'inactivation d'enzymes de types hydrolases ou oxydase qui pourraient modifier le matériel pariétal à analyser.

Le résidu pariétal (RP) de tiges est obtenu par lavage dans un premier temps à l'eau froide afin d'éliminer les composés hydrosolubles comme les composés phénoliques et les oses, puis par lavage à l'éthanol afin d'éliminer les composés solubles à l'alcool.

2.3.1. Quantification des lignines dans les tiges et les grains secs

La quantité de lignines contenue dans les tiges de *B. distachyon* a été déterminée par la méthode dite "lignine-Klason". Cette méthode permet de déterminer de façon quantitative une teneur en lignines contenue dans un échantillon réduit sous forme de poudre sèche, le résidu pariétal (Dence, 1992). Une hydrolyse forte à l'acide sulfurique permet de se débarrasser des polysaccharides pariétaux (cellulose et hémicelluloses). Les lignines résistent à cette hydrolyse et conservent leur nature polymérisée. Après filtration, les poudres sont pesées et un pourcentage en « lignine-Klason » est calculé.

Plusieurs cultures de *B. distachyon* génotype Bd21-3 indépendantes ont été réalisées en serre durant ma thèse. Des quantifications de lignines en utilisant la méthode de lignine-Klason ont été réalisées sur le résidu pariétal des tiges débarrassées des feuilles dont la teneur en lignines inférieures à celle des tiges pourrait affecter de façon significative les résultats (Rancour et al, 2012). Le pourcentage de lignines contenu dans les tiges de ces cultures est situé entre 17 et 19% du résidu pariétal (tableau 10). Des différences entre les cultures sont observées. Bien que les plantes poussent en serre, les variations, mêmes faibles, de luminosité et de température ont un impact sur l'accumulation des lignines (Barrière et al, 2007). Le niveau de lignification des tiges de *B. distachyon* est légèrement supérieur à celui du blé (15%) ou du maïs (13 à 15%) (Sun et al, 2005 ; Jung & Casler, 2006 ; Vogel et al, 2008).

Tableau 11: Quantification des lignines contenues dans les grains matures secs, les enveloppes disséquées et les albumens décortiqués de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par dosage au bromure d'acétyle.

	% ABL
Grains	4,40 ± 0,12
Enveloppes	7,02 ± 0,31
Albumens	1,21 ± 0,12

Il n'est pas possible de réaliser un dosage de lignine-Klason sur les grains de *B. distachyon*. Les lignines ont été quantifiées par dosage au bromure d'acétyle. Il s'agit d'une méthode colorimétrique permettant de mesurer l'absorbance des lignines à 280 nm (Iiyama & Wallis, 1988). Cette méthode reste cependant moins fiable que le dosage par lignine-Klason car des composés tels que les polyphénols et les protéines absorbent également à cette longueur d'onde (Fukushima & Hatfield, 2004). Selon nos résultats (tableau 11), les grains entiers matures et secs sont composés d'environ 4% de lignines. Les lignines sont principalement localisées dans les enveloppes où près de 7% de lignines sont détectées. Environ 1% de lignines sont également détectées dans les albumens décortiqués mais ce résultat est à prendre avec précautions. En effet pour ces échantillons, on constate une augmentation de l'absorbance entre 200 à 400 nm, et non un simple pic à 280 nm, indiquant une forte interférence avec d'autres composés responsable d'une surestimation du taux de lignines dans l'albumen. De plus, les albumens étant décortiqués manuellement, il se pourrait qu'une contamination du matériel par les assises externes ait pu avoir lieu. Les résultats obtenus restent comparables à ceux d'autres Poacées telles que le blé où les lignines sont également principalement localisées dans le son. Elles y représentent 10 à 15% du RP tandis que le RP de l'albumen contient 2 à 4% de lignines (Feuillet, 2000).

Pour conclure, la teneur en lignines des tiges de *B. distachyon* peut varier suivant les conditions de cultures mais elle reste globalement proche de celles des autres Poacées. Dans les grains secs matures, des traces de lignines sont détectées mais ces résultats doivent être confirmés par d'autres méthodes.

2.3.2. Détermination de la composition des lignines dans les tiges et les grains secs

La composition des lignines a été déterminée par thioacidolyse (Rolando et al, 1992). La thioacidolyse consiste en la rupture des liaisons éthers de type β -O-4, liaisons dites « labiles », en présence du mélange dioxane/éthanethiol additionné de trifluorure de borate (BF_3). La libération des monomères H, G et S est ensuite mesurée et quantifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM).

Les lignines de tiges des cultures précédemment mentionnées ont été analysées suivant cette méthode. Les lignines extraites sont composées en moyenne de 3,7% de monomères H, de 31,7% de monomères G et de 63,3% de monomères S (tableau 12).

Tableau 12 : Détermination de la composition des lignines par CPG-SM après thioacidolyse des RP de tiges matures sèches de *B. distachyon* génotype Bd21-3 issues de différentes cultures.

Cultures	Rendement ($\mu\text{mol/g}$ de LK)	%H	%G	%S	%5-OHG	Ratio S/G
1	1296,8 $\pm 12,6$	3,4 $\pm 0,0$	31,8 $\pm 0,2$	64,6 $\pm 0,2$	0,2 $\pm 0,0$	2,03 $\pm 0,02$
2	1218,6 $\pm 32,4$	3,5 $\pm 0,3$	30,8 $\pm 1,6$	65,5 $\pm 1,9$	0,3 $\pm 0,0$	2,14 $\pm 0,18$
5	918,1 $\pm 88,7$	3,6 $\pm 0,3$	34,1 $\pm 0,9$	62,2 $\pm 1,1$	0,1 $\pm 0,0$	1,83 $\pm 0,08$
6	1027,1 $\pm 65,0$	3,0 $\pm 0,1$	28,3 $\pm 0,6$	68,7 $\pm 0,6$	0,1 $\pm 0,0$	2,43 $\pm 0,07$
7	835,2 $\pm 43,9$	3,7 $\pm 0,1$	35,5 $\pm 1,1$	60,6 $\pm 1,3$	0,1 $\pm 0,0$	1,71 $\pm 0,09$
Valeurs moyennes	1059,2 $\pm 195,6$	3,4 $\pm 0,27$	32,1 $\pm 2,82$	64,3 $\pm 3,1$	0,2 $\pm 0,1$	2,0 $\pm 0,3$

Tableau 13 : Détermination de la composition des lignines par CPG-SM après thioacidolyse des grains matures secs entiers, des enveloppes de grains matures secs entiers et des albumens décortiqués de *B. distachyon* génotype Bd21-3.

Tissus	Rendement ($\mu\text{mol/g}$ de MIA)	%H	%G	%S	Ratio S/G
Grains entiers	10,0 $\pm 0,0$	5,7 $\pm 0,4$	37,2 $\pm 0,2$	57,0 $\pm 0,1$	1,53 $\pm 0,01$
Enveloppes	17,2 $\pm 0,7$	5,42 $\pm 0,63$	30,26 $\pm 1,43$	64,32 $\pm 2,17$	2,13 $\pm 0,03$
Albumens décortiqués	1,3 $\pm 0,6$	Non détecté	44,80 $\pm 26,15$	55,20 $\pm 24,03$	1,39 $\pm 0,28$

Des résidus 5-O-hydroxyguayacyl, intermédiaires dans la formation de monomère S, sont détectés à l'état de trace (moins de 0,5%). Ici encore, des disparités sont observées entre les différentes cultures, particulièrement pour le rendement total en monomères de lignines par thioacidolyse, ramené à la quantification gravimétrique en lignine Klason obtenue sur des RP des tiges.

Le rapport S/G est un indice intéressant à calculer puisqu'il permet d'avoir un aperçu de la condensation et des types de liaisons présents dans la matrice de lignine. Les monomères S sont majoritairement impliqués dans des liaisons éthers labiles de type β -O-4 faciles à dégrader alors que les monomères G sont impliqués dans des liaisons stables, et augmentent le niveau de condensation des lignines. Dans les tiges, ce rapport est en moyenne de 1,96.

Des thioacidolyses ont été réalisées sur des grains matures et secs, des enveloppes disséquées ainsi que des albumens décortiqués (tableau 13). Ces expériences confirment la présence de lignines dans les grains entiers. Les lignines y représenteraient environ 1% de la masse totale du MIA de grain entier. Les monomères de lignines libérés par thioacidolyses comprennent 6% de monomères H, 37% de monomères G et 57% de monomères S. La fréquence de la présence des monomères H dans les lignines de grains est donc plus élevée que celle mesurée dans les tiges de *B. distachyon*. Au sein du grain, les lignines sont principalement localisées dans les enveloppes comme nous le montre le rendement (tableau 13). Les enveloppes possèdent le plus haut ratio S/G. Proche de 2, il est comparable à ce qui est observé dans les tiges de *B. distachyon*. Les albumens contiennent également des traces de lignines, mais leur teneur est 17 fois inférieure à celle mesurée dans les enveloppes. Dans ces lignines d'albumen, des monomères S et G y sont détectés alors que les monomères H n'ont pas pu l'être. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus précédemment pour le grain de blé (Desvignes et al, 2006 ; Greffeuille et al, 2006).

Les différentes thioacidolyses et CPG-SM réalisées suggèrent qu'il y a moins de 0,2% de lignines dans les MIA d'albumens décortiqués et environ 2% dans les enveloppes disséquées. La mauvaise répétabilité des expériences pour les albumens vient du fait de la complexité du matériel de base. L'albumen est un organe riche en polysaccharides pariétaux, composés qui ne sont pas éliminés par l'extraction à l'alcool utilisé lors de la génération des MIA. Ces molécules provoquent alors une pollution des résultats par la présence d'un bruit de fond et de pics aspécifiques.

Tableau 14 : Dosage des acides *p*-coumarique et férulique dans les tiges matures sèches de plusieurs cultures de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par CPG-SM après thioacidolyse.

Cultures	pAC en mg/g de RP	AF en mg/g de RP
1	6,26 ± 0,00	9,34 ± 0,12
2	6,33 ± 0,17	9,09 ± 0,63
5	6,96 ± 0,36	7,37 ± 0,47
6	7,90 ± 0,78	7,74 ± 0,71
7	7,33 ± 0,49	7,95 ± 0,43
Valeurs moyennes	6,96 ± 0,69	8,30 ± 0,87

Tableau 15 : Dosage des esters d'acides *p*-coumarique et férulique dans les tiges matures sèches (cultures) et dans les grains, enveloppes et albumens de *B. distachyon* génotype Bd21-3 par HPLC après hydrolyse alcaline douce.

	pAC (E+Z) en mg/g de RP (tiges) ou de MIA (grains)	AF (E+Z) en mg/g de RP (tiges) ou de MIA (grains)
Tiges		
Culture 2	5,78 ± 0,25	4,53 ± 0,27
Culture 3	8,09 ± 0,03	5,08 ± 0,02
Culture 4	9,03 ± 0,70	4,22 ± 0,21
Culture 5	7,65 ± 0,14	4,79 ± 0,10
Culture 6	8,43 ± 0,40	5,32 ± 0,12
Culture 7	7,47 ± 0,20	4,96 ± 0,00
Culture 8	9,33 ± 0,23	3,98 ± 0,16
Valeurs moyennes	7,97 ± 1,18	4,70 ± 0,48
Grains		
Grains entiers	1,08 ± 0,05	2,11 ± 0,04
Enveloppes	1,37 ± 0,06	3,11 ± 0,12
Albumens	0,11 ± 0	0,23 ± 0

2.3.3. Détermination de la composition en acides hydroxycinnamiques des tiges et des grains secs

L'AF et l'pAC sont des acides hydroxycinnamiques associés dans les parois des Poacées aux lignines, aux arabinoxylanes ainsi qu'à d'autres polymères comme les cutines. Le dosage des acides hydroxycinnamiques dans les tiges de *B. distachyon* (Bd21-3) a été réalisé par thioacidolyse et par hydrolyse alcaline douce des résidus pariétaux (Rolando et al, 1992 ; Lam et al, 2001). La thioacidolyse permet d'hydrolyser les liaisons esters et une partie des liaisons ether (β -O-4) et de libérer les acides hydroxycinnamiques (figure 92 Matériel et Méthodes). L'hydrolyse alcaline douce ne permet d'hydrolyser que les liaisons esters (figure 93 Matériel et Méthodes).

Dans les tiges (tableau 14), la quantité d'pAC libérée par thioacidolyse est de 6,96 mg/g de résidu pariétal et la quantité d'AF libérée est d'environ de 8,30 mg/g de RP. Ces résultats varient d'une culture à l'autre et sont donc très dépendants des conditions de cultures initiales. Le ratio pAC/AF libérés dans les tiges varie également. Les résultats obtenus restent cependant similaires à ceux observés dans les tiges de Poacées cultivées comme le blé ou l'orge (Sun et al, 2001).

La thioacidolyse réalisée sur les grains entiers matures, les enveloppes et les albumens n'a pas permis de détecter la présence d'acides hydroxycinnamiques. Pour les détecter, l'hydrolyse alcaline douce a été préférée.

Menée d'abord sur les tiges, l'hydrolyse alcaline douce libère 7,97 mg/g de résidu pariétal d'esters d'pAC et 4,70 mg/g de résidu pariétal d'esters d'AF (tableau 15).

Tableau 16 : Dosage des acides hydroxycinnamiques libres et liés aux arabinoses par acidolyse douce réalisée sur le grain entier de Bd21-3. Résultats en mg/g de MIA pour les grains et en mg/g de RP pour les tiges.

Organes	pAC-Ara	AF-Ara
Grains entiers	0,77 ± 0,01	1,79 ± 0,08
Tiges	4,66 ± 0,38	7,84 ± 0,60

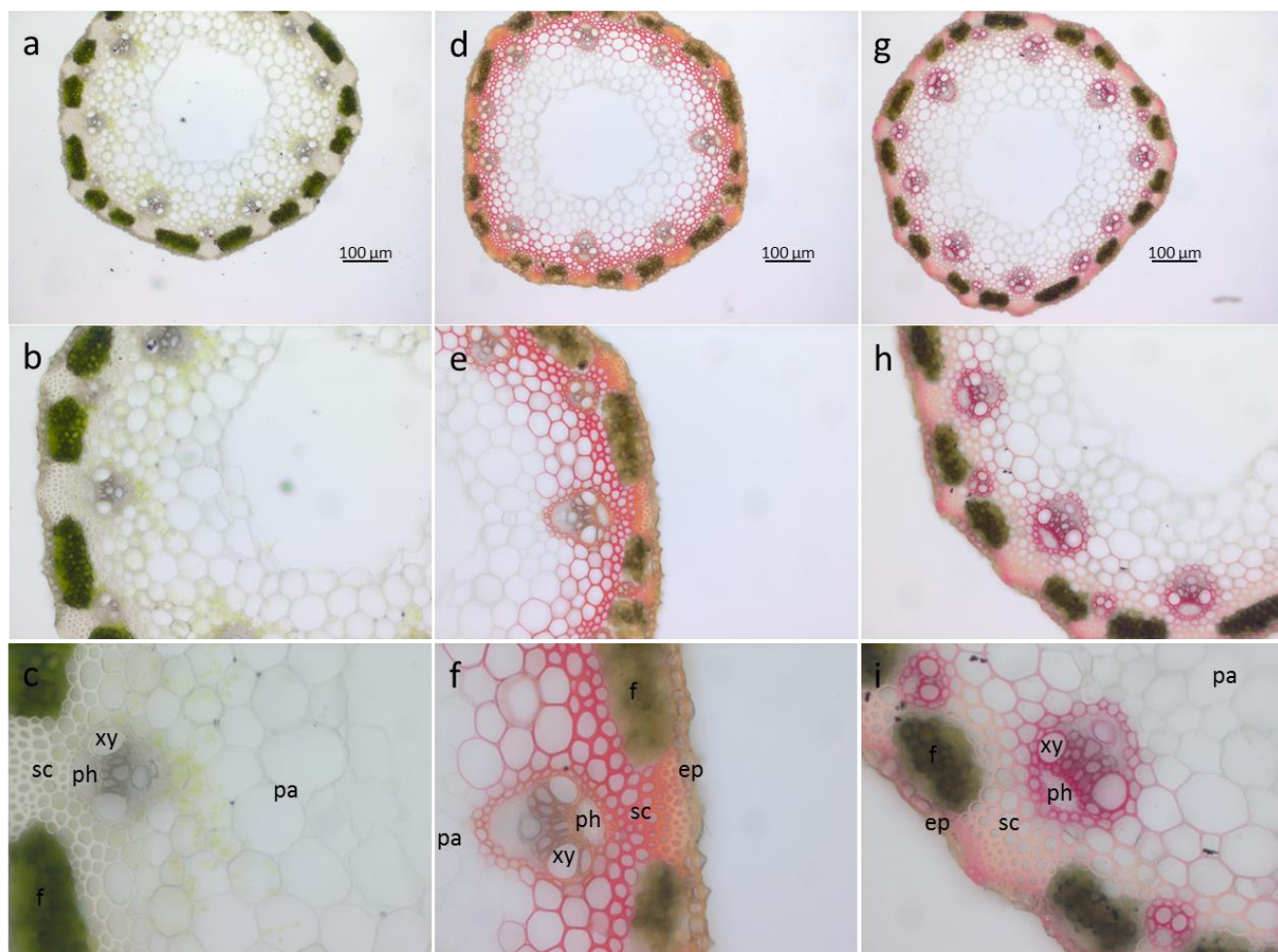


Figure 37 : sections transversales de tiges de *B. distachyon* Bd21-3 à 60 JAG observées en fond clair sans coloration à grossissements 5, 10 et 20 (a, b et c) après coloration de Maïle à grossissements 5, 10 et 20 (d, e et f) et après coloration au phloroglucinol à grossissements 5, 10 et 20 (g, h et i).

ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme

Dans les grains entiers, l'hydrolyse alcaline douce libère 1,08 mg/g de résidu pariétal d'esters d'pAC et 2,11 mg/g d'esters d'AF (tableau 15). Ces esters d'acides phénoliques sont plutôt présents dans les enveloppes puisqu'ils atteignent une valeur de 1,37 mg/g de résidu pariétal pour l'pAC et 3,11 mg/g de résidu pariétal pour l'AF. Dans l'albumen, il y a plus d'esters d'AF que d'esters d'pAC, avec des quantités détectées respectivement de l'ordre de 0,23 et 0,11 mg/g de résidu pariétal. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés dans les grains de Poacées cultivées (Li et al, 2008). Les esters d'acides sinapiques et la vanilline sont également mesurés par thioacidolyse. Ils proviennent de la dégradation des lignines lors du processus d'hydrolyse alcaline. Ces composés sont très faiblement détectés dans les échantillons grains, enveloppes et albumens. L'acidolyse douce, permet d'hydrolyser la liaison glycosidique de l'arabinose avec les résidus xylose de la chaîne principale tout en préservant la liaison ester avec les acides hydroxycinnamiques. La méthode n'est pas parfaitement quantitative mais permet une comparaison des échantillons (Petrik et al, 2014). La teneur en pAC lié à l'arabinose est de 0,77 mg/g de MIA dans les grains et 4,66 mg/g de RP dans les tiges.

Dans les tiges de *B. distachyon*, la thioacidolyse a montré que la quantité d'pAC est légèrement inférieure à celle de l'AF (7 VS 8 mg/g RP en moyenne). Cependant, l'hydrolyse alcaline douce montre qu'il y a plus d'pAC estérifié aux polymères pariétaux que d'AF (8 VS 5 mg/g RP en moyenne). Dans les tiges de *B. distachyon* une étude menée par RMN a confirmé que l'AF n'acylait pas les lignines contrairement à l'pAC (Petrik et al, 2014).

2.4. Caractérisation par (immuno)histochimie des lignines et des acides hydroxycinnamiques des grains et de la tige de *B. distachyon* (Bd21-3)

2.4.1. Distribution des lignines dans les tiges et les grains

Des colorations de Maïle et au phloroglucinol-HCl (réactif de Wiesner) ont été réalisées sur des sections transversales du second entrenœud de tiges de plantes à environ 60 jours après germination (noté JAG) et de grains matures secs de Bd21-3. Ces colorations permettent d'observer la distribution des lignines dans les tissus.

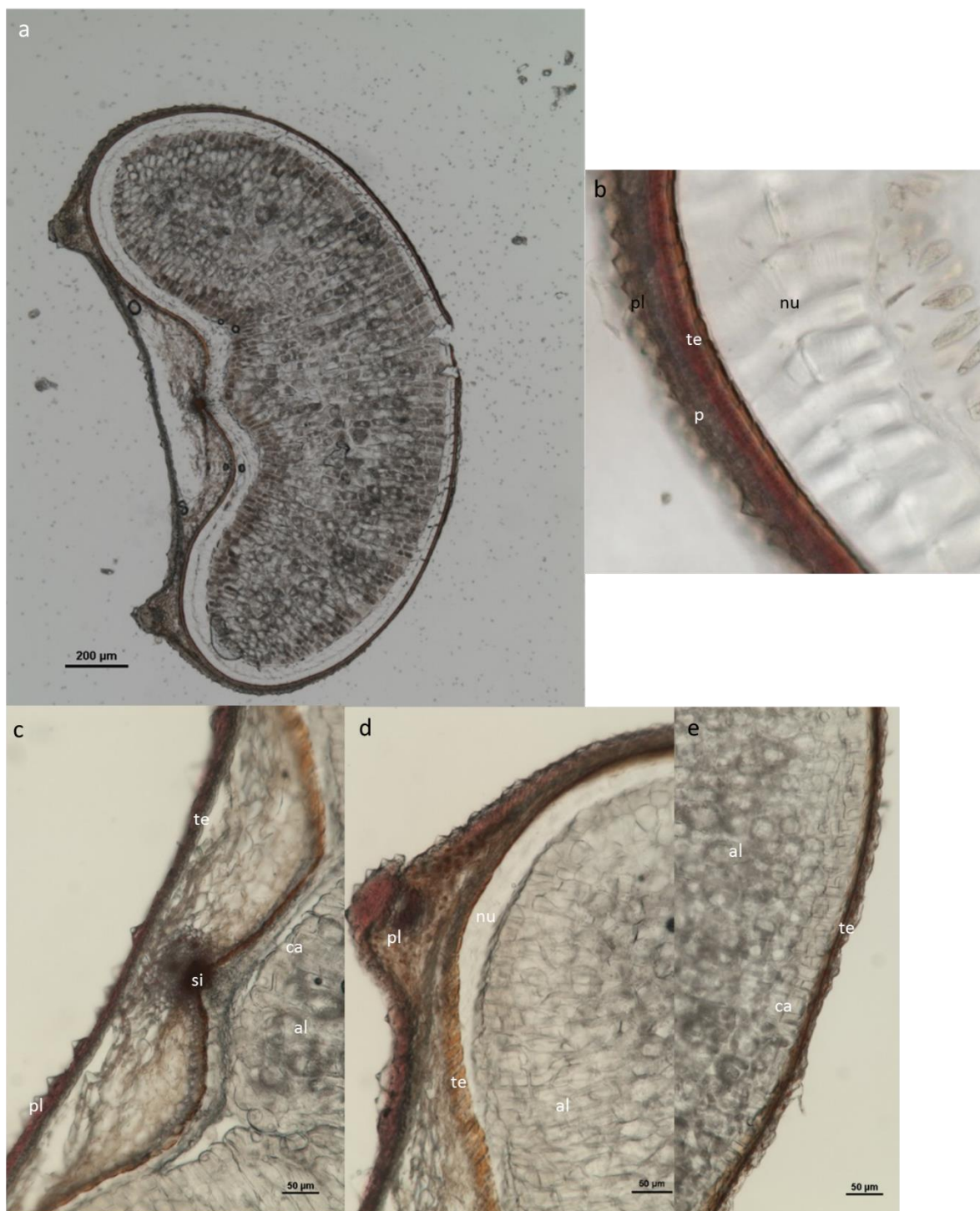


Figure 38 : sections transversales de grains matures de *B. distachyon* Bd21-3 observées sans coloration (a) après coloration de Maüle (b), après coloration au phloroglucinol (b, c, d et e). pl : palea, pe : péricarpe, te : testa, si : sillon, nu : épiderme de Nucelle, ca : couche à aleurones, al : albumen.

La coloration de Maüle permet de colorer en rouge les unités S des lignines et en jaune les unités G des lignines (Chapple et al, 1992). Le phloroglucinol-HCl colore les groupes *p*-hydroxycinnamaldehydes terminaux des lignines natives en rouge violacé.

Dans les tiges, la coloration au phloroglucinol-HCl (figure 37 g, h et i) met en évidence la présence de lignines dans l'épiderme, le sclérenchyme, le parenchyme interfasciculaire et dans les cellules du xylème. La coloration de Maüle (figure 37 d, e et f) permet de distinguer la présence de monomères G principalement dans l'épiderme et de monomères S de lignines principalement dans le sclérenchyme et le parenchyme lignifié.

Dans le grain entier mature, des colorations de Maüle réalisées sur des sections transversales permettent d'observer la présence de monomères S dans l'épiderme de la palea ainsi que dans l'assise externe du tégument séminal appelé également testa (figure 38 a). Les images en fond clair permettent également de constater que l'assise interne de la testa est, elle, naturellement colorée probablement par des pigments phénoliques.

Le phloroglucinol-HCl colore l'épiderme et les vaisseaux de la palea (figure 38 b) mais pas la testa. La sensibilité des deux colorants est probablement différente ce qui pourrait expliquer les différences au niveau des tissus marqués. Le péricarpe (figures 38 b et 38 c), l'albumen de stockage, la couche à aleurone et l'épiderme de nucelle sont exempts de coloration (figure 38 d et 38 e), ce qui suggère qu'ils ne contiendraient que très peu voire pas de lignines. Ces images permettent de confirmer les résultats obtenus précédemment lors des analyses chimiques des grains montrant que les lignines sont localisées dans les enveloppes.

La distribution des lignines dans le grain mature sec *B. distachyon* a également été étudiée par immunomarquages. Des grains matures secs ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde et de paraformaldéhyde puis inclus dans de la résine LR-White. Des sections de 20 µm des grains inclus ont été réalisées au microtome. D'après les résultats d'immunomarquages précédemment obtenus sur le grain de *B. distachyon* (Guillon et al, 2011), l'élimination des β -glucanes est nécessaire pour révéler les autres constituants de la paroi par immunomarquage.

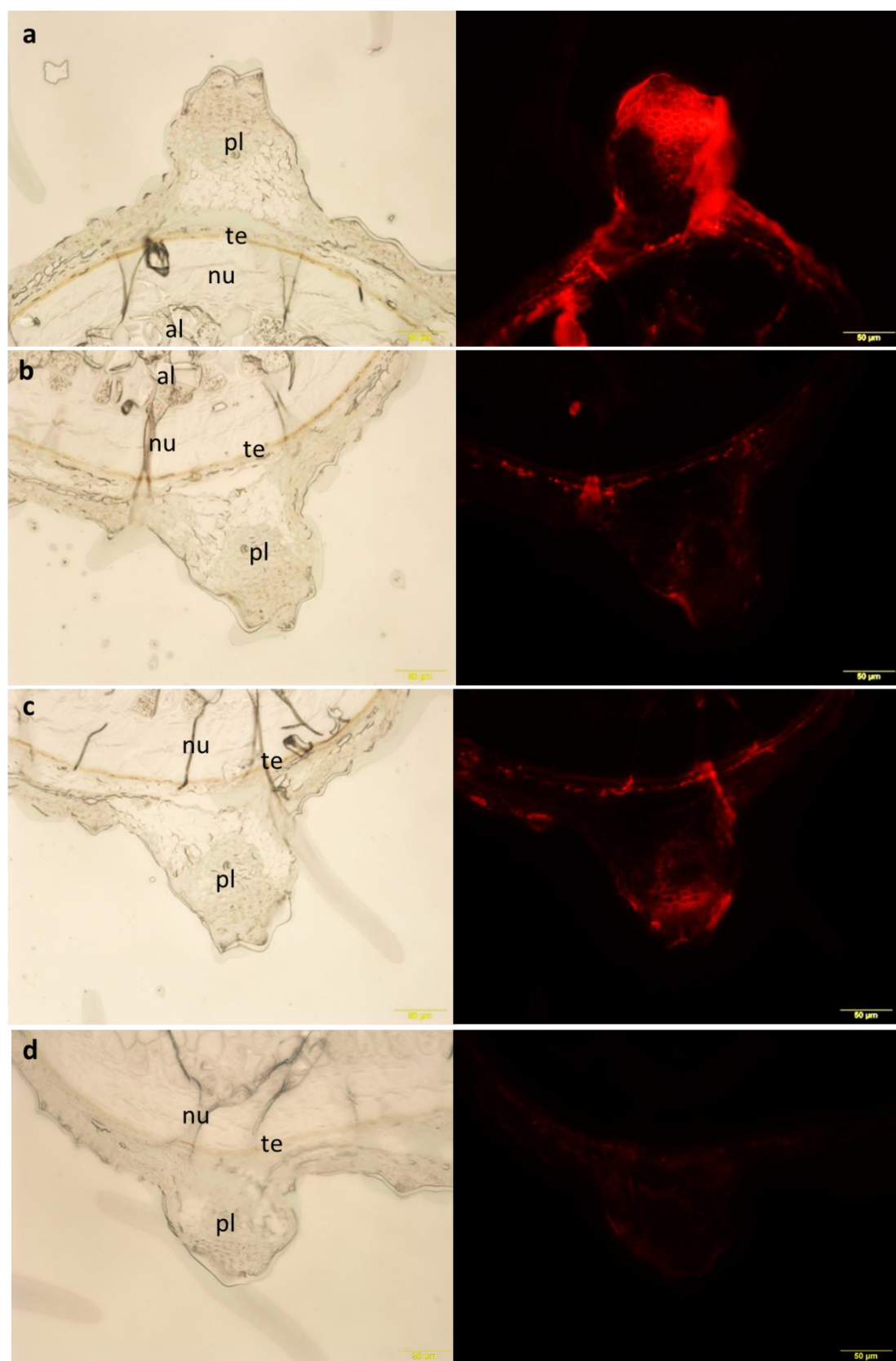


Figure 39 : détection des lignines dans les grains matures secs par immunomarquages avec les anticorps KM1 (a), KM2 (b) KM3 (c) et le contrôle sans anticorps primaire (d). Pour chaque anticorps, à gauche : image en fond clair et à droite : image en fluorescence. pl : palea, te : testa, nu : épiderme de nucelle, al : albumen.

En effet, les β -glucanes sont très abondants dans les parois des grains de *B. distachyon* et empêchent l'accessibilité des anticorps spécifiques aux autres constituants de la paroi (Guillon et al, 2011). Un traitement à la lichénase, a donc été réalisé avant de procéder aux immunomarquages.

Les anticorps utilisés afin de détecter la présence et la localisation des lignines dans les grains sont détaillés ci-dessous :

- l'anticorps KM1 reconnaît des dimères d'alcool déhydrodiconiféryle liés par des liaisons 8-5' selon les tests ELISA réalisés par Kiyoto et al, 2013, il marque bien sur coupes les parois lignifiées ce qui suggère qu'il reconnaît également les liaisons 8-5' dans les lignines polymérisées (Kiyoto et al., 2013) ;
- l'anticorps KM2 reconnaît les dimères d'unités G et/ou S liés en 8-8' comme décrit dans l'article Kiyoto et al, 2013, il reconnaît également les liaisons 8-8' dans les lignines polymérisées (Kiyoto et al, 2013) ;
- et l'anticorps KM3 reconnaît les lignines liées en β -O-4 (8-O-4') (anticorps non publié, communication du Dr. Yoshinaga), il s'agit de liaisons entre monomères de lignines ou de liaisons entre monomère de lignines et acide hydroxycinnamiques.

Ces anticorps ont été produits par l'équipe du Dr. Yoshinaga (Université de Kyoto, division des forêts et des sciences des biomatériaux, laboratoire de biologie cellulaire végétale). Ils ne sont pas distribués à la communauté cependant Dr. Yoshinaga a réalisé des immunomarquages avec ses anticorps sur nos échantillons.

Les trois anticorps ont donné un signal positif dans la testa. Les anticorps KM1 et KM3 ont marqué de plus la palea (figure 39).

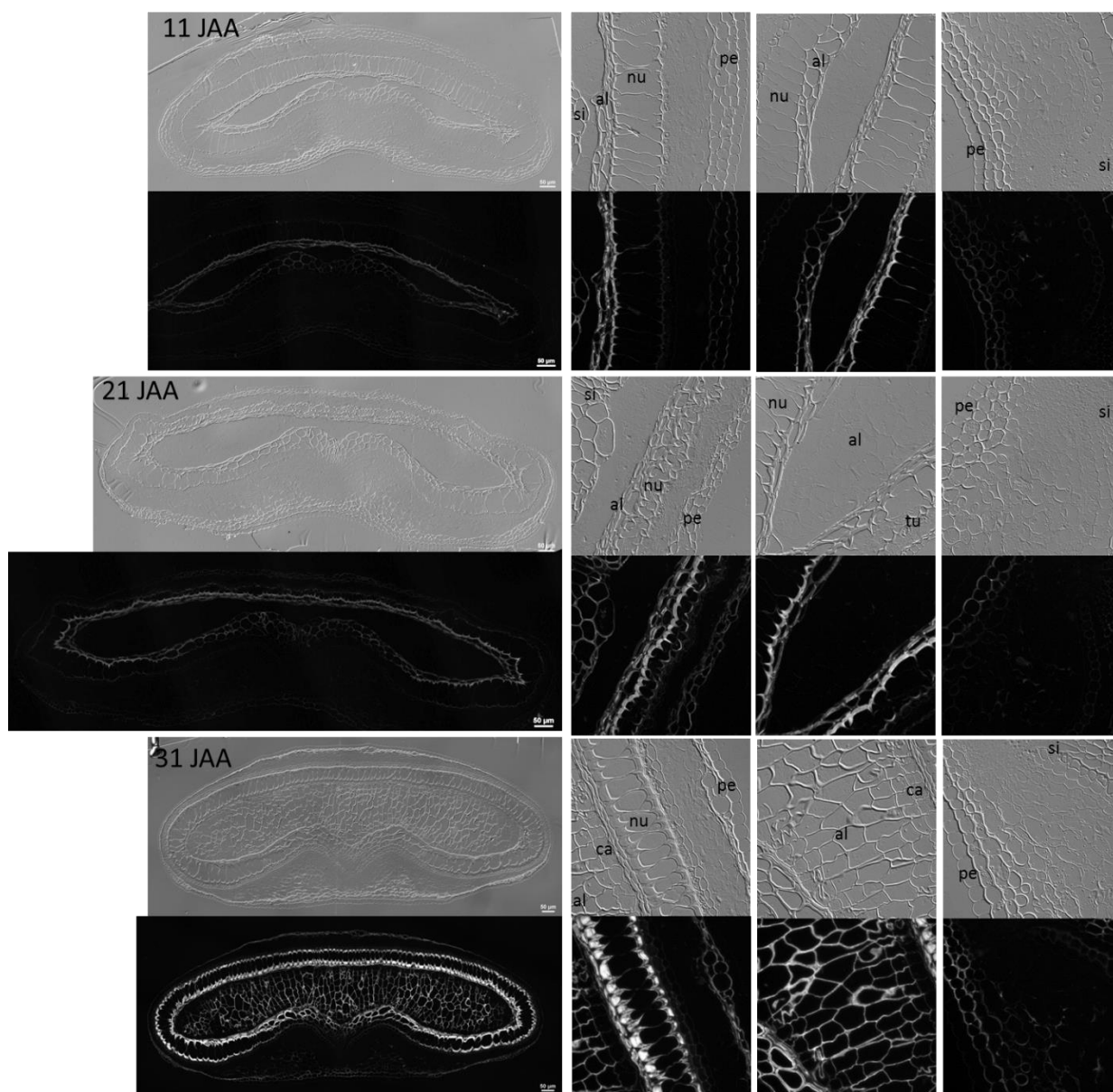


Figure 40: sections transversales de grains de Bd21-3 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps AX1.

Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Une image mosaïque de la coupe entière est montrée ainsi que des zones ciblées sur la figure 14. pe : péricarpe, tu : tubulaires, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurones, al : albumen, si : sillon.

En accord avec les résultats des analyses chimiques, les lignines sont détectées dans les enveloppes du grain (palea et testa). Ni les colorations ni les anticorps spécifiques des lignines n'ont donné de résultats positifs pour les tissus comme l'albumen et l'épiderme de nucelle.

2.4.2. Distribution des arabinoxylanes féruloylés et des acides hydroxycinnamiques dans les tiges et les grains par immunomarquages

Des immunomarquages ont été réalisés afin d'analyser la distribution des arabinoxylanes et des acides hydroxycinnamiques dans les tiges et les grains de *B. distachyon* matures et secs (Bd21-3). De plus, la mise en place de ces constituants pariétaux a été suivie pendant le développement du grain. Pour cela, des grains de Bd21-3 issus de chambres de culture ont été prélevés à 11, 21 et 31 jours après anthèse (JAA), correspondant respectivement à la phase de croissance, au début et au cours du remplissage des grains. Des grains matures et des tiges matures (environ 60 JAG) ont également été prélevés. Ces échantillons ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde et de paraformaldéhyde puis inclus dans de la résine LR-White et coupées au microtome. Après le traitement à la lichénase des coupes, des immunomarquages ont été réalisés.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

- l'anticorps anti-AX1 qui reconnaît les séquences (1-4)- β -D-xylosyl non substitués des xylanes, et tolère également les arabinoxylanes faiblement à moyennement substitués (Guillon et al, 2004),
- l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara produit contre le 5-O-(trans-féruloyl)-L-arabinose (Philippe et al, 2007) et qui reconnaît spécifiquement l'AF lié par liaison ester aux arabinoxylanes,
- l'anticorps INRA-COU1 qui reconnaît l'pAC sous forme libre et sous forme estérifiée (Tranquet et al, 2009).

Des immunomarquages avec l'anticorps anti-AX1 ont été réalisés sur des coupes de grains de Bd21-3 matures. Les coupes ont été observées en microscopie de fluorescence et en transmission électronique (Guillon et al, 2011). Ces immunomarquages avaient mis en évidence des arabinoxylanes particulièrement dans les parois de l'albumen, albumen de stockage et couche à aleurone avec un fort marquage au niveau de la lamelle moyenne (Guillon et al, 2011).

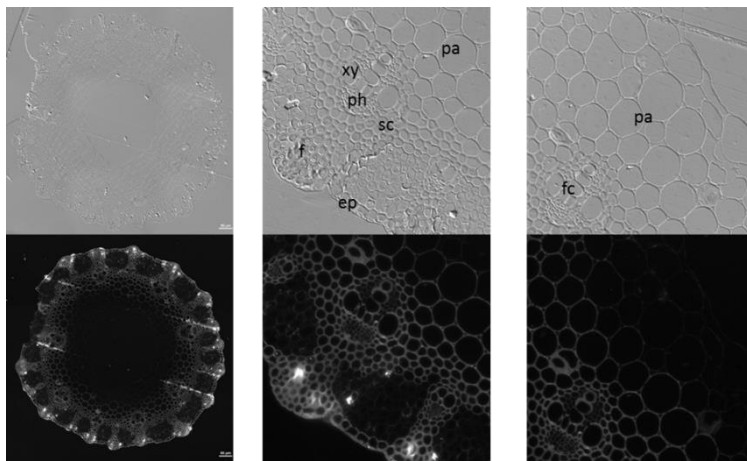


Figure 41 : section transversale de tiges de Bd 21-3 à 60 JAS marquée par l'anticorps AX1.
En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, fc : faisceau conducteur, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme.

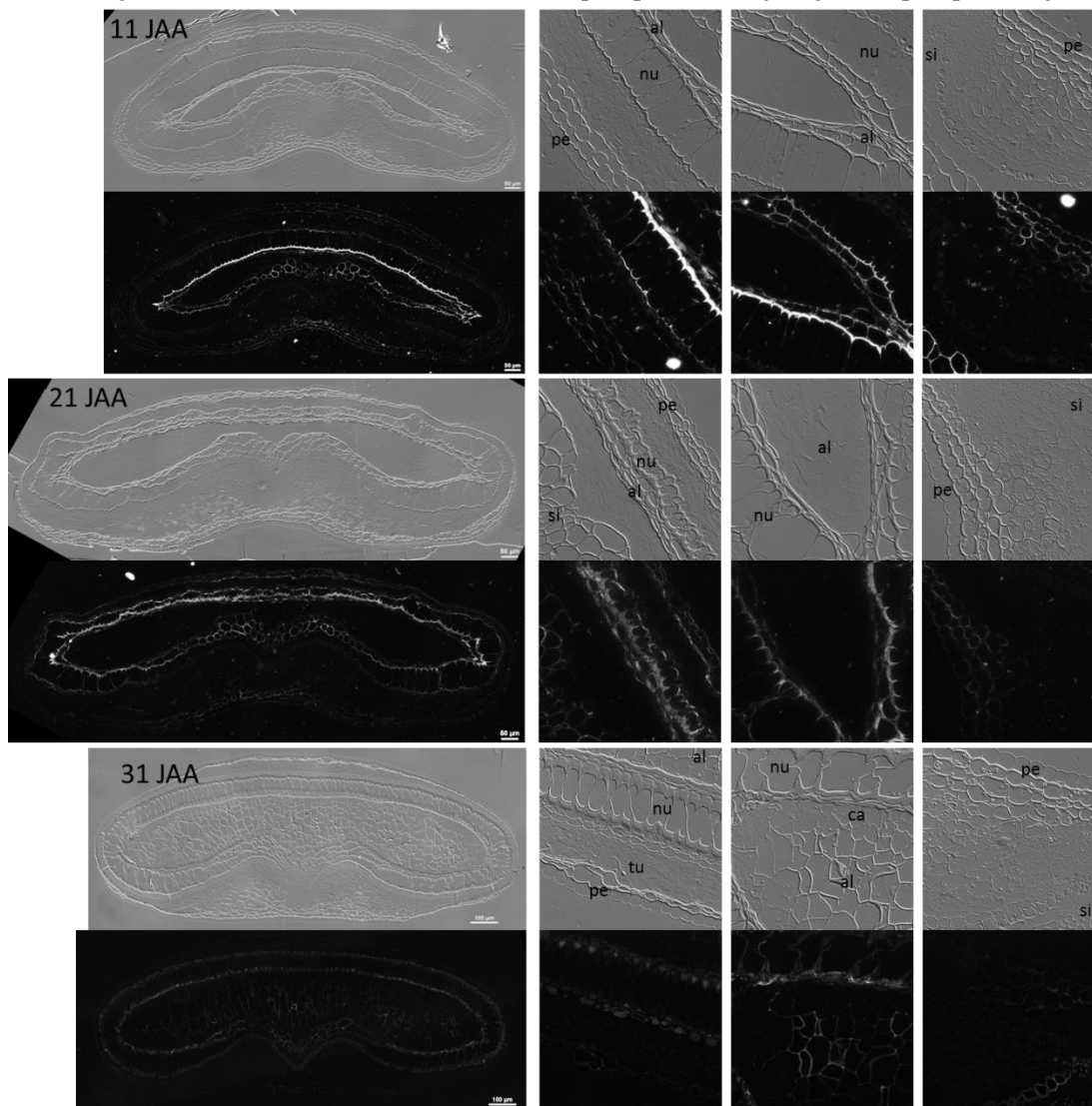


Figure 42 : sections transversales de grains de Bd21-3 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara.

Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence.
Une image mosaïque de la coupe entière est montrée ainsi que des zones ciblées sur la figure 14. pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon.

Le suivi des arabinoxylyanes pendant le développement du grain de *B. distachyon* n'a pas été publié.

A 11 JAA, le grain est constitué majoritairement par le péricarpe, l'épiderme du nucelle est épais et l'albumen est en cours de formation (figure 40, 11 JAA). On peut voir ce dernier se former, accolé à l'épiderme de nucelle (figure 40, 11 JAA). Le marquage à l'aide de l'anticorps anti-AX1 permet de détecter la présence des arabinoxylyanes dans les parois des cellules de l'albumen en cours de formation, dans les parois de l'épiderme de nucelle (particulièrement celle en contact avec l'albumen), et dans les parois du péricarpe, notamment le péricarpe externe (figure 40, 11 JAA).

A 21 JAA, l'albumen continue de se développer accolé à l'épiderme de nucelle (figure 40, 21 JAA). Le marquage à l'aide de l'anticorps anti-AX1 permet de détecter des arabinoxylyanes localisés dans les parois des cellules de l'épiderme du nucelle, de l'albumen et du péricarpe (figure 40, 21 JAA).

A 31 JAA, l'albumen de stockage est complètement formé et une couche à aleurone s'est constituée à la périphérie de l'albumen. Le marquage à l'aide de l'anticorps anti-AX1 permet de détecter des arabinoxylyanes dans les parois des cellules de l'épiderme du nucelle persistant, dans les parois des cellules de l'albumen et dans le péricarpe (figure 42, 31 JAA). La couche à aleurone est peu voire pas marquée par cet anticorps ce qui n'est pas en accord avec les résultats obtenus sur le grain mature par Guillon et al, en 2011.

Dans la tige au stade floraison, l'anticorps anti-AX1 permet de détecter la présence des arabinoxylyanes dans les parois des cellules du parenchyme, des faisceaux conducteurs de sève (xylème et phloème), du sclérenchyme, des fibres et de l'épiderme (figure 41).

Dans le grain, aux différents stades de développement observés, l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara donne un signal en accord avec celui obtenu avec l'anticorps anti-AX1. Des arabinoxylyanes féruloylés sont détectés dans les mêmes tissus que les xylanes détectés par anti-AX1 cependant le signal est, de façon générale, plus faible (figure 42, 11 JAA, 21 JAA et 31 JAA). La couche à aleurone n'est là encore pas marquée par l'anticorps utilisé. Ces résultats confirmeraient donc une féruloylation précoce et simultanée à la formation des xylanes, ainsi qu'une féruloylation sur une partie de ces xylanes.

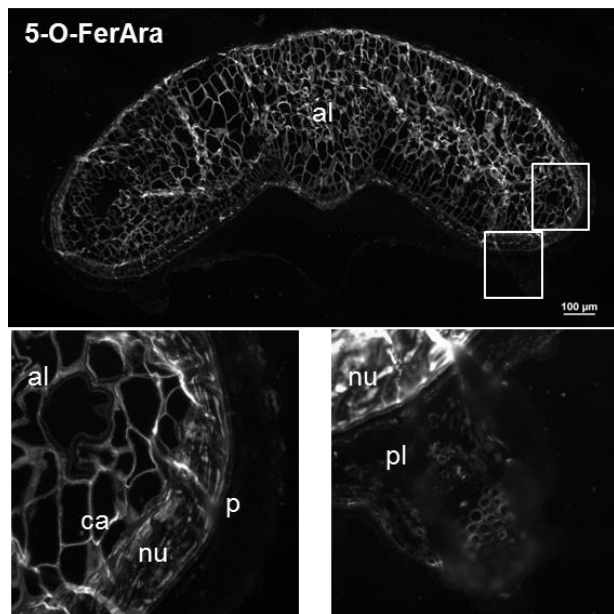


Figure 43 : sections transversales de grains de Bd21-3 matures secs traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara.

Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Une image mosaïque de la coupe entière est montrée ainsi que des zones ciblées sur la figure 14. pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon.

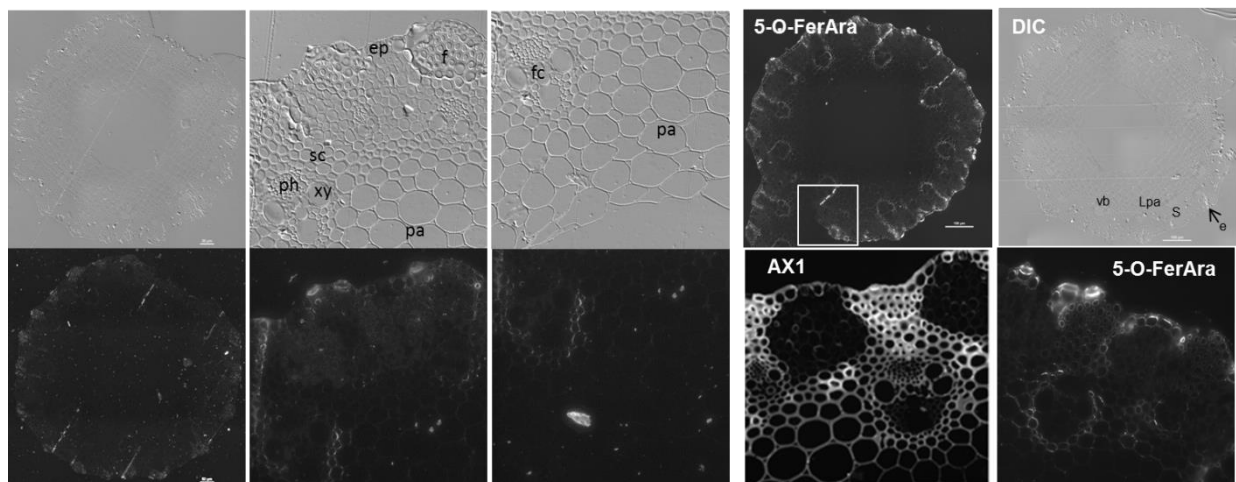


Figure 44 : Section transversale de tiges de Bd21-3 à 60 JAS marquée par l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara ou AX1. En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, fc : faisceau conducteur, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme.

Ce résultat soulève une différence majeure entre le grain de *B. distachyon* et celui du blé puisque, chez ce dernier, c'est la couche à aleurone qui est la plus marquée par cet anticorps (Philippe et al, 2007). Dans le grain mature l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara marque les parois de l'albumen de stockage, de la couche à aleurone, de l'épiderme du nucelle et faiblement les parois des vaisseaux de la palea (figure 43).

Dans la tige prélevée au stade floraison, l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara marque très peu les parois. Il permet cependant de détecter la présence d'arabinoxylanes féruloylés dans les parois des mêmes tissus que ceux identifiés à l'aide de l'anticorps anti-AX1, c'est-à-dire les parois des cellules du parenchyme, des faisceaux vasculaires, du sclérenchyme et de l'épiderme où les cellules siliceuses sont particulièrement marquées (figure 44).

Dans le grain de *B. distachyon* et aux différents stades de développement étudiés, l'utilisation de l'anticorps INRA-COU1 ne révèle aucun marquage (figure 45, 11, 21 et 31 JAA), le signal observé est dû à l'autofluorescence de la testa. Ce résultat est très différent de celui obtenu chez le grain de blé puisque l'anticorps INRA-COU1 y marque très clairement les parois des cellules de la couche à aleurone (Tranquet et al, 2010).

Des marquages ont également été réalisés sur des grains matures secs (figure 45, grain mature). Un marquage de l'épiderme de la palea est observé, le marquage est important dans les cellules siliceuses.

Les analyses chimiques sur grain mature ont permis de détecter de l'pAC dans le grain de *B. distachyon* (tableau 15) surtout dans les enveloppes disséquées qui contenaient la palea. Une faible quantité d'pAC a également été détectée dans l'albumen par les analyses chimiques mais pas par les immunomarquages. Une hypothèse peu probable serait que la quantité présente dans ce tissu ne permette pas la détection. Il est également possible que l'pAC présent ne soit pas accessible à l'anticorps. L'utilisation de l'anticorps INRA-COU1 sur les coupes de tiges de *B. distachyon* a permis d'obtenir un marquage des parois en accord avec les résultats du dosage de l'pAC dans les tiges. Cependant, ce marquage est observé uniquement sur la dernière assise cellulaire extérieure de la tige correspondant à l'épiderme et là encore particulièrement dans les cellules siliceuses (figure 46). Ce résultat est intéressant mais soulève beaucoup de questions. Il se pourrait par exemple que l'pAC ne soit présent que dans cette assise cellulaire.

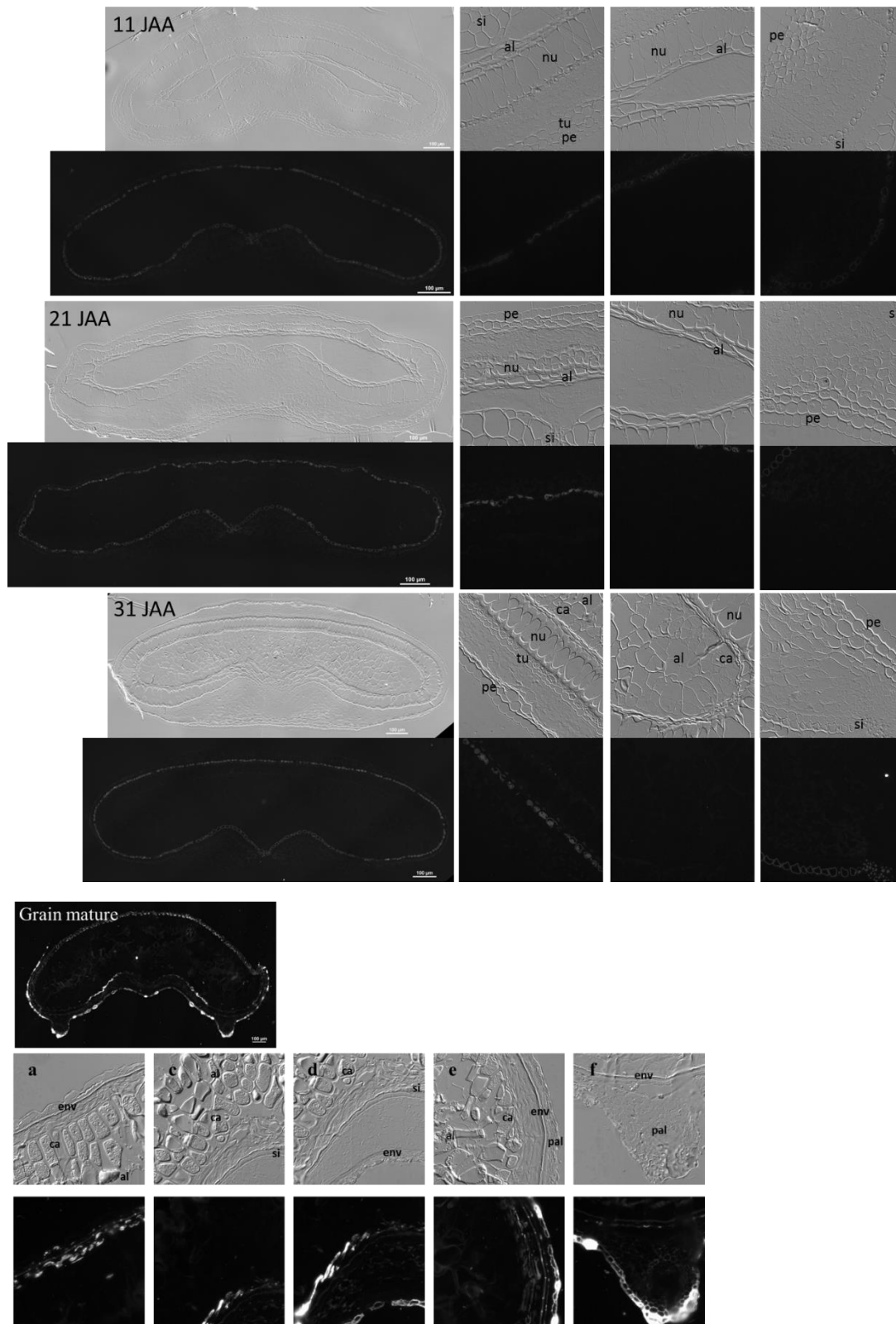


Figure 45 : Sections transversales de grain de Bd21-3 à 11, 21, 31 JAA et mature sec traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps INRA-COU1. Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Une image mosaïque de la coupe entière est montrée ainsi que des zones ciblées sur la figure 14. Pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon.

Il se pourrait également que l'anticorps utilisé, INRA-COU1, ne soit pas capable d'accéder à l'pAC dans les autres tissus de la tige, comme précédemment évoqué dans le cas de l'albumen du grain.

Les expériences d'immunomarquages ont fourni des éléments intéressants sur la localisation des arabinoxylanes féruloylés, de l'pAC et des lignines. Cependant une absence de signal ne veut pas forcément dire une absence du composé cible puisqu'il a été montré que les antigènes peuvent être masqués par d'autres composants des parois comme c'est le cas des arabinoxylanes du grain qui nécessitent l'élimination des β -glucanes mixtes pour être révélés dans l'albumen central (Guillon et al, 2011). De plus, le signal obtenu après immunomarquages à l'aide des différents anticorps n'est pas directement comparable d'un point de vue quantitatif. Tout d'abord, les résultats sont issus de plusieurs expériences indépendantes qui peuvent légèrement différer. Les anticorps anti-AX1 et INRA-COU1 sont tous les deux des anticorps monoclonaux, issus d'une seule lignée cellulaire et ne reconnaissant qu'un seul épitope, alors que l'anticorps anti-5-O-Fer-Ara est un anticorps polyclonal, donc reconnaissant plusieurs épitopes différents. Les anticorps peuvent avoir une affinité différente avec les antigènes. La qualité de la coupe sur laquelle est réalisée l'immunomarquage est également importante car l'absence de marquage ou un marquage aspécifique peuvent être dû au fait qu'il y ait des plis sur la coupe. Les anticorps sont des outils performants mais leur utilisation est délicate et l'interprétation des résultats nécessite d'être confronté de manière critique aux analyses chimiques.

La présence d'arabinoxylanes féruloylés est confirmée dans les parois du grain de *B. distachyon* tôt dans le développement. D'abord présents dans les parois des cellules de l'épiderme de nucelle et des enveloppes à 11 JAA, ils sont ensuite détectés à 31 JAA dans les parois des cellules de l'albumen de stockage. Dans la tige mature, les arabinoxylanes féruloylés sont présents dans tous les tissus. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus après analyse chimique des grains secs matures et des tiges de *B. distachyon*.

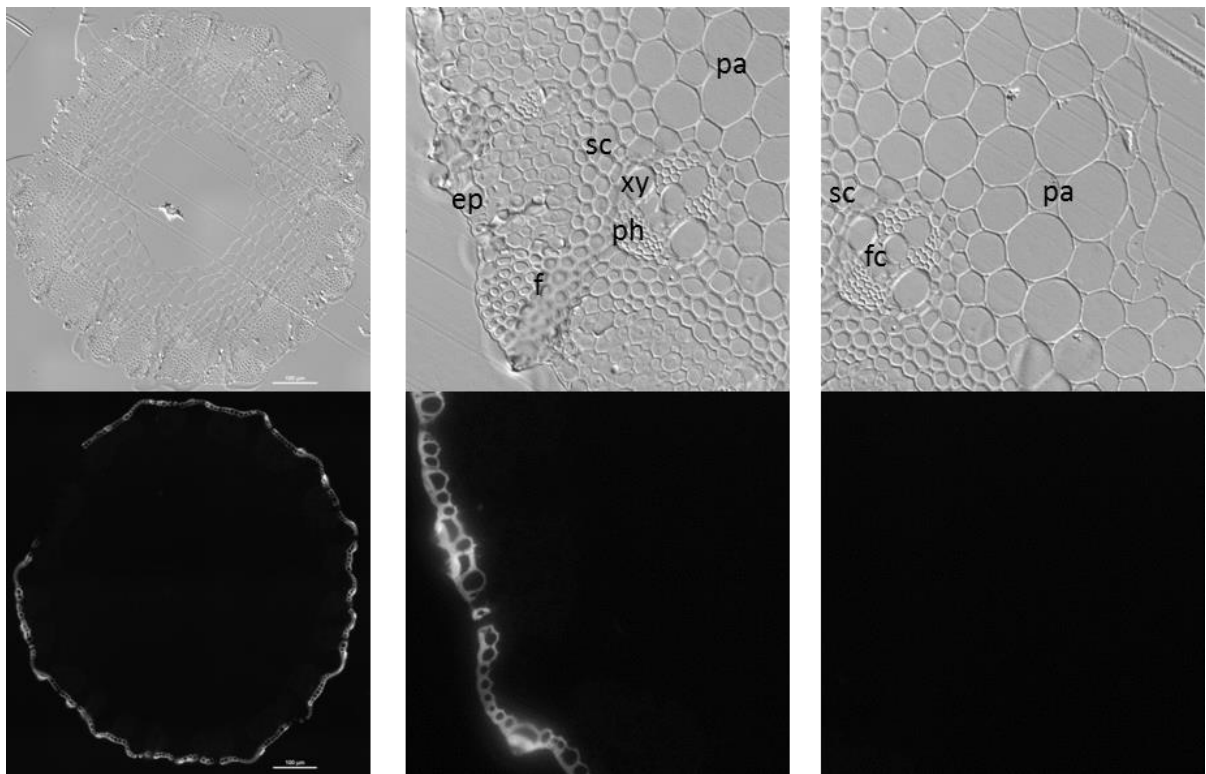


Figure 46 : Section transversale de tige à 60 JAS marquée par l'anticorps INRA-COU1.
 En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme,
 sc : sclérenchyme, f : fibre, fc : faisceau conducteur, ph : phloème, xy : xylème, pa :
 parenchyme.

L'anticorps INRA-COU1 ne marque que l'épiderme de la tige et de la palea du grain. Cette localisation du marquage ne correspond pas à la localisation plus généralisée des arabinoxylanes, ni à celle observée pour les lignines dans les tiges. Elle correspond plus à la localisation des lignines dans le grain. Il se pourrait que cet anticorps INRA-COU1 réagisse plus intensément avec l'pAC présent dans l'épiderme, par exemple l'pAC lié aux cutines de la cuticule.

2.5. Conclusions

Des similitudes et des différences sont observées entre *B. distachyon* et les autres Poacées. Le taux de lignines des tiges de *B. distachyon* est proche de celle du maïs et du blé. Les parois des tiges comportent des arabinoxylanes féruloylés. Par contre, la quantité d'pAC est plus élevée dans les tiges de *B. distachyon* que dans celles du maïs ou du blé. L'anticorps INRA-COU1 donne également des résultats différents de ceux observés sur des coupes de tiges de maïs ou de blé. Alors que chez *B. distachyon*, il n'est détecté que dans les parois des cellules de l'épiderme, dans la tige de maïs il est également détecté dans les parois des cellules des faisceaux conducteurs de sève.

L'analyse du grain de *B. distachyon* montre qu'il y a plusieurs différences observées entre *B. distachyon* et d'autres Poacées comme le blé dans la distribution des composés pariétaux. Les immunomarquages montrent que les arabinoxylanes féruloylés sont présents dans les parois des cellules de l'épiderme de nucelle et dans celles de l'albumen de stockage à 31 JAA. Ils ne sont pas détectés dans les parois des cellules de la couche à aleurone chez *B. distachyon* alors que chez le blé, celles-ci sont les plus riches en arabinoxylanes féruloylés. Les analyses chimiques ont confirmé que les parois de l'albumen de stockage comprenaient une teneur importante en arabinoxylanes féruloylés. En parallèle cette première étude des lignines du grain de *B. distachyon* a montré que le grain entier mature et sec comprenait environ 4% de lignines localisées majoritairement dans les enveloppes (palea et testa). Elle a montré que l'albumen de stockage contient des traces de lignines qui ne sont pas détectés par immunomarquages. Ce tissu était donc prometteur pour rechercher des gènes impliqués dans la synthèse de l'AF lié aux arabinoxylanes.

Chapitre 3 : Etude d'un gène *COMT* chez ***Brachypodium distachyon***

Tableau 18 : Description de la nomenclature utilisée pour les COMT de *B. distachyon* et du nombre d'acides aminés composant la séquence protéique prédite.

Locus	Nomenclature	Nombre d'acides aminés
Bradi1g14870	<i>BdCOMT1</i>	358
Bradi2g02380	<i>BdCOMT2</i>	355
Bradi2g02390	<i>BdCOMT3</i>	356
Bradi2g19830	<i>BdCOMT4</i>	385
Bradi2g19850	<i>BdCOMT5</i>	382
Bradi3g16530	<i>BdCOMT6</i>	361
Bradi3g55890	<i>BdCOMT7</i>	363
Bradi4g20020	<i>BdCOMT8</i>	386

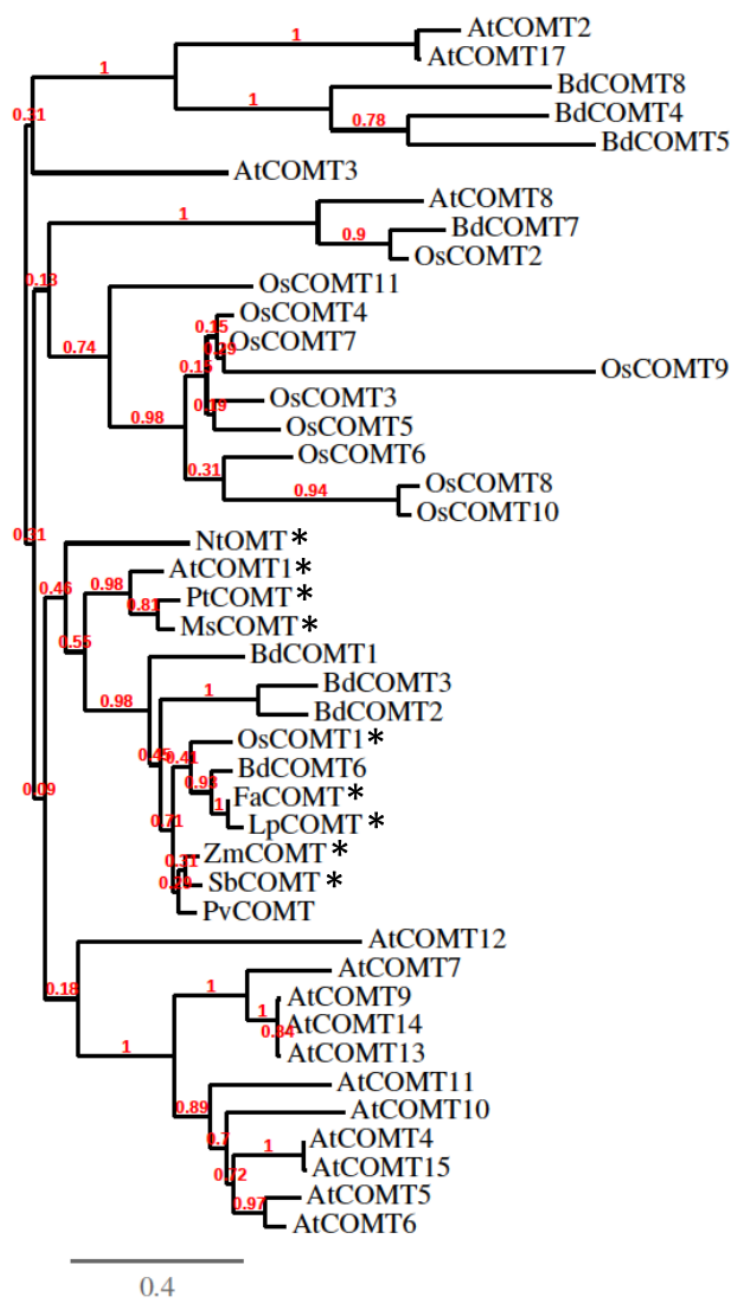


Figure 47 : Arbre phylogénétique des COMT et COMT-like contenant toutes les séquences codant pour une COMT chez *A. thaliana*, *O. sativa*, *B. distachyon* et les séquences de COMT de plantes connues comme étant impliquées dans la synthèse des lignines réalisé avec www.phylogeny.fr (Muscle, G-Block, PhyML, Bootstrap 100 et TreeDyn). Astérisque : enzyme caractérisée.

3.1. Analyse phylogénétique des COMT : choix de BdCOMT6

Les sites internet Brachypodium.org (<http://www.brachypodium.org>) et du *Brachypodium distachyon* project (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium/>) ont permis de réaliser un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) à partir des séquences protéiques des COMT d'*A. thaliana* et de maïs connues comme étant impliquées dans la biosynthèse des lignines. En utilisant les paramètres par défaut, huit gènes codant des COMT potentielles ont été identifiés : Bradi1g14870, Bradi2g02380, Bradi2g02390, Bradi2g19830, Bradi2g19850, Bradi3g16530, Bradi3g55890 et Bradi4g20020 que nous nommerons respectivement par la suite *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3*, *BdCOMT4*, *BdCOMT5*, *BdCOMT6*, *BdCOMT7* et *BdCOMT8* (tableau 18). Parmi ces huit gènes, les séquences codantes prédites de *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3*, *BdCOMT6*, et *BdCOMT7* donnent, des protéines d'environ 360 acides aminés alors que *BdCOMT4*, *BdCOMT5*, et *BdCOMT8* correspondent à des protéines de plus de 380 acides aminés ce qui suggère des fonctions biochimiques distinctes entre ces deux groupes (Louie et al, 2010).

Notre objectif était d'identifier quelle protéine COMT candidate de *B. distachyon* est impliquée dans la biosynthèse des lignines et d'évaluer son rôle dans la synthèse des arabinoxyldes féruloylés.

Une analyse phylogénétique des séquences protéiques des COMT d'*Arabidopsis thaliana*, de riz, de *B. distachyon* ainsi que les COMT de fétuque, de *Lolium perenne*, de luzerne, de maïs, de panic, de peuplier, de sorgho et de tabac que l'on sait impliquées dans la synthèse des unités S des lignines a été réalisée en utilisant le site www.phylogeny.fr (Lapierre et al, 1988 ; Barrière et al, 2004 ; Piquemal et al, 2002 ; He et al, 2003 ; Pichon et al, 2006 ; Palmer et al, 2008 ; Chen et al, 2004 ; Tu et al, 2010 ; Zubieta et al, 2002). L'arbre phylogénétique obtenu est présenté en figure 47.

Un clade contenant toutes les COMT connues comme impliquées dans la biosynthèse des lignines est observé. Ce clade se scinde en deux branches, l'une contenant uniquement la COMT du tabac (NtOMT) et l'autre se subdivisant en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe contient les COMT d'*A. thaliana* (AtCOMT1) identifiée comme celle étant impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines (Antanassova et al, 1995 ; Goujon et al, 2003 ; Do et al, 2007), de luzerne (MsCOMT) et de peuplier (PtCOMT).

Le second sous-groupe est spécifique des graminées. Il contient quatre COMT de *B. distachyon* (BdCOMT1, BdCOMT2, BdCOMT3 et BdCOMT6), la COMT de riz (OsCOMT1), de fétuque (FaCOMT), de *Lolium perenne* (LpCOMT), de maïs (ZmCOMT), de panic (PvCOMT) et de sorgho (SbCOMT). Parmi les séquences protéiques des quatre gènes de *B. distachyon* inclus dans le sous-groupe spécifique des graminées, BdCOMT1 est à part alors que BdCOMT2 et BdCOMT3 forment ensemble un sous-groupe. La protéine BdCOMT6 se trouve dans le même sous-groupe qu'une COMT de riz (OsCOMT1) ainsi que les COMT de fétuque (FaCOMT), de *Lolium perenne* (LpCOMT), de maïs (ZmCOMT), de panic (PvCOMT) et de sorgho (SbCOMT) que l'on sait impliquées dans la voie de biosynthèse des lignines.

BdCOMT7 se situe dans le clade le plus proche du précédent où sont regroupés plusieurs COMT de riz et une COMT d'*A. thaliana*.

Trois COMT potentielles de *B. distachyon* BdCOMT4, BdCOMT5 et BdCOMT8 sont regroupées au sein d'un clade où des protéines d'*A. thaliana* (AtCOMT2, AtCOMT3 et AtCOMT17) sont également présentes. Ces trois dernières sont respectivement composées de 363, 325 et 382 acides aminés. AtCOMT3 a une séquence plus courte que les COMT conventionnelles et AtCOMT17 a une séquence plus longue. Ces trois COMT ne semblent pas correspondre à celles impliquées dans la biosynthèse des lignines.

3.2. Analyse des séquences protéiques

L'obtention du cristal de la COMT de la luzerne a permis l'élucidation de sa structure (Zubieta et al, en 2002). La structure de la COMT de *Lolium perenne* a été publiée par Louie et al, en 2010. Ces études ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans la dimérisation de la COMT, la liaison au substrat, le 5-hydroxyconiféraldéhyde, et la liaison au cofacteur, le S-adenosyl-méthionine ou SAM. L'alignement des séquences des huit COMT de *B. distachyon* et de celles de la luzerne et de *Lolium perenne* a été réalisé en utilisant le logiciel CLUSTAL 2.1. Il a permis d'identifier dans les séquences des COMT potentielles de *B. distachyon* les résidus importants pour l'activité enzymatique COMT (figure 48). La conservation de ces résidus importants est résumée dans le tableau 19.

```

LpCOMT      EANPSSQGVFHVDMIMLAHN-PGGKERYEREFQALARGAGFTGVKSTYIYANAWAIEFTK 360
BdCOMT6     EATPKAQGVFHVDMIMLAHN-PGGKERYEREFEEELARGAGFTGVKATYIYANAWAIEFTK 360
BdCOMT1     EATPRARMAFEDDMIMLTYT-PGGKERYKREFVLAKGARFASVRTTYIYANSWAIEYTK 357
BdCOMT2     DETPSARGLIQIDMSLLAYS-PGGKERYLRELEKLAKGAGFAAVKATYIYANFWAIEYTK 354
BdCOMT3     EPTHGAQGLISVDVSLAYS-PGGKERYLRELEKLAKGAGFADV KATYIYADFWAIEYTK 355
MsCOMT      DSSLATKGVVHIDVIMLAHN-PGGKERTQKEFEDLAKGAGFQGFKVHCNAFNNTYIMEFLK 363
BdCOMT7     DTSTRTRALLENDIFVMTYRTQGRERSEEEFRQLGLAAGFTA FRAIYLDPFYAVLEYLK 362
BdCOMT4     D--EIVTRETQVFFDLFIMYLE-GIEREEFEWKKIFMEAGFTDYKIIISVLGVRSVIELYP 384
BdCOMT5     AGGEAMLEEAQVVDLFLMVFE-GREREEHEWEKIFLEAGFSGYKVM PVLGIRSIIEVYP 381
BdCOMT8     PCCAGPMHEAEILMDMAMMCMTTGHEREEHEWRSIFVAAGFSDYKINKALGVQC VIEVYP 385
              :      *  *  *  *  .  :  *  *  :      : *

LpCOMT      --
BdCOMT6     --
BdCOMT1     --
BdCOMT2     --
BdCOMT3     --
MsCOMT      KV 365
BdCOMT7     --
BdCOMT4     --
BdCOMT5     --
BdCOMT8     --

```

Figure 48 : Alignement des séquences protéiques de COMT du *Lolium perenne*, de luzerne et de *B. distachyon*.

Cet alignement permet l'identification des résidus importants pour l'activité avec en vert le site de dimérisation, en jaune les résidus catalytiques, en violet le motif de liaison au cofacteur, en bleu le site de positionnement et de liaison au substrat (alignement réalisé par CLUSTAL 2.1). La Sérine en orange est phosphorylée chez le peuplier (Wang et al ; 2015) et l'acide aminé en rouge est affecté par la mutation 5139 (G256D). Astérisque : conservation stricte des acides aminés chez toutes les COMT étudiées ; deux points : conservation des caractéristiques des acides aminés ; point : pas de conservation entre les acides aminés, tiret : gap.

Tableau 19 : Conservation des résidus aminés importants dans l'activité enzymatique d'une COMT impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines chez les COMT identifiées chez *B. distachyon*

Protéine	Résidus de dimérisation	Résidus catalytiques	Résidus de liaison à SAM	Résidus de liaison au substrat
BdCOMT1	0/2	3/3	14/14	8/13
BdCOMT2	1/2	2/3	11/14	4/13
BdCOMT3	2/2	2/3	12/14	5/13
BdCOMT4	1/2	2/3	12/14	2/13
BdCOMT5	1/2	2/3	14/14	2/13
BdCOMT6	1/2	3/3	14/14	13/13
BdCOMT7	0/2	2/3	13/14	3/13
BdCOMT8	0/2	3/3	12/14	4/13

Tandis que les résidus catalytiques impliqués dans l'O-méthylation et les résidus impliqués dans la liaison au cofacteur SAM sont bien conservés chez les huit COMT potentielles de *B. distachyon*, ceux impliqués dans la liaison au substrat sont difficilement identifiables (tableau 19).

BdCOMT4 et BdCOMT5 ne possèdent qu'un seul des deux résidus connus impliqués dans la dimérisation et ont une très faible conservation des résidus de liaison au substrat. De plus, leurs séquences est beaucoup plus longue que les COMT dites « classiques » (380 acides aminés) intervenant dans la voie de biosynthèse des lignines (Louie et al, 2010). De même, BdCOMT7 et BdCOMT8 ne possèdent aucun des résidus impliqués dans la dimérisation et une très faible conservation des résidus impliqués dans la liaison au substrat. Ces protéines sont donc relativement éloignées des COMT ayant un rôle dans la lignification. En conséquence, ces quatre protéines n'ont pas été retenues pour la suite des analyses. Bien que BdCOMT1 ne présente pas les résidus de dimérisation préalablement identifiés chez d'autres espèces, cette protéine a conservé un acide aminé aux caractéristiques physicochimiques proches. Tout comme BdCOMT3 et BdCOMT4, la faible conservation des résidus impliqués dans la liaison au substrat fait de BdCOMT1 un candidat peu fiable pour la COMT impliquée dans la biosynthèse des lignines. BdCOMT2 possède une bonne conservation des résidus connus comme impliqués dans la dimérisation, la réaction catalytique et la liaison au cofacteur SAM. Elle ne possède cependant que quatre des treize résidus impliqués dans le positionnement et la liaison au substrat et quatre résidus sont remplacés par des acides aminés possédant des caractéristiques similaires. BdCOMT2 pourrait se lier au substrat ce qui en fait un candidat potentiel.

A l'inverse des autres protéines décrites plus haut, BdCOMT6 présente le site de dimérisation, les résidus impliqués dans la catalyse et les résidus où se positionne et se fixe le substrat ainsi que le motif de liaison au cofacteur SAM chez les COMT impliquées dans la lignification. La protéine BdCOMT6 constitue le meilleur candidat pour une COMT impliquée dans la biosynthèse des lignines.

A l'issue de ces premières analyses, BdCOMT4, BdCOMT5, BdCOMT7 et BdCOMT8 ont été éliminées. Les analyses suivantes ont été réalisées sur les candidats BdCOMT1, BdCOMT2, BdCOMT3 et BdCOMT6 qui possèdent une grande partie voire la totalité de ces critères.

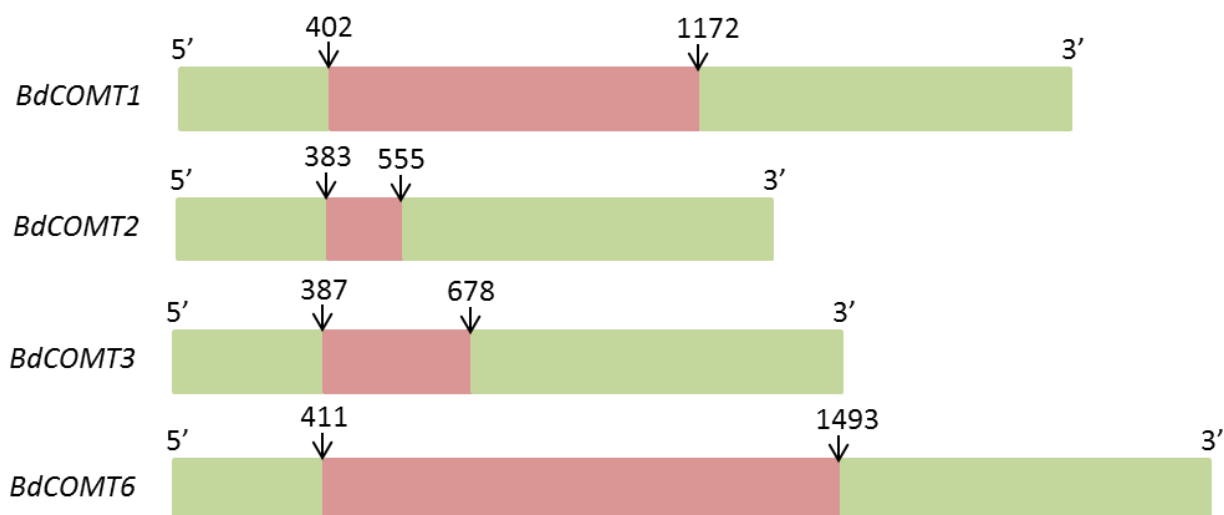


Figure 49 : Structure des ORF de *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3* et *BdCOMT6*.
Le nucléotide 1 correspond au A du codon d'initiation en 5', l'extrémité 3' correspond ici au codon stop. En vert sont représentés les exons et en rose les introns.

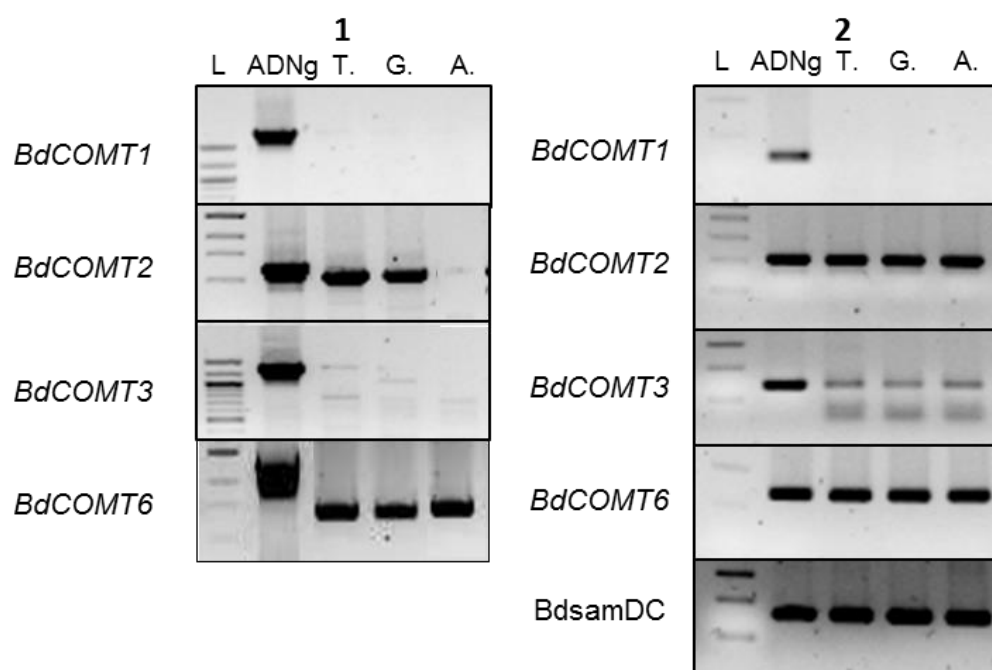


Figure 50 : Validation des ORF des gènes *COMT* et étude de leur expression dans la tige et le grain de Bd21-3.

Les PCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques pour chaque gène à partir d'ADNg, d'ADNc de tiges (60 JAG), de grains entiers et d'albumens décortiqués à 21 JAA. Le "gène de ménage" *BdSamDC* préconisé par Hong et al, 2008 et codant la S-adénosylméthionine décarboxylase a été utilisé comme contrôle pour la qualité de la RT-PCR. L=100 bp ladder, T=tige, G=grain, A=albumen. 1 : Amplification de l'ADNc pleine longueur ; 2 : Amplification d'un fragment de moins de 300 pb.

3.3. Structure des gènes et confirmation des séquences codantes

Nous nous concentrerons à présent sur les gènes *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3* et *BdCOMT6*.

Selon l'annotation structurale du génome disponible sur le site du *Brachypodium distachyon* Project (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium/searchjsp/index.jsp>), ces quatre gènes sont composés de deux exons séparés par un intron comme représenté en figure 49. Ce dernier est de taille variable, tandis que les parties codantes sont de longueurs proches (1074 paires de base pour *BdCOMT1*, de 1065 paires de bases pour *BdCOMT2*, de 1068 paires de bases pour *BdCOMT3* et de 1083 paires de bases pour *BdCOMT6*).

Une validation des séquences codantes a été réalisée par PCR et RT-PCR avec pour chacun des gènes, un couple d'amorces permettant l'amplification des séquences du cadre de lecture (ORF pour « Open Reading Frame »). L'amplification des ORF de *BdCOMT1*, *BdCOMT2*, *BdCOMT3* et *BdCOMT6* à partir de l'ADN génomique de *B. distachyon* (Bd21-3) a permis de confirmer la longueur des gènes (figure 50, partie 1) et leur séquençage a permis de confirmer les séquences prédites. L'amplification des ORF a été réalisée à partir des ADNc de tiges et de grains en développement (figure 50). Des produits d'amplification ont été obtenus à la taille attendue pour les ORF de *BdCOMT2* et de *BdCOMT6*. Nous n'avons cependant pas réussi à amplifier les ORF entières de *BdCOMT1* et de *BdCOMT3*. Les amorces ayant été validées par l'amplification de l'ADNg, il se pourrait que les gènes aient été mal annotés ou qu'ils ne s'expriment pas dans ces tissus aux stades étudiés.

3.4. Profil d'expression des gènes codant pour une COMT dans différents organes de *B. distachyon*

Dans le cadre de cette thèse, j'ai contribué à la génération de données issues d'hybridations sur puces Affymetrix, réalisées à partir de différents tissus de *B. distachyon* (génotype Bd21). Ceci s'inscrivait dans le cadre du projet KBBE CELL WALL. Ces puces Affymetrix ont été créées au laboratoire de Todd Mockler, à l'Université de l'Oregon. 2,55 millions de sondes couvrant l'ensemble des gènes, incluant les exons et les introns, et 3,95 millions de sondes ciblant des régions intergéniques sont présents sur la puce (<http://arrays.brachypodium.org/>).

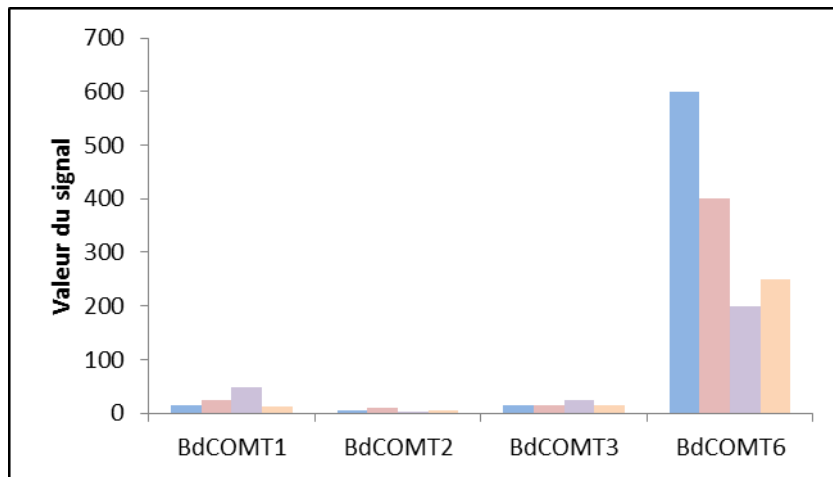


Figure 51 : Quantification de l'expression des gènes codant pour une COMT par hybridation sur puce Affymetrix dans les tiges et les grains de *B. distachyon* (Bd21).

Les données ont été obtenues à partir d'entrenœuds de tiges à 27 jours après germination (JAG) (en bleu), de nœuds de tiges à 27 JAG (en rose), de grains entiers à 11 jours après anthèse (JAA) (en violet) et d'albumens de grains décortiqués à 11 JAA (en orange).

Chaque exon et chaque intron est représenté par plusieurs sondes et 95% des exons et des introns sont ciblés par au moins cinq sondes. J'ai contribué à l'analyse en extrayant les ARN de grains entiers et d'albumens disséqués du génotype Bd21 sur les trois stades choisis (11 JAA, 21 JAA et 31 JAA), ces ARN ont ensuite été utilisés pour les hybridations sur puces Affymetrix. Les données sont disponibles sur la plateforme PlaNet (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/>).

Les résultats d'hybridation sur puce Affymetrix sont présentés en figure 5. Ils montrent que le gène *BdCOMT6* est le plus exprimé des candidats *COMT* dans tous les tissus analysés. Les transcrits des gènes *BdCOMT1*, *BdCOMT2* et *BdCOMT3* sont également détectés mais ils sont moins exprimés dans les entrenœuds et les nœuds que *BdCOMT6* à 27 JAG. Dans les grains et dans les albumens décortiqués à 11 JAA, correspondant à la phase de croissance du grain, *BdCOMT6* est également le plus exprimé.

Des RT-PCR ont été réalisées à partir de tiges à 60 JAG, de grains entiers et d'albumens de grains décortiqués en cours de remplissage prélevés à 21 JAA. Les résultats disponibles en figure 50 suggèrent que le gène *BdCOMT1* n'est pas exprimé dans les tissus analysés et que le gène *BdCOMT3* y est exprimé très faiblement. Les gènes *BdCOMT2* et *BdCOMT6* sont exprimés dans les tiges, les grains entiers et les albumens décortiqués.

L'expression de plusieurs gènes *COMT* cités plus haut a été caractérisée. *BdCOMT2* et *BdCOMT6* sont exprimés fortement dans les tissus lignifiés tels que la tige. Ils semblent être de bons candidats pour l'identification de la *COMT* impliquée dans la biosynthèse des lignines. Ces résultats, couplés aux analyses phylogénétiques précédentes, corroborent le choix de *BdCOMT6* comme choix final, la protéine issue de ce gène étant la plus proche des *COMT* de fétuque (*FaCOMT*), de *Lolium perenne* (*LpCOMT*), de maïs (*ZmCOMT*), de panic (*PvCOMT*) et de sorgho (*SbCOMT*) impliquées dans la voie de biosynthèse des lignines. La présence non négligeable de transcrits *BdCOMT6* dans l'albumen décortiqué, un tissu où les lignines ne sont présentes qu'à l'état de trace selon nos résultats (voir chapitre 2), suggère un rôle supplémentaire non affilié aux lignines.

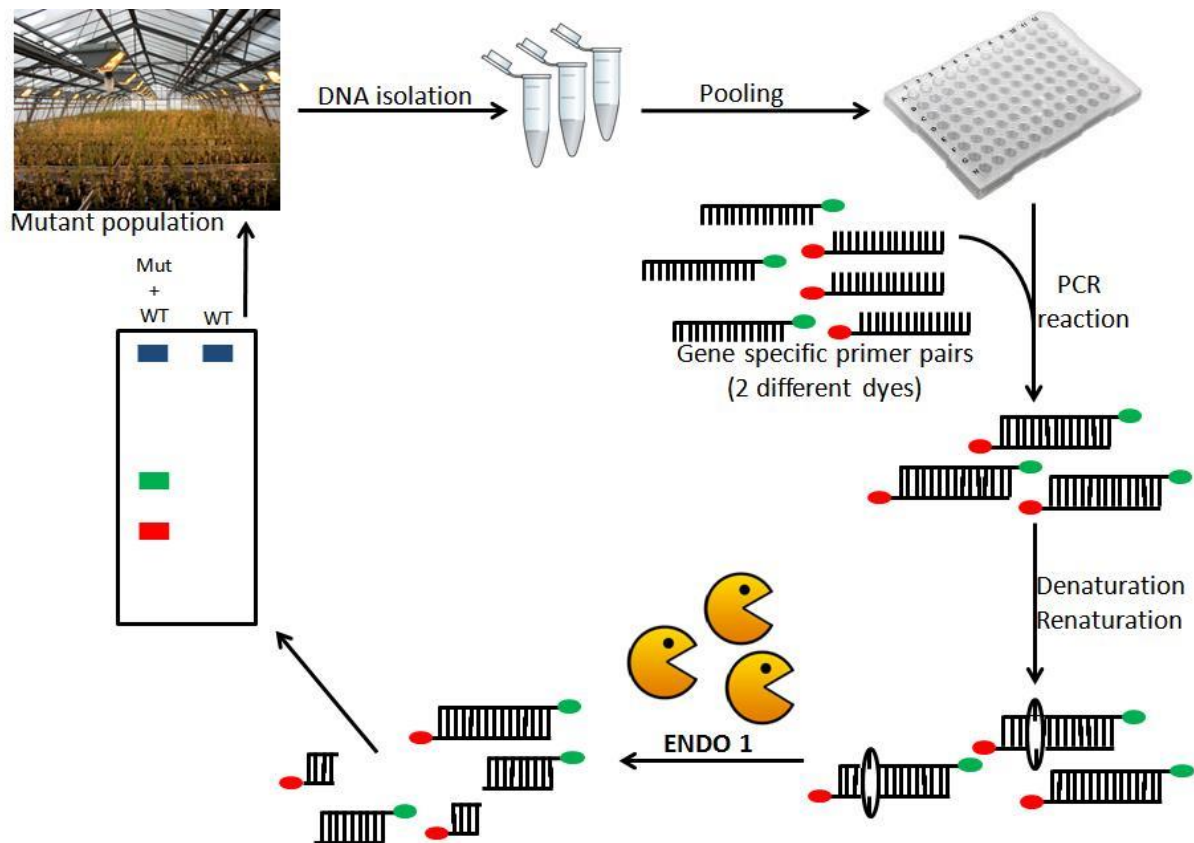


Figure 52 : Schéma représentant les différentes étapes du TILLING.

La méthode consiste à isoler l'ADN des plantes de chaque famille de mutants (correspondant à chaque grain initialement mutagénéisé) de la banque criblée puis à effectuer une PCR en utilisant des couples d'amorces spécifiques au gène d'intérêt fusionné à un chromophore différent en 3' et en 5'. Les produits PCR sont ensuite dénaturés et renaturés. Après renaturation de l'ADN, les mutations forment des mésappariements de nucléotides. Une enzyme de restriction, l'endonuclease I, est capable de reconnaître ces mésappariements et de couper l'ADN double brin au niveau de ces points. Après une électrophorèse en gel de polyacrylamide, la présence de deux bandes aux couleurs de chacun des chromophores indiquera qu'il y a eu clivage et donc la présence d'une mutation dans le gène d'intérêt. Lors des premiers criblages, un regroupement de 4 plantes issues de la même famille est réalisé afin d'augmenter les chances de détecter des mutants.

3.5. La méthode du « Targeted Induced Local Lesions in Genomes », ou TILLING, appliquée à *B. distachyon*

Depuis quelques années, le Centre de Ressources Biologiques de *B. distachyon* de l'Institut Jean-Pierre Bourgin de Versailles (http://www6.versailles-grignon.inra.fr/ijpb-brachypodium_eng/) possède une collection de mutants de *B. distachyon* générés par mutagenèse à l'azoture de sodium. La collection de mutants a été créée à partir de 25000 graines permettant la sélection de 5638 lignées de première génération (M1). Le taux de mutation a été estimé à 1/400 kb soit environ 680 mutations par lignée pour un génome de 272 Mb (Dalmais et al. 2013). La mutagenèse à l'azoture de sodium provoque principalement des substitutions de bases nucléiques de type EMS. C'est à dire que les bases guanines (G) sont substituées par des adénines (A) et les cytosines (C) par des thymines (T) mais il existe d'autres modifications (Dalmais et al, 2013). La redondance du code génétique sur la troisième base des codons entraîne le fait que 1/3 de ces mutations sont silencieuses.

La banque de mutants de Versailles a été criblée par TILLING à l'URGV d'Evry (plateforme BrachyTIL, Unité de Recherche en Génomique Végétale) afin de trouver des plantes mutantes pour le gène candidat *BdCOMT6*. La méthode employée a été publiée en 2013 (Dalmais et al, 2013). Cette méthode est résumée dans la figure 52.

Quinze familles de mutants ont été identifiées pour *BdCOMT6* (tableau 20). Pour chacune de ces familles un score SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://blocks.fhere.org/sift/SIFT.html>) a été déterminé. Ce score permet de pronostiquer l'effet de la mutation sur l'activité de la protéine (Ng and Henikoff, 2006). C'est à dire qu'il permet de prédire l'impact de la substitution d'un acide aminé dans la protéine en tenant en compte de la conservation des résidus et leurs propriétés dans les alignements de séquences similaires identifiées par PSI-BLAST (Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool). Plus ce score est proche de zéro, plus l'effet de la mutation risque d'être important.

Les plantes filles issues de la plante détectée comme positive pour une mutation dans le gène d'intérêt sont ensuite génotypées par séquençage de produits PCR. Pour cela, des germinations de vingt plantes par lignées ont été réalisées en serre.

Tableau 20 : Mutants TILLING du gène *BdCOMT6*.

Famille	Position de la mutation dans l'ADNc	Position de la mutation protéine	Score SIFT
3904	C629A	A210D	0,01
211	G638A	G213D	0,02
3380	G638A	G213D	0,02
4142	G976A	E326K	0,12
4688	G721A	G241R	0,24
4604	G737A	G246D	1,00
7480	G737A	G246D	1,00
4927	G1063A	A355T	0,03
5139	G767A	G256D	0,00
7549	G767A	G256D	0,00
6840	G616A	G206S	0,76
7391	C854T	P285L	0,03
5645	G37A	D13N	0,00
185	G1071A	E357E	-
5200	G1013A	G338D	0,00

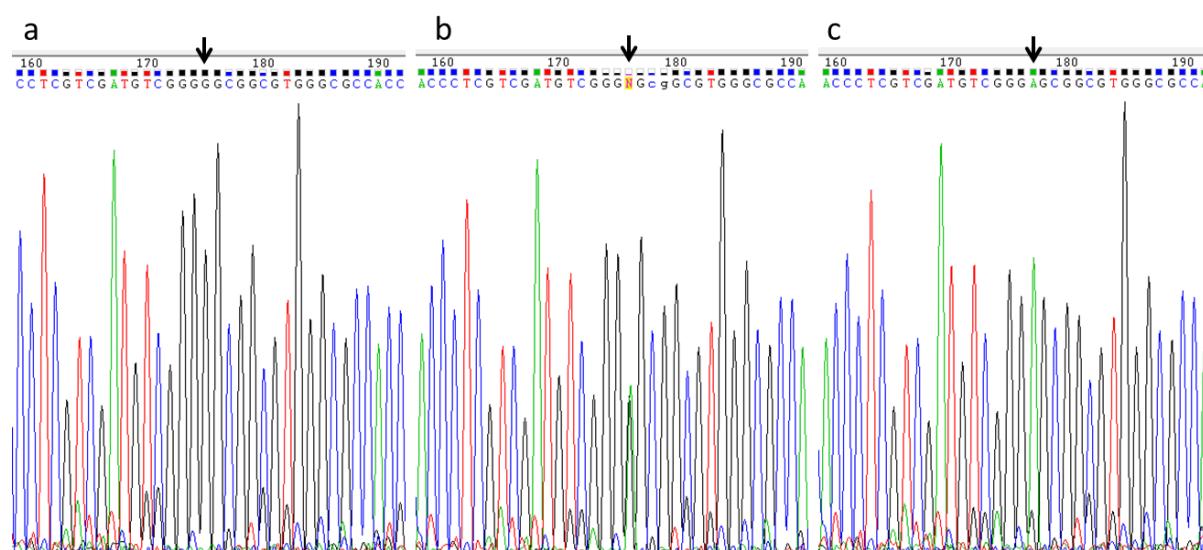


Figure 53: Chromatogrammes de séquençage de produits de PCR pour le génotypage de la lignée 6840.

a : azygote, b : hétérozygote et c : homozygote pour la mutation d'intérêt.

Trois à quatre semaines après la germination, des feuilles de chaque plante sont prélevées afin d'en extraire l'ADNg. Des PCR sont alors réalisées avant de séquencer les amplicons.

Trois types de résultats sont alors obtenus (figure 53).

- 1- La plante génotypée est de type sauvage pour la mutation d'intérêt, cette plante est appelée azygote et non sauvage car elle possède un fond génétique muté (figure 53, chromatogramme a)
- 2- La plante génotypée possède un allèle sauvage et un allèle muté pour le gène d'intérêt, la plante est appelée hétérozygote. Deux pics sont alors observés sur les chromatogrammes des séquençages de produits de PCR de ce type de plante (figure 53, chromatogramme b).
- 3- La plante génotypée est mutante pour les deux copies du gène d'intérêt, la plante est appelée homozygote mutante (figure 53, chromatogramme c).

Les plantes sur lesquelles l'ADN utilisé pour le TILLING ayant été cultivées en « bulk », il est relativement plus fréquent d'obtenir des plantes hétérozygotes mutantes plutôt que des plantes homozygotes avant la génération M3. Dans ce cas, une quatrième génération est génotypée.

Lorsque parmi les vingt plantes initiales, seules des azygotes sont obtenues, une nouvelle culture d'une vingtaine de plantes M2 est réalisée.

J'ai réalisé ce travail avec l'aide de Sébastien Antelme pour les 15 lignées jusqu'à obtention d'individus homozygotes (tableau 21).

Il est à noter que les mutants identifiés n'ont pas été « backcrossés » pour éliminer les autres mutations.

Parmi ces lignées, seules deux familles (185 et 7480) n'ont pas été étudiées en détails. La famille 185 possède une mutation silencieuse dans le gène étudié (tableau 20).

Tableau 21 : Récapitulatif des plantes homozygotes trouvées pour chaque lignée mutée.

Famille	Homozygotes détectés	Remarques
211	211.2.14.8	M4
3380	3380.10.4 3380.10.3 3380.10.2	M3
4142	4142.p.1 4142.p.6 4142.p.7 4142.p.9	M3
4688	4688.2.1 4688.2.4	M3
4604	4604.32	M2
7480	-	Hétérozygote détecté (7480.21)
4927	4927.10.3	M3
5139	5139.5	M2
7549	7549.9.1	M3
6840	6840.19.9 6840.19.12	M3
7391	7391.54 7391.61	M2
5645	5645.1	M2
185	185.1.19	M3
5200	5200.47	M2

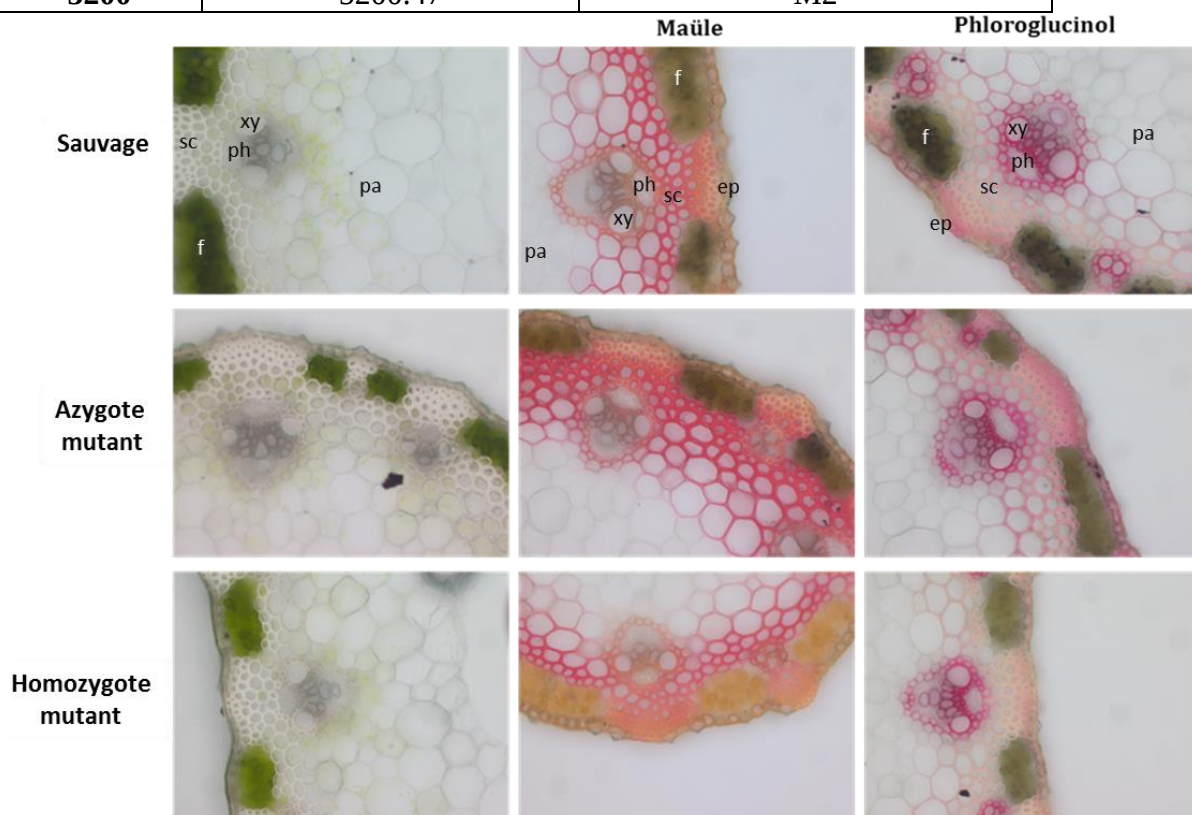


Figure 54 : Coupes transversales de tiges de plantes Bd21-3 sauvage, du mutant homozygote et azygote colorées au Maïle et au phloroglucinol-HCl.

ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme.

Il n'a pas été possible de trouver de plante homozygote pour la lignée 7480. En effet, après avoir détecté une plante hétérozygote, des germinations ont été effectuées. La nouvelle génération semée a montré un arrêt de croissance une semaine après la germination. Après plusieurs essais infructueux, la décision a été prise de ne plus étudier cette famille. Les mutants à l'azoture de sodium possédant plusieurs autres mutations dans leur génome, il est possible qu'une mutation ait eu lieu dans un gène essentiel à la germination et à la croissance des plantules. Cette mutation serait parvenue à l'état d'homozygote provoquant le phénotype observé.

3.6. Analyse des mutants identifiés par TILLING

La plupart des mutants TILLING du gène *BdCOMT6* ne montrent pas de phénotype visible. En particulier, contrairement aux mutants COMT de maïs (*bm3*) ou de sorgho (*bmr12*) les mutants de *B. distachyon* identifiés ici ne présentent pas le phénotype *brown midrib* associé à une déficience d'activité COMT. Nous avons donc effectué une caractérisation pariétale des mutants en nous basant sur l'impact possible des mutations sur l'activité enzymatique, selon les prédictions SIFT. Des méthodes histologiques et chimiques ont été utilisées.

3.6.1. Analyse histochimique des mutants par colorations Maïle et phloroglucinol-HCl

Les tiges de *B. distachyon* se lignifient plus intensément au moment de l'épiaison (Wang et al, 2015). Les tiges matures des homozygotes mutants identifiés, des sauvages et des azygotes correspondants ont été prélevées à ce stade, soit environ 60 jours après la germination, au niveau du second entrenœud. Les prélèvements sont coupés et colorés par la méthode de Wiesner (phloroglucinol-HCl) et par celle de Maïle. La coloration de Maïle permet de colorer en rouge les unités S des lignines et en jaune orangé les unités G des lignines (Chapple et al, 1992). Le phloroglucinol, en présence d'alcool et de chlorure d'hydrogène, colore les groupes *p*-hydroxycinnamaldehydes terminaux des lignines natives en rouge violacé (Pomar et al, 2002).

Les analyses réalisées ont montré peu d'effet sur l'intensité des colorations entre les sauvages et les homozygotes mutants. Par exemple, chez l'homozygote mutant 5139, il est observé une très légère diminution de l'intensité de la coloration rose avec le Maïle par rapport au sauvage et à l'azygote (figure 54, Maïle).

Tableau 22 : Teneur en lignine Klason mesurée sur les tiges des mutants *BdCOMT6* et de leurs témoins sauvages. ND non disponible (les homozygotes n'ont pas été obtenus pour cette expérience). Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0.05^\bullet$.

Famille	% Lignine KLASON
sauvage	17,82 $\pm$ 0,77
3380	18,73 $\pm$ 0,12
sauvage	15,14 $\pm$ 1,44
4142	14,57 $\pm$ 0,86
Sauvage	17,70 $\pm$ 0,51
4688	17,35 $\pm$ 0,08
Sauvage	16,89 $\pm$ 0,56
4604	16,74 $\pm$ 0,73
Sauvage	16,89 $\pm$ 0,46
6840	16,86 $\pm$ 0,02
Sauvage	18,75 $\pm$ 0,13 $^\bullet$
5139	16,4 $\pm$ 0,29 $^\bullet$
Sauvage	17,32 $\pm$ 0,61
7549	19,11 $\pm$ 0,95
Sauvage	15,39 $\pm$ 0,76
5200	17,87 $\pm$ 1,13

Une légère diminution de coloration au phloroglucinol-HCl est également observée chez la plante homozygote mutante par rapport au sauvage et à l'azygote (figure 54, phloroglucinol).

Les différences observées étant très faibles, l'analyse chimique des tiges obtenues après séchage des plantes s'est avérée nécessaire pour caractériser les mutants.

3.6.2 Analyses chimiques des mutants

Ces expériences ont été réalisées grâce à l'expertise du professeur Catherine Lapierre et de Frédéric Légée (INRA de Versailles). Les analyses des tiges ont été réalisées sur la majorité des familles étudiées, puis nous nous sommes concentrés sur les lignées les plus impactées par la mutation étudiée.

3.6.2.1. Analyse de la composition en lignines des tiges des mutants par Lignine Klason

La quantité de lignines a été mesurée par la méthode des « lignines Klason » dans les tiges des lignées mutantes et sauvages ayant poussé dans les mêmes conditions.

Les lignées 3380, 4688, 6840, 4142, 7549, 4604 et 5200, ont une teneur en lignines proche de celle des témoins (tableau 22). En revanche, le mutant 5139 possède moins de lignines que les individus sauvages. Une diminution d'environ 13% est observée (tableau 22).

Pour certaines lignées de mutants (4604, 5200 et 6840), les analyses n'ont été réalisées que sur une à deux plantes. Certains résultats sont donc à considérer avec précaution.

3.6.2.2. Distribution des monomères de lignines dans les tiges des mutants libérés par thioacidolyse

Comme évoqué dans le chapitre précédent, la structure des lignines a été évaluée par la libération de monomères par thioacidolyse des tiges. La méthode de thioacidolyse permet de libérer les monolignols liés en β -O-4. Chez les sauvages, les tiges possèdent environ 4% de monomères H, 32% de monomères G et 65% de monomères S liés en Beta-O-4. Des traces de résidus 5-OHG sont mesurées (environ 0,2%). Le ratio S/G calculé est proche de 2.

Tableau 23 : Résultats de thioacidolyse réalisée sur les tiges des mutants de BdCOMT6 et de leurs contrôles sauvages. Différence significative pour $p=0,01^*$.

Famille	S/G	%H	%G	%S	%5-OHG
sauvage	2,13 ± 0,25	3,47 ± 0,33	30,88 ± 2,36	65,65 ± 2,67	0,31 ± 0,07
3380	2,23 ± 0,15	3,41 ± 0,15	29,90 ± 1,40	66,69 ± 1,48	0,38 ± 0,07
sauvage	1,80 ± 0,01	5,24 ± 0,02	33,80 ± 0,07	60,96 ± 0,05	0,44 ± 0,02
4142	0,99 ± 0,14	6,28 ± 0,47	46,31 ± 3,09	46,41 ± 3,56	1,99 ± 0,28
sauvage	2,03 ± 0,10	3,46 ± 0,65	31,88 ± 0,84	64,66 ± 1,49	0,55 ± 0,21
4688	1,84 ± 0,02	3,77 ± 0,12	33,88 ± 0,18	62,34 ± 0,30	0,50 ± 0,00
sauvage	1,83 ± 0,11	3,60 ± 0,44	34,07 ± 1,21	62,20 ± 1,48	0,11 ± 0,01
4604	1,49 ± 0,11	3,55 ± 0,07	38,80 ± 1,70	57,70 ± 1,70	0,78 ± 0,05
sauvage	1,83 ± 0,11	3,60 ± 0,44	34,07 ± 1,21	62,20 ± 1,48	0,11 ± 0,01
6840	1,97 ± 0,14	3,75 ± 0,35	32,40 ± 1,41	63,70 ± 1,84	0,14 ± 0,01
sauvage	2,03 ± 0,10	3,46 ± 0,65	31,88 ± 0,84	64,66 ± 1,49	0,55 ± 0,21
4927	1,88 ± 0,01	3,04 ± 0,08	33,67 ± 0,10	63,29 ± 0,18	0,50 ± 0,00
sauvage	1,97 ± 0,18 *	3,60 ± 0,92	32,49 ± 1,62 *	63,91 ± 2,53 *	0,30 ± 0,14 *
5139	1,20 ± 0,03 *	4,48 ± 0,62	43,51 ± 0,49 *	52,00 ± 0,91 *	5,27 ± 0,50 *
sauvage	2,03 ± 0,10 *	3,46 ± 0,65	31,88 ± 0,84 *	64,66 ± 1,49 *	0,55 ± 0,21 *
7549	1,24 ± 0,01 *	3,98 ± 0,13	42,95 ± 0,34 *	53,07 ± 0,21 *	6,3 ± 0,85 *
sauvage	2,01 ± 0,07	3,50 ± 0,20	31,90 ± 0,60	64,20 ± 0,70	0,40 ± 0,10
7391	1,95 ± 0,02	3,70 ± 0,30	32,50 ± 0,10	63,50 ± 0,40	0,30 ± 0,10
sauvage	2,77 ± 0,19	2,50 ± 0,10	26,00 ± 1,20	71,30 ± 1,40	0,30 ± 0,10
5645	2,53 ± 0,06	3,00 ± 0,10	27,40 ± 0,30	69,50 ± 0,30	0,30 ± 0,10
sauvage	1,71 ± 0,12	3,70 ± 0,20	35,53 ± 1,50	60,63 ± 1,62	0,12 ± 0,01
5200	1,89 ± 0,07	2,87 ± 0,15	33,57 ± 0,76	63,50 ± 0,66	0,09 ± 0,00

Les familles 3380, 4688, 6840, 4927, 7391, 5645 et 5200 ont des distributions en monomères de lignines proches des témoins (tableau 23). Leur ratio S/G est supérieur à 1,8. Les mutations de *BdCOMT6* chez ces lignées ne semblent pas avoir d'effet sur la composition de ces mutants en lignines. Bien que certaines lignées aient un « score SIFT » bas (5645 et 5200 par exemple ont un « score SIFT » égal à zéro), elles ne sont pas affectées dans leur composition en lignines. Le « score SIFT » est donc un outil de prédiction qui doit être utilisé avec précaution.

Les familles 4142, 4604, 5139 et 7549 ont une répartition en monomères de lignines différentes de leurs sauvages associés (tableau 23). Les mutants 4604 montrent une diminution de la teneur en monomères S et une augmentation de la teneur en monomère G de leurs lignines se traduisant par une diminution de leur ratio S/G à 1,49 (contre 1,83 chez le sauvage). De plus, une augmentation de résidus 5-OHG qui sont formés par l'accumulation de 5-hydroxyconiferyl alcool (le substrat de la COMT) est observée chez le mutant 4604 (0,77% chez les mutants vs 0,11% chez les sauvages). Les mutants 5139, 7549 et 4142 présentent le même type de résultats mais de façon plus marquée. Ceci se traduit par un ratio S/G fortement diminué (1,19 pour 5139, 1,24 pour 7549 et 0,99 pour 4142). Ces mutants accumulent également plus de résidus 5-OHG (3% pour 5139, 6% pour 7549 et 2% pour 4142).

Ces résultats sont en accord avec les analyses d'autres mutants *COMT* disponibles dans la littérature. Chez le maïs *bm3* et le sorgho *bmr12*, il est également observé une diminution du ratio S/G et une accumulation des résidus 5-OHG dans les parois (Vignols et al, 1995 ; Piquemal et al, 2002 ; Bout & Vermerris, 2003).

Les effets majeurs observés sont la diminution de la teneur des lignines en monomères S et une augmentation de la présence des résidus 5-OHG dans les parois des tiges des mutants 5139, 7549 et 4142. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés auparavant sur les mutants *COMT* de maïs ou de sorgho (Vignols et al, 1995 ; Piquemal et al, 2002 ; Bout & Vermerris, 2003).

3.6.2.3.. Dosage des acides hydroxycinnamiques dans les tiges des mutants

Pour les mutants 5139 et 7549, l'hydrolyse alcaline douce libère une quantité d'pAC significativement inférieure à celle libérée chez leurs témoins (tableau 24).

Tableau 24 : Teneurs en acides férulique et *p*-coumarique mesurées sur les tiges des mutants BdCOMT6 et de leurs contrôles sauvages par HPLC après hydrolyse alcaline douce. Résultats exprimés en mg/g de RP. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0.05^\square$.

Famille	pAC	AF
sauvage	$9,33 \pm 0,29$	$3,98 \pm 0,18$
4142	$7,57 \pm 0,37$	$3,03 \pm 0,09$
sauvage	$8,09 \pm 0,05$	$5,08 \pm 0,02$
4688	$7,30 \pm 0,50$	$5,09 \pm 0,24$
sauvage	$7,65 \pm 0,18$	$4,79 \pm 0,13$
4604	$7,65 \pm 0,40$	$4,97 \pm 0,33$
sauvage	$8,09 \pm 0,05$	$5,08 \pm 0,02$
4927	$7,02 \pm 0,11$	$4,43 \pm 0,07$
sauvage	$9,03 \pm 0,99^\square$	$4,22 \pm 0,29$
5139	$7,07 \pm 0,36^\square$	$4,74 \pm 0,61$
sauvage	$8,09 \pm 0,05^*$	$5,08 \pm 0,02$
7549	$5,93 \pm 0,06^*$	$4,48 \pm 0,08$
sauvage	$7,65 \pm 0,18$	$4,79 \pm 0,13$
6840	$7,62 \pm 0,36$	$5,34 \pm 0,30$
sauvage	$7,47 \pm 0,28$	$4,96 \pm 0,00$
5200	$8,38 \pm 0,74$	$5,40 \pm 0,42$

Tableau 25 : Dosage d'acides férulique et *p*-coumarique libérés après thioacidolyse et mesurés par GC-SM.

Résultats exprimés en mg/g de RP.

Famille	pAC	AF
Sauvage	$6,33 \pm 0,22$	$9,09 \pm 0,82$
3380	$6,46 \pm 0,29$	$9,17 \pm 0,31$
Sauvage	$7,90 \pm 1,10$	$7,74 \pm 1,00$
4688	$7,10 \pm 0,24$	$9,57 \pm 0,59$
Sauvage	$6,33 \pm 0,22$	$9,09 \pm 0,82$
4604	$6,32 \pm 0,14$	$8,48 \pm 0,05$
Sauvage	$6,33 \pm 0,22$	$9,09 \pm 0,82$
5139	$5,09 \pm 0,06$	$7,92 \pm 0,28$
Sauvage	$6,96 \pm 0,48$	$7,36 \pm 0,62$
6840	$7,23 \pm 0,13$	$8,09 \pm 0,36$
Sauvage	$7,33 \pm 0,64$	$7,95 \pm 0,55$
5200	$8,36 \pm 0,31$	$8,87 \pm 0,84$

Pour la lignée 5139, cette diminution est de l'ordre de 21% et pour la lignée 7549, elle est de l'ordre de 27% (différence significative).

Cette diminution pourrait provenir de la diminution de la quantité de lignines mesurée chez ces mutants, puisque l'pAC est lié aux unités S et pour le mutant 5139, la teneur en lignines est diminuée d'environ 13%. Aucune modification significative de la quantité d'AF libérée par hydrolyse alcaline n'est observée.

Nous avons observé que la thioacidolyse libère également moins d'pAC (une diminution de 20% ; tableau 25) pour la lignée 5139, renforçant l'hypothèse précédente.

La lignée 4142 montre une diminution de sa teneur en AF libérée par hydrolyse alcaline douce par rapport au sauvage. Ce résultat est cependant similaire si on le compare avec celui obtenu pour les plantes azygotes contrôles 4142 (pAC libéré en hydrolyse alcaline douce : $9.97 \pm 0,32$; AF libéré en hydrolyse alcaline douce : $3,40 \pm 0,99$).

Quatre lignées se dégagent de ces analyses : les lignées 4142, 4604, 5139 et 7549. La lignée 5139 possède 13% de lignines en moins par rapport aux individus sauvages, une modification de la structure et de la composition en monomères de lignines. Elle possède 23% de monomères G en plus et 21% de monomères S en moins liés en beta-O-4 par rapport aux sauvages. Elle accumule des résidus 5-OHG (augmentation de 90% par rapport aux individus sauvages). Enfin, sa teneur en pAC est affectée. La lignée 5139 présente les effets les plus importants induits par la mutation dans le gène *BdCOMT6*. Nous avons donc choisi de l'étudier plus en détail.

3.7. Etude approfondie de la lignée 5139

La lignée 5139 montre un phénotype pariétal lié à une déficience en activité COMT typique mais comme les autres familles identifiées par TILLING, elle ne montre pas d'effet visible sur le développement de la plante (figure 55). La mesure de la biomasse des tiges de plantes sauvages et de mutants issus de la lignée 5139 montre une légère diminution (figure 55).

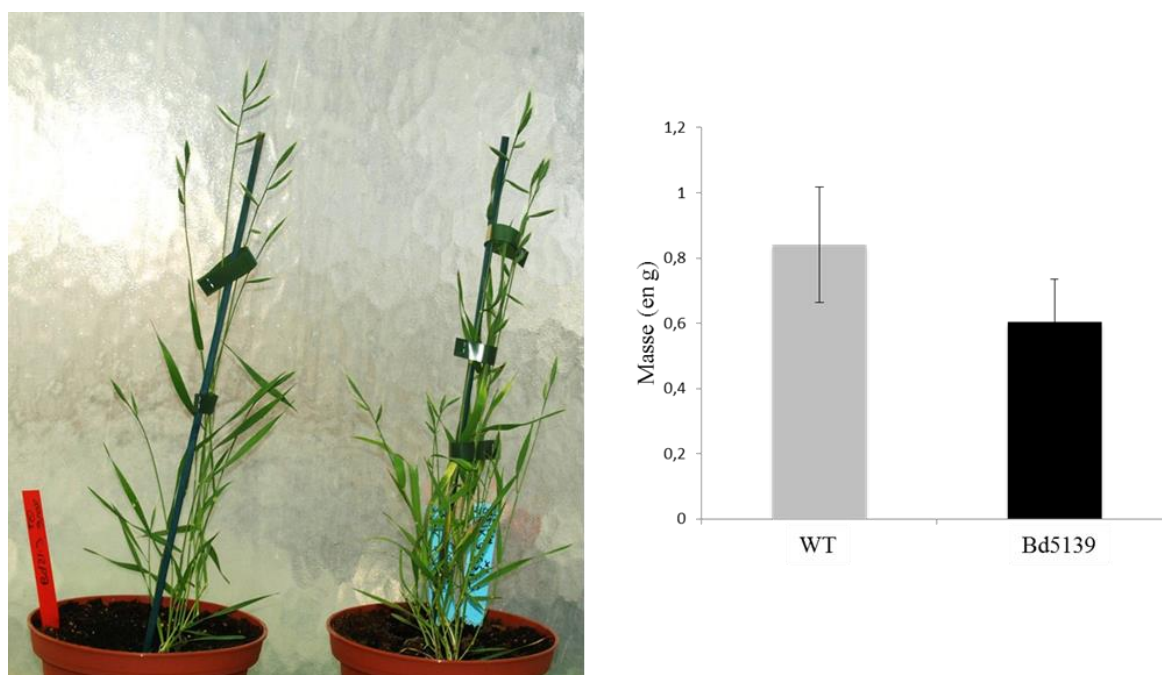


Figure 55 : Comparaison du phénotype de Bd21-3 sauvage au mutant homozygote 5139. Photographie de Bd21-3 sauvage et mutant 5139 au stade floraison. Comparaison de la biomasse entre 8 plantes Bd21-3 sauvage (WT) et 8 plantes Bd5139 cultivées en même temps en chambre de culture. Les grains et les feuilles ont été retirés de plantes sèches récoltées et les tiges ont été pesées.

Tableau 26 : Composition des résidus pariétaux des grains secs et des tiges de sauvage et du mutant 5139 obtenue après pyrolyse analytique couplée à une CPG-SM. Les valeurs représentent la surface relative des pics. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0.05^*$.

Organes	4-vinyl phenol	4-vinyl guaiacol	Autres monomères G	Monomères S	S/G (avec vinyl guaiacol	S/G (sans vinyl guaiacol
Grains entiers sauvages	22,60* ±0,60	53,20* ±0,20	10,30 ±0,70	13,90▪ ±0,10	0,22* ±0,00	1,36* ±0,09
Grains entiers 5139	16,20* ±1,40	64,50* ±1,90	12,20 ±1,00	7,10▪ ±0,40	0,09* ±0,05	0,58* ±0,08
Tiges sauvages	30,30 ±2,46	28,43▪ ±0,90	33,27* ±1,68	24,85▪ ±1,38	0,55* ±0,03	1,52* ±0,15
Tiges 5139	27,18 ±1,21	33,58▪ ±0,19	21,72* ±1,37	17,55▪ ±1,31	0,32* ±0,02	0,81* ±0,08

3.7.1. Analyse de la composition des résidus pariétaux des tiges et des grains secs en lignines et dérivés

Des pyrolyses analytiques ont été réalisées sur les résidus pariétaux de grains secs et de tiges du sauvage et de l'homozygote mutant pour la lignée 5139 uniquement (tableau 26). La quantité d'unités S libérée par l'homozygote mutant 5139 est inférieure à celle libérée par le sauvage confirmant les résultats obtenus par thioacidolyses sur les tiges. Un résultat comparable a été obtenu pour les grains. Le vinylphénol et le vinylguaiacol sont obtenus après décarboxylation de l'pAC et de l'AF dans le processus de pyrolyse (Ralph et Hatfield, 1991). De plus, les monomères G pyrolysés peuvent également aboutir à la formation de 4-vinylguaiacol. Il convient donc de calculer un ratio S/G avec et sans le vinylguaiacol.

Les pyrolyses analytiques permettent de calculer un ratio S/G. Celui-ci est, comme attendu, moins élevé dans les grains du mutant 5139 que dans les grains du sauvage, en tenant compte ou non du vinylguaiacol. Le même résultat est obtenu pour les grains secs et les tiges.

Cette méthode ne permet pas de détecter les résidus 5-OHG en raison de leur fragilité. Cependant, la thioacidolyse a permis de détecter des résidus 5-OHG dans les parois des tiges, et des grains du mutant 5139 (tableau 27). La quantité de résidus 5-OHG, marqueurs d'un défaut d'activité COMT, libérés par thioacidolyse pour le grain de 5139 est plus importante que pour les tiges (tableau 27).

Le rendement de thioacidolyse ramené à la quantité de lignines est plus faible pour le mutant 5139 que pour le sauvage, ce qui dénote d'une fréquence plus importante de liaisons résistantes condensées dans le mutant. Une diminution de la teneur en lignines et une diminution de la quantité d'unités S de lignines est observée dans les deux organes, tiges et grains, analysés chez le mutant 5139.

Des résultats similaires ont déjà été obtenus lors de l'analyse de mutants COMT chez le maïs, le sorgho, le peuplier, le tabac et la plante modèle *A. thaliana* (Lapierre et al, 1998 ; Jouanin et al, 2000 ; Pinçon et al, 2001 ; Goujon et al, 2003 ; Barrière et al, 2004 ; Palmer et al, 2008). L'observation d'effets comparables sur le grain et notamment l'observation d'accumulation de résidus 5-OHG est cependant une nouveauté.

Tableau 27 : Etude de la teneur et de la composition des lignines des tiges et des grains du mutant 5139 et de plantes sauvages par Lignine Klason et bromure d'acétyle, suivie d'une thioacidolyse. LK : lignine Klason ; ABL : lignine au bromure d'acétyle. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0,05^*$.

Echantillons analysés	% LK	Rendement thioacidolyse ($\mu\text{mol/g}$ de LK)	%H	%G	%S	%5-OHG
Tiges sauvages	19,57 ▪ $\pm 0,30$	1258 * ± 30	3,1 $\pm 0,2$	29,3 * $\pm 1,2$	66,9 * $\pm 1,1$	0,8 * $\pm 0,0$
Tiges 5139	17,66 ▪ $\pm 0,93$	888 * ± 31	2,9 $\pm 0,2$	36,4 * $\pm 1,2$	55,6 * $\pm 1,5$	5,1 * $\pm 0,4$
Echantillons analysés	% ABL	Rendement thioacidolyse ($\mu\text{mol/g}$ de ABL)	%H	%G	%S	%5-OHG
Grains entiers sauvages	4,40 $\pm 0,17$	239 * $\pm 0,02$	5,7 $\pm 0,4$	37,2 $\pm 0,2$	57,0 * $\pm 0,1$	Traces *
Grains entiers 5139	3,82 $\pm 0,20$	155 * ± 5	6,3 $\pm 0,4$	38,1 $\pm 0,2$	41,7 * $\pm 1,0$	13,9 * $\pm 0,8$

Tableau 28 : Composition des résidus pariétaux des grains secs et de tiges de plantes sauvages, de mutants 5139 et de mutants 7549 obtenue par hydrolyse alcaline couplée à une HPLC. Les valeurs sont en mg/g de MIA pour les grains et en mg/g de RP pour les tiges. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0,05^*$.

Organes	pAC	AF	Acide sinapique	Vanilline
Grains entiers sauvages	1,109▪ $\pm 0,083$	2,145▪ $\pm 0,042$	0,116 $\pm 0,014$	0,071 $\pm 0,016$
Grains entiers 5139	0,544▪ $\pm 0,009$	1,706▪ $\pm 0,038$	0,119 $\pm 0,004$	0,045 $\pm 0,003$
Tiges sauvages	9,03▪ $\pm 0,99$	4,22 $\pm 0,29$	-	-
Tiges 5139	7,07▪ $\pm 0,36$	4,74 $\pm 0,61$	-	-

3.7.2. Analyse de la composition en acides hydroxycinnamiques des résidus pariétaux de tiges et de grains

Comme montré précédemment dans le tableau 25, l'hydrolyse alcaline des résidus pariétaux des tiges des mutants 5139 libère une quantité moindre d'pAC par rapport au sauvage. Cette diminution est de 20 %. Aucun effet n'est observé concernant l'AF chez le mutant 5139.

L'hydrolyse alcaline réalisée sur les résidus pariétaux des grains secs montre que le mutant 5139 présente par rapport au sauvage une diminution des teneurs en acides hydroxycinnamiques, d'environ 50% pour l'pAC et d'environ 20% pour l'AF (tableau 28). Une quantité moindre de vanilline est détectée pour le mutant 5139 que pour le sauvage, ce qui semble logique car la vanilline est issue de l'hydrolyse des lignines et le mutant 5139 est moins lignifié que le contrôle, bien que la teneur en monomères G de ses lignines est supérieure à celle du contrôle.

L'acidolyse douce permet d'hydrolyser l'arabinose des arabinoxyanes tout en préservant la liaison ester avec l'pAC ou l'AF. Cette approche montre (tableau 29) que la quantité d'pAC liée à l'arabinose dans les tiges et les grains du mutant 5139 est proche de celle du sauvage. La diminution de la quantité d'pAC observée par hydrolyse alcaline est donc bien due à la diminution de l'pAC lié aux lignines. Les taux d'AF liés aux arabinoses sont également identiques pour le mutant et le sauvage.

Ainsi, d'après ces analyses, le taux d'pAC lié aux lignines est affecté directement en raison de la diminution de la teneur en unité S de lignines. Il n'y a pas d'impact significatif sur la teneur en AF. Des résultats similaires sont observés chez le mutant COMT de maïs *bm3* et celui du sorgho *bmr12*.

3.7.3. Analyse de la composition en polysaccharides des grains secs

Comme les lignines sont des composants importants des vaisseaux des plantes et comme les mutants 5139 sont affectés dans la lignification, nous avons vérifié que la qualité des grains n'était pas affectée. Dans ce but, nous avons analysé la composition en polysaccharides des grains.

Tableau 29 : Composition des résidus pariétaux des grains secs de témoins et de mutant 5139 obtenue après acidolyse douce (CA-ARA : pAC lié à un arabinose, FA-ARA : AF lié à un arabinose). Les résultats sont exprimés en mg/g de RP pour les tiges et en mg/g de MIA pour les grains. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0,05^*$.

Organes	CA-ARA	FA-ARA
Grains sauvages	$0,64^* \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,08$
Grains 5139	$0,50^* \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,01$
Tiges sauvages	$3,88 \pm 0,38$	$6,19 \pm 0,60$
Tiges 5139	$3,58 \pm 0,15$	$5,48 \pm 0,15$

Tableau 30 : Dosage d'oses neutres totaux présents dans les résidus pariétaux des grains entiers secs de mutants 5139 et de *B. distachyon* (Bd21-3)

Génotypes	Oses neutres totaux (% poids)
sauvage	$62,6 \pm 0,4$
mutant 5139	$61,4 \pm 1,0$

Tableau 31 : Distribution des oses neutres présents dans les résidus pariétaux de grains entiers secs des mutants 5139 et de la plante sauvage Bd21-3. Résultats exprimés en mg/g de MIA.

Génotypes	Arabinose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
sauvage	$2,86 \pm 0,26$	$5,06 \pm 0,18$	$0,17 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$	$53,90 \pm 0,74$
mutant 5139	$2,67 \pm 0,09$	$4,65 \pm 0,14$	$0,15 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,02$	$53,29 \pm 0,85$

Tableau 32 : dosage d'amidon dans les grains matures secs de *B. distachyon* sauvage et mutant.

Génotypes	% amidon mesuré
Grains entiers sauvages	$4,40 \pm 0,02$
Grains entiers 5139	$4,30 \pm 0,00$

3.7.3.1. Analyse de la composition en oses neutres des résidus pariétaux de grains

La composition en polysaccharides pariétaux a été évaluée par l'analyse de la composition en oses constitutifs des résidus pariétaux. Il n'y a pas de différence significative observée pour la quantité d'oses neutres mesurée entre les mutants et les contrôles sauvages associés (tableau 30). La quantité d'oses neutres est égale à environ 63 % du poids des résidus pariétaux des grains entiers secs.

Aucune différence n'est observée quant à la distribution des différents sucres entre les mutants et les contrôles sauvages associés (tableau 31).

3.7.3.2. Analyse de la composition en amidon des grains entiers secs

La composition des grains entiers secs en amidon a été étudiée. Les résultats des individus sauvages et des mutants sont similaires (tableau 32). L'amidon représente environ 4% du grain entier.

Le défaut de lignification des tiges et des grains de la lignée 5139 ne semble pas avoir d'effet sur la composition des grains évaluée par l'analyse des polysaccharides.

3.7.4. Caractérisation de la lignée mutée 5139 par immunomarquages

L'effet de la mutation sur la mise en place des arabinoxylanes féruloylés et des lignines du grain et de la tige a été étudié par immunomarquages. Des grains de plantes sauvages et mutantes 5139 issus de plantes mises en culture simultanément en chambres de culture ont été prélevés à 11, 21 et 31 JAA ainsi que des tiges de plantes de 60 JAG. Les échantillons ont été traités de la même façon que pour les immunomarquages décrits dans le chapitre 2.

Les résultats obtenus pour la lignée BdCOMT6 5139 sont exposés dans les figures 55 à 60 et sont à comparés à ceux obtenus pour le sauvage (voir chapitre 2 figures 40 à 46).

D'après nos observations, il n'y a pas de différence majeure entre le mutant 5139 et le sauvage dans la mise en place des arabinoxylanes féruloylés et des lignines dans la paroi, et ni dans leur localisation dans le grain et dans la tige.

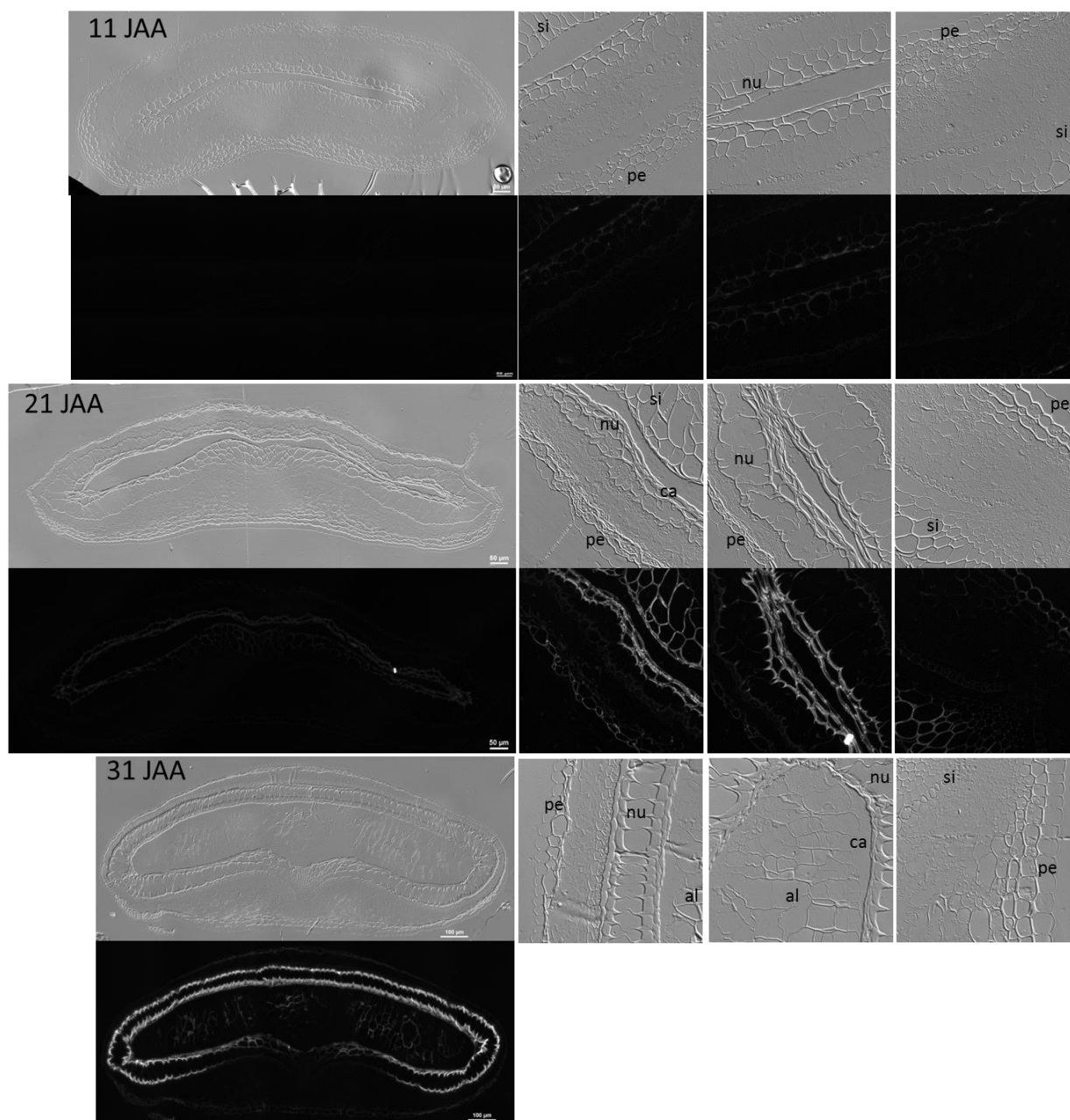


Figure 55: Sections transversales de grain de mutant BdCOMT6 5139 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps AX1, reconnaissant les arabinoxylanes. Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Une image mosaïque de la coupe entière est montrée. pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon.

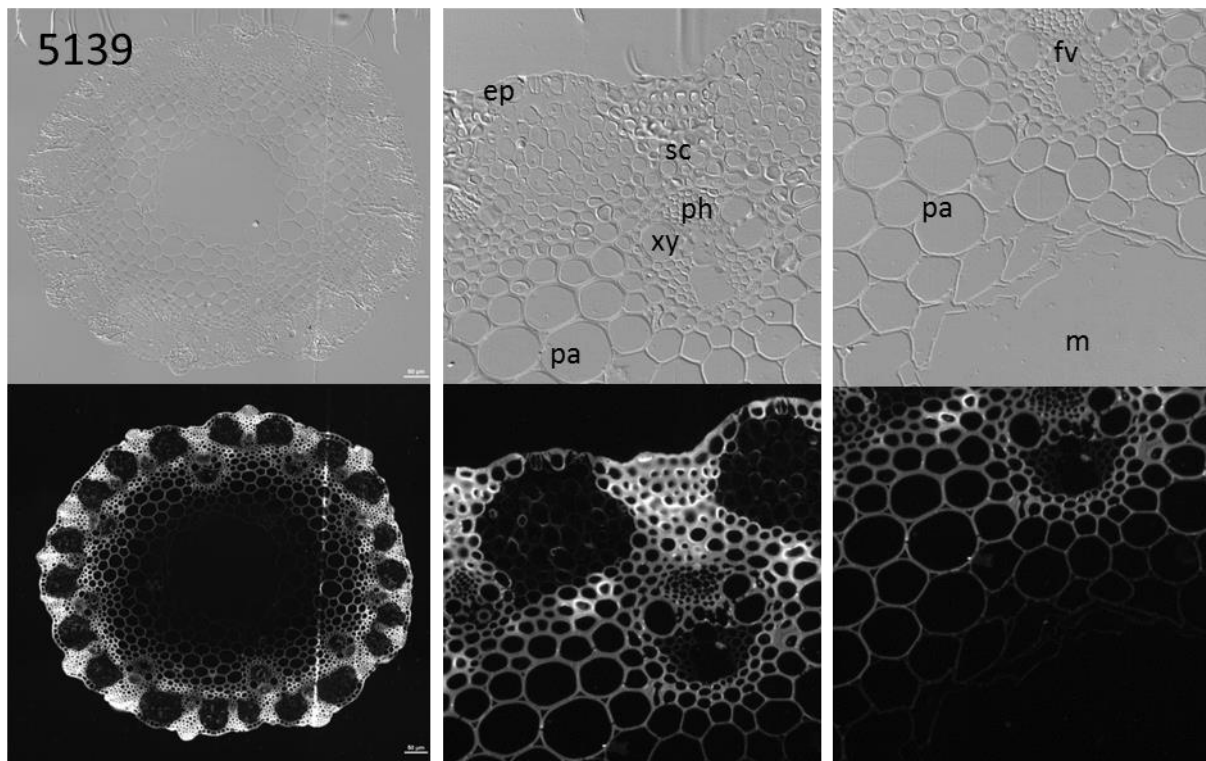


Figure 56 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 JAG marquée par l'anticorps AX1, reconnaissant les arabinoxylanes.

En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, fv : faisceau vasculaire, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme, m : méat.

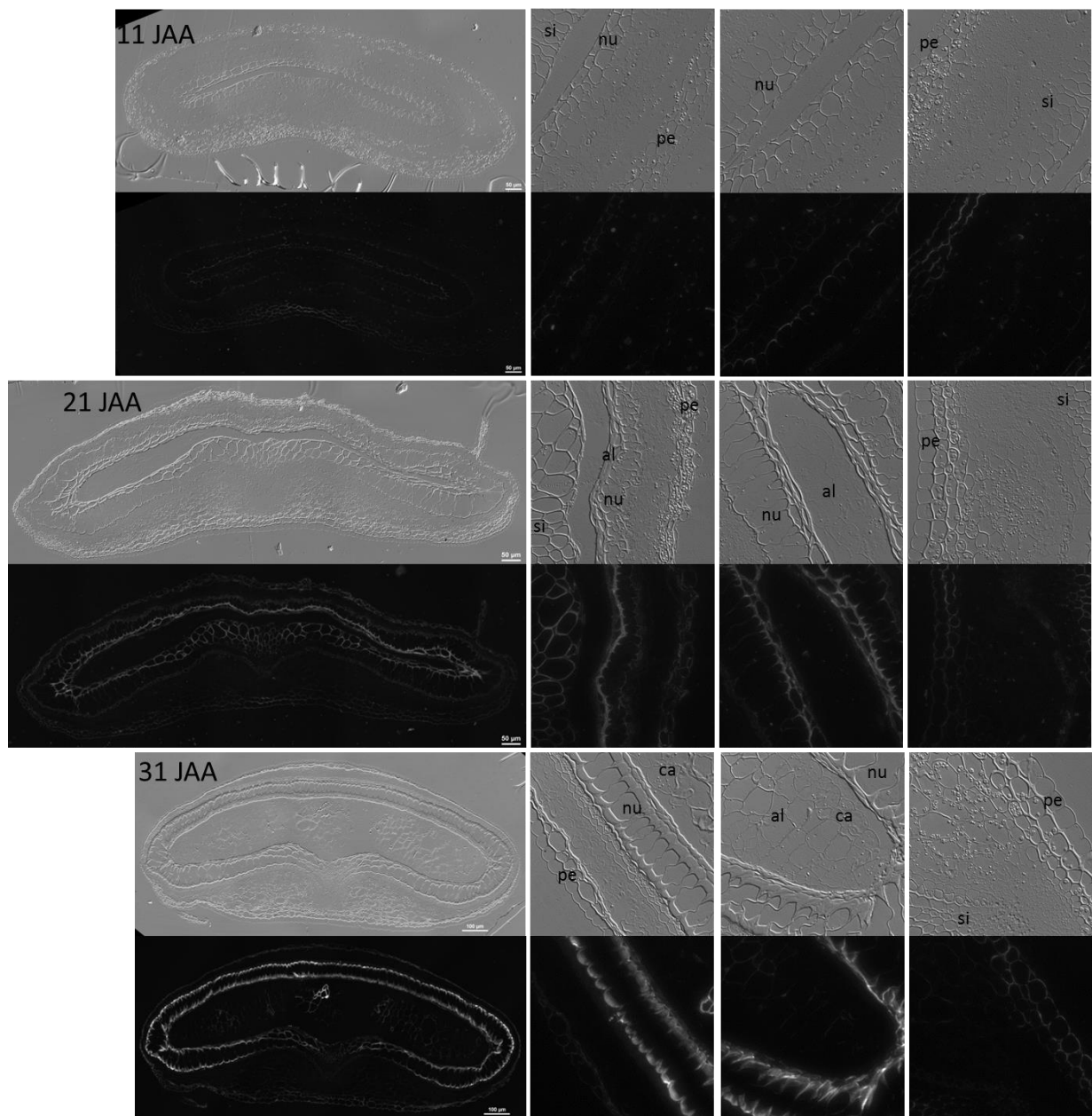


Figure 57 : Sections transversales de grain de mutant BdCOMT6 5139 à 11, 21 et 31 JAA traitées à la lichénase et marquées par l'anticorps anti 5-O-Fer-Ara, reconnaissant l'AF lié aux arabinoxylyanes.

Pour chacun des stades, en haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Une image mosaïque de la coupe entière est montrée. pe : péricarpe, nu : épiderme de nucelle, ca : couche à aleurone, al : albumen, si : sillon.

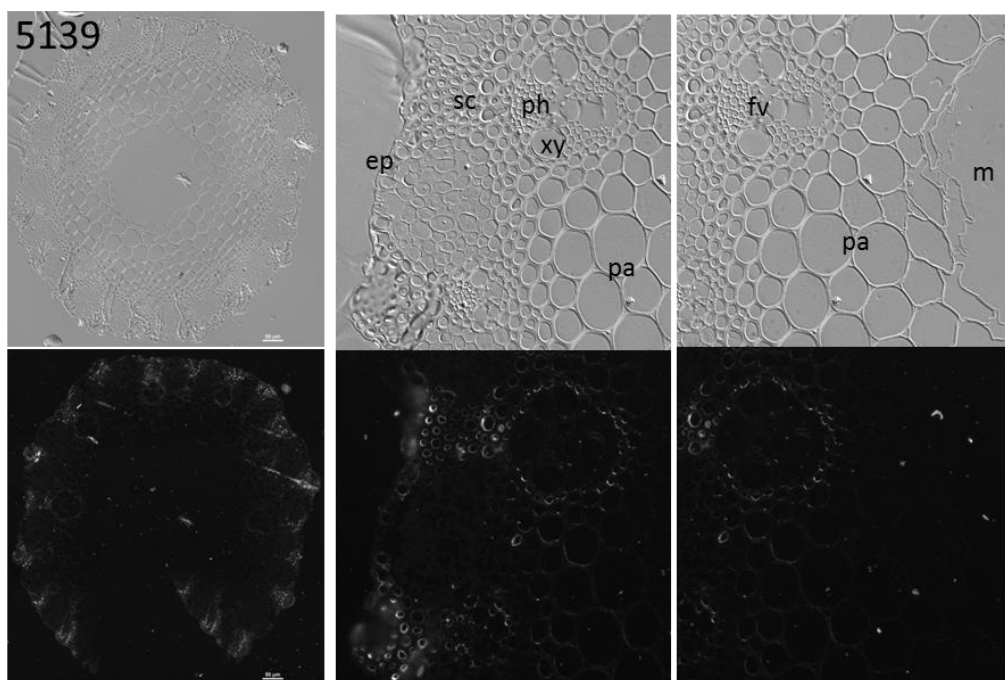


Figure 58 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 JAG marquée par l'anticorps anti 5-O-Fer-Ara, reconnaissant l'AF lié aux arabinoxylanes.

En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, fv : faisceau vasculaire, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme, m : méat.

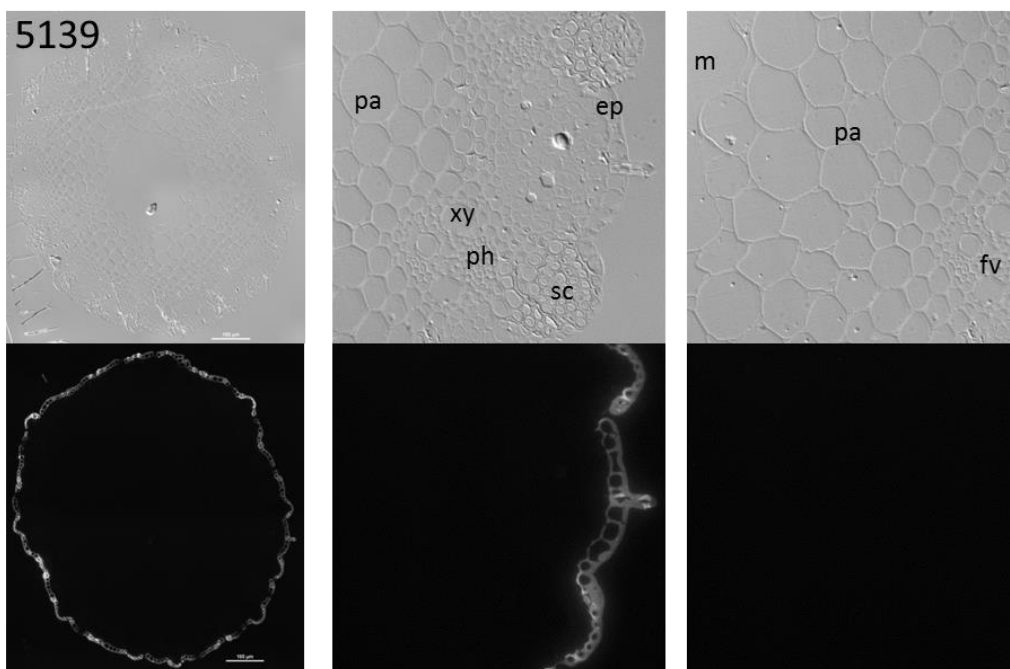


Figure 59 : Section transversale de tige de mutant BdCOMT6 5139 à 60 jours après germination marquée par l'anticorps INRA-COU1, reconnaissant l'pAC.

En haut : image en contraste interférentiel et en bas : image en fluorescence. Ep : épiderme, sc : sclérenchyme, f : fibre, fv : faisceau vasculaire, ph : phloème, xy : xylème, pa : parenchyme, m : méat.

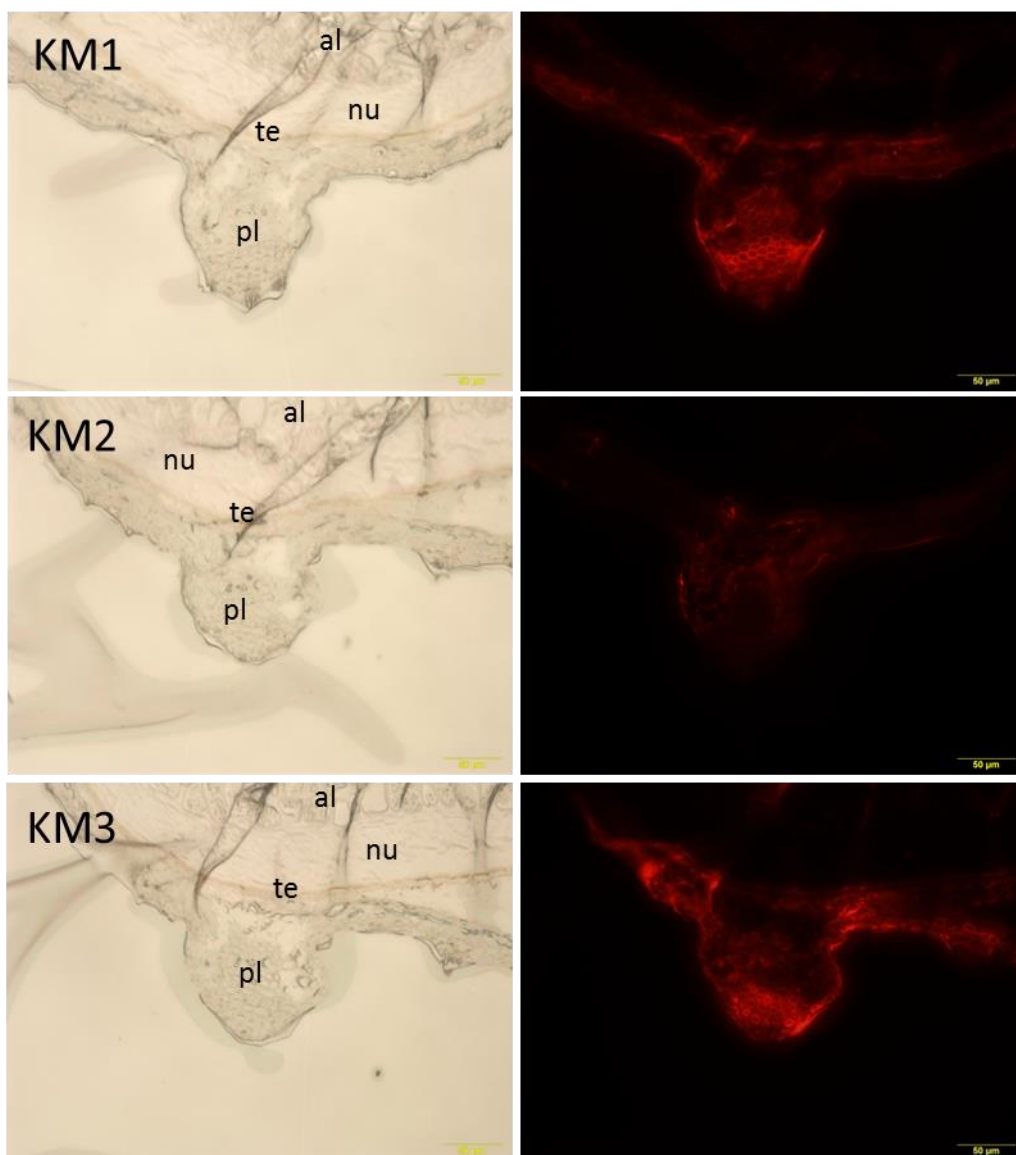


Figure 60 : Détection des lignines dans les grains matures secs mutant BdCOMT6 5139 par immunomarquages.

L'anticorps KM1 (a) cible les liaisons 8-5' des lignines, KM2 (b) cible les monomères G ou S liés en 8-8'et KM3 cible lignines liées en 8-o-4' (c). Pour chaque anticorps, à gauche : image en fond clair et à droite : image en fluorescence. pl : palea, te : testa, nu : épiderme de nucelle, al : albumen.

Tableau 33 : Dosage de la masse perdue et d'anhydroglucose libéré par saccharification réalisée sur MIA de tiges de *B. distachyon* sauvage et mutant 5139. *différence significative pour $p=0,01$.

Echantillons	% masse perdue	Anhydroglucose libéré (mg/g d'échantillon)
Tiges sauvages	27,85* $\pm$ 0,91	94,85* $\pm$ 0,64
Tiges 5139	34,35* $\pm$ 0,64	130,3*5 $\pm$ 1,63

3.7.5. Essais de saccharification sur les tiges du mutant BdCOMT6 5139

La diminution de la teneur en lignines est souvent corrélée à une amélioration de l'efficacité de libération de cellulose à partir des parois et donc à une production plus importante de glucose par hydrolyse enzymatique de la cellulose. Des expériences de cellulolyse, ou saccharification, ont été réalisées avec l'aide de Frédéric Légée de l'INRA de Versailles sur les MIA de tiges de lignées sauvages et de mutants 5139. Sont mesurées la masse de polysaccharides pariétaux perdue ainsi que la quantité de glucose libérée après l'action d'une cellulase. La masse perdue par le mutant 5139 est supérieure à celle perdue par le sauvage (tableau 33). Ceci est lié à une plus grande libération de glucose chez le mutant que chez le sauvage. Cette augmentation est de l'ordre de 27%. Les tiges du mutant BdCOMT6 issu de la lignée 5139 sont donc plus aisément saccharifiables que celles du sauvage. Des résultats similaires ont déjà été obtenus pour des mutants *COMT* de Poacées comme le maïs *bm3* (Barrière et al, 2004).

La diminution de la quantité de lignines ainsi que la modification de la structure des parois que cela entraîne permettent donc une meilleure dégradabilité des parois chez le mutant 5139 que chez le sauvage. Notons que la cellulase Onozuka utilisée présente majoritairement des activités cellulases mais également des activités hémicellulases et β -glucosidase. Les résultats peuvent donc être légèrement amplifiés par l'hydrolyse de certains hémicelluloses.

3.7.6. Caractérisation de l'expression du gène *BdCOMT6* dans la lignée mutée 5139

Le niveau relatif de transcrit codant BdCOMT6 a été évalué dans les tiges de la lignée 5139 par rapport au sauvage par RT-PCR quantitative.

Les résultats montrent que malgré la présence d'une mutation ponctuelle, le gène *BdCOMT6* reste exprimé et la quantité de transcrits codant BdCOMT6 ne semble pas affectée dans la lignée 5139 (figure 61).

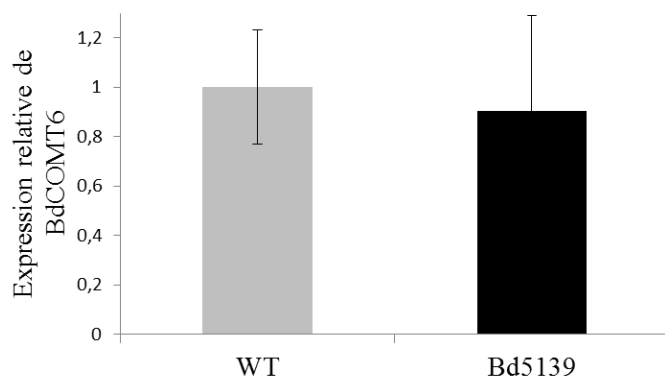


Figure 61 : Expression du gène codant pour la BdCOMT6 dans les tiges de Bd21-3 (WT) et du mutant 5139.

Comparaison de l'expression de *BdCOMT6* dans les tiges de Bd21-3 sauvages (noté WT) et de mutants Bd5139 à 60 DAG par qRT-PCR. Les niveaux de transcription de *BdCOMT6* ont été normalisés à partir du gène de ménage S-adenosylméthionine décarboxylase (SAMDC) et la valeur de l'expression a été fixée à 1 pour le WT (procédures expérimentales détaillées dans Bouvier d'Yvoire et al, 2013 ; BDCOMT-6-F GTTCCACGTCGACATGATCAT, BDCOMT-6-R CTAAGTGGTGAAGTCTGATGGC, SAMDC-F CGGCAAGCTTGCTAATCTGCTGGAAT, SAMDC-R CAGAGCAACAATAGCCTGGCTGGC). Les barres d'erreur sont les SD de trois répétitions biologiques.

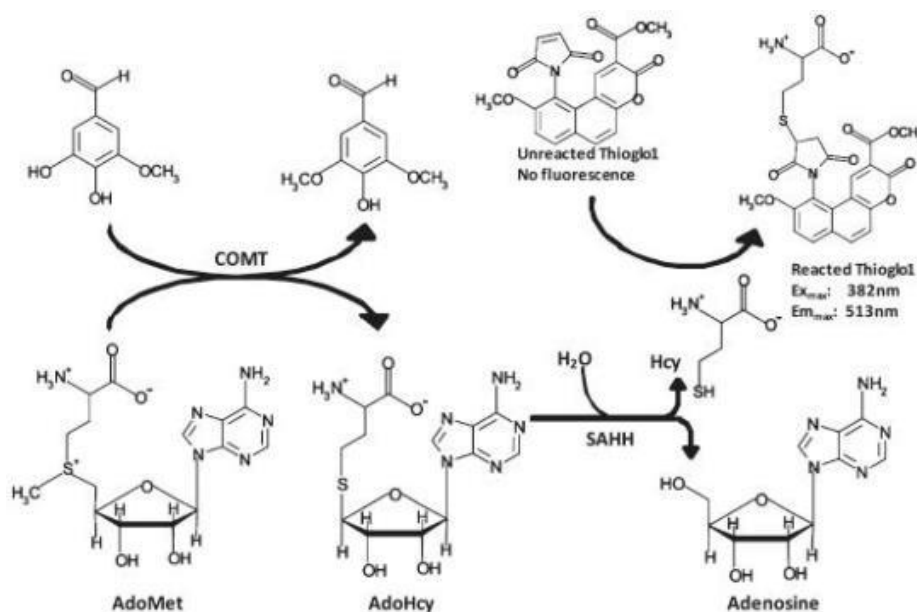


Figure 62 : Schéma théorique de l'activité enzymatique COMT mesurée par fluorescence (Palmer et al, 2010).

Au cours de la réaction, la COMT va transférer à un composé accepteur (tel que l'acide caféique) un groupement méthyl qui provient du S-adenosylméthionine (AdoMet) via l'action de la COMT. Ce dernier donne alors du S-adenosylhomocystéine (AdoHcy), molécule prise en charge par l'enzyme S-adenosylhomocystéine hydrolase (ou SAHH) qui va hydrolyser le AdoHcy en Adénosine et en Homocystéine (Hcy). Le Hcy va enfin réagir avec le Thioglo1 en le réduisant. Le Thioglo1 devient alors fluorescent et la fluorescence peut être quantifiée grâce à un lecteur de plaques. Il s'agit d'une réaction couplée quantitative selon Palmer et al, (2010).

3.8. Production de la protéine BdCOMT6 recombinante et mesure de son activité enzymatique

Afin de savoir si la COMT mutée de la lignée 5139 conserve une activité enzymatique, nous avons tenté de mesurer l'effet de la mutation sur l'activité enzymatique.

Dans un premier temps, nous avons tenté de réaliser cette expérience sur des extraits de protéines végétales. A partir de tiges de plantes sauvages et mutantes 5139 prélevées à 6 semaines de culture et plongées dans de l'azote liquide, les protéines ont été extraites et purifiées (voir partie 6.8 du Matériel et Méthodes). L'activité enzymatique a été suivie selon la méthode décrite par Palmer et al, 2010 dont le principe est schématisé dans la figure 62.

Nous avons testé comme substrat l'acide caféique puisque dans la littérature, les COMT produites *in vitro* sont capables de l'O-méthyliser en AF, ce substrat est de plus disponible dans le commerce contrairement au 5-hydroxyconiferaldéhyde. Une cinétique enzymatique a été réalisée pour les extraits d'individus sauvages et mutants en mesurant la fluorescence toutes les 5 minutes pendant 45 minutes. Une augmentation de la fluorescence a été observée dans les deux cas. Cependant, ces mêmes extraits protéiques dénaturés par incubation à 100°C pendant 15 minutes provoquaient également cette réponse. La molécule fluorescente, le ThioGloI, pouvant être activé par réduction, une molécule de nature non protéique se trouvant dans les extraits protéiques était donc vraisemblablement responsable de la fluorescence.

Nous avons alors essayé de produire la COMT de façon recombinante dans *Escherichia coli* comme décrit par Palmer et al, 2010 pour la COMT de sorgho. A partir de la séquence codante sauvage de la COMT6, nous avons créé la version mutée correspondant aux familles 5139 et 7549 par mutagenèse dirigée (voir partie 6.3.17 du Matériel et Méthodes). Le but était de voir si la version mutée est encore active.

Les versions sauvage et mutée 5139 ont ensuite été clonées dans le vecteur pDEST17 (plasmide d'expression inductible par l'IPTG qui fusionne la protéine avec une étiquette de purification 6xhistidine en position N-terminale) afin de les exprimer dans *Escherichia coli* Rosetta pLys, souche permettant l'expression de protéines eucaryotes.

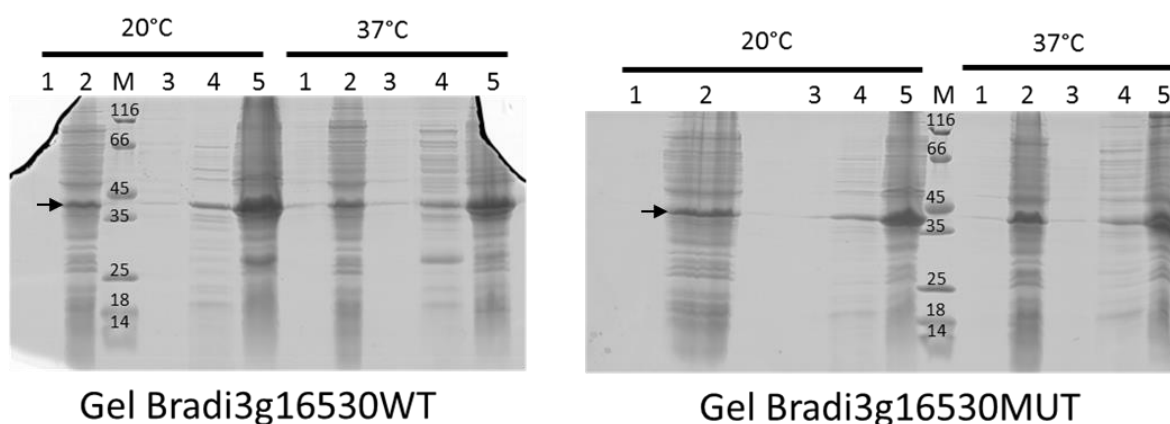


Figure 63 : gels SDS PAGE des productions à 20°C et 37°C de la COMT sauvage et mutée 5139 colorés au bleu de Coomassie

1 : sécrétion bactérienne non induite ; 2 : insoluble bactérien non induit ; 3 : sécrétion bactérien induit ; 4 : fraction bactérienne induite soluble ; 5 : fraction bactérienne induite insoluble ; M : marqueur de taille Invitrogen. La flèche indique la localisation de la protéine d'intérêt sur les gels d'électrophorèse SDS-PAGE.

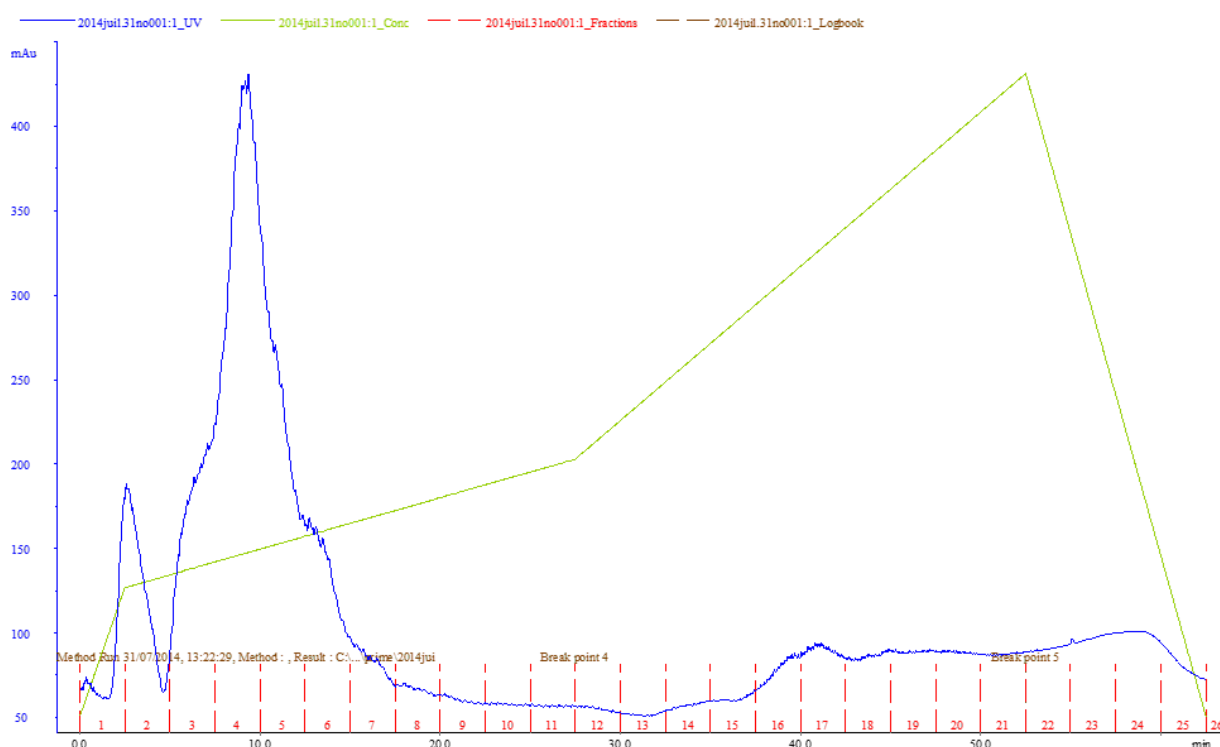


Figure 64 : Exemple de chromatogramme obtenu lors d'une purification de la protéine BdCOMT6 recombinante sur colonne de Nickel en tampon Tris HCl avec gradient d'imidazole.

Les tubes 3, 4 5 et 6 contiennent la majeure partie de la protéine recombinante et sont regroupées pour les étapes de dialyse et de concentration.

Une fois produites et purifiées, leurs activités enzymatiques ont été testées suivant la même méthode que pour les extraits protéiques.

La production a été tentée à 37°C pendant 18h comme décrit par Palmer et al, 2010. L'induction a permis de produire les protéines mais en majorité sous forme insolubles (figure 63). Une production a été tentée à 20°C pendant 18h pour essayer d'augmenter la solubilité des protéines mais les résultats obtenus avec les deux températures sont comparables (figure 63).

Afin de tester leur activité enzymatique, les protéines produites ont d'abord été purifiées par chromatographie sur colonne d'affinité Nickel-ion dans un tampon Tris HCL. La protéine d'intérêt est éluée entre 50 et 65 mM d'imidazole (figure 64).

Après dialyse et concentration, des dosages de protéines ont permis de déterminer qu'environ 35 mg/mL de protéines sauvages ou mutantes sont produites par cette méthode à partir de 1 L de culture bactérienne et concentrés dans environ 600 µL de solution Tris HCL. Des essais enzymatiques ont été réalisés d'après la méthode de Palmer et al, 2010. Nous n'avons cependant pas obtenu de résultats concluants. La fluorescence ne variait ni chez le sauvage, ni chez le mutant alors qu'une activation de la molécule fluorescente par une molécule réductrice (le glutathion réduit ou GSH) provoquait une augmentation rapide de la fluorescence.

Nous avons essayé une autre méthode pour détecter l'activité enzymatique. Après incubation de l'enzyme avec de l'acide caféique, nous avons essayé de détecter le produit de l'activité (l'AF) par HPLC. Nous n'avons observé ni diminution de la concentration en acide caféique ni apparition d'AF (figure 65).

D'après les différents tests d'activités enzymatiques et les résultats obtenus, il semblerait que les protéines COMT produites ne soient pas actives.

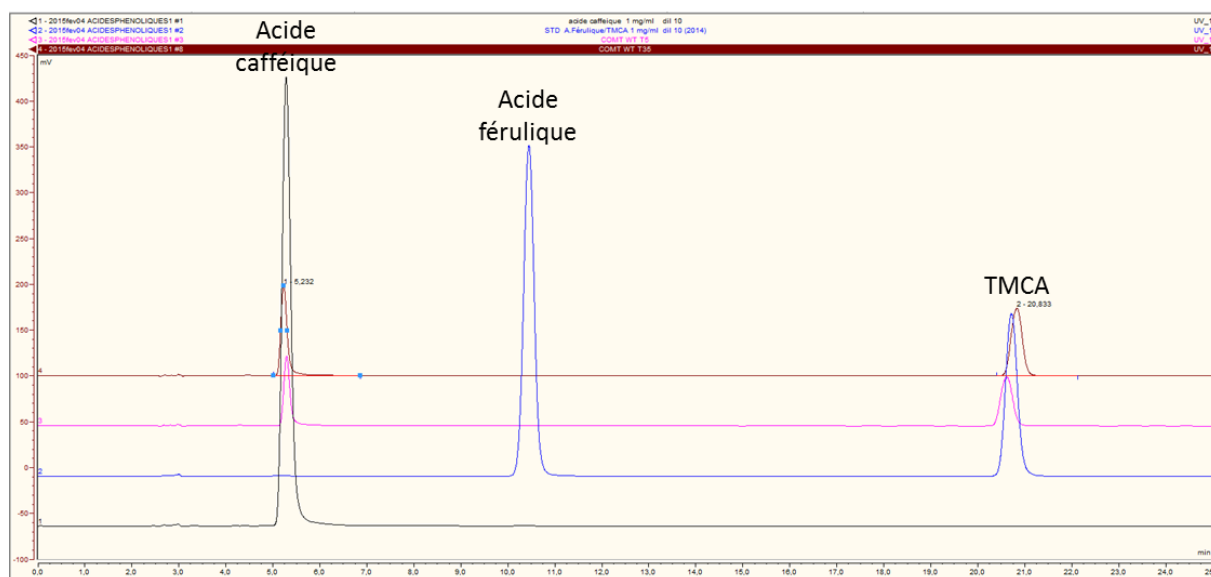


Figure 65 : Exemple de résultat obtenu après suivi de l'activité enzymatique de la COMT sauvage et mutée par HPLC.

L'acide caféique est incubé avec la BdCOMT6 recombinante. Les acides phénoliques sont ensuite extraits à l'éther après acidification, puis séparés sur une colonne C18 et détectés grâce à leur absorption UV. Légende : acide caféique seul (noir), AF et TMCA (bleu), mélange réactionnel à 5 min (rose) et 35 min (marron) après ajout de la BdCOMT6.

3.9. Transformation du mutant d'*Arabidopsis thaliana Atomt1* par les constructions *BdCOMT6* sauvage et mutante 5139

Une autre stratégie pour savoir si la protéine BdCOMT6 mutante 5139 est toujours active a consisté à transformer des plantes d'*A. thaliana Atomt1* mutées pour la COMT, avec des constructions exprimant fortement la version sauvage ou la version mutée 5139 du gène *BdCOMT6*. Le mutant d'insertion ADN-T *Atomt1* (SALK_002373) ne contenant pas d'unités S, la détection de la fonctionnalité de la protéine mutée est observée avec la restauration du phénotype sauvage.

Plusieurs transformants ont été obtenus pour chaque construction (2 lignées obtenues pour la complémentation par la forme sauvage et 15 lignées pour la complémentation par la forme mutée du gène *BdCOMT6*). Dans un premier temps, des colorations de Maïule ont été réalisées sur les tiges des transformants de première génération (figure 24). Elles ont mis en évidence une absence de coloration du mutant *Atomt1* et une coloration rouge des tiges des lignées transformées avec la forme sauvage et avec la forme mutée. Les deux constructions, sauvage et mutée, semblent complémenter la mutation *Atomt1* d'*A. thaliana*. La BdCOMT6 est donc fonctionnelle dans *A. thaliana* malgré des séquences relativement divergentes surtout en partie N terminale (figure 66).

La mutation 5139 ne semble pas affecter drastiquement l'activité de BdCOMT6. Nous avons noté dans les générations suivantes que les lignées *Atomt1* transformées avec la forme sauvage de *BdCOMT6* perdaient leur capacité à complémenter le phénotype mutant ce qui n'est pas le cas de la forme mutée BdCOMT6 5139. Nous avons également observé dans les lignées *Atomt1* transformées avec la forme mutée de *BdCOMT6* des faisceaux vasculaires collapsés (figure 67).

```

Lp      MGSTAADMAA---SADEDACMFALQLASSSLPMTLKNAIELGLLEILVAAGG---KSLT 54
BdCOMT6 MGSTAADMAA---TADEEACMFALQLASSSLPMTLKNAIELGLLDTLVQASG---KSLT 54
Zm      MGSTAGDVAA---VVDEEACMYAMQLASSSLPMTLKNAIELGLLEVLQKEAGGKAALA 57
Sb      MGSTAEDVAA---VADEEACMYAMQLASSSLPMTLKNALELGLLEVLQKDAG---KALA 54
Ms      MGSTGETQITPTHISDEEANLFAMQLASSSLPMTLKSALELDLLEIIAKAGP---GAQIS 58
At      MGSTAETQLTPVQVTDDEAALFAMQLASSSLPMTLKSALELDLLEIMAKN---GSPMS 56
      ***.      :      *:* :*:***:*:* *.*:*.*: :      : :

Lp      PTEVAAKLP--SAANP-EAPDMVDRILRLLLASYNVVTCVVEEGKDGRLSRSYGAAPVCKFL 112
BdCOMT6 PAEVAAKLP--SSSNP-AAPDMVDRMLRLLLASYGVVSCAVEEGENGLSRRYAAPVCKWL 112
Zm      PEEVVARMPAAPSDPAAAAAMVDRMLRLLLASYDVVRCQMED-RDGRYERRYSAAPVCKWL 116
Sb      AEEVVARLPVAPTNP-AAADMVDRMLRLLLASYDVVRCQMED-KDGKYERRYSAAPVCKWL 112
Ms      PIEIASQLP--TTNP-DAPVMDRLRLLLACYIILTCSVRTQQDGKVQRLYGLATVAKYL 115
At      PTEIASKLP--TKNP-EAPVMDRLRLLLTSYSVLTCSNRKLSGDGVERIYGLGPVCKYL 113
      . *:::.* . : * . *::***:.* : : * . . . * * . . * * :

Lp      TPNEGVSMAALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLDDGGIPFNKAYGMSAFEYHGTDPRENRV 172
BdCOMT6 TPNEGVSMAALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLDDGGIPFNKAYGMSAFEYHGTDPRENRV 172
Zm      TPNEGVSMAALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLDDGGIPFNKAYGMTAFEYHGTDAFENRV 176
Sb      TPNEGVSMAALALMNQDKVLMESWYYLKDAVLDDGGIPFNKAYGMTAFEYHGTDPRENRV 172
Ms      VKNEGVSISALNLMNQDKVLMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGMTAFEYHGTDPRENKV 175
At      TKNEGVSIAALCLMNQDKVLMESWYHLKDAVLDDGGIPFNKAYGMSAFEYHGTDPRENKV 173
      . *****:.* *****:****:*****:*****:*****:***.*

Lp      FNEGKKNHSIIITKKLLELYHGFEG-LGTLVDVGGGVGATVAAIAAHYPTIKGVNFDLPH 231
BdCOMT6 FNEGKKNHSIIITKKLLDLYPGFEG-LGTLVDVGGGVGATVGAIVARHPAIKGINFDLPH 231
Zm      FNEGKKNHSVIITKKLLDFYTGFEF-VSTLVDVGGGVGATLHAITSRPHPHISGVNFDLPH 235
Sb      FNEGKKNHSVIITKKLLEFYTGFEFVSTLVDVGGGIGATLHAITSHSHIRGINFDLPH 232
Ms      FNKGMSDHSITIMKKILETYTGFEF-LKSLVDVGGGTGAVINTIVSKYPTIKGINFDLPH 234
At      FNNGMSNHSITIMKKILETYKGFEF-LTSLVDVGGGIGATLKMIVSKYPNLKGINFDLPH 232
      **.*:.* * * :*: * * : : :***** *.*: *.: : : * :*****

Lp      VISEAPQFPFVTHVGGDMFKEVPFSGDTILMKWILHDWSDQHCATLLKNCYDALPAHG-KV 290
BdCOMT6 VISEGIPFPFVTHVGGDMFQKVPSCDAILMKWILHDWSDAHCATLLKNCYDALPAHG-KV 290
Zm      VISEAPFPFVGRHVGGDMFASVPAGDAILMKWILHDWSDAHCATLLKNCYDALPENG-KV 294
Sb      VISEAPFPFVQHVGGDMFKSVFAGDAILMKWILHDWSDAHCATLLKNCYDALPEKGGKV 292
Ms      VIEDAPSPFVGVHVGDMFVSIPKADAVFMKWICHDSDEHCLKFLKNCYEALPDNG-KV 293
At      VIEDAPSHPGIEHVGGDMFVSVPKGDAIFMKWICHDSDEHCVKFLKNCYESLPEDG-KV 291
      **.: .*: ***** :* .*: :***** ***** * .:*****:*** . * **

Lp      VLVQCILPVNPEANPSSQGVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFQALARGAGFTGVKSTYIY 350
BdCOMT6 VIVECILPVNPEATPKAQGVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFELARGAGFTGVKATYIY 350
Zm      IVVECVLPVNTATPKAQGVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFRELAKGAGFSGFKATYIY 354
Sb      IVVECVLPVTTDAVPKAGGVFHVDMIMLAHNPGGKERYEREFRLAKAAGFSGFKATYIY 352
Ms      IVAECILPVAPDSSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTQKEFEDLAKGAGFQGFVHCNA 353
At      ILAECILPETPDSSLSTKQVVHVDCIMLAHNPGGKERTKEFEALAKASGFGKIKVVCDA 351
      :.:*:*** .: : : *:* *****:*** :*: *.*:*** *.*

Lp      ANAWAIEFTK-- 360
BdCOMT6 ANAWAIEFTK-- 360
Zm      ANAWAIEFIK-- 364
Sb      ANAWAIEFIK-- 362
Ms      FNTYIMEFLKKV 365
At      FGVNLIELLKKL 363
      .. :*: *

```

Figure 66 : Alignement des séquences protéiques de COMT de *Lolium perenne* (Lp), de maïs (Zm), de sorgho (Sb), de miscanthus (Ms) et de *B. distachyon* (BdCOMT6).

Cet alignement permet l'identification des résidus importants pour l'activité avec en vert le site de dimérisation, en jaune les résidus catalytiques, en violet le motif de liaison au cofacteur, en bleu le site de positionnement et de liaison au substrat (alignement réalisé par CLUSTAL 2.1). Astérisque : conservation stricte des acides aminés chez toutes les COMT étudiées ; deux points : conservation des caractéristiques des acides aminés ; point : pas de conservation entre les acides aminés, tiret : gap.

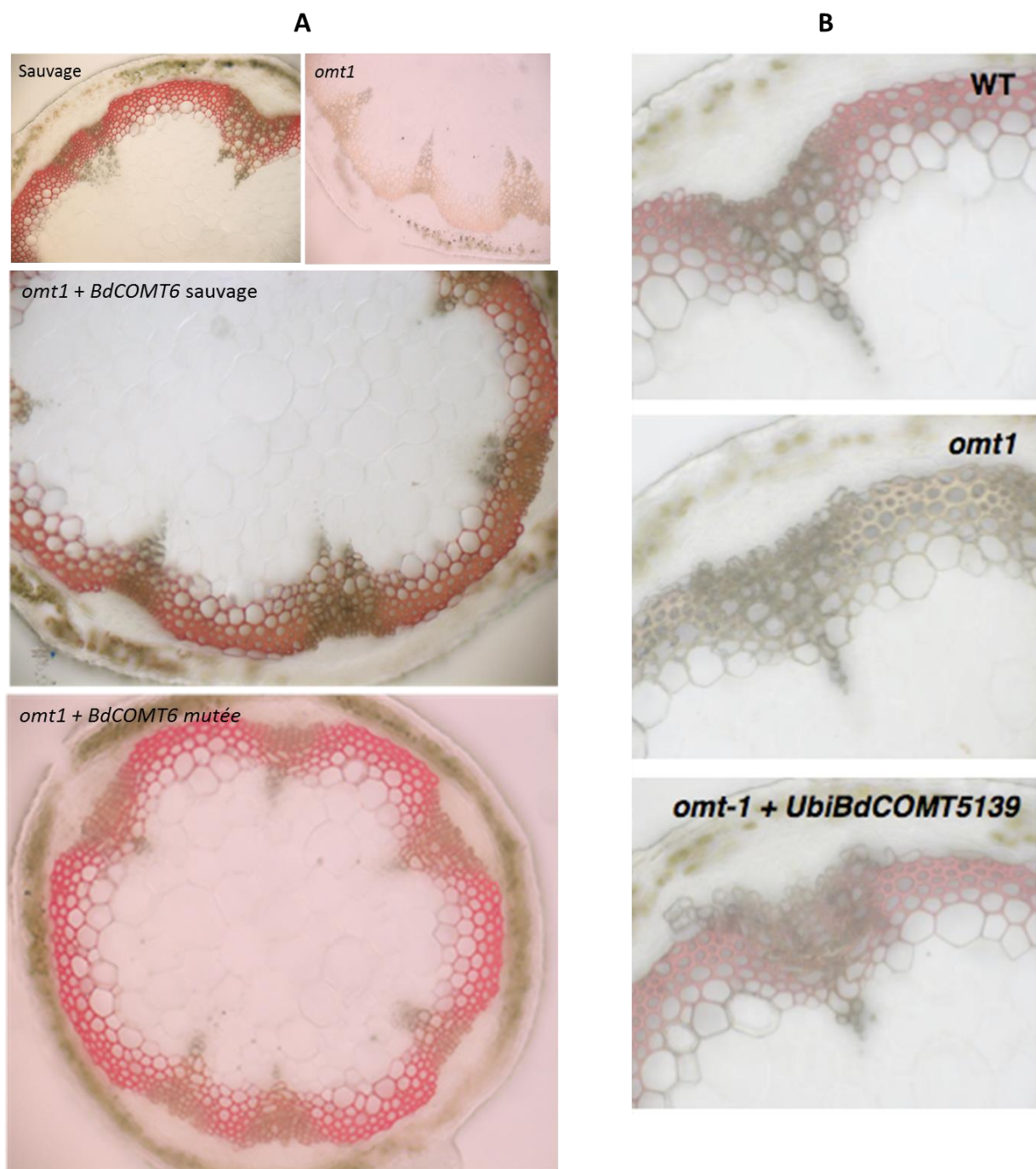


Figure 67: Sections transversales de tige d'*A. thaliana* sauvage, mutante *Atomt1* et *Atomt1* complémentées par *BdCOMT6* sauvage et mutée observées après coloration de Maïle. Panel A : plantes issues de la 1^e génération de plantes transformées. Panel B : plantes issues de la 3^e génération de plantes transformées.

Afin de mieux évaluer l'activité enzymatique des formes sauvages et mutées de BdCOMT6, la quantité, la structure et la composition des lignines des tiges des lignées d'*A. thaliana* transformées ont été déterminées à partir d'échantillons issus de la troisième génération génotypées homozygotes.

La teneur en lignines a été déterminée par lignine Klason. Les teneurs en lignines de tiges d'*A. thaliana* sauvage, du mutant *Atomt1* et de *Atomt1* transformé par la forme sauvage de BdCOMT6 sont comparables alors que la complémentation réalisée avec la forme mutée de BdCOMT6 entraîne une diminution de la teneur en lignines de l'ordre de 3 points (tableau 34).

Des thioacidolyses réalisées sur les lignées montrent que *Atomt1* contient des traces d'unités S et des résidus 5-OHG. Ces lignées complémentées avec la forme mutée de BdCOMT6 (version 5139) montre une restauration de la présence des monomères S dans les lignines des tiges sèches, et du niveau de résidus 5-OHG (tableau 34). Le taux de monomères S chez les plantes complémentées par la forme mutée est même supérieur à celui des *A. thaliana* sauvages pour les trois lignées analysées. L'expression forte de la forme mutée due à l'utilisation d'un promoteur de type 35S pourrait être responsable de cette sur-accumulation de monomères S dans les lignines. L'effet de la mutation 5139 sur l'activité enzymatique de la BdCOMT6 serait palliée par la surexpression du gène.

Les lignées transformées avec la forme sauvage de BdCOMT6 produisent également des monomères S, plus que *Atomt1*, mais leur taux est inférieur à celui des lignées *A. thaliana* sauvages, ce qui corrobore les résultats obtenus après coloration de Maïle des tiges de la même génération, mais qui diffère des résultats obtenus à la première génération de plantes. Une hypothèse pour expliquer ce résultat serait que la surexpression de la forme sauvage de BdCOMT6 (mais pas de la forme mutée) par le promoteur 35S induirait du « silencing » dans les deux lignées 4-3 et 6-3 en troisième génération et pas dans celles issues de la première génération.

Tableau 34 : Résultats de thioacidolyse réalisée sur les tiges sèches des *A. thaliana* sauvages (écotype Col-0), mutants *Atomt1* et mutants *Atomt1* complémentés par le gène *BdCOMT6* forme sauvage et mutée. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0.05^\bullet$.

Génotype	% lignine Klason	%H	%G	%S	% 5-OHG
Sauvage	17,69 ± 0,17	0,83 ± 0,02	69,3 ± 0,2	29,3 ± 0,4	0,51 ±0,02
Mutant <i>Atomt1</i>	17,48 ± 0,36	0,84 ± 0,04	90,4 ± 0,6	2,40 ± 0,69	6,34 ± 0,09
<i>Atomt1</i> complémentée par <i>BdCOMT6</i> sauvage 4-3	17,61 ± 0,35	0,8 ± 0,00	85,0 ± 0,3	10,8 ± 0,3	3,4 ± 0,0
<i>Atomt1</i> complémentée par <i>BdCOMT6</i> sauvage 6-3	17,29 ± 0,35	0,9 ± 0,1	83,3 ± 1,4	12,1 ± 1,5	3,7 ±0,1
<i>Atomt1</i> complémentée par <i>BdCOMT6</i> mutée 4-7	14,25 ▪ ± 0,36	1,63 ± 0,10	59,6 ± 0,2	38,2 ± 0,3	0,59 ± 0,01
<i>Atomt1</i> complémentée par <i>BdCOMT6</i> mutée 7-5	14,16 ▪ ± 0,53	1,74 ± 0,19	59,7 ± 0,3	38,0 ± 0,2	0,60 ± 0,02
<i>Atomt1</i> complémentée par <i>BdCOMT6</i> mutée 15-6	13,91 ▪ ± 0,38	1,57 ± 0,12	58,7 ± 0,5	39,1 ± 0,4	0,61 ± 0,03

Comme indiqué dans l'introduction (figure 30), la COMT d'*Arabidopsis thaliana* est également impliquée dans la synthèse d'autres phénylpropanoïdes que les lignines, notamment des composés phénoliques solubles comme le sinapoyl malate dérivant du sinapaldéhyde produit par la COMT mais également l'isorhamnétine par action directe de la COMT sur la quercétine (Goujon et al 2003, Do, et al 2007 ; Vanholme et al, 2012). Des dosages de composés phénoliques solubles ont été réalisés à partir de plantules des différents génotypes. Chez le mutant *Atomt1*, on remarque par rapport au sauvage, une diminution de la teneur en sinapoylmalate et en glycosides d'isorhamnétine qui ne sont plus détectés, mais le défaut de la COMT provoque l'accumulation de 5-hydroxyféruloylglucose provenant vraisemblablement d'une accumulation du substrat de la COMT, le 5-hydroxyconiféraldéhyde (tableau 35 et figure 30). La transformation de *Atomt1* avec les formes sauvages et mutées de BdCOMT6 permettent d'augmenter la teneur en sinapoyl malate et en glycosides d'isorhamnétine. Cependant les teneurs ne sont comparables au sauvage que pour une lignée complémentée par la forme mutée de BdCOMT6. Le 5-hydroxyféruloylglucose disparaît lui dans les trois lignées transformées avec la forme mutée de BdCOMT6 (tableau 35). La complémentation par la forme sauvage de BdCOMT6 est donc partielle alors que la forme mutée semble bien complémenter le mutant *Atomt1*. Ces résultats indiquent de plus, que la protéine de Monocotylédones BdCOMT6 est capable de produire l'isorhamnétine comme la COMT d'*A. thaliana*.

Très récemment, il a été montré que l'activité de certaines COMT était régulée par des modifications post-traductionnelles. Chez le peuplier, la phosphorylation de la sérine 123 (figures 48 et 66), acide aminé conservé des COMT, entraîne l'inactivation de la COMT (Wang et al, 2015). En l'absence de cette modification post-traductionnelle, la COMT est active. La possibilité d'une régulation au niveau post-traductionnelle de BdCOMT6 expliquerait le fait que le gène *BdCOMT6* soit exprimé dans tous les tissus analysés lignifiés ou non (figure 51 et données PlaNet). Les formes sauvage et mutée de BdCOMT6 possèdent cette sérine. La différence entre BdCOMT6 et la forme mutée 5139 est le changement d'une glycine en position 256 en acide aspartique. Cette position est éloignée (si on ne considère que la structure primaire des protéines) de la sérine phosphorylée chez le peuplier. La BdCOMT6 possède une autre sérine en position 255, absente chez les COMT d'*A. thaliana* et du peuplier (voir figure 48), située juste en amont de l'acide aminé affecté par la mutation G256D.

Tableau35 : Dosage de flavonoïdes réalisée sur des plantules de *A. thaliana* sauvages (Col-0), mutants *Atomt1* et mutants *Atomt1* complémentés par le gène *BdCOMT6* forme sauvage et mutée.

5-OHFE : 5-hydroxyféruloylmalate et 5-hydroxyféruloylglucose ; MF : matière fraîche ; ND : non détectable. Différence significative pour $p=0,01^*$ et $p=0.05^\bullet$.

Génotype	Sinapoylmalate ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF)	Dérivés de 5-OHFE ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF)	Glycoside d'isorhamnétine ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF)
Sauvage	$2,60 \pm 0,31$	ND	$0,14 \pm 0,03$
Mutant <i>Atomt1</i>	$1,09 \pm 0,17$	$0,43^\bullet \pm 0,10$	ND
<i>Atomt1</i> + BdCOMT6 sauvage 4-3	$1,89 \pm 0,11$	$0,15^\bullet \pm 0,03$	$0,018 \pm 0,008$
<i>Atomt1</i> + BdCOMT6 sauvage 6-3	$2,26 \pm 0,20$	$0,034^\bullet \pm 0,007$	$0,047 \pm 0,008$
<i>Atomt1</i> + BdCOMT6 mutée 4-7	$2,11 \pm 0,13$	ND	$0,062 \pm 0,007$
<i>Atomt1</i> + BdCOMT6 mutée 7-5	$1,93 \pm 0,28$	ND	$0,069 \pm 0,003$
<i>Atomt1</i> + BdCOMT6 mutée 15-6	$2,73 \pm 0,22$	ND	$0,094 \pm 0,004$

Une hypothèse pouvant expliquer le comportement de la forme sauvage de BdCOMT6, peu (voir pas) active dans *A. thaliana* par rapport à la forme mutée active, serait une différence entre les mécanismes d'activation/inactivation entre les COMT de *B. distachyon* et d'*A. thaliana*, différence annulée par la mutation BdCOMT6 5139. Il est possible que la présence de la glycine 256 (et pas d'un acide aspartique) augmente la phosphorylation de la sérine conservée (123 chez le peuplier) et donc l'inhibition de la BdCOMT6 dans *A. thaliana*. Il est également possible que la sérine 255 de BdCOMT6 se phosphoryle dans *A. thaliana* et pas dans *B. distachyon*, et que cette phosphorylation soit permise chez la forme sauvage par la glycine 256 mais pas par l'acide aspartique qui « bloquerait » la sérine 255 en position déphosphorylée, « laissant » l'enzyme toujours active.

3.10. Conclusions

Nous avons démontré que BdCOMT6 intervient dans la production des monomères S de lignines dans les tiges et les grains de *B. distachyon*. Sa mutation ponctuelle entraîne une diminution modérée de la teneur en lignines et une diminution significative du taux de monomères S dans les tiges et les grains, ainsi qu'une meilleure dégradabilité des tiges lors de la saccharification. Cependant, il reste encore des monomères S dans les tiges des mutants et la version mutée du gène permet de restaurer le phénotype sauvage du mutant *Atomt1* d'*A. thaliana*. BdCOMT6 mutée est donc encore active même si les défauts de lignification observés dans *B. distachyon* plaident pour une activité réduite.

Les résultats obtenus suite à la complémentation du mutant *Atomt1* d'*A. thaliana* sont très intéressants et ouvrent la voie vers de nombreuses nouvelles questions comme l'implication de la COMT dans la synthèse des composés phénoliques solubles comme les flavonoïdes ou encore l'impact des modifications post-traductionnelles sur l'activité des enzymes. Des analyses sont en cours afin d'apporter des réponses à ces questions.

Malgré son expression dans l'albumen du grain de *B. distachyon*, un tissu dont les parois sont relativement riches en arabinoxylanes féruloylés et où les lignines sont détectés à l'état de trace selon nos résultats, BdCOMT6 n'interviendrait pas dans la production de l'AF lié aux xylanes puisque contrairement à la teneur en unités S, la teneur en AF n'est pas impactée par la mutation ni dans les tiges, ni dans les grains.

Ces résultats confirment les résultats obtenus pour les tiges d'autres mutants COMT de Poacées comme dans le mutant de maïs *bm3* et de sorgho *bmr12* (Lapierre et al, 1998 ; Barrière et al, 2004 ; Palmer et al, 2008).

Le rôle des protéines similaires aux COMT ou COMT-like reste également à appréhender. Les gènes correspondants sont moins exprimés que *BdCOMT6* mais ils pourraient être exprimés dans des types cellulaires spécifiques ou dans certaines conditions. Par exemple, *AtCOMT2* a été identifiée comme une COMT-like proche des acides hydroxycinnamiques / hydroxycinnamoyl-CoA ester O-méthyltransférase (Li et al, 1997 ; Li et al, 2000 ; Raes et al, 2003 ; Kim et al, 2005).

Les enzymes qui interviendraient dans la synthèse de l'AF lié aux xylanes restent non identifiées. Cette enzyme n'est vraisemblablement pas une COMT classique, impliquée dans la synthèse des unités S de lignines. Puisqu'une hypothèse répandue stipule que l'AF est transféré sur les xylanes sous forme de féruloylCoA nous nous sommes orientés vers l'étude des CCoAOMT chez *B. distachyon*.

Chapitre 4 : Etude de la famille CCoAOMT chez
Brachypodium distachyon

Tableau 36 : Nomenclature utilisée pour nommer les CCoAOMT de *B. distachyon*

Locus	Nomenclature	Nombre d'acides aminés
Bradi1g48370	<i>BdCCoAOMT3</i>	263
Bradi3g39380	<i>BdCCoAOMT4</i>	240
Bradi3g39390	<i>BdCCoAOMT2</i>	242
Bradi3g39400	<i>BdCCoAOMT5</i>	248
Bradi3g39410	<i>BdCCoAOMT6</i>	248
Bradi3g39420	<i>BdCCoAOMT1</i>	245
Bradi4g33340	<i>BdCCoAOMT7</i>	251

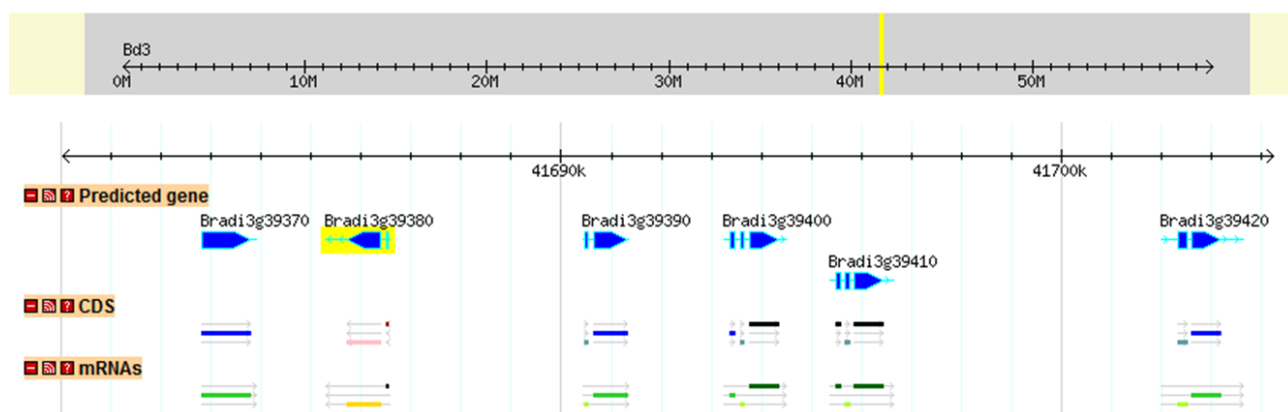


Figure 68 : Positionnement des loci des gènes codant pour une CCoAOMT sur le chromosome 3 de *B. distachyon* (d'après <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/gbrowse/BrachV10/#search>)

4.1. Identification des gènes CCoAOMT de *Brachypodium distachyon*

Chez *B. distachyon*, un BLAST réalisé à partir du gène *AtCCoAOMT1* d'*A. thaliana* (locus : At4g34050) sur le séquençage 8x a permis d'identifier sept membres de la famille des CCoAOMT : Bradi3g39420, Bradi3g39390, Bradi1g48370, Bradi3g39380, Bradi3g39400, Bradi3g39410, et Bradi4g33340 respectivement nommés *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT3*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5*, *BdCCoAOMT6* et *BdCCoAOMT7* (tableau 36).

Parmi ces sept gènes, *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT6* sont situés les uns à la suite des autres sur le chromosome 3 (figure 68). Ils sont sans doute issus de phénomènes de duplications récents. Les gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT6* sont en tandem, *BdCCoAOMT4* (locus : Bradi3g39380) est en orientation inverse, localisé sur le brin d'ADN complémentaire (figure 68).

La structure de ces sept gènes est de trois types (figure 69). Les gènes *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT3* et *BdCCoAOMT6* possèdent un seul intron. Les gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT4* et *BdCCoAOMT5* possèdent deux introns. Le gène *BdCCoAOMT7* possède quatre introns.

Ces sept gènes codant potentiellement une CCoAOMT ont été étudiés en partie dans le cadre du stage master 2 d'Eulalie Lefeuvre que j'ai co-encadré avec Anne-Laure Chateigner-Boutin en 2014.

La traduction des séquences codantes prédites montre que *BdCCoAOMT3* possède un nombre d'acides aminés élevé par rapport à d'autres CCoAOMT bien caractérisées (Phogat et al, 2009), les six autres CCoAOMT de *B. distachyon* possèdent environ 245 acides aminés (tableau 36).

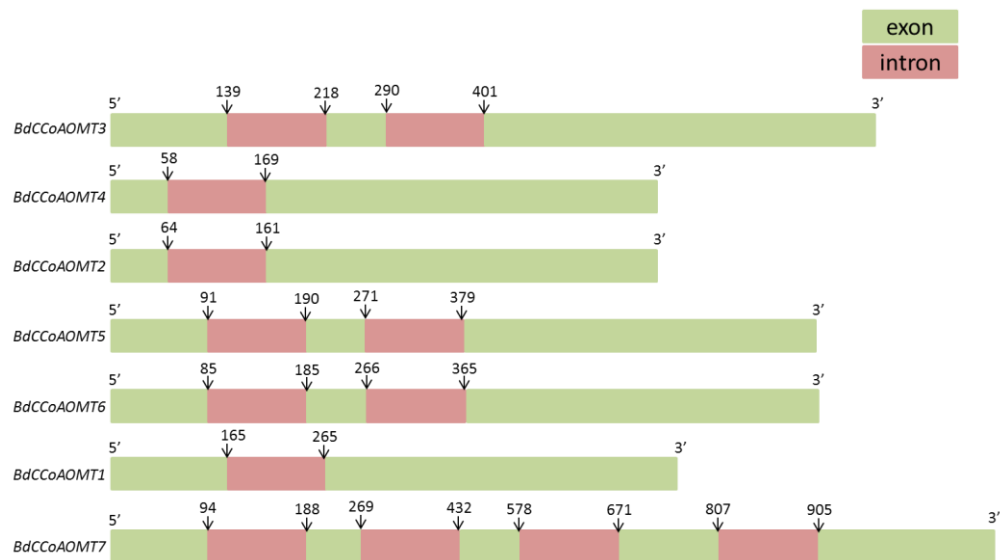


Figure 69 : Représentation de la structure des gènes codant pour une CCoAOMT chez *B. distachyon*.

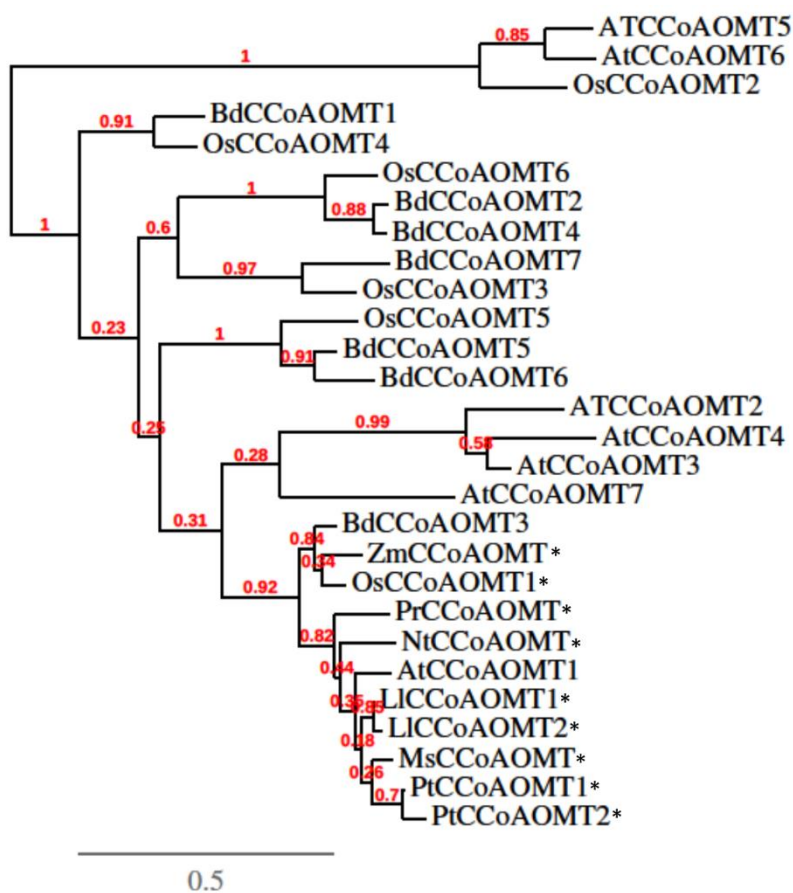


Figure 70 : arbre phylogénétique des CCoAOMT de *A. thaliana*, *B. distachyon* et *O. sativa* réalisé avec www.phylogeny.fr (Muscle, G-Block, PhyML, Bootstrap 100 et TreeDyn) et des CCoAOMT de faux-mimosa (Ll), de luzerne (Ms), de maïs (Zm), de peuplier (Pt), de pin (Pr) et de tabac (Nt).

Astérisque : CCoAOMT dont l'activité a été caractérisée expérimentalement (pour plus de détail voir partie 6.2.2 du Matériel et Méthodes).

4.2. Analyse phylogénétique des CCoAOMT de *Brachypodium distachyon*

Une analyse phylogénétique a été réalisée à partir des séquences protéiques des CCoAOMT de *A. thaliana*, *B. distachyon* et *O. sativa* (figure 70) ainsi que des CCoAOMT de faux-mimosa (*Leucaena leucocephala*), de luzerne, de maïs (ZmCCoAOMT1), de peuplier, de pin et de tabac que l'on sait impliquées dans la synthèse des lignines (Inoue et al, 1998 ; Wagner et al, 2011 ; Li et al, 2013 ; Hoffmann et al, 2001, Pagadala et al, 2009, Phogat et al, 2010).

Les CCoAOMT connues comme étant impliquées dans la synthèse des lignines aussi bien chez les Eudicotylédones comme AtCCoAOMT1 (Li et al, 2000 ; Goujon et al, 2003 ; Do et al, 2007) que chez les monocotylédones comme ZmCCoAOMT1 (Li et al, 2013) sont regroupées dans un embranchement qui comprend BdCCoAOMT3 qui serait donc leur orthologue chez *B. distachyon*. Les autres CCoAOMT de *B. distachyon* sont dans des embranchements qui semblent spécifiques des monocotylédones. BdCCoAOMT3 pourrait constituer un bon candidat pour identifier la CCoAOMT impliquée dans la synthèse des lignines. Par contre, il ne constitue pas un bon candidat si l'on cherche à identifier une enzyme impliquée dans l'acylation de l'acide férulique aux xylanes car il n'y a pas d'acide férulique lié aux xylanes dans les parois d'*A. thaliana* notamment. Les xylanes féruloylés étant caractéristiques des Poacées étudier le groupe de gènes formant le clade spécifique des Poacées et contenant les gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5*, *BdCCoAOMT6* et *BdCCoAOMT7* semble pertinent.

4.3. Analyse des séquences protéiques prédites

Un alignement des séquences protéiques des CCoAOMT de *B. distachyon* a été généré avec les séquences protéiques des CCoAOMT de faux mimosa (LlCCoAOMT1 et LlCCoAOMT2, d'après Pagadala et al, 2009) et celles de peuplier (PtCCoAOMT1 et PtCCoAOMT2, d'après Phogat et al, 2010) afin de vérifier la présence des résidus décrits comme nécessaires à l'activité enzymatique (figure 71). Après identification des résidus du site actif et intervenant dans la liaison aux différents substrats à l'aide du programme CASTp (ou Computed Atlas of Surface Topography of Proteins), la méthode de l'amarrage moléculaire (ou docking en anglais) a été utilisée par les auteurs des deux articles afin de calculer l'orientation préférée des substrats vers les sites précédemment identifiés dans la formation de complexes stables (Dundas et al, 2006 ; Pagadala et al, 2009 ; Phogat et al, 2010).

Caffeoyl-CoA

Feruloyl-CoA

5 H-FeCoA

Sinapoyl-CoA

```
BdCCoAOMT2      -----MTSYRR-----SDSNKLLKSDSILEYLETTVYPREQER 35
BdCCoAOMT4      -----MATYR-----PDRN-TLLASDSILEYLETTVYPREQER 33
BdCCoAOMT7      -----MAATGAGEGKAAAGS-----SVHSKLLKSEQLYQYILESTVFPREP DG 45
BdCCoAOMT5      -----MAAKGGGEQVADVHS-----SERAKLLQSDALYEYLKTMVYPRENEF 44
BdCCoAOMT6      -----MTTGSVANVHVSVMG-----S-TNKLLKSEALYEYLKTMVYPRENEF 42
BdCCoAOMT1      -----MTTGSVANVHSDMD-----S-TNKLLKSDALYKYLDTTVLPREHQC 42
LlCCoAOMT1      -----MAD---QNQSEAG-----RHQEVGHKSLIQSDALYQYILETSVYPREPEP 42
LlCCoAOMT2      -----MAD---QNQSEAG-----RHQEVGHKSLIQSDALYQYILETSVYPREPEP 42
PtCCoAOMT1      -----MATNGEEQQSQAG-----RHQEVGHKSLIQSDALYQYILETSVYPREPEC 45
PtCCoAOMT2      -----MAANGEEQQTQAG-----RHQEVGHKSLIQSDALYQYILETSVYPREPEC 45
BdCCoAOMT3      MATTATDAAATKEQTTNSAGGVGEQKTRHSEVGHKSLIQSDALYQYILETSVYPREHEC 60
                                     : ** * : : * : * : * * * :
```

Caffeoyl-CoA

Feruloyl-CoA

5 H-FeCoA

Sinapoyl-CoA

```
BdCCoAOMT2      VRELRLITQQHQSIMGSSPDQMQFFSVLLKMMGAEKAVEGVFTGYSLLCTALALPAHG 95
BdCCoAOMT4      VRELRLITQRHRSYMGSSPDQMQFFSVLLKMTGAVKAVEGVFTGYSLLCTALALPAHG 93
BdCCoAOMT7      LRELRLATASYEGARMAAAPDQVQLFGLLIEMLGARNTIEVGVFTGYSLLATALALPHDG 105
BdCCoAOMT5      QRELRLITKEHSYGFMSPPDEAQLLSLLKLTGAKNTIEVGVYTGCSVLATALAIPDDG 104
BdCCoAOMT6      MRELRLITMEHAYGFMSPPDEAQLLSLLKLTGAKNTIEVGVYTGCSVLATALAIPDDG 102
BdCCoAOMT1      MRDLRLVTDQHKWGFMQSSADEAQLLGMLIKMSGAKNTIEVGVFTGYSLLATALALPEDG 102
LlCCoAOMT1      MKELREITAKHPWNIMTTSADEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPEDG 102
LlCCoAOMT2      MKEIREITAKHPWNIMTTSADEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALALPEDG 102
PtCCoAOMT1      MKELREVTAKHPWNIMTTSADEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVYTGYSLLATALAIPEDG 105
PtCCoAOMT2      MKELRELTAKHPWNIMTTSADEGQFLNMLLKLINAKNTMEIGVFTGYSLLATALAIPEDG 105
BdCCoAOMT3      MKELREVTANHFWNIMTTSADEGQFLNMLLKLIGAKKTMEIGVYTGYSLLATALALPADG 120
                                     : : * * : * : : : : : : * : : : : : : * : : : : : *
```

Caffeoyl-CoA

Feruloyl-CoA

5 H-FeCoA

Sinapoyl-CoA

```
BdCCoAOMT2      -----KVVGIDVNRD-YYELGRPVIEKAGVAHKVD 124
BdCCoAOMT4      -----KVVGIDVNRD-YYELGRPVIEKAGVAHKVD 122
BdCCoAOMT7      -----KVVAIDVSRESYDEIGSPVIHKAGMAHKID 135
BdCCoAOMT5      -----KIVAIIDINRD-YFDMGLPVIKAGVAHKVD 133
BdCCoAOMT6      -----KIVAIIDVRRD-YFDMGLPVIKAGVAHKVD 131
BdCCoAOMT1      -----KVVAIDPDRE-CYEVGKPFIEKAGVAHKVD 131
LlCCoAOMT1      -----KILAMDTINRE-NYELGLPVIKAGVAHKIE 131
LlCCoAOMT2      -----KILAMDTINRE-NYELGLPVIKAGVAHKIE 131
PtCCoAOMT1      -----KILAMDTINRE-NYELGLPVIKAGVAHKID 134
PtCCoAOMT2      -----KILAMDTINRE-NYELGLPVIKAGLEHKIE 134
BdCCoAOMT3      TVSPPIQSNPIKSNQSPQINLNSVQTEIEMQILAMDTINRE-NYELGLPCIEKAGVAHKID 179
                                     : : : : * * : : * * * : : : : :
```

La protéine BdCCoAOMT3 possède le plus d'acides aminés conservés (figure 71) soit vingt-neuf des trente résidus formant le site actif ainsi que onze des douze résidus impliqués dans la liaison au cafféoyl-coA (le douzième étant remplacé par un acide aminé aux caractéristiques similaires à celui des CCoAOMT de peuplier et de faux mimosa) mais également tous les acides aminés impliqués dans la liaison au féruloyl-coA, au 5-hydroxyféruloyl-coA et au sinapoyl-coA. Les autres CCoAOMT possèdent moins de résidus conservés impliqués dans la formation du site actif et moins de résidus impliqués dans la liaison aux quatre substrats étudiés (figure 71). Il est possible que ces CCoAOMT interagissent avec d'autres substrats qui ne sont pas présentés ici. Une spécificité de substrat pourrait expliquer la présence de sept CCoAOMT chez *B. distachyon*.

En conclusion, la protéine BdCCoAOMT3 présente toutes les caractéristiques des CCoAOMT connues et bien caractérisées chez d'autres espèces. Les protéines BdCCoAOMT1, BdCCoAOMT2, BdCCoAOMT4, BdCCoAOMT5, BdCCoAOMT6 et BdCCoAOMT7 ont conservé une partie des résidus impliqués dans le site actif des CCoAOMT mais peu de résidus identifiés comme interagissant avec les substrats connus.

4.4. Expression des gènes codant pour une CCoAOMT dans les différents tissus de *Brachypodium distachyon*

Afin de choisir les gènes candidats à cibler en génétique inverse, une étude de l'expression des différents gènes dans les tiges et dans les grains en cours de développement a été réalisée.

4.4.1. Données Affymetrix

Selon les données d'hybridation sur puces Affymetrix (figure 72), dans les tiges à 60 JAG, tous les gènes codant pour une CCoAOMT sont exprimés dans le nœud et l'entrenœud. Il en est de même dans le grain entier et dans l'albumen à 11 JAA puis à 31 JAA. Il n'y a pas de données disponibles sur la plateforme PlaNet concernant l'expression de *BdCCoAOMT1* dans la tige et le grain.

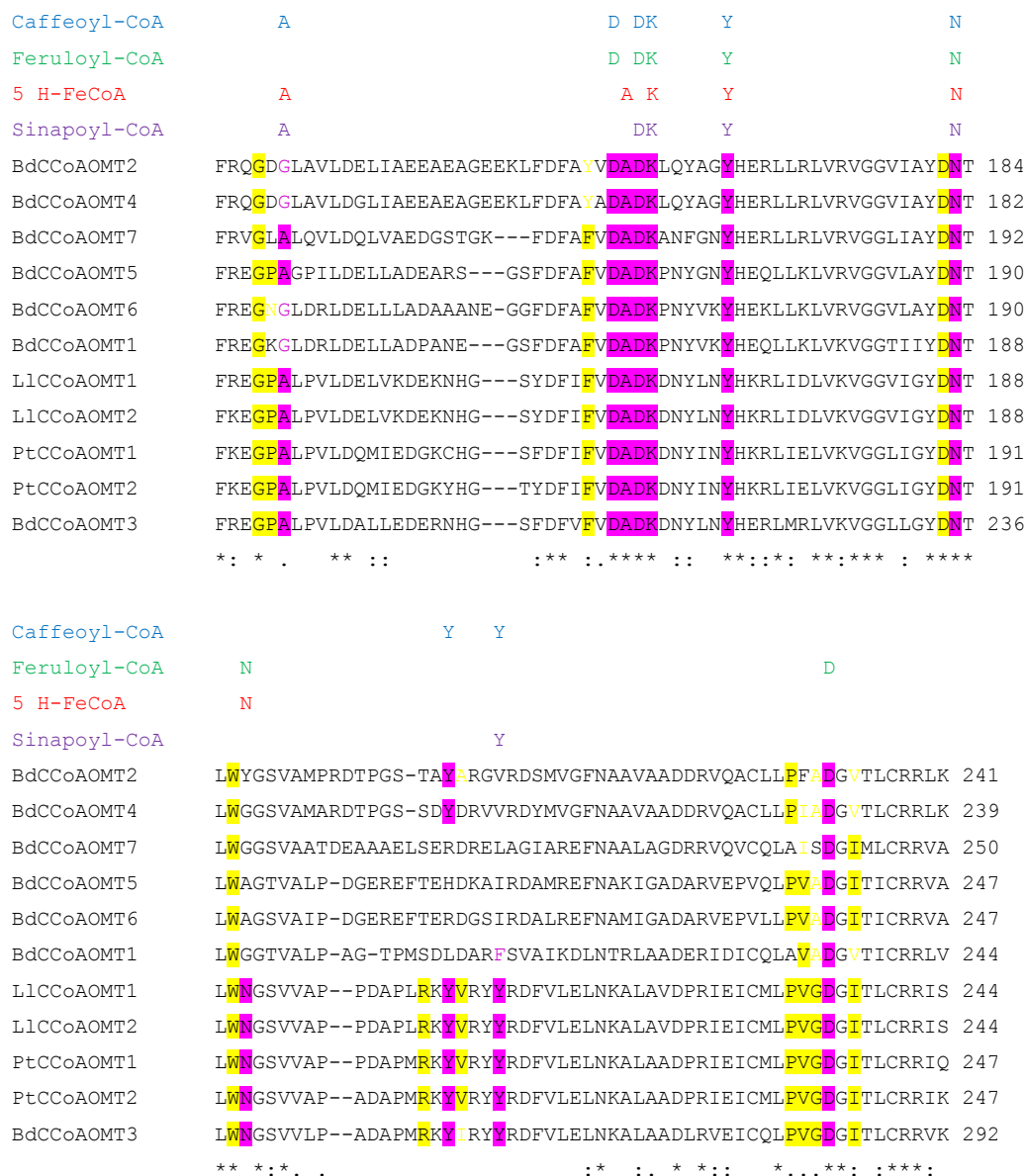


Figure 71: Alignement des séquences protéiques des CCoAOMT de *B. distachyon*, du peuplier (*Populus trichopora*) et du faux mimosa (*Leucaena leucocephala*) par CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment.

Les acides aminés surlignés en jaune correspondent aux résidus du site actif et les acides aminés surlignés en violet aux résidus permettant l'interaction avec les différents substrats (caféoyl-coA, féruloyl-coA, 5-hydroxyféruloyl-coA et sinapoyl-coA). Les lettres en jaune et en violet chez les isoformes indiquent qu'il y a modification de l'acide aminé mais conservation des caractéristiques physicochimiques. En italique et surligné en bleu, exon dans la forme BdCCoAOMT3.1 et intron dans la forme BdCCoAOMT3.2 dont les données de RT-PCR attestent l'existence de transcrits des deux formes. Astérisque : Acide aminé identique chez toutes les CCoAOMT étudiées ; deux points : acide aminé dont les caractéristiques physicochimiques sont conservées chez toutes les CCoAOMT étudiées.

4.4.2. RT-PCR

Des RT-PCR ciblant les sept gènes codant pour une CCoAOMT ont été réalisées à partir de différents tissus (racines de plantules, parties aériennes de plantules, tiges à 60 JAG, grains à 21 JAA et grains matures secs) afin de vérifier leur expression.

Tous les gènes *BdCCoAOMT* s'expriment dans la partie racinaire et la partie aérienne des jeunes plantules (figure 73). Tous les gènes *BdCCoAOMT*, à l'exception de *BdCCoAOMT7*, s'expriment dans la tige. Dans le grain sec, seule l'expression de *BdCCoAOMT5* a été détectée alors que *BdCCoAOMT3*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT1* s'expriment dans le grain en cours de développement.

Les RT-PCR conduites avec des amorces permettant d'amplifier l'ORF pleine longueur ont également permis de détecter la présence de plusieurs formes de transcrits pour un même gène, correspond aux formes 2 des gènes proposées (figure 73). La taille variable des transcrits est observée chez les sept gènes et l'abondance d'un transcrit par rapport à l'autre dépend de l'organe étudié. Cette taille variable est vraisemblablement due à la rétention d'intron, un processus déjà décrit chez *B. distachyon* (Sablok et al 2011).

La rétention d'un ou plusieurs introns introduit un codon stop prématurément selon les prédictions de séquences pour tous les gènes sauf pour *BdCCoAOMT3* ou la rétention du dernier intron permet l'incorporation de plusieurs acides aminés supplémentaires mais pas de décalage de cadre de lecture. Il se pourrait donc que les deux formes soient fonctionnelles. D'ailleurs sur le site <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/gbrowse/BrachV10/#search>, il y a deux modèles géniques pour le locus Bradi1g48370 (*BdCCoAOMT3*) : Bradi1g48370.2 dont l'ORF correspond au modèle à deux introns épissés et Bradi1g48370.1 dont l'ORF correspond à un modèle à un intron (où le second intron n'est pas épissé). On peut noter également que pour ce gène et selon les tissus analysés le variant d'épissage qui semble le plus représenté diffère, ainsi la forme correspondant à Bradi1g48370.1 semble prépondérante dans la partie aérienne des plantules et l'autre variant semble prépondérant dans les autres tissus analysés.

Figure 72 : Quantification de l'expression des gènes codant pour une CCoAOMT par hybridation sur puce Affymetrix dans la tige à 60JAG, le grain entier et l'albumen à 11 et 31 jours après anthèse.

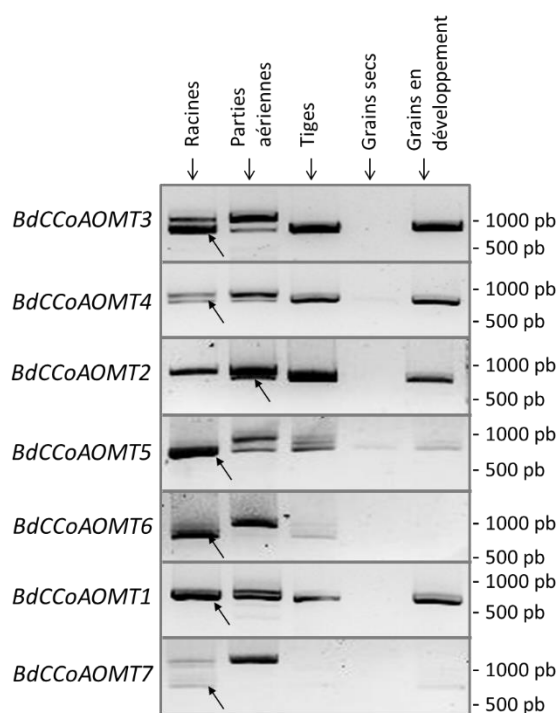
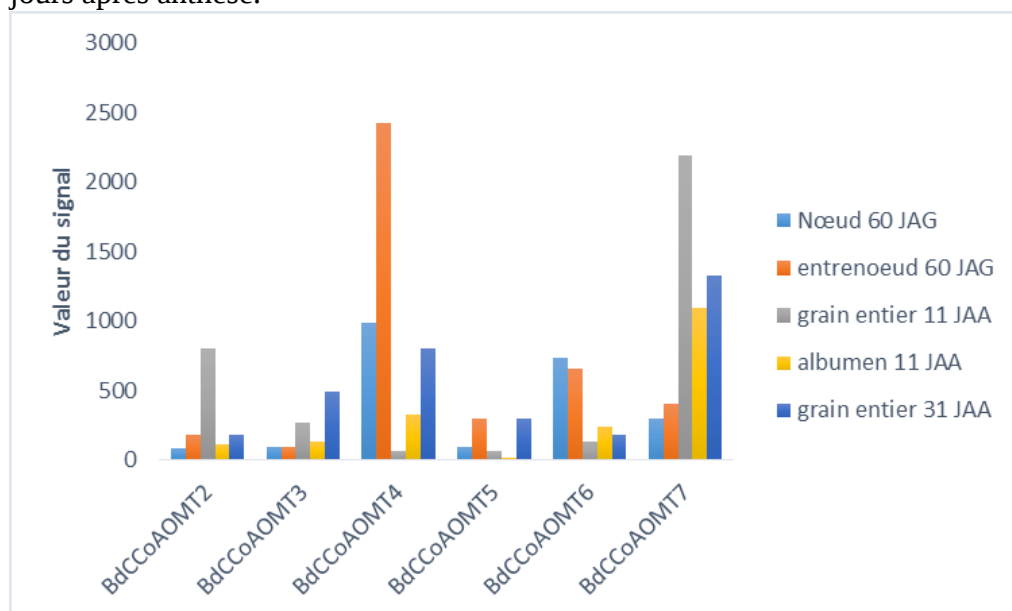


Figure 73 : expression des sept CCoAOMT dans les différents organes de *B. distachyon* (Bd21-3)

Les tailles attendues pour une forme d'épissage complète sont indiquées par une flèche noire.

Une étude des différentes formes d'épissage chez *B. distachyon* montre que dans 53% des cas analysés il y a rétention d'introns. La rétention d'intron ayant un impact fort sur l'activité des protéines traduites, il a été proposé que ce phénomène soit un mode de régulation de l'expression des gènes chez *B. distachyon* (Sablok et al, 2011) comme chez d'autres espèces végétales (Reddy et al, 2013). La rétention d'intron est proposée comme mécanisme de régulation de l'expression des gènes chez les végétaux au cours du développement ou en réponse à un stress en modifiant la composition et la stabilité de la protéine obtenue, son transport et sa localisation cellulaire (Reddy et al, 2013).

Selon les résultats obtenus par RT-PCR, des transcrits fonctionnels bien représentés dans les organes que nous ciblons (la tige et le grain en développement) sont détectés pour les gènes *BdCCoAOMT3*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4* et *BdCCoAOMT1*. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par hybridation sur les puces Affymetrix. Ceci pourrait être expliqué par la différence de génotype utilisé (nous avons travaillé en RT-PCR sur le génotype Bd21-3 et les puces ont été faites à partir d'ARN extraits de l'accèsion Bd21). Les stades étudiés, les méthodes de culture, de prélèvement et d'analyse de données pourraient expliquer également les différences obtenues ainsi que le choix des amorces utilisées.

4.5. Analyse de mutants d'insertion

La stratégie privilégiée pour obtenir des mutants était l'obtention de mutants d'insertion pour nos gènes candidats puisque l'insertion dans la phase codante du gène provoque en général l'extinction du gène. Une recherche de mutants d'insertion dans les collections (USDA-ARS, Western Regional Research Center d'Albany, Bragg et al, 2012) a révélé l'existence de mutants d'insertion ADN-T seulement pour les gènes *BdCCoAOMT3* et *BdCCoAOMT5* (tableau 37). Les lignées correspondantes ont été commandées. Les graines obtenues provenaient de cultures en lots ou « bulk » (c'est-à-dire issues de la récolte de plusieurs plantes de la même lignée). Dans le but d'éliminer les plantes ne possédant pas l'ADN-T qui contient le gène de résistance à l'hygromycine *hpt* (l'hygromycine B phosphotransférase), les graines issues des cultures en « bulk » ont d'abord été cultivées sur un milieu contenant de l'hygromycine B, un antibiotique capable d'inhiber la croissance de cellules eucaryotes. Le gène *hph* (aussi appelé *hpt*) code pour l'hygromycine B phosphotransférase, enzyme permettant d'inactiver l'hygromycine B.

Tableau 37 : Liste des lignées mutées identifiées pour les gènes codant pour une CCoAOMT chez *B. distachyon*.

ND : Non déterminé.

Lignée	Gène affecté	Méthode de détection de l'ADN-T	Position décrite de l'insertion
JJ5276b.0	<i>BdCCoAOMT3</i>	Sanger	ND
JJ10732.2	<i>BdCCoAOMT3</i>	Illumina	Intergénique
JJ12967.0	<i>BdCCoAOMT3</i>	Illumina	Intergénique
JJ6117	<i>BdCCoAOMT3</i>	Illumina	Exon
JJ10655	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10560	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10572	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10606	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10617	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10629	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10594	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10641	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon
JJ10666	<i>BdCCoAOMT5</i>	Illumina	Exon

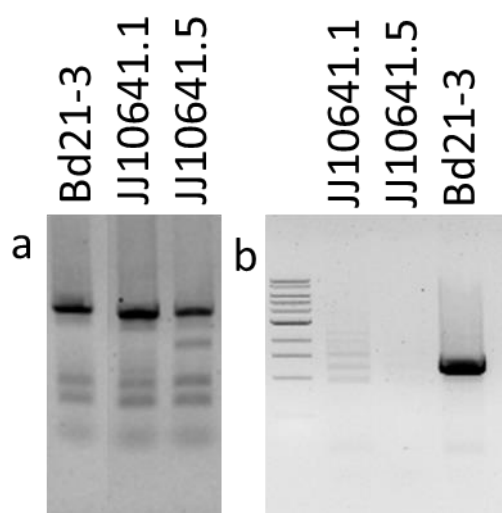


Figure 74 : Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée JJ10641 par PCR.

a : amplification avec les amorces *BdCCoAOMT5_ATG* et *BdCCoAOMT5_STOP* (amplification de l'ORF), b : amplification avec les amorces 39400fw1 et 39400rev1 (amplification du 5'UTR).

Après avoir exclu les lignées JJ5276b, JJ10732, JJ12967, JJ10655, JJ10560, JJ10572, JJ10606, JJ10629 et JJ10666 puisque celles-ci n'ont pas germé en présence d'hygromycine, nous nous sommes concentrés sur les lignées JJ6117, JJ10617, JJ10641 et JJ10594.

Un séquençage Illumina avait permis de détecter et de localiser grâce au site <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/gbrowse/BrachV10/#search> les inserts dans ces lignées. Selon ce site, la position de l'insert ADN-T dans la lignée JJ6117 était localisée, dans le deuxième intron du gène *BdCCoAOMT3*, intron qui est épissé dans la forme Bradi1g483370.2 et retenu dans la forme Bradi1g483370.1. La position de l'insert ADN-T dans les lignées JJ10617, JJ10641 et JJ10594 était décrite comme « exon » mais localisée sur le génome browser dans le 5'UTR du gène *BdCCoAOMT5*.

Les insertions dans les plantes résistantes à l'hygromycine ont été vérifiées par PCR à l'aide de plusieurs couples d'amorces (figures 74 et 75).

Une première PCR utilisant un couple d'amorces amplifiant l'ORF a permis d'obtenir une taille de produit PCR pour les mutants JJ10641.1 et JJ10641.5 identique à celle attendue chez le sauvage Bd21-3 (figure 74 a). Une PCR utilisant des amorces s'hybridant dans la région 5'UTR du gène a révélé une différence entre le sauvage et les mutants d'insertion (figure 74 b). Alors que la PCR réalisée sur l'individu sauvage a donné un produit de la taille attendue, aucune amplification n'a été obtenue pour les mutants. Ces PCR ont confirmé que l'insertion de l'ADN-T est localisée dans le 5'UTR du gène *BdCCoAOMT5* pour la lignée JJ10641.

Des PCR ont été réalisées sur l'individu JJ6117 et le sauvage Bd21-3 en utilisant des amorces amplifiant l'ORF et les UTR. Ces PCR n'ont pas montré de différence entre les deux individus étudiés (figure 75 parties a et b). Une PCR réalisée avec une amorce s'hybridant sur l'ADN-T et une amorce s'hybridant en 3' du gène a permis de détecter la présence de l'insert en aval du gène (figure 75 c).

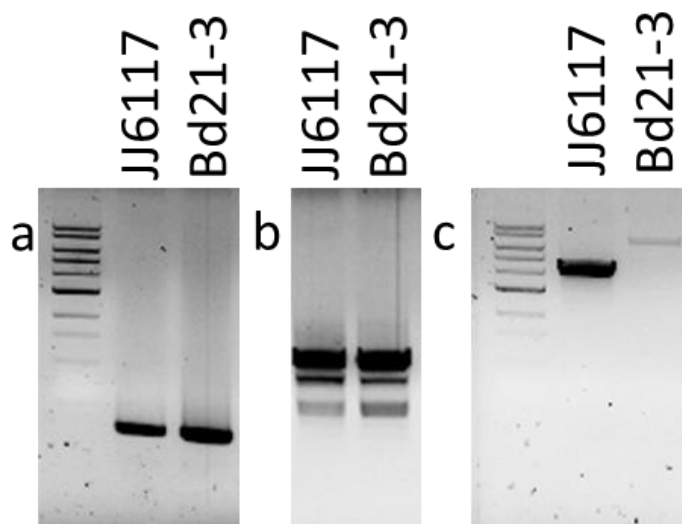


Figure 75 : Localisation de l'insertion ADN-T dans la lignée JJ6117 par PCR.

a : amplification avec les amorces 48370fw3 et 48370rev1 (amplification du 5'UTR), b : amplification avec les amorces *BdCCoAOMT3*_ATG et *BdCCoAOMT3*_STOP (amplification de l'ORF), c : amplification avec les amorces 48370fw4 et Hygfinrev (amplification de l'ADN-T en aval du gène).

Aucune lignée ne contient une insertion dans la phase codante des gènes. Une RT-PCR quantitative a été réalisée sur la lignée JJ10641 mais elle n'a pas montré de différence d'expression du gène *BdCCoAOMT5* entre la lignée sauvage Bd21-3 et la lignée ADN-T étudiée. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre l'analyse de ces lignées.

4.6. Construction de mutants ciblant les CCoAOMT

Puisqu'il n'y avait pas de mutants T-DNA disponibles pour les gènes *BdCCoAOMT1*, 2, 4, 6 et 7, nous avons mis en place en parallèle une autre approche de génétique inverse. Les gènes candidats retenus étant nombreux mais de séquences relativement proches, nous avons choisi de mettre en place une stratégie d'interférence ARN (RNAi) afin de les éteindre.

Dans ce but des lignées de *B. distachyon* transgéniques ont été produites. Une stratégie de microARN artificiel (amiARN) a été mise en place (Schwab et al. 2006 ; Warthmann et al. 2008). Il s'agit d'utiliser le microARN naturel du riz OsamiR528 et de le modifier pour y intégrer une séquence ciblant nos gènes d'intérêt (figure 76 a). Cette séquence est obtenue par analyse sur le site internet « Web microRNA designer » (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) (figure 76 c).

Le plasmide contenant OsamiR528 est modifié par des PCR successives avec des amorces permettant de modifier le microARN initial afin d'intégrer les séquences ciblant le ou les gènes ciblé(s) (figure 76 b).

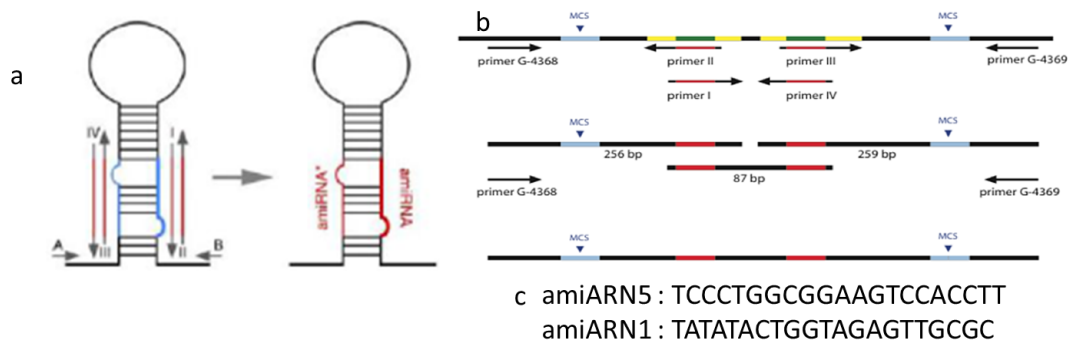


Figure 76 : Modification d'OsamiR528 en amiARN1 et amiARN5 (issu de <http://wmd2.weigelworld.org>).

A : OsamiR528 et localisation (en bleu sur la figure de gauche) des séquences importantes pour l'interférence ARN et modifiées (en rouge sur la figure de droite) pour cibler le ou les gènes d'intérêt (Schwab et al, 2006) ; B : PCR à réaliser afin de modifier OsamiR528 et d'y incorporer les séquences d'intérêt (pour plus de détails, voir partie 6.4.3 du Matériel et Méthodes) ; C : séquences à utiliser pour modifier OsamiR528.

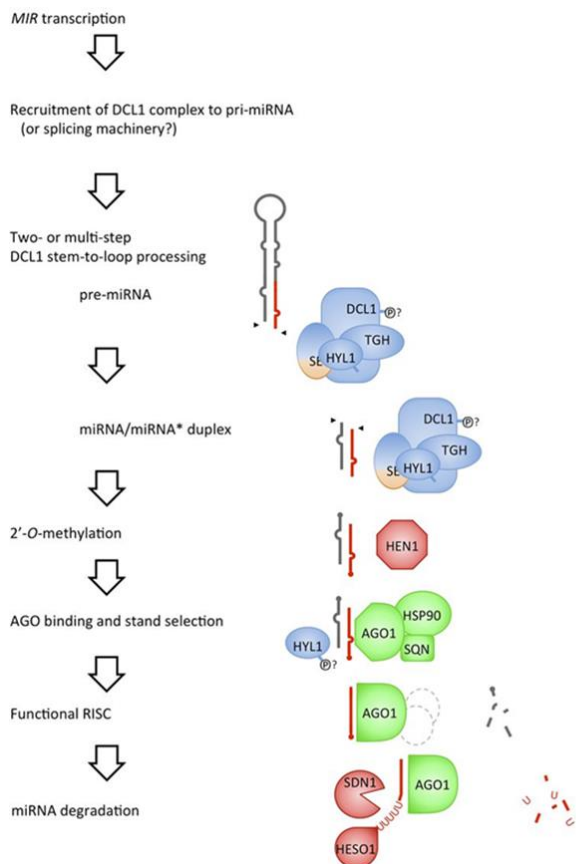


Figure 77 : Fonctionnement d'un miARN au sein d'une cellule végétale (Rogers & Chen, 2013).

Le transgène s'exprime sous forme d'un précurseur, le pri-miARN. Une fois dans le cytoplasme, ce précurseur va être pris en charge par le complexe DICER (formé par les protéines DCL1, HYL1, TGH et SE) qui va produire des microARN de 21 à 24 nucléotides. Ces derniers sont 2'-O-méthylés par la protéine HEN1 à l'extrémité 3' et, en présence du complexe RISC (formé par les protéines AGO1, HSP90 et SQN), vont interférer avec les transcrits des gènes cibles. Les mi-ARN vont alors provoquer une diminution de la quantité des ARN cibles en entraînant leur dégradation ou une répression de la traduction des ARNm cibles. Lorsque la protéine HESO1 s'accroche à l'extrémité 3' des mi-ARN, ces derniers sont déstabilisés et SDN1 peut venir les dégrader.

La construction modifiée est ensuite intégrée dans un vecteur binaire pour transformer *B. distachyon* via *Agrobacterium tumefaciens*. Le gène du microARN artificiel est alors intégré dans le génome de la plante où il va s'exprimer et pouvoir interférer avec les transcrits du gène cible (figure 77).

Deux amiARN, nommés amiARN1 et amiARN5, ont été construits (figure 76 c). L'amiARN1 ne cible qu'un seul gène (*BdCCoAOMT7*) et l'amiARN5 cible cinq gènes (*BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT5*, *BdCCoAOMT6* et *BdCCoAOMT1*).

La région ciblée par l'amiARN1 dans l'ORF de *BdCCoAOMT7* est représentée en figure 78. De même pour les régions ciblées par l'amiARN5 pour les gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT6*.

Nous n'avons pas construit de lignée amiARN ciblant le gène *BdCCoAOMT3* car nous avons obtenu des lignées de la banque de mutants d'ADN-T de l'USDA-ARS prometteuses pour ce gène. Nous ne savions pas encore que l'insertion n'était pas positionnée dans la partie codante du gène et n'affecterait pas son expression.

Les amiRNA ont été clonés dans deux vecteurs. Le vecteur pIPKb2 (Himmelbach et al. 2007) permet leur expression dans toute la plante sous le contrôle du promoteur fort et ubiquitaire ZmUBI, promoteur du gène codant l'ubiquitine de maïs. Le pHbm42GW7 permet une expression localisée dans l'albumen du grain sous le contrôle du promoteur BdGLU, promoteur du gène Bradi4g28220 codant pour l'une des gluténines de *B. distachyon*, protéines spécifiques de l'albumen (Coussens et al, 2012, figure 79).



Figure 78 : Localisation des régions ciblées par l'amiARN1 sur le gène *BdCCoAOMT7* (locus Bradi4g33340) et l'amiARN5 sur les gènes *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT5*, *BdCCoAOMT6* et *BdCCoAOMT1* (locus Bradi3g39380, Bradi3g39390, Bradi3g39400, Bradi3g39410 et Bradi3g39420).

Les constructions obtenues ont ensuite été insérées dans *A. tumefaciens* avant d'être utilisées afin de transformer des cals embryogènes de *B. distachyon* selon la méthode publiée par Vogel et Hill en 2008 (figure 80). Ceci a été réalisé avec l'aide du Dr. Oumaya Bouchabke-Coussa et de Camille Soulhat à l'INRA de Versailles (IJPB, équipe biologie cellulaire, régénération) et avec l'appui d'Eulalie. Les graines obtenues des plantes transformées et régénérées sont récoltées et correspondent à la génération T1.

Plusieurs étapes sont limitantes lors de la transformation de *B. distachyon*. Tout d'abord le nombre d'embryons prélevés doit être très important afin de s'assurer de l'obtention de plusieurs plantes à la fin de toutes les étapes (environ 150 embryons sont nécessaires pour une seule transformation). L'étape de co-culture avec *A. tumefaciens* peut entraîner la perte de plusieurs boîtes de cals embryogènes lorsque les cals ont été mal séchés entraînant une croissance trop rapide des bactéries. Du fait de l'épuisement des milieux de cultures, différentes étapes de repiquages sont nécessaires et elles peuvent entraîner des contaminations et par conséquent, la perte de cals embryogènes. Enfin, les cals sont extrêmement sensibles à la température et à l'hygrométrie ambiante et un simple changement de chambre de culture peut entraîner leur mort.

Dans un premier temps, les constructions amiARN5 et amiARN1 sous le contrôle du promoteur ubiquitine et sous le contrôle du promoteur gluténine ont été introduites via *Agrobacterium tumefaciens* dans des embryons immatures de *B. distachyon* mutants 5139 pour générer des double-mutants pour la COMT et les CCoAOMT. En descendance, des plantes auraient été mutantes pour le gène BdCOMT6 et auraient contenu la construction ciblant les cinq gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT6*. Les enzymes COMT et CCoAOMT sont des enzymes versatiles pouvant O-méthyler en position C3 et C5. Un double mutant nous aurait permis de vérifier l'implication des CCoAOMT dans une potentielle complémentarité de la baisse d'activité de la COMT due à la mutation 5139. Cependant, les embryons issus des mutants 5139 se sont révélés être peu embryogènes. Nous n'avons pas obtenu de plantes transgéniques.

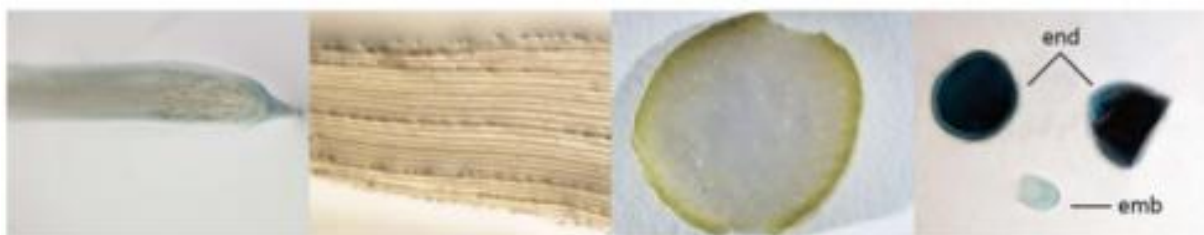


Figure 79 : Racine, feuille, tige et grain de Bd21-3 contenant une construction GUS sous contrôle d'un promoteur BdGLU du gène codant une gluténine de *B. distachyon*.
end : albumen. Issu de Coussens et al, 2012.

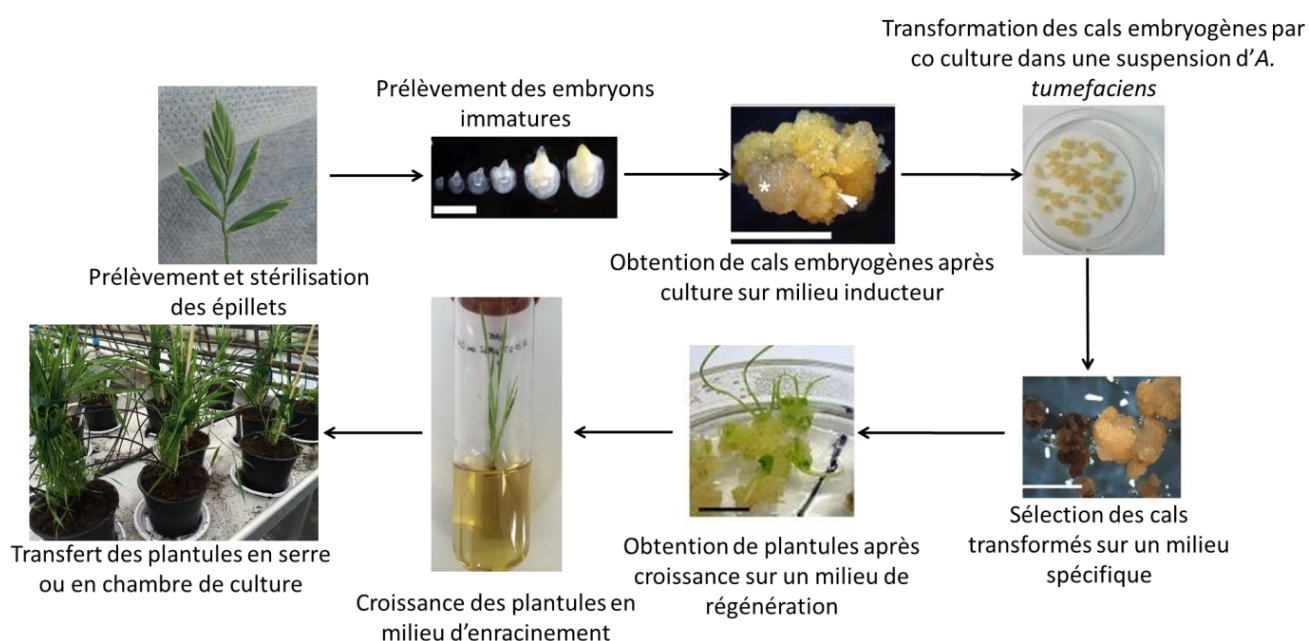


Figure 80 : transformation stable de *B. distachyon* par *A. tumefaciens* (adapté de Vogel et Hill, 2008).

A partir d'épillets âgés de deux à trois semaines et stérilisés, de nombreux embryons immatures sont prélevés et cultivés sur un milieu permettant l'induction et l'obtention de cals embryogènes. Au bout de six semaines de culture, les cals obtenus sont placés dans une suspension d'*A. tumefaciens* contenant l'insert que l'on souhaite intégrer au génome de *B. distachyon*. Après quelques minutes, les cals sont séchés sur du papier filtre avant d'être placés sur un milieu permettant la sélection des cals transformés. Au bout de quatre semaines, deux types de cals sont observés : les cals noirs correspondent à ceux qui ne sont pas résistants au milieu de sélection et qui ne contiennent donc pas l'insert alors que les cals verts sont bien résistants au milieu et donc bien transformés. Ces derniers sont transférés sur un milieu de régénération afin d'obtenir des plantules. Au bout de plusieurs semaines, les plantules obtenues sont transférées d'abord sur un milieu d'enracinement favorisant la pousse des racines puis en pot. Elles sont ensuite transférées en serre ou en chambre de culture afin de donner des graines.

La même expérience a été envisagée sur une lignée hétérozygote pour la mutation 5139 et 7549. Une plante de la lignée 7549 avait été sélectionnée mais nous avons été confrontés à un problème de stérilité des graines.

A la vue des difficultés rencontrées et pour des contraintes de temps, nous nous sommes concentrés sur la transformation d'embryons issus de plantes sauvages Bd21-3 par deux des quatre constructions prévues initialement. Il s'agit des constructions correspondant à l'amiARN5 ciblant les gènes *BdCCoAOMT1*, *BdCCoAOMT2*, *BdCCoAOMT4*, *BdCCoAOMT5* et *BdCCoAOMT6* sous le contrôle soit du promoteur ZmUBI soit du promoteur BdGLU au cas où la construction de surexpression ubiquitaire serait létale.

3.7. Analyses des plantes transgéniques amiARN5

Au début de l'année 2015, sept lignées ont été obtenues pour la construction amiARN5 sous le contrôle du promoteur ZmUBI et dix-neuf lignées ont été obtenues pour la construction amiARN5 sous le contrôle du promoteur BdGLU.

La seconde génération de plantes (T2) est en cours d'analyse.

Des analyses ont été conduites sur les lignées contenant la construction sous le promoteur ubiquitaire.

Afin de vérifier l'interférence ARN, des RT-PCR ont été réalisées sur les tiges des lignées amiARN CCoAOMT5 sous le contrôle du promoteur ZmUBI en ciblant *BdCCoAOMT4*, une CCoAOMT bien exprimée dans les tiges d'après les résultats d'hybridation sur puce Affymetrix et de RT-PCR (voir figures 72 et 73). Ces RT-PCR montrent qu'il y a des variations du niveau de transcrits *BdCCoAOMT4* mais pas d'extinction de l'expression (figure 82). Plusieurs lignées ont montré une diminution de l'expression du gène *BdCCoAOMT4* dont les lignées 522, 532 561 et 562 (figure 81) que nous avons sélectionnées pour réaliser des analyses complémentaires.

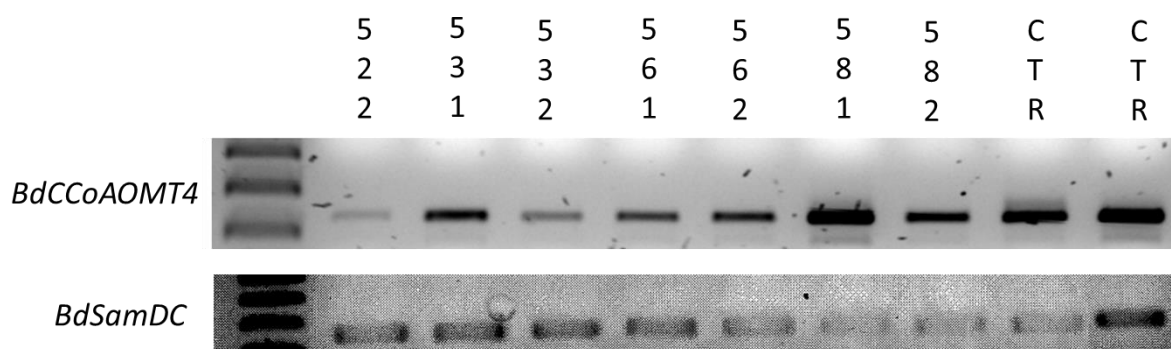


Figure 81 : Expression du gène *BdCCoAOMT4* et du gène de ménage *BdSamDC* dans les tiges des lignées transformées avec amiARN5.

Ctr : contrôle sauvage Bd21-3.

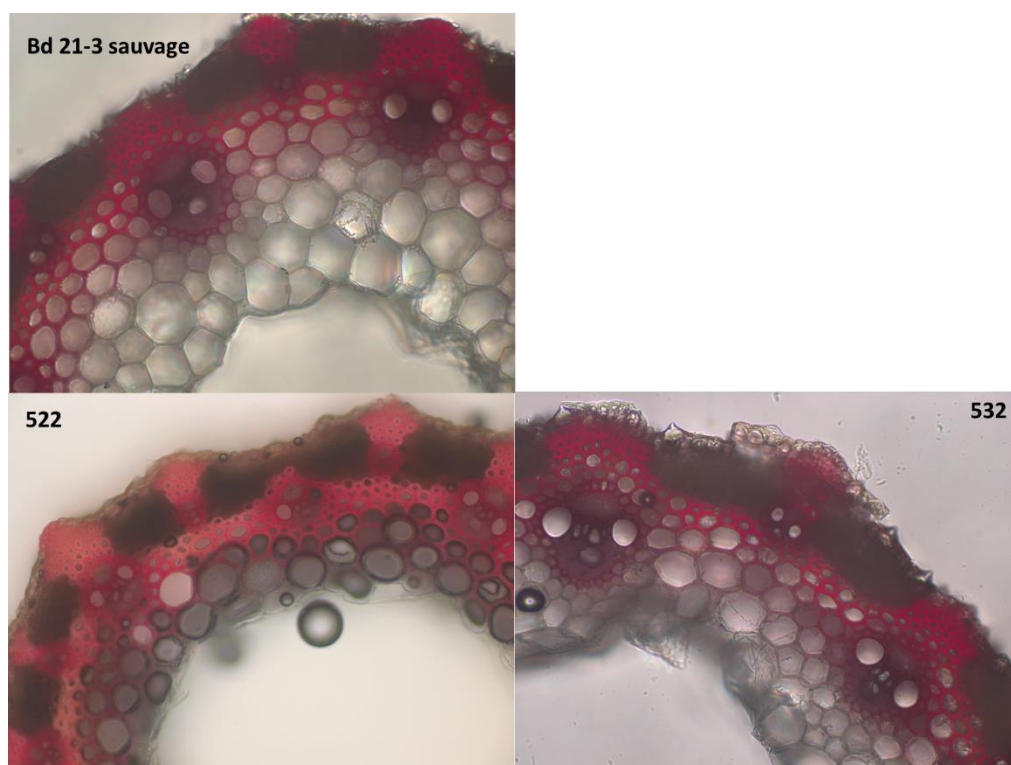


Figure 82 : Observation de la lignification des tiges des individus T2 après coloration au phloroglucinol-HCl.

Sections de tige de lignées *B. distachyon* Bd21-3 sauvage et exprimant l'amiARN5 (plantes 522 et 532) colorées au phloroglucinol. Les tiges ont été observées au grossissement x20.

Des colorations au phloroglucinol-HCl ont été réalisées sur des sections de tiges des individus T2 (figure 81). Nous avons observé une coloration indiquant la présence de lignines dans les faisceaux vasculaires, le sclérenchyme et l'épiderme chez le sauvage mais également chez tous les transformants. Il n'y a pas de différence majeure de lignification observable entre le sauvage et les T2 (figure 81).

La composition en lignines des tiges des transformants de la seconde génération a été analysée par la méthode du bromure d'acétyle (tableau 38). Les taux de lignines sont semblables pour les transformants et les témoins sauvages. Une légère baisse de la teneur en lignines est mesurée pour les plantes issues de la lignée 53 (plantes 531 et 532). L'effet sur les autres transformants n'est pas visible.

La composition des tiges des plantes transgéniques issues des transformations en acides hydroxycinnamiques, pAC et acide férulique liés par des liaisons de type esters dans les parois des cellules végétales, a été mesurée par hydrolyse alcaline douce.

Tous les échantillons analysés contiennent des esters d'acide férulique (tableau 39). Des variations de quantité d'acide férulique sont observées mais elles ne sont pas très importantes. Les variations de quantité d'pAC sont, elles, importantes : dans la lignée 53 (plantes 531 et 532) la teneur en pAC, correspond à 150% de celle du sauvage correspondant. L'hydroxybenzaldéhyde pourrait venir d'une légère oxydation de l'pAC, car ces deux composés varient parallèlement. La teneur en acide férulique, en vanilline, en syringaldéhyde diminue dans les plantes de la seconde génération issues de la lignée 53. La diminution de vanilline et de syringaldéhyde pourrait provenir d'une dégradation des lignines, ce qui confirmerait la tendance observée sur la teneur en ABL. Une hypothèse serait que l'pAC s'accumulerait en amont de la CCoAOMT.

A ce stade, il semblerait que la transformation par l'amiARN CCoAOMT5 de façon ubiquitaire ne provoque pas d'effet drastique sur la teneur en ester d'acide férulique. La lignée 53 semble néanmoins présenter des anomalies de lignification et d'acylation.

Les lignées contenant la construction sous le contrôle du promoteur ciblant l'interférence ARN dans le grain seront analysées dans un second temps.

Tableau 38 : Dosage des lignines contenues dans les tiges des lignées T2 amiARN CCoAOMT5.

Les valeurs sont données en % de lignines de bromure d'acétyle.

Lignées	% ABL
Sauvage	20,75 ± 0,60
522	19,75
531 et 532	18,77 ± 0,33
561 et 562	20,02 ± 0,65
581 et 582	19,51 ± 0,07

Tableau 39 : Dosage des composés phénoliques présent dans les parois des tiges des transformants amiARN CCoAOMT5 de génération 2.

Les valeurs sont données en mg/g de RP. pAC : pAC, AF : acide férulique, V : vanilline, S : syringaldéhyde, B : hydroxybenzaldéhyde.

Lignées	pAC	AF	V	S	B
Sauvage	4,63 ± 0,15	4,42 ± 0,25	0,398 ± 0,042	0,137 ± 0,022	0,074 ± 0,010
522	5,82 ± 0,06	5,22 ± 0,10	0,348 ± 0,025	0,163 ± 0,012	0,118 ± 0,011
531 et 532	7,10 ± 0,24	3,92 ± 0,07	0,259 ± 0,011	0,150 ± 0,020	0,118 ± 0,013
561 et 562	5,99 ± 0,55	4,21 ± 0,17	0,315 ± 0,006	0,159 ± 0,012	0,103 ± 0,011
581 et 582	6,16 ± 0,47	4,12 ± 0,40	0,315 ± 0,015	0,147 ± 0,004	0,115 ± 0,016

3.8. Conclusion

Nous avons identifié plusieurs candidats CCoAOMT chez *B. distachyon* qui pourraient être impliqués dans la synthèse de l'acide férulique lié aux xylanes. Les mutants générés sont affectés dans l'expression d'au moins une CCoAOMT et leur analyse a démontré une légère altération de la lignification et de l'acylation des composés phénoliques. Des analyses plus poussées quant à la répartition des lignines et l'analyse des grains sont en cours.

Chapitre 5 : Discussion générale

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés afin de déterminer :

- quels sont les gènes impliqués dans la synthèse de l'acide férulique présent dans les tiges et les grains de *B. distachyon* ?
- est-ce que ces gènes participent également à la synthèse des lignines ?

Les gènes étudiés par génétique inverse ont été sélectionnés selon plusieurs critères (expression dans les organes cibles et position phylogénétique) et selon les résultats de travaux antérieurs. *B. distachyon* est un modèle « jeune » par rapport à d'autres modèles comme *A. thaliana*, des outils de génomique sont disponibles mais moins performants (procédure de transformation génétique complexe, longue et moins efficace par rapport à *A. thaliana*) et/ou moins bien caractérisés (collection de mutants T-DNA non saturée et moins bien annotée que celle d'*A. thaliana*). La présence de familles multigéniques pour les activités ciblées a également rendu les études plus ardues que prévues initialement.

Le matériel choisi, la plante modèle *B. distachyon* (génotype Bd21-3), n'avait été que partiellement étudié au début de mes travaux de thèse. Nous avons par conséquent décidé d'approfondir la caractérisation des parois de sa tige et de son grain avant de travailler plus spécifiquement sur les gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de l'acide férulique.

5.1. Détection et localisation des acides hydroxycinnamiques et des lignines dans le grain et dans la tige de *B. distachyon*

Nous avons montré que la paroi des cellules de *B. distachyon* présente des similitudes et des différences avec celle des autres Poacées. Le taux de lignines des tiges sèches de *B. distachyon* est proche de celui des Poacées cultivées telles que le maïs et le blé. La présence d'acide férulique lié aux xylanes et aux lignines ainsi que d'acide *p*-coumarique lié aux lignines a été confirmée par analyses chimiques ainsi que par immunomarquage.

La distribution des composés pariétaux dans le grain de *B. distachyon* révèle des différences avec des Poacées comme le blé. Les analyses chimiques ont confirmé que dans les résidus pariétaux des grains secs de *B. distachyon*, les lignines et les xylanes féruloylés sont présents en quantité non négligeable. Les lignines sont localisées principalement dans les enveloppes des grains, la testa et la palea, tandis que les arabinoxylanes féruloylés sont principalement détectés dans les parois de l'albumen de stockage.

Nous avons également démontré que l'albumen de stockage contient des traces de lignines qui ne sont pas détectées par immunomarquages.

Les immunomarquages ont démontré que les arabinoxylanes féruloylés sont présents dans les parois de divers tissus du grain : les cellules de l'épiderme de nucelle et les cellules de l'albumen de stockage. L'une des différences principales entre le grain de *B. distachyon* et le blé est l'absence de détection des arabinoxylanes féruloylés dans la couche à aleurone de *B. distachyon* alors que ce tissu est le plus riche en arabinoxylanes féruloylés chez le blé. Les immunomarquages ont détecté l'acide *p*-coumarique uniquement dans les parois des cellules de l'épiderme de la tige de *B. distachyon* alors que chez le maïs il est également détecté dans les parois des cellules des faisceaux vasculaires. Ceci pourrait s'expliquer par une impossibilité pour l'anticorps d'accéder à la structure ciblée par l'anticorps (antigène).

Ces travaux nous ont permis de caractériser pour la première fois chez *B. distachyon* les lignines dans les grains. Les lignines sont présentes en quantité non négligeable dans le grain et, bien que principalement localisées dans les enveloppes des grains secs, elles ont également été détectées par analyses chimiques dans l'albumen de stockage. Les lignines ne sont pas décelées dans l'albumen par immunomarquage qui est une technique très sensible pour détecter et localiser des motifs structuraux d'intérêt. Les résultats restent soumis à la spécificité des anticorps ainsi qu'à l'accessibilité de l'antigène dans les tissus étudiés. L'absence de marquage ne correspond pas toujours à l'absence du composé.

5.2. Identification de la COMT impliquée dans la synthèse des lignines chez *B. distachyon*

Nous avons démontré que le gène *BdCOMT6* intervient dans la production des monomères S de lignines dans les tiges et les grains de *B. distachyon*. Plusieurs mutations ponctuelles de ce gène identifiées par TILLING induisent une diminution sensible de la teneur en lignines des tiges et une modification de la composition des lignines. La mutation Bd5139 provoque la diminution du taux de monomères S présent dans les lignines des tiges et des grains et l'apparition de composés marqueurs d'une COMT déficiente, les 5-OHG dans les tiges et, pour la première fois mis en évidence, dans les grains. La présence de monomères S dans les parois des mutants et le fait que la version mutée du gène restaure le phénotype sauvage de mutant *comt1* d'*A. thaliana* indiquent que la version mutée de *BdCOMT6* est encore active.

Les résultats obtenus suite à la complémentation du mutant *comt1* d'*A. thaliana*, c'est-à-dire une meilleure complémentation avec la forme mutée qu'avec la forme sauvage de BdCOMT6, posent de nouvelles questions. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats. La surexpression de la forme sauvage de BdCOMT6 dans *Atcomt1* par le promoteur fort et constitutif 35S induirait du « silencing » dans les lignées en troisième génération et pas dans celles de la première génération, ce qui ne serait pas le cas pour la forme mutée. Une autre hypothèse a été émise après la publication montrant que l'activité de la COMT de peuplier est régulée par phosphorylation (Wang et al, 2015) et en cohérence avec le fait que la BdCOMT6 est exprimée au niveau transcriptionnel dans tous les tissus analysés (lignifiés ou non) selon les données de la plateforme d'expression PlaNet. La forme mutée et la forme sauvage ne seraient pas actives de la même façon dans *A. thaliana* en raison de la présence de modifications post-traductionnelles (ex : phosphorylation) qui pourraient être différentes entre les formes sauvages et mutées. Les différences de niveaux de complémentation observées pourraient être liées à la localisation des sites d'insertions cependant cette hypothèse est peu probable car plusieurs lignées indépendantes ont été générées pour la transformation avec les formes sauvage et mutée. Des expériences complémentaires pourraient être entreprises comme la vérification de la présence de modifications post-traductionnelles ou encore la quantification des transcrits codant la BdCOMT6 dans les jeunes plantules d'*A. thaliana* de première et troisième générations. De plus, la complémentation de la déficience en composés phénoliques solubles (ex : glycosides d'isorhamnétine et sinapoyl malate) d'*Atcomt1* par BdCOMT6 suggère que BdCOMT6 est capable de produire leurs précurseurs alors que ces composés seraient absents ou minoritaires chez les Poacées.

5.3. La COMT associée à la synthèse des monolignols ne serait pas impliquée dans la synthèse de l'acide férulique lié aux xylanes

BdCOMT6 ne semblerait pas intervenir dans la synthèse de l'acide férulique lié aux xylanes puisque la teneur en acide férulique libéré par thioacidolyse des parois n'est pas affectée par la mutation de BdCOMT6 alors que la teneur en unité S est, elle, modifiée. Nos résultats confirment ceux obtenus chez les mutants COMT du maïs *bm3* et du sorgho *bmr12* où il n'avait pas non plus été observé de diminution de l'acide férulique lié aux parois (Piquemal et al, 2002, Barrière, 2004). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'obtenir un mutant « knock-out » ou un mutant affecté dans le site actif de BdCOMT6.

Une approche nouvelle et prometteuse de mutagenèse dirigée par l'utilisation de la technologie « CRISPR/Cas9 » pourrait être envisagée (Bortesi & Fisher, 2015).

5.4. Critique du choix de la COMT

Le choix du candidat COMT était motivé par le fait que des COMT de plusieurs espèces sont capables « in vitro » de transformer l'acide caféique en acide férulique (Davin & Lewis, 1992 ; Humphreys et al, 1999 ; Osakabe et al, 1999 ; Li et al, 2000 ; Parvathi et al, 2001). De plus une association génétique avait été mise en évidence entre un variant de COMT de blé et la teneur en arabinoxylanes féruloylés (Charmet et al, 2009). L'analyse de la BdCOMT6 était donc justifiée mais présentait également un côté opportuniste puisque des mutants de *B. distachyon* pour le gène *BdCOMT6* venaient d'être identifiés. L'analyse du mutant *bm3* de maïs n'avait pas montré d'effet sur l'acide férulique. Selon la littérature, le maïs ne posséderait qu'une seule protéine identifiée comme une COMT (Guillet-Claude et al, 2004 ; Courtial et al, 2013). Chez *B. distachyon*, tout comme chez le riz, la COMT appartient à une famille multigénique d'après des analyses effectuées par homologies de séquences. La présence de plusieurs gènes *COMT* nous avait suggéré une éventuelle spécificité de certaines de ces COMT. Nos analyses montrent que BdCOMT6 est une COMT classique impliquée dans la synthèse des unités S de lignines et ne serait pas impliquée dans la synthèse de l'acide férulique. La poursuite de l'étude des mutants COMT nous a fourni des résultats intéressants et nouveaux comme ceux obtenus après la complémentation du mutant *comt1* d'*A. thaliana* par la *BdCOMT6* sauvage et mutée (voir 5.2). Nous avons mis en évidence l'expression de deux gènes *COMT* dans les tiges et les grains, la fonction de ces *COMT-like* n'a pas été recherchée faute de temps. Nous avons décidé de nous focaliser sur une autre famille d'OMT impliquées dans la méthylation en position C3, les CCoAOMT qui produisent du féruloylCoA pouvant être transféré sur les xylanes. Nous avons mis à profit le temps nécessaire à la génération de lignées transgéniques ciblant ces CCoAOMT pour approfondir l'analyse des mutants de la COMT nous permettant d'obtenir des résultats publiables.

5.5. Obtention de plantes mutantes pour la CCoAOMT

Chez *B. distachyon*, les gènes CCoAOMT appartiennent à une famille multigénique.

Plusieurs candidats *CCoAOMT*-like potentiellement impliqués dans la synthèse de l'acide férulique lié aux xylanes ont été identifiés chez *B. distachyon* rendant l'obtention de mutants TILLING délicate puisqu'il y aurait eu plusieurs gènes à cribler, de nombreuses familles de mutants à géotyper et à analyser chimiquement et histologiquement.

Notre choix s'est porté sur l'exploitation des collections de mutants d'insertion et sur la création de lignées transgéniques miARN pour les gènes pour lesquels il n'y avait pas de mutants disponibles. Les mutants d'insertion étudiés n'étant pas affectés dans la séquence codante des gènes cibles cette stratégie n'a pas abouti et nous n'avons donc pas obtenu de mutants pour BdCCoAOMT3 la CCoAOMT orthologue des CCoAOMT impliquées dans la synthèse des lignines chez d'autres espèces.

L'obtention de lignées transgéniques ciblant plusieurs gènes *CCoAOMT* a pris beaucoup de temps, nous avons essuyé plusieurs échecs avant de réussir à produire des transformants. Des analyses préliminaires effectuées sur les plantes régénérées à partir des embryons transformés ont montré que les parois des tiges des transformants contenaient des esters d'acide férulique. Les générations suivantes sont en cours d'étude. Nous avons notamment identifié des lignées de seconde génération affectées dans l'expression des *CCoAOMT*. Ces lignées ne montrent pas de phénotype visible. Les premières analyses ont révélé une lignée affectée dans la teneur et la composition en lignines, dans la teneur en pAC mais pas de façon drastique dans la teneur en acide férulique.

5.6. Limites des méthodes employées

Les méthodes employées pour les analyses chimiques présentent des limites. Le dosage des acides hydroxycinnamiques présentent un biais. En effet, on ne dose que ce qui est libéré par les diverses méthodes employées (thioacidolyse, acidolyse, pyrolyse analytique), mais pas la totalité des acides hydroxycinnamiques présents dans la paroi, notamment de l'acide férulique. D'autre part, une proportion importante de l'acide férulique est présent sous formes de dimères et trimères dans les parois responsables de la réticulation des parois (Saulnier & Thibault, 1999 ; Grabber et al, 2000). L'acide férulique composant ces dimères et trimères n'a pas été analysé dans notre étude. De même, l'analyse de la composition des lignines ne correspond pas à la totalité des lignines mais à un type de lignines spécifiques de la méthode d'extraction puis d'analyse (la thioacidolyse libère les liaisons de type éther).

5.7. Autres propositions d'approches

L'analyse ciblée par génétique inverse de gènes candidats, comme ici la *BdCOMT6* et les cinq gènes *CCoAOMT*, ne permet pas toujours d'obtenir des réponses satisfaisantes, même si, comme dans notre cas, ce choix repose sur des indices préliminaires. Un criblage global de l'ensemble de la collection de mutants *B. distachyon* de l'IJPB de Versailles aurait été intéressant. La culture de l'ensemble des lignées mutées suivie du prélèvement et de l'analyse de la teneur en acides hydroxycinnamiques des tiges et des grains auraient pu nous permettre de détecter des individus affectés dans leur composition pour ces molécules. Il aurait ensuite été possible d'identifier les gènes modifiés dans les lignées affectées.

Cette stratégie n'a cependant pas pu être mise en place en raison de contraintes de temps, les méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques n'étant pas encore à haut débit.

L'utilisation du maïs comme plante modèle aurait pu être un autre choix intéressant. L'acide férulique lié aux xylanes est détecté dans les tiges et les grains du maïs. Le péricarpe du grain de maïs est le tissu le plus riche en acide férulique décrit jusqu'à présent (Saulnier et al, 1995, Harris & Tretheway, 2010) et c'est un tissu très peu lignifié (Chanliaud, 1995). Le génome de maïs est séquencé et en cours d'annotation. Des analyses transcriptomiques ont été conduites et sont disponibles en ligne avec des données déjà existantes sur le péricarpe (Sekhon et al, 2011). Des mutants et des plateformes de transformation sont disponibles. L'analyse de gènes candidats chez le maïs pourrait donc être entreprise. D'autres stratégies sont utilisées chez le maïs dans le cadre de la recherche des déterminants de la digestibilité du maïs où des gènes candidats ont été co-localisés avec des QTL pour la teneur en acide férulique lié aux parois (Courtial et al, 2013).

Une approche telle que celle publiée par Jung et al en 2010 et 2011 identifiant parmi 12 000 plantes mutées le mutant *sfe* affecté dans sa teneur en acide férulique dans les tiges chez la canne à sucre aboutissant à une meilleure dégradabilité des parois pourrait être réalisée chez le maïs et chez *B. distachyon*. Cependant, des différences existent entre les Pooidées (dont font partie *B. distachyon* ou encore le blé et l'orge) et les Panicoidées (dont fait partie le maïs) justifiant le choix d'une plante modèle telle que *B. distachyon*.

5.8. Conclusion

L'acide férulique a un rôle déterminant dans l'architecture des parois de Poacées par l'établissement de liaisons entre les polymères de ces parois, notamment entre les xylanes et les lignines. L'acide férulique intervient dans la récalcitrance des parois végétales à la dégradation. Les lignines sont quant à elles nécessaires au port érigé de la plante ainsi qu'à sa résistance aux stress biotiques et abiotiques. Leur présence constituant un frein à la dégradation des parois végétales et à l'accessibilité aux composés comme la cellulose, le contrôle voire la diminution de la teneur en lignines et en acide férulique pourrait être intéressant pour une exploitation de la biomasse issue des cultures de Poacées dans la production de biocarburant ainsi que la digestibilité et l'ingestibilité par les animaux.

Dans le grain, le taux de réticulation des arabinoxylanes féruloylés par des ponts diféruliques affecte les propriétés mécaniques des parois et la solubilité des polymères. Ces propriétés et leurs variations impactent vraisemblablement le développement du grain avec des conséquences sur les technologies de mouture, et peuvent avoir des effets comme l'augmentation du taux de fibres solubles, ce qui est recherché en alimentation humaine et plutôt négatif pour l'alimentation des volailles. Un meilleur contrôle des propriétés des parois nécessite la compréhension des mécanismes qui les régulent parmi lesquels le taux d'acide férulique demeure une piste prometteuse. Le contrôle des propriétés des parois pourrait passer par l'amélioration des cultures par des stratégies classiques d'amélioration en ciblant des allèles favorables de gènes candidats.

Chapitre 6 : Matériel et méthodes

6.1. Matériel végétal et bactérien utilisé et conditions de culture

6.1.1. Plantes et génotypes utilisés

La lignée Bd21 de *B. distachyon* séquencée en 2010 a été utilisée pour les expériences d'hybridation sur puce Affymetrix.

La lignée Bd21-3 de *B. distachyon* séquencée en 2011 a été utilisée pour toutes les autres expérimentations.

Arabidopsis thaliana écotype Col-0 séquencé en 2000 et la lignée d'insertion ADN-T SALK_002373 (Alonso et al ; 2003) nommées mutant *Atcomt1* et ayant une insertion dans At5g54160 ont été utilisées pour la transformation.

6.1.2. Conditions de culture des plantes

Les plants de *B. distachyon* ont été cultivés en serre non chauffée pour les expériences de génotypage et de multiplication des lignées. Ils ont été cultivés en terre dans des pots de 1 L en chambre de culture à 20 heures de lumière, 23°C jour et 18°C nuit avec 60% d'humidité pour les expériences nécessitant un contrôle des conditions de cultures.

Les plants d'*A. thaliana* ont été cultivés en serre non chauffée.

6.1.3. Liste des souches bactériennes utilisées

La souche d'*E. coli* DH10b de génotype F^- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *endA1* *recA1* *deoR* $\Delta(ara, leu)7697$ *araD139* *galU* *galK* *nupG* *rpsL* λ^- rendue thermo-compétente ou électro-compétente a été utilisée lors des clonages. Elle a été utilisée afin d'amplifier les plasmides.

La souche d'*E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS de génotype F^- *ompT* *hsdS_B*(*r_B⁻* *m_B⁻*) *gal* *dcm* (DE3) pLysSRARE (Cam^R) rendue thermo-compétente a été utilisée lors des productions de protéines recombinantes. Elle possède un plasmide permettant la production d'acides aminés rares chez les bactéries et nécessaires à la production de protéines recombinantes eucaryotes.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* AGL1 (Lazo et al, 1991) est une souche hypervirulente rendue thermo-compétente et a été utilisée pour la transformation stable de la

plante monocotylédone *B. distachyon*. Cette souche est résistante à la rifampicine et à la carbenicilline.

La souche d'*A. tumefaciens* C58pMP90 (Koncz and Schell, 1986) est une souche à virulence modérée rendue thermo-compétente et a été utilisée pour la transformation stable de la plante eudicotylédone *A. thaliana*. Elle apporte la résistance à l'hygromycine.

6.1.4. Conditions de culture des bactéries

Les bactéries *E. coli* ont été cultivées à 37°C pendant 16h, sous agitation s'il s'agissait de cultures liquides.

Les bactéries *A. tumefaciens* ont été mises en croissance à 28°C pendant 2 à 3 jours.

6.2. Bioinformatique

6.2.1. Construction des arbres phylogénétiques

Le logiciel gratuit et accessible en ligne www.phylogeny.fr a été utilisé afin de créer les arbres phylogénétiques (Dereeper et al, 2008). L'alignement des séquences protéiques a été réalisé en premier lieu par le logiciel Muscle version 3.7 puis a été affiné par le logiciel Gblocks version 0.91b. L'arbre a été calculé par le logiciel PhyML version 3.0 avec un bootstrap de 100 et le logiciel TreeDyn version 198.3 a permis de le dessiner.

6.2.2. Liste des numéros d'accessions des protéines

Les séquences protéiques utilisées pour construire les arbres phylogénétiques des COMT ont été prédites à partir des loci et numéros d'accession suivants : At1g21100.1 (AtCOMT9), At1g62900.1 (AtCOMT15), At3g62000.1 (AtCOMT16), At1g21120.1 (AtOMT13), At1g21130.1 (AtOMT14), At1g33030.1 (AtOMT12), At1g51990.1 (AtOMT3), At1g63140.2 (AtOMT4), At1g76790.1 (AtOMT7), At1g77520.1 (AtOMT5), At1g77530.1 (AtOMT6), At3g53140.1 (AtOMT8), At4g35150.1 (AtOMT2), At4g35160.1 (AtOMT17), At5g37170.1 (AtOMT10), At5g53810.1 (AtOMT11), At5g54160.1 (AtOMT1), X71430.1 NtCOMT,

POPTR_0012s00670.1 (PtCOMT), Os02g57760.1 (OsOMT2), Os04g01470.1 (OsOMT3), Os04g09604.1 (OsOMT4), Os04g09654.1 (OsOMT5), Os04g09670.1 (OsOMT6), Os04g09680.1 (OsOMT7), Os08g06100.1 (OsOMT1), Os12g09770.1 (OsOMT8), Os12g10140.1 (OsOMT9), Os12g10170.1 (OsOMT10) Os12g13800.1 (OsOMT11), AF153825.1 (FaCOMT), AF033538.1 (LpCOMT), AAB46623.1 (MsCOMT), HQ645965.1 (PvCOMT), AC196475.3 (ZmCOMT), AY217766.1 (SbCOMT).

Les séquences protéiques utilisées pour construire les arbres phylogénétiques des CCoAOMT ont été prédites à partir des loci et numéros d'accès suivants : L1CCoAOMT1 (DQ431233), L1CCoAOMT2 (DQ431234), MsCCoAOMT (Q40313.1), NtCCoAOMT (O24144), PrCCoAOMT (HQ444753), PtCCoAOMT1 (XM_002313089), PtCCoAOMT2 (XM_002298693) et ZmCCoAOMT (EU952463.1).

6.3. Matériel et protocoles de biologie moléculaire

6.3.1. Liste des plasmides utilisés

Le plasmide pDONR207 est utilisé lors des clonages en système Gateway® (voir 6.3.15) pour l'amplification des séquences. Il confère aux bactéries transformées la résistance à la gentamycine.

Le plasmide pHbm42GW7 est utilisé lors de la fabrication des vecteurs amiARN en réalisant une double recombinaison Gateway® (voir 6.3.15). Ce plasmide permet l'introduction de deux séquences d'ADN issus de deux vecteurs compatibles avec le système Gateway® et possédant les séquences bordantes attR2 et attR4 ainsi que la même séquence attL. Les séquences des deux vecteurs s'associent au niveau de la séquence attL commune avant de se recombiner au plasmide pHbm42GW7 grâce à la présence de séquences bordantes particulières nommées ici attR2 et attR4. Ce plasmide confère la résistance à la streptomycine, à la spectinomycine ainsi qu'à l'hygromycine (Invitrogen™ *life technologies*).

Le plasmide pEN L4 BdGLU RI est utilisé lors de la fabrication des vecteurs amiARN pour la réalisation d'une recombinaison Gateway®. Ce plasmide a permis la conversion du

promoteur du gène BdGLU en promoteur compatible avec le système Gateway grâce à l'ajout des séquences bordantes attL4 et attR1. Il confère la résistance à la kanamycine.

Le plasmide pDEST17 est un vecteur d'expression utilisé pour produire les protéines recombinantes fusionné à une étiquette polyhistidine positionnée en N-terminal de la protéine sous l'action d'un promoteur fort. Ce plasmide confère la résistance à l'ampicilline (Invitrogen™ life technologies).

Le plasmide pETG10A est un vecteur d'expression utilisé pour produire les protéines recombinantes fusionnées à une étiquette polyhistidine positionnée en N-terminal de la protéine sous l'action d'un promoteur fort inductible à l'IPTG. Il permet la résistance à l'ampicilline.

Le plasmide pIPKb2 est un vecteur binaire pour la transformation des plantes médiée par *Agrobacterium tumefaciens*. Il a été utilisé pour l'expression des amiARN, et du gène *BdCOMT6* dans *A. thaliana* et dans *B. distachyon* sous le contrôle du promoteur fort ZmUBI, initialement promoteur du gène codant l'ubiquitine de maïs et s'exprimant dans toute la plante cible. Le plasmide confère la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine chez les bactéries et à l'hygromycine chez les plantes (Himmelbach et al, 2007).

Le plasmide pNW55_OsmiR528 est utilisé lors de la fabrication des amiARN, il contient la séquence du microARN (miR) du riz OsamiR528 dans le site multiple de clonage (addgene).

6.3.2. Extraction de l'ADN génomique de *Brachypodium distachyon*

La méthode au CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) a été employée pour extraire l'ADN génomique.

- Des fragments de feuilles de 0,5 cm² sont prélevés et placés dans des tubes de 2 mL à fond plat sur glace. 300 µL de tampon CTAB (CTAB Hexadecyl trimethyl-ammonium bromide 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, β-mercaptoéthanol 0,2%) préchauffé à 60°C au bain-marie, ainsi qu'une bille de céramique et une bille de silice sont ajoutés.
- Les feuilles sont broyées pendant 1 min au Fastprep (Krackeler Scientific) puis les tubes sont incubés à 60°C pendant 15 min.

- 300 µL de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) sont ajoutés aux broyats afin d'isoler les acides nucléiques des autres constituants. Les tubes sont mélangés par retournement pendant 30 s.
- Les tubes sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- De nouveaux tubes de 1,5 mL sont préparés avec 180 µL d'isopropanol à température ambiante.
- Les surnageants des broyats contenant les acides nucléiques sont transférés dans ces nouveaux tubes où, sous l'action de l'isopropanol, les acides nucléiques sont précipités.
- Les nouveaux tubes sont mélangés par retournements avant d'être centrifugés à 13000 rpm pendant 15 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Les surnageants sont éliminés délicatement à la pipette et les culots lavés avec 200 µL d'éthanol 70% à température ambiante.
- Les tubes sont mélangés au vortex avant d'être centrifugés à 13000 rpm pendant 8 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Les surnageants sont prélevés délicatement à la pipette et les culots sont laissés à sécher 30 min sous la hotte à flux laminaire.
- Une fois les culots secs, ils sont repris dans 30 µL de tampon d'élution (Tris EDTA 0,1 mM pH8) additionné de RNase (50 µg/L) et 120 µL d'eau stérile avant d'être incubés 30 min à température ambiante afin que la RNase ajoutée dégrade les ARN présents.
- Les ADN génomiques extraits sont laissés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou à -20°C pour une plus longue conservation.

6.3.3. Extraction d'ADN plasmidique

Le kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps de *Bio Basic Inc.* a été employé afin de réaliser les purifications de plasmides.

- 1,5 à 5 mL d'une culture saturée de bactéries sont centrifugés à 12000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Après avoir jeté le surnageant, le culot bactérien est remis en suspension dans 100 µL de solution de re-suspension (solution I) et incubé 1 min sur la paillasse afin de lyser les bactéries.
- 200 µL de solution de lyse (solution II) sont ajoutés et l'échantillon est mélangé par retournements avant d'être incubé sur la paillasse pendant 1 min afin de neutraliser la soude contenue dans la solution I.

- 350 µL de solution de neutralisation (solution III) sont ajoutés avant de mélanger par retournement et d'incuber sur la paillasse pendant 1 min. Le tube est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Le surnageant est transféré sur une colonne EZ-10 contenant une membrane de silice fixant les ADN en présence d'une solution tampon à forte concentration en sel et centrifugé à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Le tube collecteur est vidé et 750 µL de solution de lavage sont ajoutés sur la colonne. Le tube est centrifugé à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Cette étape est réalisée deux fois.
- Le tube collecteur est vidé et la colonne est centrifugée à 10000 rpm pendant 1 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- La colonne est alors transférée sur un tube de 1,5 mL propre et 50 µL de tampon d'élution contenant une salinité faible sont ajoutés sur la membrane. L'échantillon est incubé à température ambiante pendant 2 min avant d'être centrifugé à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- L'ADN plasmidique obtenu est gardé à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservé à -20°C pour stockage.

6.3.4. Extraction d'ARN totaux de grains de *B. distachyon* pour hybridation sur puces à ADN

Une méthode a été mise au point afin d'extraire les ARN des différents organes de *B. distachyon* qui ont été utilisés lors des hybridations sur puces Affymetrix. Cette méthode a été adaptée de celle employée par Li & Trick (2005) sur le grain de riz.

- 50 à 100 mg de grains entiers sans les glumes ou de grains décortiqués sont placés dans des tubes à vis de 2 mL. 394 µL de tampon I (100 mM Tris, pH 8, 150 mM LiCl, 50 mM EDTA, 1,5% SDS) et 6 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés à chaque tube.
- Les échantillons sont broyés pendant 2 min au Fastprep (Krackeler Scientific). 250 µL du mélange phénol-chloroforme (1:1, pH 4,7) sont ajoutés et les échantillons sont mélangés par retournements avant d'être centrifugés à 13000 rpm, 4°C pendant 15 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- De nouveaux tubes de 1,5 mL contenant 250 µL de tampon II (70% sulfate de guanidinium (m/v), 0,75 M citrate de sodium, 10% de lauryl sarcosine, 2 M d'acétate de sodium, pH 4) sont préparés. Les surnageants (environ 250 µL) sont ajoutés aux nouveaux tubes avant d'être mélangés par retournements.

- Les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 10 min puis 200 µL du mélange chloroforme – alcool isoamylique (1 :1) y sont ajoutés.
- Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm, 4°C pendant 15 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Les surnageants (environ 450 µL) sont transférés dans de nouveaux tubes de 1,5 mL auxquels 300 µL d’isopropanol et 250 µL de chlorure de sodium 1,2 M sont ajoutés.
- Après avoir été mélangés par retournements, les échantillons sont incubés sur glace pendant 15 min. Les tubes sont alors centrifugés à 10000 rpm, 4°C pendant 15 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Les surnageants sont jetés et les culots sont lavés avec de l’éthanol 70°.
- L’éthanol est enlevé à la pipette et les culots sont mis à sécher sous la hotte à flux laminaire à température ambiante pendant 15 à 20 min.
- Les culots sont repris dans 30 µL d’eau sans RNase et conservés à – 80°C.

6.3.5. Extraction d’ARN totaux de grains entiers, de grains décortiqués, de tiges, de feuilles, de partie aérienne de jeunes plantules et de partie racinaire de jeunes plantules avec le kit EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps de Bio Basic Inc.

Le kit EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps de *Bio Basic Inc.* a été employé afin de réaliser les extractions d’ARN utilisés lors des RT-PCR.

- Des plantes cultivées en chambre de culture ont été utilisées lors des prélèvements de grains, de tiges et de feuilles. Des grains entiers (sans les glumes) et décortiqués ont été prélevés à 11, 21 et 31 jours après anthèse. Des grains ont été semés sur milieu gélosé afin d’obtenir des jeunes plantules dont les parties aériennes et racinaires ont été prélevées. Les tissus ont été plongés directement dans l’azote liquide après prélèvement et stockés à -80°C.
- 450 µL de tampon de lyse (tampon Rlysis-PG) sont versés dans des tubes de 1,5 mL.
- 25 à 50 mg d’échantillons congelés sont broyés au mortier et pilon dans de l’azote liquide. La poudre obtenue est transférée dans le tube contenant le tampon de lyse. Le tube est mélangé par retournements et laissé 5 min à température ambiante. Le tube est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL auquel ½ volume d’éthanol absolu sont ajoutés. Le tube est mélangé par retournement et la solution est transférée sur une colonne Plant RNA Mini-Preps dont la membrane de silice va piéger les ARN. La colonne, placée sur un tube collecteur, est centrifugé à 12000 rpm pendant 30 s (Sigma 6K15, rotor 12130-H).

- Le tube collecteur est vidé et 0,5 mL de tampon de nettoyage (tampon GT) sont versés sur la colonne. La colonne est centrifugée à 12000 rpm pendant 1 min (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- La colonne est transférée sur un nouveau tube de 1,5 mL et 50 µL d'eau stérile sans RNase sont versés délicatement sur la membrane. La colonne est incubée 2 min à température ambiante avant d'être centrifugée à 12000 rpm pendant 30 s (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- 30 µL d'eau sans RNase sont de nouveau versés sur la membrane. Après une incubation de 2 min à température ambiante, la colonne est centrifugée à 12000 rpm pendant 30 s (Sigma 6K15, rotor 12130-H).
- Les ARN totaux extraits sont alors conservés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou stockés à -80°C.

6.3.6. Purification et concentration des ARN totaux extraits

Un traitement permettant l'élimination des traces d'ADN génomique présent dans les ARN totaux extraits est réalisé. La DNase commerciale du kit RNase-free DNase Set de QIAGEN est utilisée. Les ARN sont ensuite nettoyés et concentrés en utilisant le kit RNeasy MinElute Cleanup de QIAGEN.

- 80 µL d'ARN totaux sont mélangés à 10 µL de tampon RDD et à 2,5 µL de l'enzyme DNase I. 7,5 µL d'eau stérile sans RNase sont ajoutés. Les échantillons sont laissés 30 min à température ambiante.
- 250 µL d'éthanol absolu sont ajoutés aux ARN précédemment traités à la DNase afin de les précipiter. Les échantillons sont mélangés par retournement avant d'être transférés sur la colonne RNeasy MinElute contenant une membrane de silice qui va piéger les ARN. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant 15 s (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les tubes collecteurs sont vidés et 500 µL de tampon de nettoyage (tampon RPE) sont versés sur la colonne afin d'éliminer les traces d'éthanol et de sels. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant 15 s (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les tubes collecteurs sont vidés et 500 µL d'éthanol 80% sont versés sur la colonne. Les tubes sont centrifugés à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les tubes collecteurs sont vidés et replacés sous les colonnes pour être centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min afin de sécher la membrane (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les colonnes sont placées sur de nouveaux tubes de 1,5 mL et 15 µL d'eau stérile sans RNase sont ajoutés délicatement sur chaque membrane. Les tubes sont alors centrifugés à 10000 rpm pendant 1 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).

- La concentration des ARN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop de Thermo Scientific ou Epoch de BioTek).

La qualité des ARN est contrôlée. Le rapport d'absorbance A260/A230 nm mesuré à l'aide du spectrophotomètre doit être compris entre 1,8 et 2. Une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% permet de visualiser l'absence d'ADNg et l'absence de dégradation des ARN.

6.3.7. Analyse de l'expression des gènes par puces Affymetrix

Des extractions d'ARN totaux de grains entiers et d'albumens décortiqués à 11, 21 et 21 jours après anthèse ont été réalisées en suivant la méthode adaptée de Li & Trick, 2005 décrite précédemment. Après quantification des ARN au Nanodrop, ils ont été envoyés au MPIMP de Golm (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de>) en carboglace pour y être hybridés sur puces Affymetrix. Les résultats sont disponibles sur le site « PlaNet » (<http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/>).

6.3.8. Rétro-transcription

Avant d'exploiter les ARN en PCR, il est nécessaire de réaliser une transcription inverse afin d'obtenir des ADN complémentaires. Le kit First Strand cDNA Synthesis for RT-PCR de Roche a été utilisé.

- 500 ng d'ARN sont utilisés pour réaliser une réaction de transcription inverse.
- 2 µL d'hexamères aléatoires (60 µM) sont ajoutés aux 500 ng d'ARN totaux. De l'eau stérile sans RNase est ajoutée jusqu'à atteindre 9,5 µL de solution.
- Les ARN totaux sont incubés 10 minutes à 65°C afin de les dénaturer puis transférés sur glace.
- 4 µL de tampon 5x RT, 0,5 µL de RNase inhibitor (20U), 0,5 µL de dNTP (1mM chacun) et 0,5 µL de Reverse Transcriptase sont ajoutés à chaque échantillon.
- Les tubes sont mélangés au vortex, centrifugés et incubés 10 min à 25°C pour l'hybridation des amorces puis 1h à 50°C afin que l'enzyme « Reverse Transcriptase » rétro-transcrive les ARN en ADN complémentaires.
- A la fin de la réaction, les échantillons sont incubés 5 minutes à 85°C afin d'inactiver l'enzyme et transférés sur glace.

- Les ADN complémentaires obtenus sont gardés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservés à -20°C pour stockage.

Une PCR est pratiquée à partir d'un aliquot du produit de la réaction de transcription inverse pour contrôler la synthèse des ADNc. Des amorces ciblant le gène de ménage *BdSamDC* s'exprimant dans tous les tissus ont été utilisées afin de vérifier l'efficacité de la réaction de transcription inverse.

6.3.9. Amplification des ADN par PCR

Les amplifications d'ADN sont réalisées par PCR. Si l'amplification a pour but de génotyper des plantes, de vérifier l'efficacité d'une transcription inverse, de confirmer la présence d'un insert dans un plasmide ou une amplification sans visée de clonage, l'enzyme utilisée est la One *Taq*[®] Hot Start DNA Polymerase produite par New England BioLabs[®] Inc. Cette enzyme est peu onéreuse mais bien qu'ayant une activité 3'-5' exonucléase, elle réalise en moyenne une erreur toute les 140.10⁶ bases. Si l'amplification a pour but le clonage ou la construction d'un microARN artificiel, l'enzyme utilisée est la Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase produite par New England BioLabs[®] Inc. Cette enzyme est plus chère mais possède une activité 3'-5' exonucléase et un taux d'erreur très faible, 50 fois inférieur à celui de la *Taq* Polymerase faisant d'elle une polymérase de haute-fidélité idéale pour ce type d'expérience.

6.3.9.1. PCR réalisée avec l'enzyme One *Taq*[®] Hot Start DNA Polymerase :

- Pour une réaction, 300 ng ou 1 pg à 1 ng de plasmide de matrice sont mélangés au tampon 5X de l'enzyme contenant du tampon Tris et les sels nécessaires à l'activité de l'enzyme. 150 mM de chacune des deux amorces sont ajoutés ainsi que 10 mM de chacun des quatre dNTP. 1,25 U d'enzyme sont ajoutés et de l'eau stérile jusqu'à atteindre 25 µL de solution.
- La solution est mélangée et distribuée dans des barrettes de PCR.
- Les barrettes sont placées dans un thermocycleur (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) et le programme, spécifique de chaque couple d'amorce, est enregistré.
- Une première étape de dénaturation à 94°C de 5 min a lieu permettant de séparer les deux brins d'ADN. Elle est suivie d'une dénaturation à 94°C pendant 15 s, d'une étape d'hybridation pendant laquelle les amorces ajoutées s'hybrident sur les brins d'ADN à T_M-15°C des amorces (T_M ou température de fusion, température correspondant à la fusion c'est-à-dire la séparation des brins d'ADN calculée pour chaque amorce dépendant de sa composition en nucléotide et de la composition

du milieu réactionnel) pendant 20 s et d'une étape d'élongation à 68°C pendant 1 min par kilobase à amplifier pendant laquelle l'enzyme va polymériser l'ADN à partir de l'amorce et en utilisant pour référence l'ADN complémentaire. Ces trois étapes sont répétées pendant 35 à 40 cycles. Une dernière étape d'élongation à 68°C pendant 5 min est réalisée afin de permettre la fin de l'élongation de tous les fragments commencés puis un retour à 4°C termine le programme.

- Les tubes contenant les produits PCR sont alors gardés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservés à -20°C pour stockage.

6.3.9.2. PCR réalisée avec l'enzyme Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase :

- Pour une réaction, 500 ng de matrice d'ADNg ou ADNc ou 1 pg à 1 ng de plasmide sont mélangés au tampon 5X HF de l'enzyme. 100 mM de chaque amorce sont ajoutés ainsi que 10 mM de chacun des dNTP. 1 U d'enzymes sont ajoutés et de l'eau stérile jusqu'à atteindre 25 µL de solution.

- La solution est mélangée et distribuée dans des barrettes de PCR. Les barrettes sont placées dans un thermocycleur (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) et le programme est enregistré.

- Une première dénaturation à 98°C de 30 s a lieu. Elle est suivie d'une dénaturation à 98°C pendant 10 s, d'une étape d'hybridation à $T_m - 20^\circ\text{C}$ des amorces pendant 30 s et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s par kilobase à amplifier. Ces trois étapes sont répétées pendant 35 à 40 cycles. Une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 5 min avant un retour à 4°C termine le programme.

- Les tubes de PCR sont alors gardés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservés à -20°C pour stockage.

6.3.9.3. Liste des amorces utilisées en PCR ou en séquençage

Les températures de fusion ont été calculées à l'aide du logiciel en ligne « applied biosystems » (www6.appliedbiosystems.com).

Tableau 39: Liste des amorces utilisées.

Nom	Séquence	Caractéristiques	Utilisation
Bradi1g14870 fw	ATGGTCGTCCCGGGCGCG	$T_m = 72,61^\circ\text{C}$	Amplification ATG-STOP
Bradi1g14870 rev	CTATTTGGTGTACTCAATGGCCAGGAGTTGG	$T_m = 72,46^\circ\text{C}$	Amplification ATG-STOP

Bradi3g16530 fw	ATGGGTTCCACGGCGGCG	TM = 70.37°C	Amplification ATG-STOP
Bradi3g16530 rev	CTACTTGGTGAAC TCGATGGCCCACG	TM = 70.84°C	Amplification ATG-STOP
Bradi2g02380 fw	ATGGCCGAGGAGGAGGCGTG	TM = 69.68°C	Amplification ATG-STOP
Bradi2g02380 rev	CTACTTGGTGTACTCGATGGCCCAGAAGTTT	TM = 69.72°C	Amplification ATG-STOP
Bradi2g02390 fw	ATGGCGGAAGAGGAAGCCGG	TM= 68.45°C	Amplification ATG-STOP
Bradi2g02390 rev	CTACTTGGTGTACTCGATGGCCCAGAAGTC	TM = 69.69°C	Amplification ATG-STOP
Bradi1g14870.1 fw	GAAGCAACGCCTAGGGCACGG	TM = 69,61°C	RT-PCR
Bradi1g14870.1 rev	GCATAGATGTAGGTTGTCCTAACGCTCGC	TM = 68,77°C	RT-PCR
Bradi3g16530.1 fw	GAGGCCACCCCAAAGGCACAAG	TM =69,61°C	RT-PCR
Bradi3g16530.1 rev	CAAGGCAGAAGTGGAGATCGATCTCATC	TM =68,69°C	RT-PCR
Bradi2g02380 fw	CAGTGCAGGGGGCTTGATCCAG	TM = 69,04°C	RT-PCR
Bradi2g02380 rev	CTAGCAGCGAGCAGCAGCAACTAGATATG	TM = 68,46°C	RT-PCR
Bradi2g02390 fw	CGCAGGGGTTGATCAGCGTTG	TM = 68,79°C	RT-PCR
Bradi2g02390 rev	CAGAAGTCGGCGTAGATGTAGGTGGC	TM = 68,42°C	RT-PCR
Attb1 bradi3g16530 fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTTC CACGGCGGCGGACAT	TM = 89,92°C	clonage
Attb2 bradi3g16530	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACTTGGT GAACTCGATGGCCC	TM = 85,86	clonage

rev			
16530 mut5139 fw	CCAGAAGGTCCCCTCGGACGATGCCATCC	TM = 79,31°C	mutagénèse dirigée
16530 mut5139 rev	GGATGGCATCGTCCGAGGGGACCTTCTGG	TM = 79,31°C	mutagénèse dirigée
BdSamDC fw	CGGCAAGCTTGCTAATCTGCTCCAAT	TM = 69,56°C	RT-PCR
BdSamDC rev	CAGAGCAACAATAGCCTGGCTGGC	TM = 68,73°C	RT-PCR
Attb1 Bradi1g48370	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCCA CCACGGCGACCG	TM = 89,53°C	clonage
Attb2 Bradi1g48370	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTGAC GCGGCGGCAGAG	TM = 88,50°C	clonage
Attb1 Bradi3g39380	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCGA CCTACCGGCCG	TM = 87,47°C	clonage
Attb2 Bradi3g39380	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTGAG GCGGCGGCAG	TM = 87,80°C	clonage
Attb1 Bradi3g39390	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGACGA GCTACAGGCGGTCTCG	TM = 87,17°C	clonage
Attb2 Bradi3g39390	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTGAG GCGGCGGCAG	TM = 87,80°C	clonage
Attb1 Bradi3g39400	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCGG CGAAGGGCGGC	TM = 89,63°C	clonage
Attb2 Bradi3g39400	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCGAC GCGGCGGC	TM = 89,82°C	clonage
Attb1 Bradi3g39410	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGACGA CCGGCAGCGTGGCC	TM = 89,77°C	clonage
Attb2 Bradi3g39410	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGACGA CCGGCGGCGTTG	TM = 88,70°C	clonage
Attb1 Bradi3g39420	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATGACGAC CGGCGGCGTTG	TM = 86,23°C	clonage
Attb2 Bradi3g39420	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGACGAG GCGGCGGCAG	TM = 88,68°C	clonage

Attb1 Bradi4g33340	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCCG CCACCGGCGC	TM = 90,20°C	clonage
Attb2 Bradi4g33340	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCGAC GCGGCGGC	TM = 89,82°C	clonage
48370midfw	GCACCGTCAGTCCCCCAATCCAATCC	TM = 74,79°C	séquençage
48370midrev	GGATTGGATTGGGGGACTGACGGTGC	TM = 78,79°C	séquençage
39380midfw	GATCGAGAAGGCCGCGTCGC	TM = 72,89°C	séquençage
39380midrev	GCGACGCCGGCCTTCTCGATC	TM = 72,89°C	séquençage
39390midfw	CGTCGCCCACAAGGTGGACTTC	TM = 68,85°C	séquençage
39390midrev	GAAGTCCACCTTGTGGGCGACG	TM = 68,85°C	séquençage
39400midfw	GATCGTCGCCATCGACATCAACCG	TM = 72,14°C	séquençage
39400midrev	CGGTTGATGTCGATGGCGACGATC	TM = 72,14°C	séquençage
39410midfw	CGTCAGAAGGGACTACTTCGACATGGGC	TM = 71,58°C	séquençage
39410midrev	GCCCATGTCTGAAGTAGTCCCTTCTGACG	TM = 71,58°C	séquençage
39420midfw	CGACCCGGACAGGGAGTGCTACG	TM = 71,51°C	séquençage
39420midrev	CGTAGCACTCCCTGTCCGGGTCG	TM = 71,51°C	séquençage
33340midfw	CGTGTTACCGGGTACTCGCTGC	TM = 70,55°C	séquençage
33340midrev	GCAGCGAGTACCCGGTGAACACG	TM = 70,55°C	séquençage
IPKb2debfbw	CGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACG	TM = 68,38°C	Séquençage pIPKb2
IPKb2debrev	CGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACG	TM = 68,38°C	Séquençage pIPKb2
IPKb2finfw	CTAGTACCTGCAGAAGTAACACCAAACAACAGG	TM = 67,72°C	Séquençage pIPKb2
IPKb2finrev	CCTGTTGTTTGGTGTTACTTCTGCAGGTACTAG	TM = 67,72°C	Séquençage pIPKb2
16530midfw	GGATGAAGAACCACTCCATCATCATCACC	TM = 69,78°C	Séquençage Bradi3g16530
16530midrev	GGTGATGATGATGGAGTGTTCTTCATCC	TM = 69,78°C	Séquençage

			Bradi3g16530
16530debfw	ATGGGTTCCACGGCGGCG	TM = 70,37°C	Séquençage Bradi3g16530
16530debrev	CGCCGCCGTGGAACCCAT	TM = 70,37°C	Séquençage Bradi3g16530
16530finfw	GTGGGCCATCGAGTTCACCAAGTAG	TM = 67,52°C	Séquençage Bradi3g16530
16530finrev	CTACTTGGTGAAC TCGATGGCCCCAC	TM = 67,52°C	Séquençage Bradi3g16530
Primer I CCoAOMT s	AGTCCCTGGCGGAAGTCCACCTTCAGGAGATTCAGTTG A	TM = 81,04°C	AmiARN 5
Primer II CCoAOMT a	TGAAGGTGGACTTCCGCCAGGGACTGCTGCTGCTACAGC C	TM = 85,59°C	AmiARN 5
Primer III CCoAOMT*s	CTAAGGTCGACATCCGCCAGGGATTCTGCTGCTAGGCT G	TM = 83,04°C	AmiARN 5
Primer IV CCoAOMT*a	AATCCCTGGCGGATGTCGACCTTAGAGAGGCCAAAAGTGA A	TM = 80,33°C	AmiARN 5
Primer I miR CCoAOMT a	AGTATATACTGGTAGAGTTGCGCCAGGAGATTCAGTTTG A	TM = 72,66°C	AmiARN 1
Primer II miR CCoAOMT b	TGGCGCAACTCTACCAGTATATACTGCTGCTGCTACAGC C	TM = 77,49°C	AmiARN 1
Primer III miR CCoAOMT c	CTGCGCATCTCAACCAGTATATATTCCTGCTGCTAGGCTG	TM = 77,09°C	AmiARN 1
Primer IV miR CCoAOMT d	AATATATACTGGTTGAGATGCGCAGAGAGGCCAAAAGTG AA	TM = 74,21°C	AmiARN 1
G4368	CTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAAC	TM = 64,58°C	AmiARN
G4369	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	TM = 66,98°C	AmiARN
G11491	TCGGATCCCAGCAGCAGCCACAGCAAA	TM = 78,23°C	AmiARN
G11494	TCGGTACCGCTGCTGATGCTGATGCCAT	TM = 76,93°C	AmiARN
Attb1-11491	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCGGATCCC AGCAGCAGCCACAGCAAA	TM = 87,83°C	AmiARN

Attb2-11494	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCCGGTACCGC TGCTGATGCTGATGCCAT	TM = 88,97°C	AmiARN
proxyAttL1fw (seqLA)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	TM = 67,94°C	Séquençage pDONR207
proxyAttL2rev (SeqLB)	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	TM = 53,34°C	Séquençage pDONR207
pHbm42 mid fw	GGGAGAGTAAGCCGATAATGTGGCAGG	TM = 69,67°C	Séquençage pHbm42
pHbm42mid rev	CCTGCCACATTATCGGCTTACTCTCCC	TM = 69,67°C	Séquençage pHbm42

6.3.10. Génotypage des lignées de *Brachypodium distachyon* « TILLEES » pour le locus Bradi3g16530

La méthode du TILLING a permis d'identifier quinze familles de plantes mutées dans le locus Bradi3g16530. Pour chacune de ces quinze familles une vingtaine de graines ont été semées et cultivées en serre. A partir du stade quatre feuilles, soit environ un mois après le semis, des prélèvements de feuilles ont été réalisés sur chaque plante dans le but d'extraire de l'ADNg par la méthode du CTAB (voir 6.3.2). Des PCR ont été réalisées avec des amorces encadrant la région où les mutations ponctuelles avaient été détectées. Après vérification par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% de la qualité des produits d'amplification, ceux –ci ont été séquencés. Pour chaque échantillon séquencé, un chromatogramme est obtenu et analysé. A chacun des quatre nucléotides est associée une couleur sur le chromatogramme et la présence de l'un des nucléotides dans la séquence ADN sera associée à l'apparition d'un pic de la couleur correspondante.

La vérification des chromatogrammes obtenus a permis d'identifier :

- soit des individus possédant à la position attendue un seul pic de la couleur associée au nucléotide retrouvé dans la forme sauvage du gène étudié. Ces individus sont qualifiés d'azygotes et ils possèdent deux allèles sauvages du gène d'intérêt mais dans un fond génétique muté,

- soit des individus possédant à la position attendue un seul pic de la couleur associée au nucléotide retrouvé dans la forme mutée du gène étudié. Ces individus sont qualifiés d'homozygotes et ils possèdent deux allèles mutés du gène d'intérêt,
- soit des individus possédant à la position attendue deux pics superposés de deux couleurs différentes associée au nucléotide retrouvé dans la forme sauvage mais aussi au nucléotide retrouvé dans la forme mutée du gène étudié. Ces individus sont qualifiés d'hétérozygotes et ils possèdent un allèle sauvage et un allèle muté du gène.

Les semis sont renouvelés en cas d'absence d'identification d'individus hétérozygotes ou homozygotes. Lors de l'identification d'un individu hétérozygote, les grains de celui-ci sont semés de nouveau dans le but de détecter la présence d'un individu homozygote dans sa descendance.

6.3.11. Culture et géotypage de lignées d'insertion T-DNA de *Brachypodium distachyon*

Des cultures de *B. distachyon* sont réalisées sur un milieu gélosé Murashige & Skoog contenant de l'hygromycine afin d'éliminer les plantes ne contenant pas l'ADN-T. Les graines étant issues de culture en « bulk », une récolte contient les graines de plusieurs plantes hétérozygotes et la ségrégation des gènes fait que les plantes ne contiennent pas toutes l'ADN-T donc le gène de résistance à l'hygromycine.

L'ADNg des plantes est extrait suivant la méthode CTAB (voir 6.3.2).

L'amplification de l'ADN est réalisée par PCR avec un couple d'amorces ciblant l'ADN-T puis avec un couple d'amorces ciblant le gène (partie codante, UTR ou promoteur) où devrait se trouver l'ADN-T ou une amorce ciblant l'ADN-T et une amorce ciblant le gène cible.

Les résultats de la PCR sont observés après électrophorèse sur un gel d'agarose 0,8%.

6.3.12. Purification de produits de PCR par l'utilisation du kit "EZ-10 Spin Column PCR Products Purification (Bio Basic Inc.)"

- 5 volumes de tampon B3 sont ajoutés au produit de la PCR. Après avoir mélangé par retournement, la solution est transférée sur une colonne EZ-10 contenant une membrane de silice capable de fixer les acides nucléiques puis laissée à température ambiante pendant 2 min. Les colonnes sont ensuite centrifugées à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).

- Les tubes collecteurs sont vidés et 750 µL de solution de lavage sont versés sur les colonnes qui sont alors centrifugées à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Cette étape est réalisée deux fois.
- Le tube collecteur est vidé et la colonne est centrifugée à 10000 rpm pendant 1 min afin d'éliminer les résidus éventuels de solution de lavage (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les colonnes sont placées sur de nouveaux tubes de 1,5 mL. 50 µL de tampon d'élution sont versés sur les membranes qui sont laissées à température ambiante pendant 2 min. Les colonnes sont centrifugées à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les tubes de produits de PCR purifiés sont alors gardés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservés à -20°C pour stockage.

6.3.13. Electrophorèse en gel d'agarose

L'agarose possède la capacité à former un maillage moléculaire ralentissant la migration de composés tels que les molécules d'ADN suivant leur taille. Dans un champ électrique, une molécule d'ADN chargée négativement migrera vers le pôle positif du champ électrique. La vitesse de migration est proportionnelle à la taille de la molécule. Les molécules les plus petites migreront plus vite et se retrouveront plus proche du pôle positif. La densité du maillage souhaité est directement liée à la taille des molécules étudiée. Un gel à 0,8% d'agarose, donc à mailles larges, est utilisé quand on souhaite séparer des fragments d'ADN de plus de 500 paires de bases et un gel à 2% d'agarose, à mailles plus fines, est utilisé quand on souhaite séparer des fragments d'ADN de moins de 500 paires de bases.

Pour un gel de 100 mL :

- 0,8 g ou 2 g d'agarose (Fisher Scientific) sont pesés et dissous dans 100 mL de tampon TAE (pour Tris acétate EDTA) 0,5X (Invitrogen™ life technologies) par chauffage. Une goutte de bromure d'éthidium 0,5 mg/ml (BET) (Merck) est ajoutée avant de couler le gel.
- Une fois le gel polymérisé, l'électrophorèse est réalisée dans une cuve contenant du tampon TAE 0,5X. Les échantillons sont mélangés à du tampon de charge (Bleu de Bromophénol 2,5 mg/ml, Glycérol 50%, Tris-HCl 5 mM, EDTA 0,5 mM pH8) avant d'être déposés dans chaque puits. Suivant la taille attendue des acides nucléiques, le marqueur de taille Quick-Load® 1 kb DNA ladder (New England BioLabs® Inc.) ou Quick-Load 100 pb DNA ladder (New England BioLabs® Inc.) est utilisé.
- La migration est réalisée à 100 Volt pendant 30 min. Les bandes sont observées par exposition aux UV grâce au Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

6.3.14. Purification d'ADN à partir de gel d'électrophorèse par l'utilisation du kit "EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Bio Basic Inc.)"

Lorsqu'un échantillon d'ADN comporte des fragments de différentes tailles et qu'un seul de ces fragments nous intéresse, il est nécessaire de procéder à une purification d'ADN à partir du gel d'électrophorèse.

- Après électrophorèse en gel d'agarose, les bandes d'ADN sont découpées et transférées dans des tubes de 1,5 mL. 400 µL de tampon Binding Buffer II sont ajoutés pour 100 mg d'agarose. Les tubes sont incubés à 60°C pendant 10 min et mélangés au vortex régulièrement afin de dissoudre l'agarose.
- Une fois l'agarose dissout, la solution est transférée sur une colonne contenant une membrane de silice et laissée à température ambiante pendant 2 min avant d'être centrifugée à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Le tube collecteur est vidé et 750 µL de solution de lavage sont versés sur la colonne. Après une centrifugation d'une minute à 10000 rpm, le tube collecteur est vidé et cette étape est renouvelée (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Le tube collecteur est vidé et la colonne est centrifugée à 10000 rpm pendant 1 min afin d'éliminer les résidus éventuels de solution de lavage (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).
- Les colonnes sont placées sur de nouveaux tubes de 1,5 mL. 50 µL de tampon d'élution sont versés sur les membranes qui sont laissées à température ambiante pendant 2 min. Les colonnes sont centrifugées à 10000 rpm pendant 2 min (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).

La concentration des ADN purifiés est alors mesurée au spectrophotomètre (voir section 6.3.6). Les ADN sont gardés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou conservés à -20°C pour stockage.

6.3.15. Clonage par la méthode Gateway® (Invitrogen™ life technologies)

Le système Gateway® permet de réaliser des clonages par recombinaison grâce à l'ajout de sites de recombinaison de part et d'autre du fragment d'ADN que l'on souhaite cloner. Cette technique a été développée sur la base de la recombinaison réalisée par le phage lambda afin d'intégrer son ADN dans le chromosome bactérien de *E. coli*. Une première étape nommée BP permet le transfert du fragment d'ADN dans un plasmide d'amplification tel que le

pDON207 grâce à la présence des séquences de recombinaisons AttB et AttP. Une seconde étape nommée LR permet le transfert du fragment d'ADN dans un plasmide d'expression tel que pDEST17, pETG10A ou encore pHbm42GW7 grâce à la présence des séquences de recombinaisons AttL et AttR.

Il faut préalablement réaliser une PCR afin d'intégrer au fragment d'ADN à cloner les séquences AttB1 et AttB2 nécessaires à la recombinaison par BP.

6.3.15.1. BP : transfert d'un fragment d'ADN dans le plasmide d'amplification

- 150 ng de pDONR207 sont mélangés à 300 ng de produit de PCR et à 1 µL d'enzyme BP Clonase du kit "Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix" (Invitrogen™ *life technologies*). De l'eau stérile est ajoutée pour atteindre 5 µL de solution.
- La préparation est laissée sur glace pendant 2 min, mélangée au vortex et incubée à température ambiante pendant 1h30.
- 2,5 µL de la préparation sont alors utilisés pour une transformation de bactéries DH10b par électroporation. Le reste est conservé à -20°C dans l'éventualité où la transformation n'aurait pas fonctionné.

6.3.15.2. LR : transfert d'un fragment d'ADN dans un plasmide d'expression

- 300 ng de pDONR207 contenant le fragment d'ADN à cloner sont mélangés à 150 ng du plasmide d'expression et à 1 µL de l'enzyme "LR Clonase kit Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix" (Invitrogen™ *life technologies*). De l'eau stérile est ajoutée pour atteindre 5 µL de solution.
- La préparation est laissée sur glace pendant 2 min, mélangée au vortex et incubée à température ambiante pendant 4h.
- 2,5 µL de la préparation sont alors utilisés pour une transformation de bactéries DH10b par électroporation. Le reste est conservé à -20°C dans l'éventualité où la transformation n'aurait pas fonctionné.

6.3.16. Construction d'un microARN artificiel :

Un microARN artificiel peut être construit à partir de la séquence d'un microARN connu appartenant à une plante proche de celle d'intérêt. Ici, le microARN miR528 de riz a été utilisé comme matrice et les séquences spécifiques à l'extinction du gène initial ont été

modifiées afin de cibler un ou plusieurs gènes. Cette modification se fait par des PCR successives en utilisant l'ADN polymérase de haute-fidélité *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*.

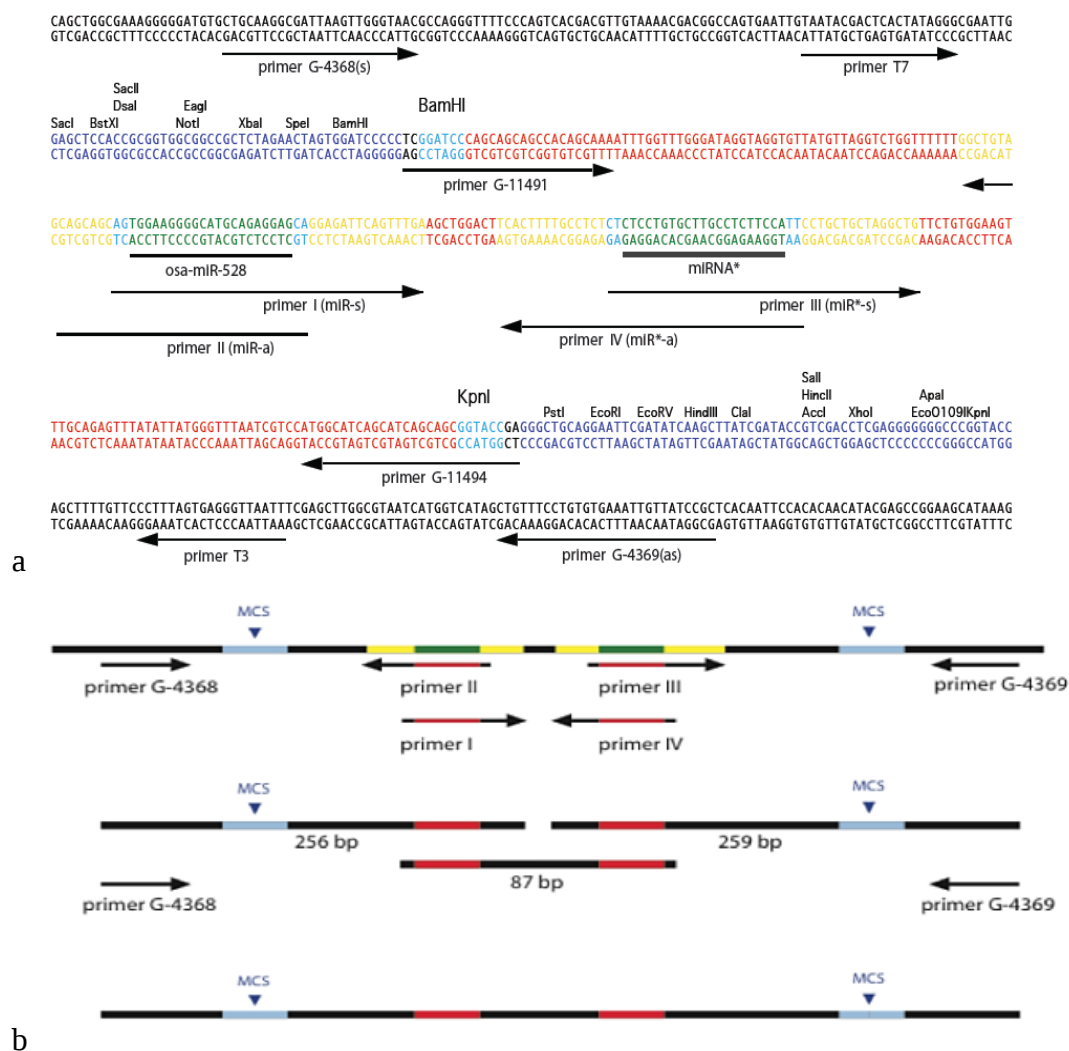


Figure 84 : Modification des séquences de OsaMiR528.

- Dans un premier temps, trois PCR indépendantes sont effectuées afin de modifier le miR528.
- Une première PCR est réalisée à partir de 500 ng du plasmide pNW55_OsamiR528 en utilisant les amorces G4368 s'hybridant sur le miR528 et miR II (primer II sur la Figure 1 b) contenant la section modifiée,
- Une seconde PCR est réalisée à partir de 500 ng du plasmide pNW55_OsamiR528 en utilisant les amorces miR I (primer I sur la Figure 1 b) et miR IV (primer IV sur la Figure 1 b) contenant les sections modifiées,

- Une troisième PCR est réalisée à partir de 500 ng du plasmide pNW55_ OsamiR528 en utilisant les amorces G4369 (s'hybridant sur le miR528) et miR III (primer III sur la Figure 1 b) contenant la section modifiée.
 - Le programme suivant est utilisé pour ces trois PCR : une première étape de dénaturation à 98°C pendant 30 s est suivie d'une dénaturation à 98°C de 10 s, d'une hybridation à 55°C de 30 s et d'une élongation à 72°C de 20 s. Ces trois dernières étapes sont répétées 35 fois. Une étape d'élongation finale à 72°C de 5 min termine le programme.
 - Une électrophorèse en gel d'agarose 2% est réalisée à partir de 5 µL de produit de PCR afin de contrôler l'amplification. Les tailles des amplicons attendues pour la première et troisième PCR sont d'environ 300 pb et pour la deuxième PCR d'environ 100 pb.
 - Lorsque les PCR ont produit des fragments de taille attendue, ceux-ci sont purifiés en utilisant le kit "EZ-10 Spin Column PCR Products Purification" (*Bio Basic Inc.*) décrit paragraphe 6.3.14.
 - Une quatrième PCR utilisant comme matrice 300 ng de chaque produit des PCR précédentes est réalisée en présence des amorces G4368 et G4369. Le programme utilisé est le même que précédemment.
 - Une électrophorèse en gel d'agarose 2% est réalisée comme précédemment et la taille des produits d'amplification attendue est d'environ 400 pb.
 - Les fragments sont ensuite purifiés comme précédemment.
 - Le produit de PCR purifié est séquencé à partir des amorces G4368 et G4369 ou G11491 et G11494 pour vérifier que le microARN produit contient bien les modifications prévues.
 - Une cinquième PCR est réalisée afin d'introduire les sites Attb1 et Attb2 nécessaires au clonage par Gateway®. Pour cela, 300 ng du produit de la quatrième PCR purifié et séquencé sont utilisés en présence des amorces Attb1-11491 et Attb2-11494. La PCR, l'électrophorèse, et la purification du produit PCR sont réalisées comme décrit précédemment.
 - Le produit purifié de la cinquième PCR est introduit dans le plasmide pDONR 207 par recombinaison BP (paragraphe 6.3.15.1).
 - Des bactéries DH10b électro-compétentes sont transformées par le produit de BP et mises en culture sur une boîte de milieu LB contenant de la gentamycine.
 - Les plasmides pDONR207_amiARN sont extraits à partir d'une solution saturée de bactéries en utilisant le kit "EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps de *Bio Basic Inc.*", comme décrit paragraphe 6.3.3. L'efficacité de l'extraction est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% de 5 µL de plasmides purifiés. Les tailles attendues sont de 5586 pb pour le pDONR207 vide et de 3632 pb pour le pDONR207 contenant la construction amiARN.
- Après avoir dosé la quantité de plasmides purifiés, ils sont séquencés à partir des amorces SeqLA et SeqLB qui se fixent en amont et en aval de la région modifiée.

- Après avoir obtenu la séquence du pDONR207_amiARN, une recombinaison LR est effectuée en utilisant le pDONR207_amiARN et le pIPKb2 comme décrite dans la section 6.3.15.2.
- Des bactéries DH10b électro-compétentes sont transformées par le produit de la réaction de LR et mises en culture sur une boîte de milieu LB contenant de la spectinomycine et de la streptomycine.
- Les plasmides pIPKb2 contenant la construction amiARN sont extraits à partir d'une solution saturée de bactéries en utilisant le kit "EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps de *Bio Basic Inc.*". L'efficacité de l'extraction est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% de 5 µL de plasmides purifiés. Les tailles attendues sont de 13992 pb pour le pIPKb2 vide et de 12599 pb pour le pIPKb2 contenant la construction amiARN.
- Après avoir dosé la quantité de plasmides purifiés, ils sont séquencés avec les amorces IpKb2 fw et IPKb2 rev.

6.3.17. Modification d'un nucléotide par mutagenèse dirigée, utilisation du kit "QuickChange II Site-Directed Mutagenesis" de Agilent

Le kit "QuickChange II Site-Directed Mutagenesis" de Agilent permet, à partir d'un plasmide contenant la séquence ADN à modifier, de créer une mutation. Pour cela, des amorces en orientation "sens" et "anti-sens" s'hybrident sur la séquence à modifier et contenant la mutation souhaitée sont nécessaires.

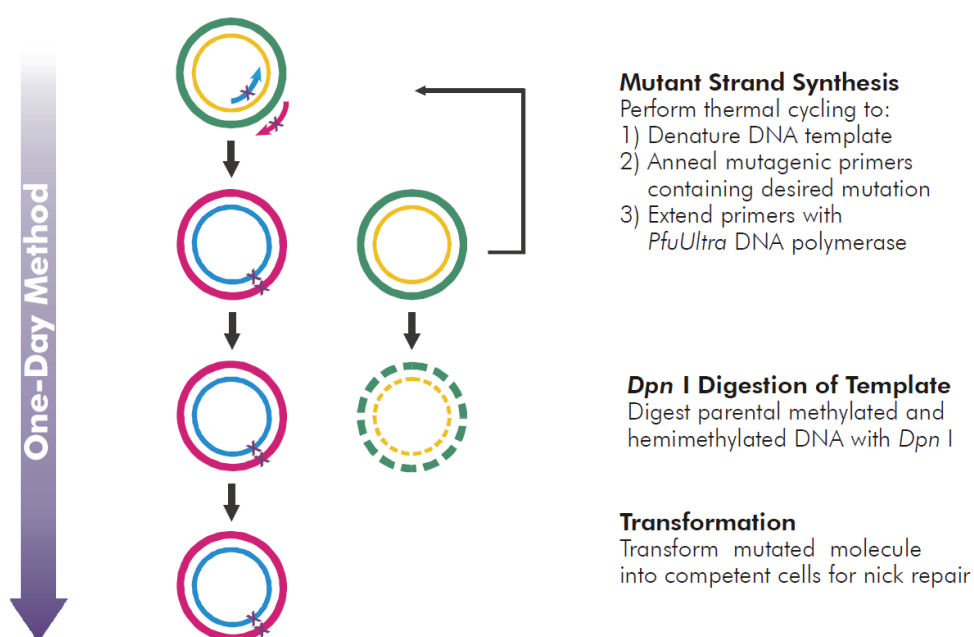


Figure 85 : Modification d'une séquence d'ADN par mutagenèse dirigée.

- Une PCR est réalisée avec pour matrice 50 ng de plasmide contenant la séquence à modifier dans un mélange réactionnel composé d'une solution tampon 1x, de 125 ng de chaque amorce, de 1 mM de chaque dNTP, de 2,5 U d'ADN polymérase "*PfuUltra* HF DNA polymerase" et d'eau distillée jusqu'à atteindre un volume réactionnel de 50 µL. Le programme de PCR commence par une dénaturation de 30 s à 95°C suivie d'une dénaturation de 30 s à 95°C, d'une hybridation de 1 min à 55°C et d'une élongation de 5 min à 68°C. Ces trois étapes sont répétées 12 fois comme préconisé par le protocole car la modification à réaliser est une mutation ponctuelle. Il est possible de déposer 10 µL de produit de PCR sur gel d'agarose 0,8% afin de vérifier l'efficacité de la PCR.
- Après avoir refroidi les tubes en les laissant 2 min sur glace, 10 U de l'enzyme Dpn I sont ajoutés. L'enzyme Dpn I est capable de dégrader l'ADN méthylé du plasmide initial. Il ne restera que le plasmide copié lors de la PCR contenant la modification qui n'est pas issu d'une bactérie et donc non méthylé. La solution est mélangée par pipetage et incubée 1 h à 37°C.
- 5 µL de la solution finale sont utilisés pour la transformation des bactéries.

6.4. Protocoles de transformations stables de bactéries et de plantes

6.4.1. Transformation des bactéries

6.4.1.1. Transformation de bactéries *E. coli* DH10b par électroporation

- 300 ng de plasmides sont ajoutés à des bactéries rendues électro-compétentes.
- Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation de 1 mm de distance entre les électrodes et laissé 10 min sur glace. L'électroporateur de cellules (Biorad) est réglé à une intensité de 2 V après y avoir placé la cuve. Le bouton « pulse » est actionné deux fois. Il permet de délivrer un courant électrique qui, en traversant la cuve, va provoquer des trous dans la membrane des bactéries permettant l'entrée des plasmides. L'efficacité de la transmission du courant peut être vérifiée en appuyant sur « time constant », cette valeur doit être comprise entre 3,2 et 4,4.
- Les bactéries sont alors rapidement mises en suspension dans 1 mL de milieu LB liquide et incubées 1h à 37°C.
- 150 µL de cette suspension de bactéries sont étalés sur une boîte de Petri contenant du milieu LB agar avec l'antibiotique adéquat.
- Le reste de la suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 2 min et 700 µL de milieu LB sont enlevés (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Le culot de bactéries est remis en suspension dans le

LB liquide restant avant d'être étalé sur une deuxième boîte de LB agar contenant l'antibiotique adéquat.

- Les boîtes sont incubées 16h à 37°C.

6.4.1.2. Transformation de bactéries *A. tumefaciens* (souche AGL1) par électroporation

- 40 µL d'agrobactéries électro-compétentes sont mélangées à 300 ng de plasmides. Le mélange est transféré dans une cuve à électroporation de 1 mm froide. La cuve est placée dans l'électroporateur et une décharge électrique de 1,25 V est appliquée.
- Le mélange est remis en suspension dans 1 mL de milieu LB liquide et transféré dans un tube de 1,5 mL. Le tube est incubé à 28°C pendant 4 h.
- 150 µL de cette suspension de bactéries sont étalés sur une boîte de LB agar contenant l'antibiotique adéquat.
- Le reste de la suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 2 min et 700 µL de milieu LB sont enlevés (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Le culot de bactéries est remis en suspension dans le LB liquide restant avant d'être étalé sur une boîte de LB agar contenant l'antibiotique adéquat.
- Les boîtes sont incubées 2 à 3 jours à 28°C.

6.4.1.3. Transformation de bactéries *E. coli* RosettaTM(DE3) par choc thermique

- Les bactéries thermo-compétentes mélangées à 300 ng de plasmides sont laissées 30 min sur glace. Elles sont plongées dans un bain-marie à 42°C pendant 40 s avant d'être transférées sur glace pendant 2 min. Les bactéries sont mises en suspension dans 1 mL de milieu LB liquide et incubées 1 h à 37°C.
- 150 µL de cette suspension de bactéries sont étalés sur une boîte de LG agar contenant l'antibiotique adéquat.
- Le reste de la suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 2 min et 700 µL de milieu LB sont enlevés (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Le culot de bactéries est remis en suspension dans le LB liquide restant avant d'être étalé sur une boîte de LB agar contenant l'antibiotique adéquat.
- Les boîtes sont incubées 16h à 37°C.

6.4.1.4. Transformation de bactéries *A. tumefaciens* (souche C58) par choc thermique

- Les agrobactéries congelées sont laissées 20 min sur glace.
- 300 ng de plasmides sont mélangés aux bactéries avant de les laisser reposer 10 min sur glace.

- Les tubes d'agrobactéries mélangées aux plasmides sont plongés dans de l'azote liquide pendant 5 min avant d'être laissés à température ambiante pendant 10 min.
- Les bactéries sont mises en suspensions dans 1 mL de milieu LB liquide et incubées 12 h à 28°C.
- Les tubes de bactéries sont centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min. 750 µL de milieu LB sont éliminés (Eppendorf mini-spin, rotor 15299). Le culot de bactéries est remis en suspension dans le LB liquide restant et étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB agar et un antibiotique adapté.
- Les bactéries sont incubées 2 à 3 jours à 28°C.

6.4.2. Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* via *Agrobacterium tumefaciens*

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* à transformer sont semées environ 5 semaines avant la transformation pour être à un stade de floraison peu avancé où les fleurs sont encore fermées afin que la fécondation n'ait pas encore eu lieu (hampes florales d'environ 10 cm environ). Les plantes peuvent être préparées en coupant les siliques déjà formées, ce qui augmentera la proportion de graines transformées.

- 500 mL de culture d'agrobactéries dans du milieu LB additionné d'antibiotiques sont préparés la veille de la transformation. La densité optique de la culture mesurée au spectrophotomètre à 600 nm doit être comprise entre 0,6 et 0,8.
- Les agrobactéries sont centrifugées à 6500 rpm à 4°C pendant 10 minutes (Sigma 6K15, rotor 12500). Le surnageant est éliminé et les culots de bactéries sont remis en suspension dans 250 mL de milieu d'infiltration (25 g de saccharose, 100 mL de Silwet et de l'eau stérile jusqu'à atteindre 500 mL). Cette préparation contient un adjuvant qui va renforcer l'action des agrobactéries dans la plantes.
- Les boutons floraux sont trempés pendant 2 minutes dans la suspension d'agrobactéries.
- Les plantes après infiltration sont laissées en culture jusqu'à leur séchage et leurs graines sont récoltées, séchées et stérilisées.

6.4.3. Transformation stable de *Brachypodium distachyon* via *Agrobacterium tumefaciens*

La méthode consiste à transformer de cals embryogènes issus d'embryons immatures de *B. distachyon* par *A. tumefaciens* et à régénérer des plantes transgéniques par embryogenèse somatique. Toutes les étapes de culture *in vitro* du processus de transformation doivent se faire en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination. La méthode est délicate et plusieurs étapes constituent des points critiques pour la réussite du

processus (conditions de culture de la plante mère, choix des embryons immatures, choix du type de cal pour la transformation, choix de l'agent de sélection, stade auquel l'embryon somatique est isolé pour enracinement).

Production de plantes mères :

- Des graines de Bd21-3 sont trempées dans de l'eau pendant 5 jours à 4°C pour stratification.
- Une ou plusieurs graines sont ensuite semées par pot à 1cm de la surface du terreau humide.
- Les pots sont placés en chambre de culture dont la photopériode est de 20 h de lumière, l'intensité lumineuse de 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, l'hygrométrie de 60 % et la température de 24°C.
- Après 6 à 8 semaines de cultures, les plantes mère arrivent à épiaison. Les épis sont prélevés à partir de 10 jours après l'épiaison. Les épis encore verts et contenant des grains tendres mais bien remplis sont prélevés pour l'extraction des embryons immatures.

Production de cals embryogènes :

- Les épis immatures sont prélevés en chambre de culture et stérilisés pendant 30 min dans un mélange d'eau de javel (une pastille de barychlore contenant 1,5 g de chlore actif dissoute dans 800 ml d'eau stérile) et de savon Gevic (10 mL de savon préalablement dissout au 1/5). Les épis sont récupérés sous une hotte à flux laminaire avec une pince stérile et placés dans un pot stérile avant d'être rincés deux fois avec de l'eau distillée stérile.
- L'eau est éliminée mais pas complètement afin de garder les épillets humides pour une meilleure manipulation.
- Les épis sont sortis un par un pour être disséqués en conditions stériles. Les épillets puis les grains sont séparés à l'aide d'une pince et d'un scalpel stériles. Sous une loupe binoculaire placée sous la hotte à flux laminaire, la glume est enlevée et le grain est décortiqué afin de dégager et récupérer l'embryon. L'embryon se trouve à l'extrémité inférieure du grain, sur la face dorsale.
- Seuls les stades très juvéniles d'embryons produisent du cal embryogène (figure 86).

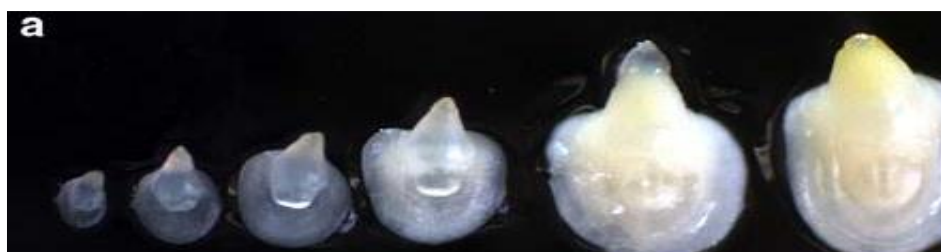


Figure 86 : Photographies d'embryons de Bd21-3 à différents stades de croissances. Les 4 premiers embryons à gauche donneront du cal embryogène. Les 2 gros embryons à droite donneront du cal non embryogène (on observe alors une coloration jaune des embryons).

- L'embryon est posé sur un milieu d'induction de cal (milieu MS M0222.0050 Duchefa 4,4 g/L, saccharose 30g/L, MES 14%, BCP 0,16%, CuSO₄ 0,6 mg/L, l'agent gélifiant Phytigel 2g/L et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 2,5 mg/L dans 1 L d'eau distillée) sans l'enfoncer dans la gélose. Ce milieu contient des éléments permettant le développement de cals embryonnaires à partir d'embryons jeunes.
- Une fois tous les embryons prélevés, les boîtes sont scellées grâce à une bande de paraffine et placées à l'obscurité et à 28°C pendant 6 semaines. Au cours de cette période, deux repiquages sont réalisés 3 puis 5 semaines après la mise en culture sur des milieux frais d'induction de cals afin d'assurer une bonne croissance des cals et d'éviter l'épuisement du milieu nutritif (figure 87).

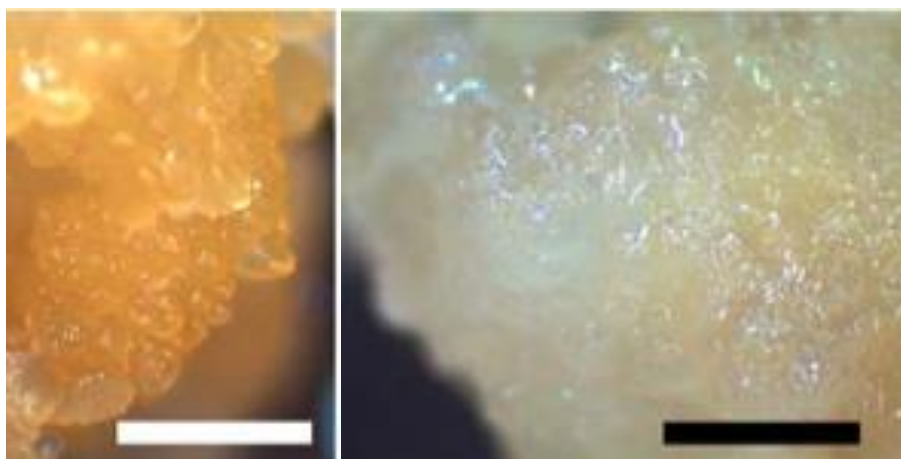


Figure 87 : Photographies de cals embryogènes et non embryogènes. A gauche, une photo de cal capable de produire des cellules embryogènes qui pourront redonner une plante entière. A droite, une photo de cal non embryogène issu d'un embryon trop mature et qui ne pourra pas donner des cellules embryogènes et une plante entière.

Transformation via Agrobacterium tumefaciens

- Deux semaines avant la date prévue de transformation des cals, des bactéries *A. tumefaciens* de la souche AGL1 sont transformées avec le plasmide contenant la construction que l'on souhaite introduire dans la plante. La transformation est vérifiée par PCR à partir des plasmides extraits des bactéries AGL1 transformées.
- Quatre jours avant la date prévue de transformation, la culture de *A. tumefaciens* est repiquée sur un nouveau milieu et incubée 2 à 3 jours à 28°C. Une suspension bactérienne est réalisée en mélangeant les bactéries issues de la culture et le milieu de co-culture (200 mL de Milieu S30, acétosyringone 30 mg/L, de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 2,5 mg/L et pluronic 10 µL/L). Le

milieu de co-culture contient des composés favorisant l'action des agrobactéries (acétosyringone). L'absorbance à 600 nm de la suspension doit être comprise entre 0,6 et 0,8.

- Les cals embryogènes sont placés dans des tubes de 50 mL en présence de la suspension bactérienne. La co-culture est mélangée par retournement et laissée à température ambiante pendant 5 min. La suspension bactérienne est éliminée par aspiration puis par égouttage sur du papier filtre 2 fois pendant 2 min.
- Les cals sont ensuite placés en co-culture sur un papier filtre stérile dans une boîte de Petri à l'obscurité pendant 3 jours à 23°C. A la fin de la co-culture, les cals doivent être secs afin d'éviter la surcroissance des agrobactéries lors des étapes suivantes.
- Les cals sont transférés sur un milieu de sélection (milieu MS M0222.0050 Duchefa 4,4 g/L, saccharose 30 g/L, MES 14%, BCP 0,16%, CuSO₄ 0,6 mg/L, l'agent gélifiant Phytigel 2g/L, de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 2,5 mg/L, trimentin 250 mg/L et hygromycine 40 mg/L dans 1 L d'eau distillée). Les boîtes de Petri sont scellées par une bande de paraffine et elles sont placées à l'obscurité, à 28°C pendant 3 semaines.
- Les cals sélectionnés (figure 88) sont repiqués sur un milieu gélosé de régénération qui va favoriser leur croissance grâce à la présence de molécules régulant la croissance cellulaire (milieu MS M0222.0050 Duchefa 4,4 g/L, maltose 30 g/L, MES 14%, BCP 0,16%, l'agent gélifiant Phytigel 2g/L, kinétine 0,2 mg/L, trimentin 250 mg/L et hygromycine 40 mg/L dans 1 L d'eau distillée) et placés en chambre de culture *in vitro* à 28°C à 16h de lumière.

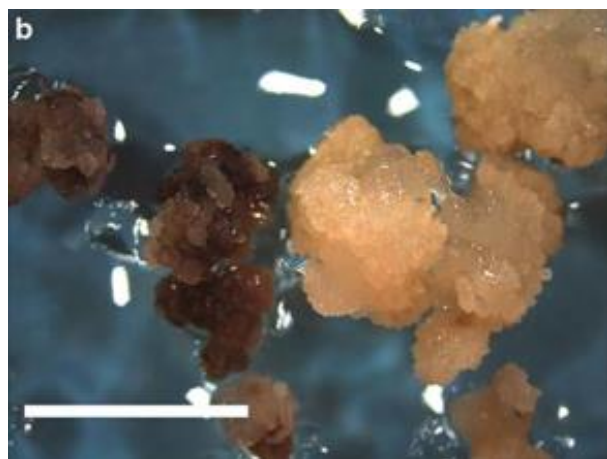


Figure 88 : Photographies de cals transformés et non transformés. A gauche, une photo de cal non sélectionné car ne contenant pas le vecteur et la résistance à l'hygromycine. A droite, une photo de cal sélectionné car résistant à l'hygromycine grâce au vecteur qu'il a intégré.

- Lorsque la partie aérienne des plantules régénérées mesure environ 2 cm et la racine commence à se former (figure 89), chaque plantule est isolée dans un tube en verre dédié à la culture *in vitro* (figure 90) contenant un milieu gélosé pour enracinement (milieu MS M0222.0050 Duchefa

4,4 g/L, saccharose 10g/L, MES 14%, BCP 0,16%, l'agent gélifiant Phytigel 2g/L et de l'AIB (acide β -indolbutyrique, hormone membre de la famille des auxines) 0,25 mg/L dans 1 L d'eau distillée).

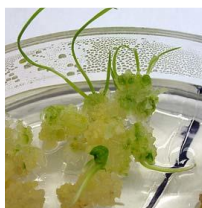


Figure 89 : Photographie de plante en régénération. Régénération de plantules en boîte de Petri, 3 semaines après transfert sur milieu de régénération.

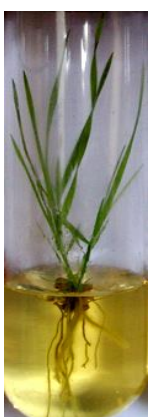


Figure 90 : Photographie de plantes en phase d'enracinement. Enracinement en tube, 2 semaines après isolation des plantules.

- Lorsque les plantules font 5 à 6 cm et sont bien enracinées (figure 90), elles sont transférées en chambre de culture (20 h de lumière, 24°C le jour et 18°C la nuit, 60% d'humidité) dans des pots contenant du terreau humide (figure 91). Une mini-serre est utilisée pour recouvrir les pots pendant les 4 premiers jours pour éviter le dessèchement des plantules.



Figure 91 : Photographie de plante transformée, régénérée et transférée en serre depuis trois semaines.

Les plantes obtenues sont hémizygotes, elles possèdent l'insert muté sur un seul de ses deux chromosomes. Elles donneront des grains qui seront pour $\frac{1}{4}$ d'entre eux de type homozygote, pour $\frac{1}{4}$ de type sauvage et pour $\frac{1}{2}$ de type hétérozygote. Une analyse des plantes obtenues à partir de ces grains par génotypage est réalisée pour trouver les plantes homozygotes pour le transgène.

6.5. Protocoles de cytologie

6.5.1. Coloration GUS

- Des sections transversales de 2000 μm de grains réalisées au vibratome sont préfixées dans de l'acétone 90% glacial (-20°C) et laissées au repos pendant 20 minutes sur glace.
- Les sections sont rincées à l'eau distillée 2 à 3 fois afin d'éliminer l'acétone.
- Quelques gouttes de tampon GUS (tampon phosphate 50 mM pH7, potassium ferricyanide 10 mM, potassium ferrocyanide 10 mM, Triton 0,5%, XGlu 0,25 mM et de l'eau osmosée) sont versées sur les coupes avant de les incuber une nuit à 37°C . Si les tissus étudiés expriment le gène codant pour la protéine β -glucuronidase, l'enzyme va hydrolyser son substrat, le XGlu (pour acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique) qui prendra une couleur bleue.
- Les coupes sont rincées à l'eau distillée et décolorées quelques minutes dans de l'alcool à 70%.

Les coupes peuvent être observées à la loupe binoculaire ou au microscope photonique.

6.5.2. Coloration de Maüle (adapté de Lorenzen et al, 1996)

Les colorations de Maüle sont toujours réalisées en parallèle sur les échantillons mutés et sur les échantillons témoins. Les mêmes quantités de réactifs et les mêmes durées doivent être respectées. C'est une coloration qui permet de colorer qualitativement les unités syringiles des lignines en rouge et les unités coniféryles en orange.

- Des sections transversales de tiges d'épaisseur 2000 μm (réalisées au vibratome) et de grains d'épaisseur 50 μm (réalisées au cryotome) sont déposées sur des lames de verre.

- Après élimination de l'excès d'eau, quelques gouttes de KMnO_4 (1%) sont déposées sur chaque coupe et laissées 5 min. Le KMnO_4 est éliminé et les coupes sont rincées à l'eau jusqu'à disparition du KMnO_4 .
- Les coupes sont ensuite décolorées par une goutte de HCl (30%) pendant 1 min. L'acide est éliminé puis l'échantillon est rincé à l'eau osmosée pendant 1 min. Dans le cas des grains, ils sont alors recouverts d'une fine couche d'agar à 2% avant le rinçage à l'eau pour que la coupe se tienne.
- Après élimination de l'eau, quelques gouttes de NaHCO_3 (5%) sont déposées sur les sections. Une lamelle est alors déposée sur les coupes qui doivent être rapidement observées au microscope optique ou au macroscopie.

6.5.3. Coloration au phloroglucinol (réactif de Wiesner)

Les colorations au phloroglucinol sont toujours réalisées en parallèle sur les échantillons mutés et sur les échantillons témoins. Les mêmes quantités de réactifs et les mêmes durées doivent être respectées. L'intensité de la coloration dépend du niveau de lignification des échantillons traités. C'est une coloration spécifique des cinnamaldéhydes qui permet de colorer en rouge/rose les groupements coniferaldéhydes terminaux et en rouge/violet les groupements sinapaldéhydes terminaux (Kim et al, 2002). Cette coloration donne une idée générale de la quantité de lignines présentes dans les échantillons analysés.

- Des sections transversales de 2000 μm des échantillons mutés et des témoins sont déposées sur des lames.
- Après élimination de l'excès d'eau, deux gouttes de phloroglucinol (50 mg/mL) sont déposées sur les coupes à l'aide d'une pipette pasteur et laissées pendant 2 min.
- Le réactif est éliminé par plusieurs rinçages par de l'eau osmosée.
- Les échantillons sont alors prêts à être observés.
- Le rinçage par un mélange d'éthanol et de HCl (9:1) est effectué si les observations sont réalisées dans les jours suivants.

6.5.4. Immunohistochimie

Prélèvements et préparation des échantillons :

- Des tiges matures et des grains de *B. distachyon* sont prélevés à 11, 21 et 31 jours après anthèse. Des grains secs sont dégermés et mis à imbiber en boîte de Petri sur papier filtre saturé d'eau à 4°C pendant 24 h.

- Des sections transversales d'environ 1 mm d'épaisseur sont coupées à la lame de rasoir, sous la loupe binoculaire pour la microscopie photonique.

Fixation des échantillons :

- Sous la sorbonne, les échantillons sont rapidement placés dans des tubes à vis contenant une solution de paraformaldéhyde 3%, glutaraldéhyde 1% dans du tampon phosphate PBS 0,1 M pH 7,4 (NaCl à 8 g/L ; KCl à 0,2 g/L ; Na₂HPO₄ à 1,44 g/L et KH₂PO₄ à 0,24 g/L).
- Les tubes sont mis sous vide jusqu'à ce que les échantillons tombent dans le fond du tube, puis ils sont conservés à 4°C pendant au plus 2 jours.
- Sous la sorbonne, la solution de fixation est éliminée. Trois rinçages de 10 min sont réalisés avec le tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Sept rinçages supplémentaires de 10 min sont réalisés avec de l'eau millipore afin d'ôter toute trace résiduelle de fixateur.

Déshydratation :

La résine "London Resin (LR) White Hard Grade" (réf : R1280 de Agar Scientific, revendu par Oxford Instrument) est utilisée pour l'imprégnation et l'inclusion. Cette résine étant miscible à l'alcool, les échantillons sont déshydratés progressivement par des solutions de concentration de plus en plus élevée en éthanol permettant l'élimination de l'eau.

- La déshydratation commence par une première incubation de 30 min dans de l'éthanol à 30%, suivie d'une incubation de 45 min dans de l'éthanol à 50% puis d'une incubation de 1 h dans de l'éthanol 70%.
- Une incubation de 1 h15 dans de l'éthanol 85% est réalisée, suivie d'une incubation de 1 h30 dans de l'éthanol 95% et de 2 incubations successives de 1 h dans de l'éthanol 100%.
- La déshydratation se termine par une incubation des échantillons d'une nuit dans de l'éthanol 100% à 4°C.

Imprégnation dans la résine :

A cette étape, l'éthanol est remplacé progressivement par la résine "LR White Hard Grade".

- L'imprégnation commence par une première incubation de 45 min dans un mélange composé de 80% d'éthanol absolu et de 20% de résine, suivie d'une incubation de 45 min dans un mélange composé de 60% d'éthanol absolu et de 40% de résine, puis d'une incubation de 1 h dans un mélange composé de 40% d'éthanol absolu et de 60% de résine.

- Une incubation de 1h30 dans un mélange composé de 20% d'éthanol absolu et de 80% de résine est réalisée, suivie d'une première incubation de 1 h dans de la résine pure.
- Cette étape est suivie d'une incubation de 2 h des échantillons dans de la résine pure.
- Les échantillons sont enfin incubés dans de la résine pure une nuit à 4°C.

Inclusion dans la résine :

L'inclusion des échantillons se fait à l'abri de l'air, dans des capsules en gélatine.

- Chaque échantillon est immergé dans de la résine "LR White Hard Grade" contenu dans une capsule en gélatine.
- Les capsules d'échantillons sont fermées et placées à l'étuve à 55°C pendant 4 jours.

Les inclusions peuvent se conserver indéfiniment en boîtes à compartiments en plastique transparent à l'abri de l'humidité.

Réalisation de coupes des échantillons pour observations en microscopie photonique :

Des coupes semi-fines de 1000 μm sont réalisées grâce à un ultramicrotome (LEICA EM UC6) et les observations sont réalisées au microscope photonique lié à une caméra Nikon DS-1QM et d'une platine X-Y motorisée gérées par le logiciel NIS.

Immunomarquages :

- Afin d'éliminer les β -glucanes mixtes, polymère abondant dans les parois de *Brachypodium* et notamment dans le grain, les coupes de grains sont incubées pendant 12 h à 40°C avec 40 U de lichénase (*endo*-1,3(4)- β -Glucanase, de *Bacillus* sp., commercialisée par Megazyme EC 3.2.1.73, CAZY Family: GH16, contaminé par de l' α -amylase < 0.0001%), pH6,5.
- Les coupes sont rincées 5 fois pendant 5 min dans l'eau millipore avant d'être bloquées par une incubation de 30 min dans une solution PBS et de sérum albumine bovine (BSA) 3%.
- Les sections de grains et de tiges sont incubées avec l'anticorps primaire. préalablement dilué au 1/20^e pour anti-AX1 (Guillon et al, 2004), 1/2000^e pour anti-5-O-Fer-Ara (Philippe et al, 2007), 1/3 pour INRA-COU1 (Tranquet et al, 2009), non dilué pour KM1 et KM2 (Kiyoto et al, 2013) et non dilué pour KM3 (communication Dr. Yoshinaga) dans une solution de PBS, BSA 1%, Tween 20 0,05%. L'anticorps FerARA étant polyclonal, le sérum pré-immun du lapin 21 a été dilué au 1/2000^e et utilisé comme contrôle.
- Après 6 rinçages de 5 min dans la solution de PBS, BSA 1%, Tween 20 0,05%, les coupes sont incubées pendant 1 h avec l'anticorps secondaire GAM (pour Goat Antibody) Alexa 546 préalablement dilué au 1/100^e dans une solution de PBS, BSA 1%, Tween 20 0,05%.

- Pour finir, les coupes sont rincées 3 fois pendant 5 min dans du PBS puis 5 fois pendant 65 min dans de l'eau millipore.

6.6. Protocoles d'analyse biochimique des polysaccharides pariétaux

6.6.1. Préparation de matériel insoluble à l'alcool (MIA)

Cette technique permet l'élimination des composés solubles dans l'éthanol et d'inactiver tous les systèmes enzymes enzymatiques.

- Des grains entiers, albumens décortiqués ou tiges secs et déshydratés sont réduits en fines particules dans un ultra-broyeur à azote liquide.
- 100 mg de chaque échantillon sont incubés pendant 30 min dans 2 mL d'éthanol 80% à 100°C.
- Après avoir refroidi les tubes, ils sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min, à température ambiante (Sigma 3K3, rotor 12154-H). Le surnageant contenant les composés solubles est éliminé.
- 2 mL d'éthanol 80% sont ajoutés dans chacun des tubes qui sont mélangés au vortex et centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min, à température ambiante (Sigma 3K3, rotor 12154-H). Le surnageant est éliminé.
- Les tubes sont laissés ouverts à température ambiante pendant 1 à 2 heures sous la hotte à flux laminaire afin que l'éthanol s'évapore.
- Les tubes sont ensuite placés à l'étuve à 40°C, sous vide pendant une nuit.

6.6.2. Dosage des oses neutres par chromatographie en phase gazeuse

Cette expérience est toujours réalisée en dupliquant les MIA d'échantillons. Elle consiste en une hydrolyse acide des polysaccharides en monomères d'oses neutres. Les oses neutres sont ensuite convertis en acétates d'alditols qui sont des composés volatils et qui permettent une simplification de la détection en chromatographie car chaque ose ne donne alors qu'un seul pic.

- 20 mg de poudre de MIA sont incubés dans une solution de H₂SO₄ 26N pendant 30 min à 25°C dans un tube en verre à vis de 10 mL. Cette étape de pré-hydrolyse est nécessaire pour doser le glucose d'origine cellulosique dans les échantillons.

- 1,76 mL d'eau distillée (ou milliQ) et 0,4 mL d'inositol 5 mg/mL (étalon interne, ose présent dans la nature mais pas dans les polysaccharides) sont ajoutés. Les échantillons sont mélangés au vortex.
- 0,5 mL d'un mélange d'oses neutres composé de rhamnose, d'arabinose, de xylose, de mannose, de galactose, de glucose et d'inositol à 1 mg/mL sont mélangés à 0,5 mL de H_2SO_4 4N. Préparés en triplicata, ces mélanges constituent les standards de la réaction et subissent les mêmes étapes de préparation que les échantillons à analyser, sauf la pré-hydrolyse.
- Après la pré-hydrolyse, la concentration en H_2SO_4 est de 2N. Une hydrolyse est réalisée en incubant les échantillons à 100°C pendant 2h en mélangeant régulièrement au vortex.
- Après refroidissement à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804R, rotor A4-44).
- 800 μL de surnageant sont transférés dans de nouveaux tubes (1,3 mL de surnageant restant sont conservés dans des tubes Eppendorf à -20°C pour être utilisé lors du dosage des oses acides). L'acide sulfurique est neutralisé par l'ajout de 0,3 mL d'ammoniaque 25%. Après avoir mélangé au vortex, le pH des tubes est vérifié à l'aide de papier pH, il doit être supérieur à 7.
- Les oses neutres sont ensuite réduits par l'ajout de 0,1 mL d'une solution de NaBH_4 à 100 mg/mL préparé dans de l'ammoniaque 3N. Après avoir mélangé au vortex, les tubes sont incubés à 40°C pendant 1h.
- Après que les tubes aient refroidi, 50 μL d'acide acétique pur sont ajoutés 2 fois à chaque échantillon (cette réaction produit beaucoup de chaleur). Les tubes sont ensuite mélangés au vortex et laissés plusieurs minutes dans de la glace.
- Les oses réduits sont enfin acétylés. 150 μL de l'hydrolysât réduit sont mélangés à 2 mL d'anhydride acétique pur et à 0,2 mL de N-méthylimidazole pur. Après avoir mélangé les échantillons au vortex, ils sont incubés à température ambiante pendant environ 20 min.
- Les oses neutres modifiés en acétates d'alditols sont alors extraits. Pour cela 5 mL d'eau osmosée et 1,5 mL de dichlorométhane sont ajoutés à la solution précédente et les échantillons sont bien mélangés.
- Après décantation, la phase aqueuse est éliminée. 5 mL d'eau osmosée sont ajoutés avant de mélanger fortement les tubes au vortex.
- De nouveau, après décantation, la phase aqueuse est éliminée. La phase organique est transférée dans un vial en verre qui est scellé avant d'être injectée ou conservée à -20°C.

Les échantillons sont injectés sur un chromatographe en phase gazeuse (Autosystem XL, Perkin-Elmer) équipé d'une colonne capillaire en silice fondue greffée chimiquement avec une phase de type OV-225 d'une longueur de 25 m, d'un diamètre de 0,32 mm et d'une épaisseur de 0,25 μm . L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 70 kPa et

la colonne est maintenue à une température de 205°C. Le volume injecté est de 2 µL en mode split (fuite de 100 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 220°C.

6.6.3. Dosage des oses acides par la méthode au MHDP en auto-analyseur

En milieu acide sulfurique concentré et à chaud, les polysaccharides sont hydrolysés et les oses formés sont transformés en dérivés furfuriques. Ces dérivés ont la capacité de se condenser avec différents composés phénoliques afin de donner un complexe coloré. Dans le cas des acides uroniques, le 3-phényl-phénol (métahydroxydiphényl ou MHDP) forme un complexe spécifique avec leurs dérivés furfuriques dont le maximum d'absorption se situe à 520 nm. Le dosage est réalisé sur un auto-analyseur (Skalar) selon les conditions décrites par Thibault (1979).

- Les échantillons sont hydrolysés par une solution d'acide sulfurique concentré contenant du tétraborate de sodium et par une solution d'acide sulfurique concentré sans tétraborate, pour distinguer l'acide glucuronique et l'acide galacturonique dans l'échantillon. En effet l'acide galacturonique donne une réponse équivalente avec ou sans tétraborate, tandis que l'acide glucuronique répond environ dix fois moins sans tétraborate (Thibault, 1979)
- des gammes d'acide galacturonique et d'acide glucuronique de 10, 20, 30, 40 et 50 µg/mL sont préparées.
- Une gamme de glucose est réalisée en tenant compte de la quantité de glucose détectée et mesurée dans les MIA. Ici, une gamme de 100, 200, 300, 400 et 500 µg/mL de glucose a été réalisée à partir d'une solution mère à 1 mg/mL. Cette gamme permet de tenir compte de l'interférence possible des oses neutres dans la méthode au MHDP.
- 320 µL d'échantillon issu des MIA hydrolysés et conservés à -20°C sont mélangés à 1280 µL d'eau osmosée.

6.6.4. Dosage de l'amidon

Le dosage de l'amidon contenu dans les MIA est réalisé à l'aide de deux enzymes, l'α-amylase et l'amyloglucosidase qui sont capables de dégrader l'amidon en glucose.

- 10 mg de MIA et 5 mg d'amidon de maïs sont pesés. L'amidon de maïs correspond au témoin.

- 100 µL de solution de rhamnose à 20 mg/mL et 200 µL de tampon MOPS (acide 3-(N-Morpholino) propanesulfonique 1,15 mg/mL et chlorure de calcium 0,74 mg/mL dans de l'eau désionisée, pH7), sont ajoutés dans les tubes contenant les MIA. Le rhamnose sert d'étalon interne.
- Après les avoir mélangé au vortex, les tubes sont laissés une nuit à température ambiante.
- Le lendemain, 200 µL de la solution de rhamnose à 20 mg/mL et 200 µL de tampon MOPS sont ajoutés aux témoins amidon de maïs. Les tubes sont agités au vortex.
- Les échantillons et les témoins sont incubés 5 min à 120°C puis transférés dans un bain sec à 100°C. 300 µL d' α -amylase thermostable à 100 U/mL sont alors ajoutés. Les tubes sont incubés 6 min à 100°C en les agitant au vortex toutes les 2 min.
- Les tubes sont ensuite transférés à 50°C. Après 5 min, 0,4 mL de tampon acétate de sodium 200 mM, pH 4,5 ainsi que 0,1 mL d'amyloglucosidase 20 U sont ajoutés. Les tubes sont agités au vortex et incubés 30 min à 50°C.
- Les échantillons sont centrifugés à 12000 rpm pendant 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804R, rotor A-4-44). Le surnageant est prélevé et conservé à -20°C pour stockage.
- Avant l'analyse, 10 µL de surnageant sont dilués dans 990 µL d'eau désionisée pour les échantillons et 2 µL dans 998 µL d'eau pour les témoins. Les solutions sont filtrées sur des membranes à 0,45 µm.
- Les échantillons dilués sont dosés par HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography) sur une colonne PA-1 (4x250 mm, Dionex) éluée à 1 mL/min par une solution de NaOH 100 mM. 20 µL de solution sont injectés. Une gamme de glucose et de rhamnose de 2, 4, 6, 12, 20, 30 et 40 µg/mL est utilisée pour la quantification.

6.7. Protocoles d'analyse biochimique des lignines et des composés hydroxycinnamiques

6.7.1. Obtention du résidu pariétal (RP)

Cette technique permet l'élimination des composés solubles dans l'éthanol et d'inactiver tous les systèmes enzymes enzymatiques.

- Des tiges sèches et déshydratés sont réduites en fines particules dans un ultra-broyeur à azote liquide.
- 100 mg de chaque échantillon sont incubés pendant 30 min dans 2 mL d'éthanol 80% à 100°C.
- Après avoir refroidi les tubes, ils sont centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min, à température ambiante (Sigma 3K3, rotor 12154-H). Le surnageant contenant les composés solubles est éliminé.

- 2 mL d'éthanol 80% sont ajoutés dans chacun des tubes qui sont mélangés au vortex et centrifugés à 8000 rpm pendant 10 min, à température ambiante (Sigma 3K3, rotor 12154-H). Le surnageant est éliminé.
- Les tubes sont laissés ouverts à température ambiante pendant 1 à 2 heures sous la hotte à flux laminaire afin que l'éthanol s'évapore.
- Les tubes sont ensuite placés à l'étuve à 40°C, sous vide pendant une nuit.

6.7.2. Dosage des lignines par Lignine-Klason

Cette méthode gravimétrique permet de doser les lignines acido-insolubles. La solubilisation des polysaccharides pariétaux est réalisée dans l'acide sulfurique concentré à température ambiante. L'hydrolyse totale des polysaccharides est achevée dans l'acide dilué et à reflux étape qui permet d'insolubiliser les lignines acido-insolubles. Le résidu obtenu, appelé lignine Klason, est récupéré par filtration avant d'être lavé sur filtre, séché et pesé.

- 300 mg de résidu pariétal sont placés dans un petit bécher de 25 ml et 3 ml d'acide sulfurique concentré à 72% (p/v) sont ajoutés. La suspension est placée à température ambiante durant 2 h, en agitant à l'aide d'une baguette de verre toutes les 30 min.
- Le contenu du bécher est ensuite transvasé dans un ballon à col rodé de 250 ml avec suffisamment d'eau de rinçage pour amener la concentration en acide à 5% (p/v).
- La suspension diluée est portée à reflux grâce à un bain de sable pendant 3 h.
- La suspension refroidie est filtrée sur un creuset filtrant en Pyrex (porosité N°1) protégé par un filtre en fibres de verre (GF/A Whatman), l'ensemble creuset et filtre ayant été préalablement taré.
- Le résidu insoluble recueilli est lavé à l'eau sur le creuset.
- L'ensemble (creuset, filtre et résidu) est séché la nuit à 105°C avant d'être refroidi en dessiccateur et pesé pour obtenir la masse de LK.
- L'ensemble est ensuite incinéré à 550°C pour déduire de la masse de LK obtenue une éventuelle fraction de cendres sulfuriques (cette correction est le plus souvent négligeable).

6.7.3. Répartition des lignines par thioacidolyse

Cette méthode provoque la rupture des liaisons ester et d'une partie des liaisons éther β -O-4 grâce à la présence de BF₃ étherate dans un mélange dioxane/éthanethiol (Lapierre *et al.*

1995). Seules les unités H, G ou S de lignines liées par ces liaisons labiles, vont être thioéthylés. Les monomères sont extraits et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sous forme de dérivés triméthylsilylés.

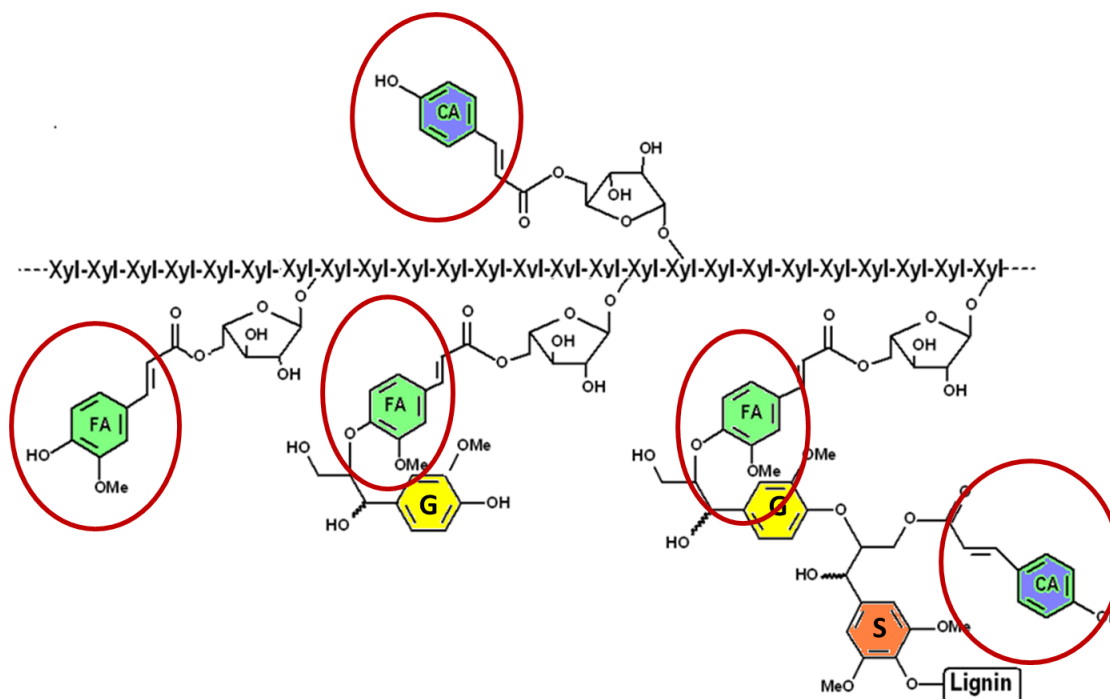


Figure 92 : Rupture des liaisons ester et d'une partie des liaisons éther (β -O-4) par thioacidolyse (communication C. Lapierre)

- Une solution fraîche de thioacidolyse est préparée en versant 10 mL d'éthanethiol et 2,5 mL de BF_3 étherate dans une fiole jaugée de 100 mL contenant 20 mL de dioxane. La fiole jaugée est complétée à 100 mL avec du dioxane afin d'obtenir un mélange de dioxane/éthanethiol (9/1, v/v) en présence de 0,2 M de BF_3 étherate.
- 10 mg de résidu pariétal ou de MIA sont placés dans un tube en verre à bouchon à vis en téflon de 30 mL et 7 mL de solution de thioacidolyse fraîche ainsi que 0,1 mL d'étalon interne (heicosane C21, 2,5 mg/mL dans du CH_2Cl_2) sont ajoutés.
- Les tubes sont fermés et chauffés à 100°C (bain d'huile) pendant 4 h et mélangés doucement régulièrement.
- Après avoir été refroidis dans de l'eau glacée, 7 mL de 0,2 M de NaHCO_3 sont ajoutés à chaque tube afin de neutraliser l'excès de BF_3 étherate.
- 0,1 mL d'une solution à 6 M de HCl sont ajoutés afin de s'assurer que le mélange réactionnel ait un pH inférieur à 3.
- 7 mL de dichlorométhane sont ajoutés à chaque tube avant de les mélanger.

- 10 à 20 mg d'échantillon sont placés en tube plastique à hémolyse auxquels sont additionnés 1 ml de NaOH 1M et 0,1 ml d'étalon interne (solution méthanolique d'éthylvanilline ou d'acide o-coumarique à 1 mg/ml). L'échantillon est incubé 4 h à 40°C ou la nuit à température ambiante, à l'abri de la lumière et avec rotation du tube sur à l'aide d'un carrousel.
- Après acidification par ajout de 0,3 ml d'une solution à 6 M de HCl, le milieu réactionnel est centrifugé à 2000 g pendant 10 min à 8°C.
- Le surnageant est déposé sur cartouche SEPACK C18 (Waters) préalablement conditionnée par un lavage de 2 ml de MeOH, puis par un second lavage de 2 ml d'eau contenant 0,1% HCOOH.
- La cartouche est lavée à l'eau acidulée et les composés phénoliques retenus sont ensuite élués par 1 ml de MeOH.
- La solution filtrée est placée 20 min à -20°C afin d'accélérer la précipitation des impuretés avant d'être ultrafiltrée.
- 1 µL du filtrat est injecté sur une colonne HPLC couplée à une détection UV (barette de diodes).

La colonne employée en HPLC est une colonne Nucleoshell RP18 (dimensions: 50 x 2 mm, granulométrie : 2,7 µm ; Macherey-Nagel) munie de la précolonne correspondante. L'analyse HPLC est réalisée à un débit de 0,5 ml/min en utilisant un gradient de solvants A (eau milliQ contenant 0,1% HCOOH) et B (acétonitrile contenant 0,1% HCOOH), selon le programme suivant : 0-3 min, 100% A ; 3-12 min, 100-80% A ; 12-13 min, 80-20% A ; 13-16 min, 20-100% A. La quantification est réalisée par détection UV 280 nm, à l'aide du standard interne et après calibration à l'aide de composés de référence. Les isomères *E* (majoritaire) et *Z* (minoritaire) d'pAC ou d'AF sont pris en compte.

6.7.5. Acidolyse douce pour quantifier le pAC-Arabinose et le AF-Arabinose

Cette méthode de dosage du CA-Ara et FA-Ara a été publiée dans Petrik et al, 2014 Il s'agit d'une extraction au dioxane à chaud qui permet d'hydrolyser les liaisons glycosidiques arabinose-xylose sans dégrader les liaisons acide hydroxycinnamique-arabinose.

- 10 mg de résidu pariétal ou de MIA sont mis en suspension dans 2 mL de mélange dioxane/eau (9/1, v/v) et de HCl 0,2 M contenant 0,05 mg de standard interne C21 une nuit à 50°C sur un carrousel. Puis 2 mL d'eau sont ajoutés et les échantillons sont extraits avec 3x 4 mL d'EtOAc. Les extraits organiques combinés sont séchés avec du Na₂SO₄ et concentrés pour obtenir un volume de 0,5 à 1 mL. 10 µL d'échantillon sont silylés avec 100 µL de BSTFA et 10 µL de pyridine pendant 1 h à 50°C. Puis les échantillons sont injectés sur un système GC-SM (Supelco) avec une colonne de méthylsilicone 15 m x 0.32 x 0.25 µm d'épaisseur de film, en utilisant l'Hélium comme gaz vecteur (1,5 mL/ min) et les températures suivantes : de 45 à 180°C à 30°C/min, puis de 180 à 280°C à

+3°C/min. Les déterminations quantitatives sont faites à partir des chromatogrammes d'ion à m/z (57+71+85) pour le standard interne C21 (heneicosane), à (308+293) pour pAC-TMS, à (338+323) pour AF-TMS, et à 219 pour pAC-Ara-TMS, le per-TMS éther de 5-O-*p*-coumaroyl arabinose, et à 249 pour AF-Ara-TMS, le per-TMS éther de 5-O-feruloyl arabinose.

6.7.6. Pyrolyse analytique (d'après Ralph et al, 1991 et Dignac et al, 2009)

0,5 à 1 mg de l'échantillon (poudre de MIA) sont déposés au fond d'un tube de quartz puis placés dans une unité de pyrolyse (GSG Curie-Point Pyrolyser 1040 PSC). L'échantillon est pyrolysé à une température augmentant toutes les 15s jusqu'à atteindre 650°C avec un temps de pause de 10 s en utilisant l'hélium comme gaz vecteur. Un Hewlett Packard HP 5890 GC équipée d'une colonne capillaire de quartz (60 m, 0.32 mm, épaisseur de 0.25 µm), recouvert d'une phase polaire de PEG (colonne SolGelWax, SGE) a été utilisée. La température du CG augmente de 30 à 280°C (2°C/min) La température finale est maintenue pendant 15 min.

6.7.7. Dosage des acides phénoliques par HPLC

Cette technique permet de libérer les acides phénoliques estérifiés aux arabinoxylanes et aux pectines par saponification. Après extraction à l'éther et acidification, les acides phénoliques sont dosés par chromatographie en phase inverse.

- Une solution standard d'AF à 1mg/mL contenant du 3,4,5-triméthoxy-trans-cinnamique (TMCA, étalon interne) à 1mg/mL est préparée et conservée à l'abri de la lumière afin d'éviter que l'acide férulique trans ne devienne cis.
- 20 mg de MIA sont pesés et additionnés de 2 mL de NaOH à 2 N. Les MIA sont solubilisés au Vortex.
- Les tubes sont protégés de la lumière par du papier aluminium avant d'être incubés à 35°C pendant 30 min dans un bain à agitation latérale.
- 200 µL de TMCA 1mg/mL dilué dans du NaOH 0,2 N à chaque tube avant de bien mélanger au Vortex.
- Si l'échantillon contient des résidus insolubles, il est nécessaire de les centrifuger à cette étape afin de faire s'agréger les résidus dans le fond du tube.
- 1 mL de surnageant sont prélevés (attention à ne pas prélever les résidus isolubles) et acidifiés par l'ajout de 1 mL de HCl 2 N. Le pH est vérifié à l'aide de bandelettes et doit être égal à 2.

- 3 mL d'éther éthylique sont versés dans chaque tube avant de les agiter fortement et de les centrifuger afin de bien séparer les deux phases. La phase étherée (phase supérieure) contenant les acides phénoliques saponifiés, acidifié et extraits est prélevée.
- La phase étherée est évaporée sous un flux d'azote à 30°C pendant une nuit.
- Les échantillons sont repris dans un mélange méthanol/eau (50/50) avant d'être injectés.

20 µL d'extraits sont injectés sur une colonne C18 greffée de silice. Cette dernière interagit avec les molécules apolaires. L'élution se fait grâce à un gradient d'acétonitrile contre du tampon acétate (4,5 g d'acétat de sodium trihydraté et 2,2 mL d'acide acétique dissous dans 1 L d'eau) à pH 4,6. La détection des acides phénoliques est réalisée par un détecteur UV.

6.8. Protocoles d'analyse biochimique des protéines

6.8.1. Quantification de protéines par dosage "BCassays Protein Quantification" (Interchim.com)

Une gamme étalon de BSA de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 et 200 µg/mL est préparée à partir d'une solution mère de BSA à 200 µg/mL.

La solution de dosage est réalisée en mélangeant 98% du réactif A à 2% du réactif B du kit "BCassays Protein Quantification" (Interchim.com).

200 µL de la solution obtenue sont déposés dans chaque puits d'une plaque de 96 puits type Elisa (F96 Maxisorp Nunc Immunoplate). 10 µL de chaque dilution de la gamme étalon sont ajoutés dans chacun des puits ainsi que différentes quantités d'échantillons protéiques à doser. La plaque est scellée et mise à incuber à 60°C pendant 1 h. Après 30 min à température ambiante, l'absorbance de chacun des puits est lue à une longueur d'onde de 540 nm grâce à un spectrophotomètre (KC4, BioTech).

La gamme étalon permet de tracer une droite dont l'équation permet de calculer la quantité de protéines contenue dans les échantillons à analyser. Si les échantillons sont trop concentrés et qu'ils se trouvent en dehors de la gamme, il faut les diluer et recommencer l'expérience.

6.8.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La présence des protéines recombinantes est observée à l'aide d'électrophorèse en gel d'acrylamide et en conditions dénaturantes.

<i>Gel de concentration :</i>	polyacrylamide	0,68 mL
	eau	2,25 mL
	Tris 1,5 M, pH 8,8	1 mL
	SDS 10%	40 µL
	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 µL
	AmmoniumPerSulfate (APS) 10%	10 µL

<i>Gel de séparation 12% :</i>	polyacrylamide	3 mL
	eau	2,56 mL
	Tris 1,5 M, pH 8,8	1,87 mL
	SDS 10%	75 µL
	TEMED	12,5 µL
	APS 10%	12,5 µL

- Le gel de séparation est préparé et coulé jusqu'au $\frac{3}{4}$ de la cassette d'électrophorèse. De l'éthanol 70% permet de niveler le gel, les gels sont laissés à température ambiante pour polymérisation. L'éthanol 70% est enlevé une fois le gel de séparation polymérisé.

- Le gel de concentration est préparé et coulé jusqu'en haut de la cassette. Les peignes sont alors placés et les gels sont laissés à température ambiante pour polymérisation.

L'échantillon protéique additionné de 5 µL de tampon de charge (Tris 0,25 mol/L glycérol 20% en volume, SDS 4% en masse et du β -mercaptoéthanol à 10% en volume et rajoutés extemporanément) sont incubés pendant 5 min à 100°C afin de dénaturer les protéines puis centrifugés 2 min à 10000 rpm (Eppendorf mini-spin, rotor 15299).

- Les plaques, cassettes et cuves sont montées avant de déposer 20 µL d'échantillons préparés par puits.

- 5 µL de marqueur de masse moléculaire (Euromedex) sont déposés dans un puits par gel.

La migration se déroule pendant 30 min à 15 mA par gel dans un premier temps puis 45 min à 20 mA par gel dans un second temps. Elle s'effectue dans du tampon de migration (100 mmol/L de Tris, 100 mM d'HEPES, 0,1% de SDS, pH proche de 8). Les gels sont colorés dans une solution de bleu de Coomassie (pour 1 L : 1,5 g de bleu de Coomassie G250, 455 mL d'éthanol pur, 75 mL d'acide acétique pur, qsp 1 litre à l'eau distillée.) sous agitation pendant une nuit avant d'être décolorés 2 h dans de l'eau. Les gels sont alors scannés.

6.8.3. Production de protéines recombinantes

La veille, 5 mL de milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (50 mg/L) et du chloramphénicol (15 mg/L) sont inoculés par la bactérie Rosetta pLys transformée avec le plasmide pDEST17 contenant le gène BdCOMT à exprimer. La solution est cultivée à 37°C sous agitation pendant la nuit.

Les 5 mL de pré-culture sont transvasés dans un erlenmeyer contenant 250 mL de LB liquide, de l'ampicilline (50 mg/L) et du chloramphénicol (15 mg/L). L'erlenmeyer est placé dans une étuve à 37°C sous agitation. L'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm de 1 mL de culture est mesurée au spectrophotomètre. Le blanc utilisé correspond à 1 mL de milieu de culture prélevé avant transfert des bactéries.

Lorsque l'absorbance est comprise entre 0,6 et 0,8, la production de protéines recombinantes est induite par l'ajout de 20 mM d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Cette molécule est un analogue non hydrolysable du lactose et en se fixant sur le promoteur inductible LacZ, il va permettre l'activation du promoteur et de la transcription. La culture de bactéries est alors transférée à 37°C ou à 20°C pendant 18 h. De l'ampicilline, du chloramphénicol et de l'IPTG sont rajoutés 6 h après le début de la production.

Les protéines contenues dans les tubes sont quantifiées par la méthode "BCassays Protein Quantification" (6.8.1) avant d'être vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (6.8.2).

6.8.4. Purification d'une protéine recombinante par chromatographie d'affinité

6.8.4.1. Extraction des protéines recombinantes

- La culture de bactéries est transférée dans un gros pot de 250 mL et équilibrée avant d'être centrifugée pendant 20 min à 3000 rpm à 4°C (Sigma 6K15, rotor 12500).
- Le surnageant est jeté et le culot bactérien est remis en solution dans 20 mL de solution de lavage (Tris HCl 0,1 M, pH 6.8) avant d'être transféré dans un tube de 50 mL. Le pot est ensuite rincé avec 5 mL de solution de lavage également transférés dans le tube de 50 mL.
- Le tube de 50 mL est centrifugé pendant 20 min à 5000 rpm à 4°C (Sigma 6K15, rotor 12169-H). Le surnageant et le culot sont séparés et conservés à 4°C pour une utilisation dans la journée ou congelés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

- Le culot bactérien est remis en suspension dans 10 mL de solution de lyse (Tris HCL 50 mM, pH 7,5, NaCl 20 mM, imidazole 20 mM, eau stérile qsp 100 mL d'une demi pastille d'anti-protéases "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-free", Roche).
- Les bactéries sont lysées au sonicateur (amplitude 80, durée 2 min et pulsation 6 s) en les conservant bien dans la glace.
- Les acides nucléiques contenus dans le lysat bactérien sont dégradés par l'ajout de 2,5 µL de DNase (100 µg/mL) et 10 µL de RNase (50 µg/mL) suivie d'une incubation de 1 h à 37°C en mélangeant par inversion toutes les 15 min.
- Le tube de 50 mL est centrifugé 25 min à 5000 rpm à 4°C (Sigma 6K15, rotor 12169-H). Le surnageant est conservé à 4°C et doit être utilisé dans la journée pour un dosage d'activité enzymatique ou une purification de protéines recombinantes.

6.8.4.2. Purification des protéines par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel

La chromatographie d'affinité permet, à partir de l'ensemble des protéines d'un lysat bactérien, la purification de protéines spécifiques. La colonne utilisée est une colonne de type Nickel qui fixe préférentiellement des acides aminés positifs comme les histidines. La protéine recombinante que l'on souhaite purifiée a été clonée en fusion avec une étiquette polyhistine en position N-terminale favorisant son interaction avec la colonne, l'élution s'effectue en appliquant une concentration d'imidazole spécifique. L'imidazole est également positive et de taille plus petite que la protéine. L'augmentation de sa concentration va favoriser le décrochage de la protéine d'intérêt. L'ensemble de ces étapes est suivie à l'aide d'un détecteur UV.

- 2 h avant le dépôt, la colonne de nickel de 1 mL (GE Healthcare) est placée sur la colonne de chromatographie AKTA (Prime Amersham Pharmacia Biotech). Les tubes sont rincés pendant 10 min avec de l'eau puis la colonne est équilibrée avec une solution de 20 mM d'imidazole à 1 mL/min pendant 30 min (la ligne des UV affichée par le logiciel Chromeleon ne doit plus fluctuer).
- La colonne est chargée avec la solution correspondant au surnageant du lysat bactérien précédent à 0,5 mL/min.
- Une fois la charge terminée, la solution de 20 mM d'imidazole est injectée de nouveau afin d'éliminer les protéines qui ne s'accrochent pas à la colonne. Cette phase est suivie à l'ordinateur, plusieurs pics doivent être observés avant un retour de la ligne des UV à son niveau de base ce qui correspond à la sortie de la colonne de l'ensemble des protéines ne s'étant pas accrochées à celle-ci.

- L'élution est alors lancée avec un gradient de 20 à 300 mM d'imidazole atteint en 42 mL avec un débit de 0,8 mL/min. Les éluats sont automatiquement collectés dans des tubes par fraction de 2 mL.
- Une fois le programme terminé, les tubes et la colonne sont lavés avec de l'eau distillée pendant 2 h à 1 mL/min.

Les tubes collectés sont conservés à 4°C jusqu'au lendemain. Les protéines contenues dans les tubes sont quantifiées par la méthode "BCassays Protein Quantification" avant d'être vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

6.8.5. Dosage de l'activité enzymatique d'une COMT

6.8.5.1. Mesure d'activité enzymatique par fluorescence (adapté de Palmer et al 2010)

Il a été démontré que "in vitro" la COMT est capable de méthoxiler en position 3 du carbone de l'acide caféique et de produire ainsi de l'AF. Une méthode publiée par Palmer et al, en 2010 permet de mesurer l'activité enzymatique de la COMT par une réaction couplée qui va produire de la fluorescence (voir principe dans la partie 3.8). L'activité de la COMT, en présence d'une seconde enzyme, la S-adénosylhomocystéine ou SAHH, va être mesurée par l'émission de fluorescence du ThioGloI.

- 150 µL de milieu réactionnel (5 mL de Tris 200 mM pH 7,5, 100 µL de la solution de S-adénosylméthionine ou SAM à 62.7 mM, 15 µL de SAHH, 100 µL de la solution à 250 µM d'acide caféique, 100 µL de ThioGloI (15 µM) et compléter à 10 mL avec de l'eau stérile) sont placés dans les puits d'une plaque à 96 puits "Microplate 96 black".
- 0 à 50 µL d'extrait sont ajoutés.
- La lecture est réalisée à l'aide d'un "Synergy IHT Microplate Reader" de Biotek. La plaque est maintenue à 37°C et une lecture est réalisée toutes les 3 min avec une longueur d'onde d'excitation à 340 nm et une longueur d'onde d'émission à 516 nm. La sensibilité utilisée est de 180.
- Une gamme étalon de glutathion réduit (GSH) de 0, 25, 50, 100, 500, 1000, 1550 et 2000 pmol est utilisée afin de vérifier la fluorescence émise par le ThioGloI augmente. 100 µL de milieu réactionnel (2,5 mL de Tris 200 mM pH 7,5, 50 µL de ThioGloI et compléter à 5 mL avec de l'eau stérile) sont déposés par puits et 10 µL de chaque dilution de GSH sont ajoutés. La lecture est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment avec une sensibilité de 130.

6.8.5.2. Dosage d'activité enzymatique par HPLC

- 15 mL de milieu réactionnel (7,5 mL de tampon Tris HCl 200 mM pH 7,5, 20 µL de SAM à 62,7 mM, 60 µL d'acide caféique à 62,5 mM, 180 µL de COMT recombinante et qsp 15 mL d'eau milliQ) sont incubés à 37°C sous agitation pendant 45min.
- Toutes les 5 min, 1 mL de milieu réactionnel sont prélevés et transférés dans un tube en verre. 50 µL de TMCA (3, 4, 5-triméthoxy-trans-cinnamique) à 1mg/mL dans de la soude 0,2 M (étalon interne) et 25 µL de HCl 2M sont ajoutés et mélangés au vortex. Le pH est alors égal à 2. Ceci permet d'arrêter la réaction enzymatique et de mettre les acides phénoliques sous forme acide, ils sont alors plus solubles dans l'éther que dans l'eau.
- 3 mL d'éther éthylique sont ajoutés et les tubes sont fortement agités. La phase étherée (supérieure) contenant les acides phénoliques est prélevée puis évaporée sous un flux d'azote à 30°C.
- Les échantillons sont repris dans un mélange méthanol/eau (50/50) avant d'être injectés sur une colonne C18 (Purospher, Merck). L'analyse HPLC est réalisée à un débit de 1 ml/min en utilisant un gradient de solvants A (Acétonitrile) et B (Tampon acétate 50 mM, pH 4,6), selon le programme suivant : 0-6 min, 15% A ; 6-26 min, 15-35% A ; 26-27 min, 35-15% A ; 27-30 min, 15% A. La quantification est réalisée par détection UV 320 nm, à l'aide du standard interne et après calibration à l'aide de composés de référence. Les isomères *E* (majoritaire) et *Z* (minoritaire) d'pAC ou d'AF sont pris en compte.

Bibliographie

- Adler E. 1977. Lignin chemistry: Past, present and future. *Wood Science and Technology*. 11: 169–218.
- Adom KK, Sorrells ME, Liu RH. 2005. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53: 2297-2306.
- Aimi H, Matsumoto Y, Meshitsuka G. 2005. Structure of small lignin fragments retained in water-soluble polysaccharides extracted from birch MWL isolation residue. *Journal of Wood Science*. 51: 303-308.
- Akin DE. 2008. Plant cell wall aromatics: influence on degradation of biomass. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2: 288–303.
- Alves, SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P. 2009. A protocol for Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature protocols*. 4(5): 638-649.
- Anders N, Wilkinson MD, Lovegrove A, Freeman J, Tryfona T, Pellny TK, Weimar T, Mortimer JC, Stott K, Baker JM, Defoin-Platel M, Shewry PR, Dupree P, Mitchell RAC. 2012. Glycosyl transferases in family 61 mediate arabinofuranosyl transfer onto xylan in grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 109: 989-993.
- Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr., Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews* 67: 188-205.
- Ascherson P & Graebner P. 1901. *Brachypodium*. *Synopsis der mitteleuropaischen Flora*. 2(1).
- Atanassova R, Favet C, Martz F, Chabbert B, Tollier MT, Monties B, Fritig B, Legrand M. 1995. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *The Plant Journal*. 8: 465–477.
- Bablak P, Draper J, Davey MR, Lynch PT. 1995. Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *The Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 42: 97-107.
- Barakat A. 2007. Etude de la lignification de parois végétales de graminées par des assemblages modèles: Réactivité, organisation et structure supramoléculaire. *Thèse*.
- Baranowski JD, Davidson PM, Nagel CW, Branen AL. 1980. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. *Journal of Food Science* 45: 592–594.
- Barrière Y, Ralph J, Méchin V, Guillaumie S, Grabber JH, Argillier O, Chabbert B,

Lapierre C. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from *brown-midrib* mutants. *Comptes Rendus de Biologie* 327: 847-860.

■ Barrière Y, Riboulet C, Méchin V, Maltese S, Pichon M, Cardinal A, Lapierre C, Lübberstedt T, Martinant JP. 2007. Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. *Genes, Genomes and Genomics*.

■ Barron C, Surget A, Rouau X. 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal science*. 45: 88-96.

■ Bartley LE, Peck ML, Kim SR, Ebert B, Manisseru C, Chiquiny DM, Sykes R, Gao L, Rautengarten C, Vega-Sanchez ME, Benke PI, Canlas PE, Cao P, Brewer S, Lin F, Smith WL, Zhang X, Keasling JD, Jentoff RE, Foster SB, Zhou J, Ziebell A, An G, Vibe-Scheller H, Ronad PC. 2013. Overexpression of a BAHD acyltransferase, *OsAt10*, alters rice cell wall hydroxycinnamic acid content and saccharification. *Plant Physiology*. 161(4):1615-33.

■ Baskin TI. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: A review and a model. *Protoplasma*. 215: 150-171.

■ Bennetzen JL, Kellogg EA. 1997. Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? *The Plant Cell*. 9(9): 1509–1514.

■ Bergvinson DJ, Arnason JT, Amilton RI, Tachibana S, Towers GHN. 1994. Putative role of photodimerized phenolic acids in maize resistance to *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*. 23:1516.

■ Betekhtin A, Jenkins G, Hasterok R. 2014. Reconstructing the evolution of *Brachypodium* genomes using comparative chromosome painting. *PloS One*. 9(12):e115108.

■ Bertocci B, Miggiano V, Da Prada M, Dembic Z, Lahm HW, Malherbe P. 1991. Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *PNAS*. 88(4): 1416-1420.

■ Bevan MW, Garvin DF, Vogel JP. 2010. *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology*. 21(12): 211-217.

■ Bhuiya MW & Liu CJ. 2010. Enzyme catalysis and regulation : engineering monolignol 4-O-methyltransferases to modulate lignin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 285:277-285.

■ Bidlack JE, Malone M, Benson R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 72: 51–56.

- Billa E, Monties B. 1995. Molecular variability of lignin fractions isolated from wheat straw. *Research of Chemical Intermediates*. 21 (3-5): 303-311.
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 519–546.
- Bolot S, Abrouk M, Masood-Quraishi U, Stein N, Messing J, Feuillet C, Salse J. 2009. The “inner circle” of the cereal genomes. *Current Opinion in Plant Biology*. 12(2):119-125.
- Bonawitz ND & Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: Connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*. 44:337-363.
- Bosch M, Mayer CD, Cookson A, Donnison IS. 2011. Identification of genes involved in cell wall biogenesis in grasses by differential gene expression profiling of elongating and non-elongating maize internodes. *Journal of Experimental Botany*. 62:3545-3561.
- Bout S & Vermerris W. 2003. A candidate-gene approach to clone the sorghum *brown-midrib* gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Molecular Genetics and Genomics* 269(2): 205-214.
- Bouvier d’Yvoire M, Bouchabke-Coussa O, Voorend W, Antelme S, Cézard L, Légée F, Lebris F, Legay S, Whitehead C, McQueen-Mason SJ, Gomez LD, Jouanin L, Lapierre C, Sibout R. 2013. Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (BdCAD1) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*. *Plant Journal*. 73: 496-508.
- Bragg JN, Wu J, Gordon SP, Guttman ME, Thilmony R, Lazo GR, Gu YQ, Vogel JP. 2012. Generation and characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA Insertional Mutant Collection. *Plos One*. 7(9): e41916.
- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, VainP, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt BF III, Hong SY, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LAJ, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP. 2011. *Brachypodium* as a model for the grasses: Today and the future. *Plant Physiology*. 157: 3-13.
- Brown DM, Zeef LAH, Ellis J, Goodacre R, Tumer SR. 2005. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The Plant Cell*. 17: 2281-2295.
- Brown DM, Goubet F, Vicky WWA, Goodacre R, Stephens E, Dupree P, Turner SR. 2007. Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *Plant Journal*. 52:1154–68

- Buanaфина MMD. 2009. Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Molecular Plant*. 2: 861–872.
- Budak H & Akpınar A. 2011. Dehydration Stress-Responsive miRNA in *Brachypodium distachyon*: Evident by Genome-Wide Screening of microRNAs Expression. *OMICS*. 15(11):791-799.
- Burr SJ & Fry SC. 2009. Feruloylated arabinoxylans are oxidatively cross-linked by extracellular maize peroxidase but not by horseradish peroxidase. *Mol Plant*. 2(5): 883-892.
- Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Medhurst A, Stone BA, Newbigin EJ, Bacic A, Fincher GB. 2006. Cellulose synthase-like *Cs1F* genes mediate the synthesis of cell wall (1,3;1,4)-beta-D-glucans. *Science*. 311:1940–1942.
- Burton RA & Fincher GB. 2009. (1, 3; 1, 4)-D-Glucans in cell walls of the *Poaceae*, Lower Plants, and Fungi: A tale of two linkages. *Molecular Plant*. 2(5): 873.
- Burton RA, Gidley MJ, Fincher GB. 2010. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*. 6: 724-732.
- Caffall KH & Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate research*. 344: 1879-1900.
- Cao S, Siriwardana CL, Kumimoto RW, Holt BF III. 2011. Construction of high quality Gateway entry libraries and their application to yeast two hybrid for the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnology*. 11: 53.
- Carpita NC. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 445-476.
- Carpita NC, Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*. 3(1): 1-30.
- Carpita NC & McCann MC. 2010. The maize mixed-linkage (1-3), (1-4)-β-D-glucan polysaccharide is synthesized at the Golgi membrane. *Plant Physiology*. 153(3): 1362-1371.
- Carroll A, Somerville C. 2009. Cellulosic biofuels.
- Catalan P, Shi Y, Armstrong L, Draper J, Stace CA. 1995. Molecular phylogeny of the grass genus *Brachypodium* P. Beauv. Based on RFLP and RAPD analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 117(4): 263-280.
- Catalan PA, Kellogg EA, Olmstead RG. 1997. Phylogeny of Poaceae Subfamily Pooideae Based on Chloroplast *ndhF* Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8(2): 150-166.

- Catalan P, Müller J, Hasterok R, Jenkins G, Mur LAJ, Langdon T, Betekhtin A, Siwinska D, Pimentel M, Lopez-Alvarez D. 2012. Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*. 109: 385-405.
- Catalan P, Chalhoub B, Chochois V, Garvin DF, Hasterok R, Manzaneda AJ, Mur LAJ, Pecchioni N, Rasmussen SK, Vogel JP, Voxeur A. 2014. Update on the genomics and basis biology of *Brachypodium*. *Trends in Plant Science*. 19(7): 414-418.
- Chanliaud E. 1995. Extraction, caractérisation et propriétés fonctionnelles des hétéroxylanes de son de maïs. Thèse Universités de Paris VII, Paris XI et ENSIA.
- Chapple C, Ladish M, Meilan R. 2007. Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology*. 25(7): 746-748.
- C.C.S. Chapple, T. Vogt, B.E. Ellis, C.R. Somerville (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell* 4: 1413-1424.
- G. Charmet, U. Masood-Quraishi, C. Ravel, I. Raomeuf, F. Balfourier, M.R. Perretant, J.L. Joseph, M. Rakszegi, F. Guillon, P.E. Sado, Z. Bedo, L. Saulnier (2009). Genetics of dietary fibre in bread wheat. *Euphytica* 170: 155-168.
- L. Chen, C.K. Auh, P. Dowling, J. Bell, D. Lehmann, Z.Y. Wang (2004). Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improve digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biology* 31: 235-245.
- Chen S, Su L, Chen J, Wu J. 2013. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. 31(8): 1754-1767.
- Cheng YH, Yang SH, Liu CC, Gefen A, Lin FH. 2013. Thermosensitive hydrogel made of ferulic acid-gelatin and chitosan glycerophosphate. *Carbohydrate polymers*. 92(2):1512-1519.
- Chesson A, Provan GJ, Russel Wn Scobbie L, Chabbert B, Monties B. 1997. Characterization of lignin from parenchyma and sclerenchyma cell walls of the maize internode. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 73(10).
- Chiniquy D, Sharma V, Schultink A, Baidoo EE, Rautengarten C, Cheng K, Carroll A, Ulvkov P, Harholt J, Keasling JD, Pauly M, Vibe-Scheller H, Ronald PC. 2012. XAX1 from glycosyltransferase family 61 mediates xylosyltransfer to rice xylan. *PNAS*. 109(42): 17117-17122.
- Choct M, Hughes RJ, Bedford MR. 1999. Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *British Poultry Science*. 40(3):419-422.

- Christiansen P, Andersen CH, Didion T, Folling M, Nielsen KK. 2005. A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Reports*. 23, 751–758
- Christensen JH, Overney S, Rohde A, Ardiles Diaz W, Bauw G, et al. 2001. The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Molecular Biology*. 47:581–93.
- Christensen U, Alonso-Simon A, Scheller HV, Willats WGT, Harholt J. 2010. Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon* – a potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry*. 71(1): 62-69.
- Clayton WD & Renvoize SA. 1986. “Genera Graminum.” KewBulletin Additional Series XIII. London.
- Cosgrove DJ. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature*. 6: 850-851.
- Courtial A, Soler M, Chateigner-Boutin AL, Reymond M, Méchin V, Wang H, Grima-Pettenati J, Barrière Y. 2013. Breeding grasses for capacity to biofuel production or silage feeding value : an updated list of genes involved in maize secondary cell wall biosynthesis and assembly. *Maydica*. 58 : 67-102.
- G. Coussens, S. Aesaert, W. Verelst, M. Demeulenaere, S. de Buck, E. Njuguna, D. Inzé, M. van Lijsebettens. 2012. *Brachypodium distachyon* promoters as efficient building blocks for transgenic research in maize. *Journal of Experimental Botany* 1-11.
- Crowell EF, Gonneau M, Stierhof Y6D, Höfte H, Vernhettes S. 2010. Regulated trafficking of cellulose synthase. *Current Opinion in Plant Biology*. 13(6): 700-705.
- D’Auria JC. 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current opinion in plant biology*. 9: 331-340.
- Dalmais M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, Darracq O, Bouvier d’Yvoire M, Cézard L, Légée F, Blondet E, Oria N, Troadec C, Brunaud V, Jouanin L, Höfte H, Bendahmane A, Lapierre C, Sibout R. 2013. A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. *Plos One*. 8(6).
- L.-B. Davin, N.-G. Lewis (1992). Phenylpropanoid metabolism: bio- synthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. In HA Stafford, RK Ibrahim, eds, Phenolic Metabolism in Plants. *Plenum Press, New York*, 325-375.
- Davis JI and Soreng RJ. (1993). Phylogenetic structure in the grass family (*Poaceae*) as inferred from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal of Botany*. 80: 1444–1454.

- De Oliveira DM, Finger-Teixeira A, Mota TR, Salvador VH, Moreira-Vilar FC, Molinari HBC, Mitchell RAC, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O, Dos Santos WD. 2014. Ferulic acid: A key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*. 1-9.
- Déjardin A, Laurans F, Arnaud D, Breton C, Pilate G, Leplé. 2010. Wood formation in Angiosperms. *Comptes Rendus Biologies*. 333: 325-334.
- Del Rio JC, Rencoret J, Prinsen P, Martinez AT, Ralph J, Gutierrez A. 2012. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 5922-5935.
- Delmer D. 1999. Cellulose biosynthesis: exciting times in a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:245–276.
- Demircan T & Akkaya MS. 2009. Virus induced gene silencing in *Brachypodium distachyon*, a model organism for cereals. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 100: 91–96.
- Dence CW. 1992. The determination of lignin. Springer Series in Wood Science. Methods in Lignin Chemistry.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*. 36: W465-W469.
- Dhugga, K.S., Barreiro, R., Whitten, B., Stecca, K., Hazebroek, J., Randhawa, G.S., Dolan, M., Kinney, A.J., Tomes, D., Nichols, S., Anderson, P., 2004. Guar seed beta-mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science*. 303:363-366.
- Dignac MF, Pechot N, Thevenot M, Lapierre C, Bahri H, Bardoux G, Rumpel C. 2009. Isolation of soil lignins by combination of ball-milling and cellulolysis: Evaluation of purity and isolation efficiency with pyrolysis/GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 5(1-2): 426-430.
- C.-T. Do, B. Pollet, J. Thévenin, R. Sibout, D. Denoue, Y. Barrière, C. Lapierre and L. Jouanin (2007). Both caffeoyl CoA enzyme 3-O-methyltransferase and caffeic acid O-methyltransferase I are involved in redundant functions for lignins, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*. 226: 1117-29.
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-WilkD, Delmer DP. 2002. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiology*. 43, 1407–1420.
- Doblin MS, Pettolino FA, Wilson SM, Campbell R, Burton RA, Fincher GB, Newbigin E, Bacic A. 2009. A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)-

beta-D-glucan synthesis in transgenic *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 106, 5996-6001.

■ Donaldson LA. 2001. Lignification and lignin topochemistry. an ultrastructural view. *Phytochemistry*. 57: 859.

■ Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge APM. 2001. *Brachypodium distachyon*, a new model system for functional genomics in grasses. *American Society of Plant Physiologist*. 127(4):1539-1555.

■ Driouich A, Faye L, Staehelin A. 1993. The plant Golgi apparatus: a factory for complex polysaccharides and glycoproteins. *Biochemical Sciences*. 18(6): 210-214.

■ Dudareva N, D'Auria JC, Nam KH, Raguso RA, Pichersky E. 1998. Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase — an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant Journal*. 14:297-304.

■ Dumortier BCJ. 1824. Observations sur les Graminées de la flore de Belgique.

■ Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. 2006. CASTp : computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*. 34(Web Server Issue): W116-118.

■ Ebringerova A, Hromadkova Z, Heinze T. 2005. Hemicellulose. *Advances in Polymers Science*. 186: 1-67.

■ Ebringerova A & Heinze T. 2000. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*. 21: 542-556.

■ Ercal N, Yang P, Aykin N. 2001. Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents. *Journal of Chromatography* 753 (2), 287–292.

■ Ellis JR, Chaffey NJ. 1987. Structural differentiation of the nucellar epidermis in the caryopsis of rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany*. 60: 671-675.

■ Engvild KC. 2005. Mutagenesis of the Model Grass *Brachypodium distachyon* with Sodium Azide. *Riso*. R: 1510.

■ Febrer M, Goicoechea JL, Wright J, McKenzie N, Song X, Lin J, Collura K, Wissotski M, Yu Y, Ammiraju JSS, Wolny E, Idziak D, Betekhtin A, Kudrna D, Hasterok R, Wing RA, Bevan MW. 2010. An integrated physical, genetic and cytogenetic map of *Brachypodium distachyon*, a model system for grass research. *PLoS One*. 5: e13461.

■ Fellenberg C, van Ohlen M, Handrick V, Vogt T. 2012. The role of CCoAOMT1 and COMT1 in *Arabidopsis* anthers. *Planta* 235 online first.

- Ferrer JL, Zubietta C, Dixon RA, Noel JP. 2005. Crystal structure of alfalfa caffeoylcoenzyme A 3-O-methyltransferase. *Plant physiology*. 137: 1009-1017.
- Feuillet P. 2000. Le grain de blé: composition et utilisation.
- Filiz E, Ozdemir BS, Budak F, Vogel JP, Tuna M, Budak H. 2009. Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome*. 52: 876–890.
- Fincher GB. 2009. Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. American Society of Plant Biologists. 149(1): 27-37.
- Fincher GB & Stone BA. 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. Pomeranz, Y. (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, St Paul. 207-295.
- Frankova L & Fry SC. 2011. Phylogenetic variation in glycosidases and glycanases acting on plant cell wall polysaccharides, and the detection of transglycosidase and trans-b-xylanase activities. *Plant Journal*. 67: 662-681.
- Fry SC. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of Angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*. 37: 165-186.
- Fry SC. 1988. The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis.
- Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Nakao M, Ashikari T, Kusumi T. 1997. Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*. 249: 45-51.
- Fukushima RS, Hatfield RD. 2004. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (12): 3713-3720.
- Fursova O, Pogorelko G, Zabolina OA. 2012. An efficient method for transient gene expression in monocots applied to modify the *Brachypodium distachyon* cell wall. *Annals of Botany*. 110: 47-56.
- Garvin DF. 2007. *Brachypodium*: a new monocot model plant system emerges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(7): 1177-1179.
- Garvin DF, Gu YQ, Hasterok R, Hazen SP, Jenkins G, Mockler TC, Mur LAJ, Vogel JP. 2008. Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *The Plant Genome (A Supplement to Crop Science)*. 1: 69-84.
- Gaut BS. 2002. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Physiologist*. 132.

- Gibeaut DM, Carpita NC. 1991. Cleanup procedure for partially methylated alditol acetate derivatives of polysaccharides. *Journal of Chromatography*. 587: 284-287.
- Grabber JH. 2005. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Science*. 45:820-831.
- Grabber JH, Mertens DR, Kim H, Funk C, Lu F, Ralph J. 2009. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of food and agriculture*. 89(1): 122-129.
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD. 2000. Cross-linking of maize walls bu ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 48: 6106-6113.
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD. 2002. Model studies of ferulate-coniferyl alcohol cross-product formation in primary maize walls: Implications for lignification in grasses. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 50:6008-6016.
- Grabber JH, Ralph J, Hatfield RD, Quideau S, Kuster T, Pell A. 1996. Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1453-1459.
- Grayer RJ & Harborne JB. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*. 37(19): 42.
- Gemen R, de Vries JF, Slavin JL. 2011. Relationship between molecular structure of cereal dietary fiber and health effects: focus on glucose/insulin response and gut health. *Nutrition Reviews*. 69: 22-33.
- T. Goujon, R. Sibout, B. Pollet, B. Maba, L. Nussaume, N. Bechtold, F. Lu, J. Ralph, I. Mila, Y. Barrière, C. Lapierre, L. Jouanin (2003). A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Molecular Biology* 51(6): 973-989.
- Guillon F, Bouchet B, Jamme F, Robert P, Quémener B, Barron C, Larré C, Dumas P, Saulnier L. 2011. *Brachypodium distachyon* grain: Characterization of endosperm cell walls. *Journal of Experimental Botany*. 62(3): 1001-1015.
- Guillon F, Larré C, Petitpas F, Berger A, Moussawi J, Rogniaux H, Santoni A, Saulnier L, Jamme F, Miquel M, Lepiniec L, Dubreucq B. 2012. A comprehensive overview of grain development in *Brachypodium distachyon* variety Bd21. *Journal of Experimental Botany*. 63(2): 739-755.
- Guillon, F.; Tranquet, O.; Quillien, L.; Utile, J.-P.; Ordaz Ortiz, J. J.; Saulnier, L., Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for

immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *Journal of Cereal Science* 2004, 40 (2), 167-182.

- Handakumbura PP, Matos DA, Osmont KS, Harrington MJ, Heo K, Kafle K, Kim SH, Baskin TI, Hazen SP. 2013. Perturbation of *Brachypodium distachyon* CELLULOSE SYNTHASE A4 or 7 results in abnormal cell walls. *BMC Plant Biology*. 13: 131
- Hands P & Drea S. 2012. A comparative view of grain development in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Cereal Science*. 56: 2-6.
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe-Scheller H. 2010. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*. 153: 384-395.
- Harris D, Bulone V, Ding SY, DeBolt S. 2010. Tools for cellulose analysis in plant cell walls. *Plant Physiology*. 153:420-426.
- Harris P & Trethewey J. 2010. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Review*. 9: 19–33.
- Hartley AB & Morrison III WH, Himmelsbach DS, Borneman WS. 1990. *Phytochemistry*. 29: 3705.
- Hartley RD & Harris PJ. 1981. Phenolic constituents of the cell walls of Dicotyledons. *Biochemicals Systematics and Ecology*. 9: 189.
- Harz C O. 1880–1882. Beitrage zur Systematik der Gramineen. *Linnaea*. 43: 1–30.
- Hasterok R, Draper J, Jenkins G. 2004. Laying the cytotaxonomic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. *Chromosome Research*. 12(4): 397-403.
- Hasterok R, Marasek A, Donnison IS, Armstead I, Thomas A, King IP, Wolny E, Idziak D, Draper J, Jenkins G. 2006. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics*. 173(1): 349-362.
- Hatfield RD & Marita JM. 2010. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls. *Phytochemistry Review*. 9: 35–45.
- Hatfield R, Ralph J, Grabber JH. 2008. A potential role for sinapyl p-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation. *Planta*. 228: 919–928.
- Hatfield R & Vermerris W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*. 126: 1351.
- Hatfield RD, Wilson JR, Mertens DR. 1999. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79(6): 891-899.

- Hayashi K, Mardsen M, Delmar D. 1987. Pea xyloglucan and cellulose: xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo. *Plant Physiology*. 83(2): 384-389.
- Hayashi T. 1989. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*. 40:139–68
- Hayek A. 1925. Zur Systematik der Gramineen. *Osterr. Bot. Z.* 74: 249–255.
- He L & Terashima N. 1989. Formation and structure of lignin in monocotyledons II. *Mokkuzai Gakkaishi*. 35: 123.
- He L & Terashima N. 1990. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons. III. Heterogeneity of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Lignin with Respect to the Composition of Structural Units in Different Morphological Regions. *Journal of Wood chemistry and Technology*. 10(4).
- He L & Terashima N. 1991. Formation and Structure of Lignin in Monocotyledons IV. Deposition Process and Structural Diversity of the Lignin in the Cell Wall of Sugarcane and Rice Plant Studied by Ultraviolet Microscopic Spectroscopy. *Holzforschung*. 45(3).
- X. He, M.B. Hall, M. Gall-Meagher, R.L. Smith (2003). Improvement of forage quality by down-regulation of maize O-methyltransferase. *Crop Science* 43: 2240-2251.
- Helm R, Ralph J. 1993. Lignin-Hydroxycinnamyl model compounds related to Forage Cell Wall Structure. 2. Ester-Linked Structures. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 41: 570.
- Hill Jr. JL, Hammudi MB, Tien M. 2014. The *Arabidopsis* cellulose synthase complex: A proposed hexamer of CESE trimers in an equimolar stoichiometry. *Plant Cell*. 26(1): 4834-4842.
- Hilu KW, & Wright K. 1982. Systematics of gramineae: A cluster analysis study. *Taxon*. 31(1): 9-36.
- Himmelbach A, Zierold U, Hensel G, Riechen J, Douchkov D, Schweizer P, Kumlehn J. 2007. A set of modular binary vectors for transformation of cereals. *Plant Physiology*. 145: 1192-1200.
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. 2004. Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell*. 16: 1446-1465.
- Hoffmann L, Maury S, Bergdoll M, Thion L, Erard M, Legrand M. 2001. Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-

methyltransferase by site-directed mutagenesis. *Journal of Biology and Chemistry*. 276(39): 36831-36838.

- Hong SY, Seo PJ, Yang MS, Xiang F Park CM. 2008. Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology*. 8:112.
- Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB. 1994. Phylogenetic relationships of 10 grass species: An assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome*. 37(1): 112-120.
- Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB. 1995. Molecular phylogeny of the Pooideae (*Poaceae*) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theoretical and Applied Genetics*. 90(3-4): 389-398.
- Humphreys JM, Hemm MR & Chapple C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 10045-10050.
- Humphreys JM & Chapple C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 224-229.
- Huo N, Lazo GR, Vogel JP, You FM, Ma Y, Hayden DM, Coleman- Derr D, Hill TA, Dvorak J, Anderson OD, Gu YQ (2007) The nuclear genome of *Brachypodium distachyon*: analysis of BAC end sequences. *Functional and Integrative Genomics*. 8: 135-147.
- Huo N, Vogel JP, Lazo GR, You FM, Ma Y, McMahon S, Dvorak J, Anderson OD, Luo MC, Gu YQ. 2009. Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Molecular Biology*. 70(1-2): 47-61.
- Ibrahim RK, Bruneau A, Bantignies B. 1998. Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology*. 36: 1-10.
- K. Iiyama, T. B.T. Lam, B. A. Stone (1984). Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*. 3: 733-737.
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*. 104: 315-320.
- Iiyama K, Wallis AFA. 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps.
- Inoue K, Sewalt VJH, Balance GM, Ni W, Stürzer C, Dixon RA. 1998. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-

methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology*. 117: 761-770.

- International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*. 463: 763–768.
- Ishii T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*. 127(2): 111-127.
- Jacquet G, Pollet B, Lapierre C. 1995. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2746-2751.
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox P. 2003. Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell & Environment*. 26(7): 977-989.
- Jaspard E., Macherel D., Hunault G. 2012. Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes. *PloS One*. 7(5): e36968.
- Jenkins G, Hasterok R, Draper J. 2003. Building the molecular infrastructure of a new model grass. In: Zwierzykowski Z, Surma M, Kachlicki P. eds. Applications of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses. Poznan: Institute of Plant Genetics PAS. 77–84.
- Jenkins G, Mikhailova E, Phillips D, Hasterok R, Draper J, Jones N. 2005. Models and meiosis in the ‘omics era. In: Zwierzykowski Z, Kosmala A, eds. Recent advances in genetics and breeding of grasses. Poznan, Poland: Institute of Plant Genetics PAS. 97–104
- Jeoh T, Ishizawa CI, Davis M, Himmel ME, Adney WS, Johnson DK. 2007. Cellulase Digestibility of Pretreated Biomass Is Limited by Cellulose Accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*. 98: 112-122.
- Jorgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, Felby C. 2007. Liquefaction of lignocellulose at High-Solids concentrations. *Biothechnology and Bioengineering*. 96(5): 862-870.
- Jouanin L, Goujon T, de Nadaï V, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C. 2000. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology*. 123(4): 1363-1373.
- Joshi & Chiang, 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Molecular Biology*. 37(4): 663-674.
- Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J. 1993. Forage cell wall structure and digestibility. Eds: American Society of Agronomy, Madison. pp. 133-163.

- Jung HG, Casler MD. 2006. *Crop Science*. 46: 1793-1800.
- Jung HG, Mertens DR, Phillips RL. 2011. Effect of reduced ferulate-mediated lignin/arabinoxylan cross-linking in corn silage on feed intake, digestibility, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 94: 5124-5137.
- Jung HG & Phillips RL. 2010. Putative seedling ferulate ester (sfe) maize mutant: Morphology, biomass yield, and stover cell wall composition and rumen degradability. *Crop Science*. 50:403–418.
- Kagan RM & Clarke S. 1994. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 417–427.
- Kaneda M, Rensing KH, Wong JCT, Banno B, Mansfield SD, Samuels AL. 2008. Tracking monolignols during wood development in lodge pole pine. *Plant Physiology*. 147: 1750–1760
- Kent NL & Evers AD. 1994. *Technology of Cereals*, fourth ed. Elsevier Science Ltd.
- Kim BG, Kim DH, Hur HG, Lim J, Lim Y, Ahn JH. 2003. O-methyltransferases from *Arabidopsis thaliana*.
- Koncz C & Schell J. 1986. The promotor of T-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics*. 204:383-396.
- Krauze-Baranowska M. 2002. Truxillic and truxinic acids occurrence in plant kingdom. *Acta Polonica Pharmaceutica. Drug Research*. 59(5): 403-410.
- Lam KC, Ibrahim RK, Behdad B, Dayanandran S. 2007. Structure, function and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*. 50: 1001-1013.
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA. 1992. Changes in phenolic-acids from internode walls of wheat and *Phalaris* during maturation. *Phytochemistry*. 31: 2655-2658.
- Lam TBT, Iiyama K, Stone BA. 1992. Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and *phalaris* intemodes. *Phytochemistry*. 31: 1179-1183.
- Lam TBT, Kadoya K, Iiyama K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry*. 57(6): 987-992.
- Lapierre C. 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield, J Ralph, eds, *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 133–166

- Lapiere C. 1986. Hétérogénéité des lignines de peupliers:mise en evidence systématique. p. 305.
- Lapiere C, Monties B, Rolando C. 1986. Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterisation of guaiacyl-syringyl lignins fractions. *Holzforschung*. 40: 113.
- Lapiere C, Pollet B, Monties B. 1991. Heterogeneous distribution of diarylpropane structures in spruce lignins. *Phytochemistry*. 30: 659-662.
- Lapiere C, Tollier MT, Monties B. 1988. A new type of constitutive unit in lignins from the corn bm3 mutant. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences*. 307(3): 723-728.
- Larré C, Penninck S, Bouchet B, Lollier V, Tranquet O, Denery-Papini S, Guillon F, Rogniaux H. 2010. *Brachypodium distachyon* grain: Identification and subcellular localization of storage proteins. *Journal of experimental botany*. 61(6): 1771-1783.
- Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. 1991. A DNA transformation-Competent Arabidopsis genomic library in Agrobacterium. *BioTechnology*. 9: 963-967
- Lee CH, Zhong RQ, Richardson EA, Himmelsbach DS, McPhail BT, Ye ZH. 2007. The *PARVUS* gene is expressed in cells undergoing secondary wall thickening and is essential for glucuronoxytan biosynthesis. *Plant Cell Physiology*. 48: 1659–72.
- Li C, Rudi H, Stockinger EJ, Cheng H, Cao M, Fox SE, Mockler TC, Westereng B, Fjellheim S, Rognli OA, Sandve SR. 2012. Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *Plant Biology*. 12: 65.
- Li L, Popko JL, Umezawa T, Chiang VL. 2000. Enzyme catalysis and regulation: 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in Angiosperms. *Journal of Biology and Chemistry*. 275: 6537-6545.
- Li X, Chen W, Zhao Y, Xiang Y, Jiang H, Zhu S, Cheng B. 2013. Downregulation of caffeoyl-CoA O-methyltransferase (*CCoAOMT*) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw. *Genetics and Molecular Biology*. 36(4): 540-546.
- Li Z & Trick HN. 2005. Rapid method for high-quality RNA isolation from seed endosperm containing high levels of starch. *BioTechniques*. 38: 872-876.
- Louie GV, Bowman ME, Tu Y, Mouradov A, Spangenberg G, Noel JP. 2010. Structure-function analyses of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference. *The plant cell*. 22(12):4114-4127.

- Lovegrove A, Wilkinson MD, Freeman J, Pellny TK, Tosi P, Saulnier L, Shewry PR, Mitchell RC. 2013. RNA interference suppression of genes in glycosyl transferase families 43 and 47 in wheat starchy endosperm causes large decreases in arabinoxylan content. *Plant Physiology*. 163(1): 95-107.
- Lawoko M, Henriksson G, Gellerstedt G. 2005. Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromolecules*. 6: 3467-3473.
- Luo N, Liu J, Yu X, Jiang Y. 2011. Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum*. 141: 19–29.
- Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman CE. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*. 251: 1318-1323.
- Ma QH & Xu Y. 2008. Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis. *Biochimie*. 90: 515-524.
- Ma JF & Yamaji N. 2008. Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 3049-3057.
- Ma L, Vu GTH, Schubert V, Watanabe K, Syein N, Houben A, Schubert I. 2010. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordum vulgare* as revealed by FISH. *Chromosome Research*. 18(7): 841-850.
- MacCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*. 123: 439–442.
- MacFarlane TD & Watson L. 1982. The classification of *Poaceae* subfamily Pooideae. *Taxon*. 31: 178–203.
- MacNeil M, Albersheim P, Taiz L, Jones R. 1975. The structure of plant cell walls. VII. Barley aleurone cells. *Plant Physiology*. 55: 64-68.
- Manthey FA, Hareland GA, Huseby DJ. 1999. Soluble and insoluble dietary fiber content and composition in oat. *Cereal Chemistry*. 76: 417–420.
- Martin JL & McMillan FM. 2002. S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Current Opinion in Structural Biology*. 12: 783–793.
- Mastrangelo L, Lenucci M, Piro G, Dalessandro G. 2009. Evidence for intra- and extra-protoplasmic feruloylation and cross-linking in wheat seedling roots. *Planta*. 229: 343–355.
- Mathews JA. 2008. Carbon-negative biofuels. *Energy Policy*. 36(3): 940-945.

- Matos DA, Whitney IP, Harrington MJ, Hazen SP. 2013. Cell walls and the developmental anatomy of the *Brachypodium distachyon* stem internode. *Plos One*. 8(11): e80640.
- Maury S, Geoffroy P, Legrand M. 1999. Tobacco O-Methyltransferases Involved in Phenylpropanoid Metabolism. The Different Caffeoyl-Coenzyme A/5-Hydroxyferuloyl-Coenzyme A 3/5-O-Methyltransferase and Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O-Methyltransferase Classes Have Distinct Substrate Specificities and Expression Patterns. *Plant physiology*. 121: 215-223.
- Meineke T, Manisseri C, Voigt CA. 2014. Phylogeny in Defining Model Plants for Lignocellulosic Ethanol Production: A Comparative Study of *Brachypodium distachyon*, Wheat, Maize, and Miscanthus x giganteus Leaf and Stem Biomass. *Plos One*. 9(8): e103580.
- Meyermans H, Morrell K, Lapierre C, Pollet B, De Bruyn A, Busson R, Herdewijn P, Devresse B, Van Beeumen J, Marita JM, Ralph J, Chen C, Burggraeve B, Van Montagu M, Messens E, Boerjan W. 2000) Modifications in lignin and accumulation of phenolic glycosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 36899–36909.
- Mitchell RA, Dupree P, Shewry PR. 2007. A novel bioinformatics approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan. *Plant Physiology*. 144: 43-53.
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 266–277.
- Molina I, Li-Beisson Y, Beisson F, Ohlrogge JB, Pollard M. 2009. Identification of an Arabidopsis feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant physiology*. 151(3): 1317-1328.
- Molinari HBC, Pellny TK, Freeman J, Shewry PR, Mitchell RAC. 2013. Grass cell wall feruloylation; distribution of bound ferulate and candidate gene expression in *Brachypodium distachyon*. *Frontiers in Plant Science*. 4: article 50.
- Monties B. 1991. Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: Relations with lignin structure and function. *Animal Feed Science and Technology*. 32: 159–175.
- Monties B. 1998. Novel structures and properties of lignins in relation to their natural and induced variability in ecotypes, mutants and transgenic plants. *Polymer Degradation and Stability*. 59: 53.
- Morgan JL, Strumillo J, Zimmer J. 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*. 10: 493.

- Mortimer JC, Miles GP, Brown DM, Zhang Z, Segura MP, Weimar T, Yu X, Seffen KA, Stephens E, Turner SR, Dupree P. 2010. Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gux* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 107: 17409-17414.
- Mur LAJ, Allainguillaume J, Catalan P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel JP. 2011. Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. *New Phytologist*. 191(2): 334-347.
- Murat F, Louis A, Maumus F, Armero A, Cooke R, Quesville H, Roest Crolius H, Salse J. 2015. Understanding Brassicaceae evolution through ancestral genome reconstruction. *Genome Biology and Evolution*. 6:12-33.
- Murat F, Xu JH, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J. 2010. Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research*. 20(11):1545-57.
- Murat F, Zhang R, Guizard S, Flores R, Armero A, Pont C, Steinbach D, Quesneville H, Cooke R, Salse J. 2014. Shared subgenome dominance following polyploidization explains grass genome evolutionary plasticity from a seven protochromosome ancestor with 16 K protogenes. *Genome Biology and Evolution*. 6(1):12-33.
- Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW, Chapple C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell*. 16(2):544-554.
- Nawrath C, Schreiber L, Franke RB, Geldner N, Reina-Pinto JJ, Kunst L. 2013. Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* book.
- Ng PC & Henikoff S. 2006. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 7:61-80.
- Nimz H, Robert D, Faix O, Nemr M. 1981. Carbon-13 NMR Spectra of Lignins, 8: Structural Differences Between Lignins of Hardwoods, Softwoods, Grasses and Compression Wood. *Holzforschung*. 35: 16.
- Noel JP, Dixon RA, Pickersky E, Zubieta C, Ferrer JL. 2003. Structural, functional and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. Recent Adv. *Phytochemistry*. 37: 37–58.
- O’Neil MA & York WS. 2003. The composition and structure of plant primary cell walls. In *The Plant Cell Wall*, J.K.C. Rose, ed (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 1–54.

- Ordaz-Otiz JJ & Saulnier L. 2005. Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylanes. *Journal of Cereal Science*. 42: 119-125.
- Oikawa A, Joshi HJ, Rennie EA, Ebert B; Manisseri C, Heazlewood JL, Vibe-Scheller H. 2010. An integrative approach to the identification of Arabidopsis and Rice genes involved in xylan and secondary wall development. *PLoS One*. 5(11): e15481.
- Olek AT, Rayon C, Makowski L, Rae Kim H, Ciesielski P, Badger J, Paul LN, Ghosh S, Kihara D, Crowley M, Himmel ME, Bolin JT, Carpita NC. 2014. The structure of the catalytic domain of a plant cellulose synthase and its assemble into dimers. *Plant Cell*. 26(7): 2996-3009.
- Olsen P, Lenk I, Jensen CS, Petersen K, Andersen CH, Didion T, Nielsen KK. 2006. Analysis of two heterologous flowering genes in *Brachypodium distachyon* demonstrates its potential as a grass model plant. *Plant Science*. 170: 1020–1025.
- Opanowicz M, Hands P, Betts D, Parket ML, Toole GA, Clare Mills EN, Doonan JH, Drea Sinead. 2011. Endosperm development in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany*. 62(2): 735-748.
- Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH. 2008. *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends in Plant Science*. 13: 172–177.
- Oparka KJ & Gates P. 1981. Transport of assimilates in the developing caryopsis of rice (*Oryza sativa* L.) The pathways of water and assimilated carbon. *Planta*. 152: 388–396.
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Jpshi CP, Chiang VL. 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 8955–8960.
- Oscarsson M, Andersson R, Salomonsson A-C, Aman P. 1996. Chemical composition of barley samples focusing on dietary components. *Journal of Cereal Science*. 24: 161–170.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D. 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal*. 53: 674-690.
- Pacak A, Geisler K, Jørgensen B, Barciszewska-Pacak M, Nilsson L, Nielsen TH, Johansen E, Grønlund M, Jakobsen I, Albrechtsen M (2010) Investigations of barley stripe mosaic virus as a gene silencing vector in barley roots and in *Brachypodium distachyon* and oat. *Plant Methods*. 6: 26.

- Pacheto-Villalobos D, Sankar M, Ljung K, Hardtke CS. 2013. Disturbed local auxin homeostasis enhances cellular anisotropy and reveals alternative wiring of auxin-ethylene crosstalk in *Brachypodium distachyon* seminal roots. *PLoS Genetics*. 9(6): e1003564.
- Pacurar DI, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I. 2008. A highthroughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Research*. 17: 965–975.
- Pagadala NS, Arha M, Reddy PS, Kumar R, Sirisha VL, Prashant S, Reddy KJ, Khan B, Rawal SK, Kishor PBK. 2009. Phylogenetic analysis, homology modelling, molecular dynamics and docking studies of caffeoyl-coA_O-methyltransferase (CCoAOMT1 and 2) isoforms isolated from subabul (*Leucaena leucocephala*). *Journal of molecular modelling*. 15: 203-221.
- Palmer NA, Sattler SE, Saathoff AJ, Funnell D, Pedersen JF, Sarath G. 2008. Genetic background impacts soluble and cell-bound aromatics in *brown-midrib* mutants of sorghum. *Planta*. 229: 115-127.
- Palmer NA, Sattler SE, Saathoff AJ, Sarath G. 2010. A continuous, quantitative fluorescent assay for plant caffeic acid O-methyltransferase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58: 5220–5226.
- Parvathi K, Chen F, Guo D, Blount JW, Dixon RA. 2001. Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *The Plant Journal*. 25(2): 193-202.
- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti AK, Chapman J, Feltus FA, Gowik U, Grigoriev IV, Lyons E, Maher CA, Martis M, Narechania A, Otillar RP, Penning BW, Salamov AA, Wang Y, Zhang L, Carpita NC, Freeling M, Gingle AR, Hash CT, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann MC, Ming R, Peterson DG, Mehboob-ur-Rahman, Ware D, Westhoff P, Mayer KFX, Messing J, Rokhsar DS. 2009. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*. 457: 551-556.
- Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS. 1999. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants. *Plant Journal*. 20: 629–639.
- Pellny TK, Lovegrove A, Freeman J, Tosi P, Love CG, Knox JP, Shewry PR, Mitchell RAC. 2012. Cell walls of developing wheat (*Triticum aestivum* L.) starchy endosperm: comparison of composition and RNA Seq transcriptome. *Plant Physiology*. 158: 612e627.

- Penugonda S, Wu W, Mare S, Ercal N. 2004. Liquid chromatography analysis of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine in biological samples by ThioGlo (TM) 3 derivatization. *Journal of Chromatography*. 807 (2): 251–256.
- Persson S, Wei H, Milne J, Page GP, Somerville CR. 2005. Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 102: 8633–8638.
- Petrik DL, Karlen SD, Cass CL, Padmakshan D, Lu F, Liu S, Le Bris P, Antelme S, Santoro N, Wilkerson CG, Sibout R, Lapierre C, Ralph J, Sedbrook JC. 2014. *p*-Coumaroyl-CoA:monolignols transferase (PMT) acts specifically in the lignin biosynthesis pathway in *Brachypodium distachyon*. *Plant Journal*. 77(5): 713-726.
- Philippe S, Saulnier L, Guillon F. 2006. Arabinoxylan and (1,3), (1,4)-glucans deposition in cell walls during wheat endosperm development. *Planta*. 224:449–461.
- Philippe, S.; Tranquet, O.; Utille, J. P.; Saulnier, L.; Guillon, F., Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. *Planta* 2007, 225 (5), 1287-1299.
- Phogat N, Vindal V, Kumar V, Inampudi KK, Prasad NK. 2010. Sequence analysis, in silico modeling and docking studies of caffeoylcoenzymeA-O-methyltransferase of *Populus trichopora*. *Journal of Molecular Modeling*. 16: 1461-1471.
- Pichon M, Deswartes C, Gerentes D, Guillaumie S, Lapierre C, Toppan A, Barrière Y, Goffner D. 2006. Variation in lignin and cell wall digestibility in caffeic acid O-methyltransferase down-regulated maize half-sib progenies in field experiments. *Molecular Breeding*. 18: 253-261.
- Pinçon G, Maury S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. 2001. Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry*. 57:1167-1176.
- Piquemal J, Chamayou S, Nadaud I, Beckert M, Barrière Y, Mila I, Lapierre C, Rigau J, Puigdomenech P., Jauneau A, Dignonnet C, Boudet AM, Goffner D Pichon M. 2002. Down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase in *maize* revisited using a transgenic approach. *Plant Physiology*. 130(4): 1675-1685.
- Piston, F., Uauy, C., Fu, L., Langston, J., Labavitch, J., Dubcovsky, J., 2010. Downregulation of four putative arabinoxylan feruloyl transferase genes from family PF02458 reduces ester-linked ferulate content in rice cell walls. *Planta*. 231: 677-691.

- Pomar F, Merino F, Ros Barcelo A. O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*. 220: 17-28.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van de Peer, Y. and Boerjan, W. (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 133, 1051-1071.
- Ralph J, Brunow G, Boerjan W. 2007. Lignins. *Encyclopuedia of life sciences*. Chapter.
- Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD. 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research*. 275(1): 167-178.
- Ralph J, Hatfield RD. 1991. Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 39(8): 1426-1437.
- Ralph J, Hatfield R, Quideau S, Helm R, Grabber J. 1994. Pathway of p-coumaric acid incorporation into maize lignin as revealed by NMR. *Journal of the American Chemical Society*. 116: 9448.
- Rancour DM, Marita JM, Hatfield RD. 2012. Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Frontiers in Plant Science*. 3: 266.
- Rautengarten C, Ebert B, Herter T, Petzold CJ, Ishii T, Mukhopadhyay A, Usadel B, Scheller HV. 2011. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23: 1373-1390.
- Rautengarten C, Ebert B, Ouellet M, Nafisi M, Baidoo EEK, Benke P, Stranne M, Mukhopadhyay A, Keasling JD, Sakuragi Y, Vibe-Scheller H. 2012. Arabidopsis *Deficient in Cutin Ferulate* encodes a transferase required for feruloylation of ω -hydroxyfatty acids in cutin polyester. *Plant Physiology*. 158: 654-665.
- Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A. 2013. Complexity of the alternative splicing lanscape in plants. *The Plant Cell*. 25: 3657-3683.
- Rennie, E.A., Hansen, S.F., Baidoo, E.E., Hadi, M.Z., Keasling, J.D. and Scheller, H.V. 2012. Three members of the Arabidopsis glycosyltransferase family 8 are xylan glucuronosyltransferases. *Plant Physiology*. 159: 1408–1417.
- Rennie EA & Vibe-Scheller H. 2014. Xylan biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*. 26: 100-107.

- Rice annotation project. 2008. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): 2008 update. *Nucleic Acids Research*. 36.
- Richmond TA & Somerville CR. 2000. The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiology*. 124: 495-498.
- Riley RG & Kolattukudy PE. 1975. Evidence for covalently attached p'coumaric acid and ferulic acid in cutins and suberins. *Plant Physiology*. 56:650-654.
- Robert P, Jamme J, Barron C, Bouchet B, Saulnier L, Dumas P, Guillon F. 2011. Change in wall composition of transfer and aleurone cells during wheat grain development. *Planta* 233, 393–406.
- Robertson IH. 1981. Chromosome numbers in *Brachypodium* Beauv. (Gramineae). *Genetica*. 56: 55–60.
- Roje S. 2006. A-adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry*. 67: 1686-1698.
- Rolando C, Monties B, Lapierre C. 1992. Thioacidolysis. In *Methods and Lignin Chemistry*.
- Sado PE, Tessier D, Vasseur M, Elmorjani K, Guillon F, Saulnier L. 2009. Integrating genes and phenotype: A wheat-Arabidopsis-rice glycosyltransferase database for candidate gene analyses. *Functional & Integrative Genomics*. 9: 43-58.
- Sablok G, Gupta PK, Back JM, Vasquez F, Min XJ. 2011. Genome-wide survey of alternative splicing in the grass *Brachypodium distachyon*: An emerging model biosystem for plant functional genomics. *Biotechnology Letters*. 33: 629-636.
- Salminen M, Lundström K, Tilgma C, Savolainen R, Kalkkinen N, Ulmanen I. 1990. Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene*. 93(2): 241-247.
- Salmen L & Olsson AM. 1998. Interaction between hemicelluloses, lignin and cellulose.
- Salse J. 2012. In silico archeogenomics unveils modern plant genome organization, regulation and evolution. *Current Opinion in Plant Biology*. 15(2): 122-130.
- Samuels AL, Rensing KH, Douglas CJ, Mansfield SD, Dharmawardhana DP, Ellis BE. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta*. 216: 72-82.
- Sanchez-Rodriguez C, Rubio-Somoza I, Sibout R, Persson S. 2010. Phytohormones and the cell wall in *Arabidopsis* during seedling growth. *Trends in Plant Science*. 15(5): 291-301.

- Sattler SE, Saathoff AJ, Haas EJ, Palmer NA, Funnell-Harris DL, Sarath G, Pedersen JF. 2009. A nonsense mutation in a cinnamoyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the *Sorghum brown midrib 6* phenotype. *Plant Physiology*. 150 (2): 584–95.
- Saulnier L, Guillon F, Chateigner-Boutin AL. 2012. Cell wall deposition and metabolism in wheat grain. *Journal of Cereal Science*. 56: 91-108
- Saulnier L, Guillon F, Sado PE, Rouau X. 2007. Plant cell wall polysaccharides in storage organs: xylanes (food applications). *Comprehensive Glycoscience*. Eds. From Chemistry to Systems Biology. pp: 653-689.
- Saulnier L, Peneau N, Thibault JF, 1995. Variability in grain extract Viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. *Journal of Cereal Science*. 22: 259-264.
- Saulnier L, Vigouroux J, Thibault J-F. 1995. Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran. *Carbohydrate Res*. 272: 241-253.
- Scalbert A, Monties B, Lallemand JY, Guittet E, Rolando C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*. 24: 1359-1362.
- Schippmann, U. 1991. Revision der europäischen Arten der Gattung *Brachypodium* Palisot de Beauvois (Poaceae). *Boissiera*. 45: 1–249.
- Schmidt TJ, Hemmati S, Klaes M, Konuklugil B, Mohagheghzadeh A, Ionkova I, Fuss E, Alfermann AW. 2010. Lignans in flowering aerial parts of *Linum* species – Chemodiversity in the light of systemics and phylogeny. *Phytochemistry*. 71: 1714-1728.
- Schmidt A, Grimm R, Schmidt J, Scheel D, Strack D, Rosahl S. 1999. Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoylCoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 4273–4280.
- Schmitt D, Pakusch AE, Matern U. 1991. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 17416–17423.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthman N, Weigel D. 2006. Highly specific gene silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18: 1121-1133.
- Seifert GJ & Roberts K. 2007. The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 137-161.
- Sekhon RS, Lin H, Childs KL, Hansey CN, Buell CR, de Leon N, Kaeppler SM. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *Plant Journal*. 66(4): 553-63.
- Sethaphong L, Haigler CH, Kubicki JD, Zimmer J, Bonetta D, DeBolt S, Yingling YG. 2013. Tertiary model of a plant cellulose synthase. *PNAS*. 110(18):7512-7517.

- Shane M, McCully M, Canny MJ. 2000. The vascular system of maize stems revisited: implications for water transport and xylem safety. *Annals of Botany*. 86(2): 245-258.
- Shen H, Fu C, Xiao X, Ray T, Tang Y, Wang Z. 2009. Developmental control of lignification in stems of low land switchgrass variety Alamo and the effects on saccharification efficiency. *Bioenergy Research*. 2: 233–245.
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L and Séguin A. 2005. Cinnamyl alcohol dehydrogenase C and D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 17: 2059-2076.
- Silva GB, Ionashiro M, Carrara TB, Crivellari AC, Tiné MA, Prado J, Carpita NC, Buckeridge MS. 2011. Cell wall polysaccharides from fern leaves: evidence for a mannan rich Type III cell wall *Adiantum raddianum*. *Phytochemistry*. 72(18): 2352-2360.
- Somerville CR. 2006. Cellulose synthesis in Higher plants. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 53-78.
- Somerville CR, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, et al. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science*. 306: 2206–2211.
- Soreng RJ, Davis JJ, Doyle JJ. 1990. A phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation in Poaceae subfam. Pooideae. *Plant Systematics and Evolution*. 172: 83–97.
- St Pierre B, Laflamme P, Alarco AM, De Luca V. 1998. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A dependent acyl transfer. *Plant Journal*. 14: 703-713.
- St Pierre B & De Luca V. 2000. Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Recent Advances in Phytochemistry*. 34: 285-315.
- Storey BT, Alvarez JG, Thompson KA. 1998. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Molecular Reproduction Development*. 49(4): 400–407.
- Sugiyama J, Perrson K, Chanzy H. 1991. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules*. 24(9): 2461-2466.
- Sun R, Lawther, JM, Banks WBA. 1997. Tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*. 6: 1.
- Sun RC, Sun XF, Zhang SH. 2001. Quantitative Determination of Hydroxycinnamic Acids in Wheat, Rice, Rye, and Barley Straws, Maize Stems, Oil Palm Frond Fiber, and Fast-Growing Poplar Wood.

- Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS. 2005. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw.
- The International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*. 463: 763-768.
- Thibault JF. 1979. Automated-method for the determination of pectic substances. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 12: 247-251.
- Thole V, Peraldi A, Worland B, Nicholson P, Doonan JH, Vain P. 2011. T-DNA mutagenesis in *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany*. 63(2): 567-576.
- Thole V, Worland B, Wright J, Bevan MW, Vain P. 2010. Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Journal of Plant Biotechnology*. 8: 734–747.
- Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, Henikoff S, Comai L. 2007. Discovery of chemical induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology*. 7: 19.
- Trafford K, Haleux P, Henderson M, Parket M, Shirley NJ, Tucker MR, Fincher GB, Burton RA. 2013. Grain development in *Brachypodium distachyon* and other grasses: possible interactions between cell expansion, starch deposition, and cell-wall synthesis. *Journal of Experimental Botany*. 64(16): 5033-5047.
- Tranquet, O.; Saulnier, L.; Utille, J.-P.; Ralph, J.; Guillon, F., Monoclonal antibodies to p-coumarate. *Phytochemistry* 2009, 70 (11-12), 1366-1373.
- Tu Y, Rochefort S, Liu Z, Ran Y, Griffith M, Badenhorst P, Louie GV, Bowman ME, Smith KF, Noel JP, Mouradov A, Spangenberg G. 2010. Functional analyses of caffeic acid O-methyltransferase and cinnamoyl-CoA-reductase genes from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *The Plant Cell*. 22: 3357-3373.
- Tyagi AK & Mohanty A. 2000. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Science*. 158: 1-18.
- Urbanowicz BR, Rayon C, Carpita NC. 2004. Topology of the maize mixed linkage (1→3), (1→4)-β-D-glucan synthase at the Golgi membrane. *Plant Physiology*. 134: 758–768.
- Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Alves SC, Opanowicz M, Fish LJ, Bevan MW, Snape JW. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*. 6: 236–245.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. 153(3): 895-905.

- Vanholme R, Strome V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K Boerjan W. 2012. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 24: 3506-3529.
- Vermeersch L, De Winne N, Depicker A. 2014. Detection and investigation of transitive gene silencing in plants. *Methods in Molecular Biology*. 1112: 219-241.
- Vibe-Scheller H & Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 263-289.
- Vidgren J, Svensson LA, Liljas A (1994) Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* 368: 354–357.
- Vignols F, Rigau J, Torres MA, Capellades M, Puigdomenech P. 1995. The brown midrib3 (bm3) mutation in *maize* occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *The Plant Cell*. 7(4): 407-416.
- Vogel JP. 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 11(3): 301-307.
- Vogel JP, Garvin DF, Leong OM, Hayden DM. 2006. Agrobacterium mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84: 199-211.
- Vogel JP, Gu YQ, Twigg P, Lazo GR, Laudencia-Chingcuanco D, Hayden DM, Donze TJ, Vivian LA, Stamova B, Coleman-Derr D. 2006. EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theoretical and Applied Genetics*. 113(2): 186-195.
- Vogel J & Hill T. 2008. High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Reports*. 27: 471–478
- Vogel JP, Raab TK, Somervielle CR, Somerville SC. 2004. Mutations in PMR5 in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant Journal*. 40(6): 968-78.
- Wallace G, Russel T, Lomax JA, Jarvis M, Lapierre C, Chesson A. 1995. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from graminaceous cell wall. *Carbohydrate Research*. 272(1): 41-53.
- Wang H, Tucket M, Ji Y. 2013. Recent development in chemical depolymerization of lignin: a review. *Journal of applied chemistry. Journal of Applied Chemistry*. 2013: ID 838645.
- Wang JP, Chuang L, Loziuk PL, Chen H, Lin YC, Shi R, Qu GZ, Muddiman DC, Sederoff RR, Chiang VL. 2015. Phosphorylation is an on/off switch for 5-

hydroxyconiferaldehyde O-methyltransferase activity in poplar monolignols biosynthesis. *PNAS*.

- Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, Antelme S, Soulhat C, Gineau E, Dalmais M, Bendhamane A, Morin H, Mouille G, Legée F, Cézard L, Lapierre C, Sibout R. 2015. LACCASE 5 is required for lignification of the *Brachypodium distachyon* culm. *Plant Physiology*.
- Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Hervé P. 2008. Highly Specific Gene Silencing by Artificial miRNAs in Rice. *PLoS ONE*. 3(3): 1829.
- Watson L & Dallwitz MJ. 1992. The Grass Genera of the World. Eds: C.A.B. International, Wallingford, UK.
- Wei JH, Wang YZ, Wang HZ, Li RF, Lin N, Ma RC, Qu LQ, Song YR. 2008. Pulp performance of transgenic poplar with depressed caffeoyl-CoA O-methyltransferase. *Chinese Science Bulletin*. 53(22): 3553-3558.
- Weng JK & Chapple C. 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*. 187: 273-285.
- Wikerson CG, Mansfield SD, Lu F, Withers S, Park JY, Karlen SD, Gonzales-Vigil E, Padmakshan D, Unda F, Rencoret J, Ralph J. 2014. Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. *Science*. 344(6179): 90-93.
- Willats WGT, McCartney L, Mackie W, Knox P. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47: 9-27.
- Wilson SM, Burton RA, Doblin MS, Stone BA, Newbigin EJ, et al. 2006. Temporal and spatial appearance of wall polysaccharides during cellularization of barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. *Planta* 224:655–67.
- Wilson SM, Yin Ho Y, Lampugnani ER, Van de Meene AML, Bain MP, Bacic A, Doblin MS. 2015. Determining the subcellular location of synthesis and assembly of the cell wall polysaccharide (1,3; 1,4)- β -glucan in Grasses. *The Plant Cell*. 27(3): 754-771.
- Withers S, Lu F, Kim H, Zhu Y, Ralph J, Wilkerson CG (2012) Identification of grass-specific enzyme that acylates monolignols with p-coumarate. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 8347-8355.
- Wolny E & Hasterok R. 2009. Comparative cytogenetic analysis of the genomes of the model grass *Brachypodium distachyon* and its close relatives. *Annals of Botany*. 104(5): 873-881.
- Wolny E, Lesniewska K, Hasterok R, Langdon T. 2011. Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium*. *Chromosoma*. 120(2): 199-212.

- Wu AM, Rihouey C, Seveno M, Hornblad E, Singh SK, Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A. 2009. The *Arabidopsis* IRX10 and IRX10- LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant Journal*. 57:718–31.
- Wu W, Wu J, Luo Y, Bragg J, Anderson O, Vogel J, Gu YQ. 2012. Phylogenetic, molecular, and biochemistry characterization of caffeic acid O-methyltransferase gene family in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Plant Genomics* (2013).
- Yamamoto E, Lewis NG, Ohashi H, Towers GHN. 1987. 5-hydroxyferulic acid in *Zea mays* and *Hordeum vulgare* cell walls. *Phytochemistry*. 26(7): 1915-1916.
- Yamamoto I, Matsunaga T, Kobayashi H, Watanabe K (1991) Analysis and pharmacotoxicity of feruloytyramine as a new constituent and *p*-coumaroyltyramine in *Cannabis sativa* L. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 40: 465–469.
- Yang B & Wyman CE. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotchnology and Bioengineering*. 86(1): 88-95.
- Yang Q, Reinhard K, Schiltz E, Matern U.1997. Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl- CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Molecular Biology*. 35: 777-789.
- Ye ZH, Kneusel RE, Matern U, Varner JE (1994) An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell*. 6: 1427–1439.
- Yokoyama R & Nishitani K. 2004. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 45(9): 1111-1121.
- Yoshida-Shimokawa T, Yoshida S, Kakegawa K, Ishii T. 2001. Enzymic feruloylation of arabinoxylan-trisaccharide by feruloyl-CoA: arabinoxylan-trisaccharide O-hydroxycinnamoyl transferase from *Oryza sativa*. *Planta*. 212: 470–474.
- Yuan JS, Tiller KH, Al-Ahmad H, Stewart NR, Stewart CN Jr. 2008. Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends in Plant Science*. 13(8): 421-429.
- Zablackis E, Huang J, Müller B, Darvill AG, Albersteim P. 1995. Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Physiology*. 107: 1129-1138.

- Zeng W, Jiang N, Nadella R, Killen TL, Nadella V, Faik A. 2010. A glucurono(arabino)xylan synthase complex from wheat contains members of the GT43, GT47, and GT75 families and functions cooperatively. *Plant Physiology*. 154:78-97.
- Zhang J, Zou W, Li Y, Feng Y, Zhang H, Wu Z, Tu Y, Wang Y, Cai X, Peng L. 2015. Silica distinctively affects cell wall features and lignocellulosic saccharification with large enhancement on biomass production in rice. *Plant Science*. 239: 84-91.
- Zhang Y, Lv H, Ma CY, Guo L, Tan JF, Peng QH. 2015. Cloning of a caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase from *Camelia sinensis* and analysis of its catalytic activity. *Journal of Zhejiang University Science B*. 16(2). 103-112.
- Zhao H, Sheng Q, Lu S, Wang T, Song Y. 2004. Characterization of three rice CCoAOMT genes. *Chinese Science Bulletin*. 49(15):1602-1606.
- Zhong R, Morrison WH, Negrel J, Ye ZH. 1998. Dual methylation pathways in lignin Biosynthesis. *Plant Cell*. 10:2033–2045
- Zhong R, Morrison WH, Himmelsbach DS, Poole FL, Ye ZH. 2000. Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiology*. 124:563–577
- Zubieta C, Kota P, Ferrer JL, Dixon RA, Noel JP. 2002. Structural Basis for the Modulation of Lignin Monomer Methylation by Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O – Methyltransferase. *The plant cell*. 14: 1265-1277.

Sources :

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

Service Central des Enquêtes et Etudes statistiques du ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales (SCEES)

Conseil International des Céréales

Institut National de la statistique et des études économiques (INSEE)

Renewable Fuel Association (RFA)

Institut Français du Pétrole Energies Nouvelles (IFPEN)

© NAS/Photo Researchers/OKAPIA

www.biodiesel.org

www.bp.com

www.wikipedia.org

A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*

Marion Dalmais¹, Sébastien Antelme^{2,3}, Séverine Ho-Yue-Kuang^{2,3}, Yin Wang^{2,3}, Olivier Darracq^{2,3}, Madeleine Bouvier d'Yvoire^{2,3}, Laurent Cézard^{2,3}, Frédéric Légée^{2,3}, Eddy Blondet¹, Nicolas Oria^{2,3}, Christelle Troadec¹, Véronique Brunaud¹, Lise Jouanin^{2,3}, Herman Höfte^{2,3}, Abdelafid Bendahmane¹, Catherine Lapierre^{2,3}, Richard Sibout^{2,3*}

1 URGV, Unité de Recherche en Génétique Végétale, Université d'Evry Val d'Essonne, INRA, Evry, France, **2** Institut National de la Recherche Agronomique, Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences, Versailles, France, **3** AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, Saclay Plant Sciences, Versailles, France

Abstract

The new model plant for temperate grasses, *Brachypodium distachyon* offers great potential as a tool for functional genomics. We have established a sodium azide-induced mutant collection and a TILLING platform, called "BRACHYTIL", for the inbred line Bd21-3. The TILLING collection consists of DNA isolated from 5530 different families. Phenotypes were reported and organized in a phenotypic tree that is freely available online. The tilling platform was validated by the isolation of mutants for seven genes belonging to multigene families of the lignin biosynthesis pathway. In particular, a large allelic series for *BdCOMT6*, a caffeic acid O-methyl transferase was identified. Some mutants show lower lignin content when compared to wild-type plants as well as a typical decrease of syringyl units, a hallmark of COMT-deficient plants. The mutation rate was estimated at one mutation per 396 kb, or an average of 680 mutations per line. The collection was also used to assess the Genetically Effective Cell Number that was shown to be at least equal to 4 cells in *Brachypodium distachyon*. The mutant population and the TILLING platform should greatly facilitate functional genomics approaches in this model organism.

Citation: Dalmais M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, Darracq O, et al. (2013) A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. PLoS ONE 8(6): e65503. doi:10.1371/journal.pone.0065503

Editor: Baohong Zhang, East Carolina University, United States of America

Received: February 11, 2013; **Accepted:** April 25, 2013; **Published:** June 19, 2013

Copyright: © 2013 Dalmais et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the European FP7 project n° 211982 "RENEWALL" and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) projects ANR-08-KBBE-004 "CELLWALL" and ANR-10-BLAN-1528 "PHENOWALL". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: richard.sibout@versailles.inra.fr

Introduction

Brachypodium distachyon is a valuable model plant for economically important temperate grasses such as wheat, barley and oat [1]. Attractive features are the small size, simple culture conditions and the small (272 Mb), diploid (2n = 10) and fully sequenced genome [2]. *B. distachyon* is currently being used as a model for the study of domestication in grasses [1,2,3,4,5], plant pathogen interactions, root and culm development, biomass production and cell wall biosynthesis. Important progress has been made in the development of efficient transformation protocols [6,7,8] and sequence-indexed T-DNA insertion collections [9]: the BrachyTAG collection at the John Innes Centre (5000 lines) ([10], <http://www.brachytag.org/>) and the USDA Brachypodium Genome Resources collection (8491 lines) [11]. To extend the panel of resources for functional genomics in this species, we have developed a mutagenized population and a TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome) platform. Chemically-induced mutants are complementary to insertion mutants in several aspects: (i) mutation rates are higher and hence screens can be done on smaller mutant populations, (ii) single base pair changes, as opposed to insertion mutants, more likely yield allelic series of partial loss-of-function, conditional or gain-of-function mutants and (iii) somaclonal variation is avoided in the absence of an *in vitro*

culture step that is required for T-DNA-induced mutagenesis [12,13]. An efficient method to identify new alleles for target genes is TILLING. This method developed a decade ago has been successfully applied to many plant species [14,15]. In the TILLING method, seeds are mutagenized, the resulting M1 plants are self-fertilized, and the M2 generation of individuals is used to prepare DNA samples for mutational screening, while seeds of the M3 families can be stored and distributed. DNA samples are pooled and subjected to gene-specific PCR. The amplification products are incubated with an endonuclease that preferentially cleaves mismatches in heteroduplexes between wild type and mutant. Upon detection of a mutation in a pool, the individual DNA samples are similarly screened to identify the plant carrying the mutation. TILLING populations have been established for grasses including wheat, sorghum, barley, rice and oat [15,16,17,18,19,20,21,22,23] but to our knowledge not yet for *Brachypodium distachyon*. Here we report on the development of a mutagenized population and a TILLING platform and demonstrate the efficiency of the TILLING method with the identification of a series of allelic mutants for an O-methyl transferase, involved in the lignification of the internodes.

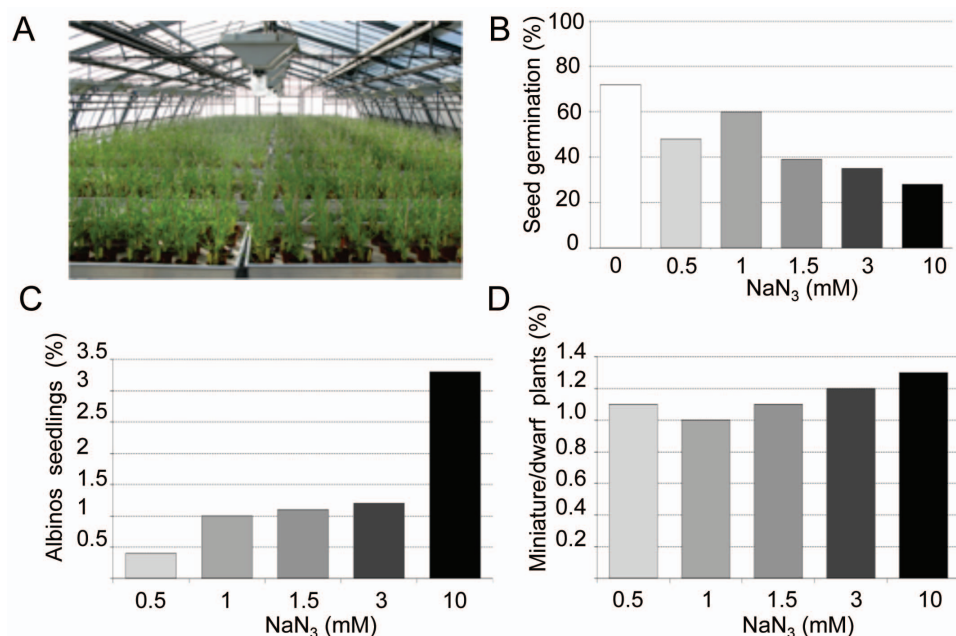


Figure 1. Production of *Brachypodium* mutants. A. 3000 M1 mutagenized individual plants growing in greenhouse. B. Percentage of seeds germinating after 2 hours imbibition in different NaN₃ concentrations. C. Percentage of M2 albino seedlings observed according to NaN₃ concentrations. D. Percentage of M2 dwarf/miniature plants observed according to NaN₃ concentrations. In each experiment (B–D) 100 seeds per concentration were sowed.

doi:10.1371/journal.pone.0065503.g001

Materials and Methods

Plant Material and Growth Conditions

Brachypodium distachyon (L.) Beauv. inbred line Bd21-3 was kindly provided by John Vogel. Bd21-3 seeds were grown in a greenhouse under long-day conditions (18 h light, 400 watt sodium lamps). Day and night temperatures were 23°C and 18°C, respectively. The relative humidity was about 60%. Plants were grown in soil (one-liter pots) and watered twice a week.

Chemical Mutagenesis

For the production of mutants, dry seeds were pre-soaked in distilled water for 2 h. Portions of 5000 seeds were then suspended in 200 mL of fresh sodium azide (NaN₃) solution diluted in phosphate buffer (0.1 M, pH 3) for 2 h under the hood and with gentle shaking. The seeds were washed 3 times in water for 1 h and then kept at +4°C for 72 h before sowing in pots. For establishment of the kill curve, 500 seeds were mutagenized with 0.5, 1, 1.5, 3 or 10 mM NaN₃.

Genomic DNA Extraction and Pooling

Four M2 plants per family were grown for one month in a greenhouse. DNA was extracted from 3 cm-long portions of the median foliar part. The collected samples were pooled and placed in 96-well plates containing 2 steel beads per well. Samples were lyophilized and ground using a bead mill. Genomic DNAs were isolated using the DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany). All genomic DNAs were both quantified on a 1% agarose gel with λ DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as a concentration reference using a NanoDrop spectrophotometer 2000 c (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). DNA concentration was normalized to 6 ng.μL⁻¹ and pooled eightfold in a 96-well format.

PCR Amplification and Detection of Mutations

DNA amplification is based on nested-PCR. The first PCR amplification is a standard PCR reaction with target-specific primers and 10 ng of *Brachypodium* genomic DNA. One μl of the first PCR product served as a template for the second nested PCR amplification, with a combination of specific primers carrying M13 tail and M13 universal primers, M13F700 (5'-CAC-GACGTTGTAAAACGAC-3') and M13R800 (5'-GGATAA-CATTTCACACAGG-3'), labelled at the 5' end with infra-red dyes IRD700 and IRD800 (LI-COR®, Lincoln, Nebraska, USA) respectively. Mutation detection was carried out as described previously except for the second PCR. This PCR was carried out using 0.05 μM of specific primers carrying M13 tail and 0.1 μM of M13 universal primers. The identity of the mutations was determined by sequencing.

Sequence Analysis Tools

The CODDLE software (Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions, <http://www.proweb.org/coddle/>) was used to identify regions of the target gene in which G/C to A/T transitions are most likely to result in deleterious effects on the protein. The PARSESNP software (Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs, <http://www.proweb.org/parse-snp/>) was used to illustrate the distribution of mutations within the gene and to indicate the nature of each single mutation. The SIFT software (Sorting Intolerant from Tolerant, http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html) was used to predict the impact of the mutation on the protein. Multiple sequence alignment of full-length protein sequences was performed with ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).

Phylogenetic Tree and 3D-structure Prediction

Protein sequences of COMT from several vascular plants were identified by protein blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> and

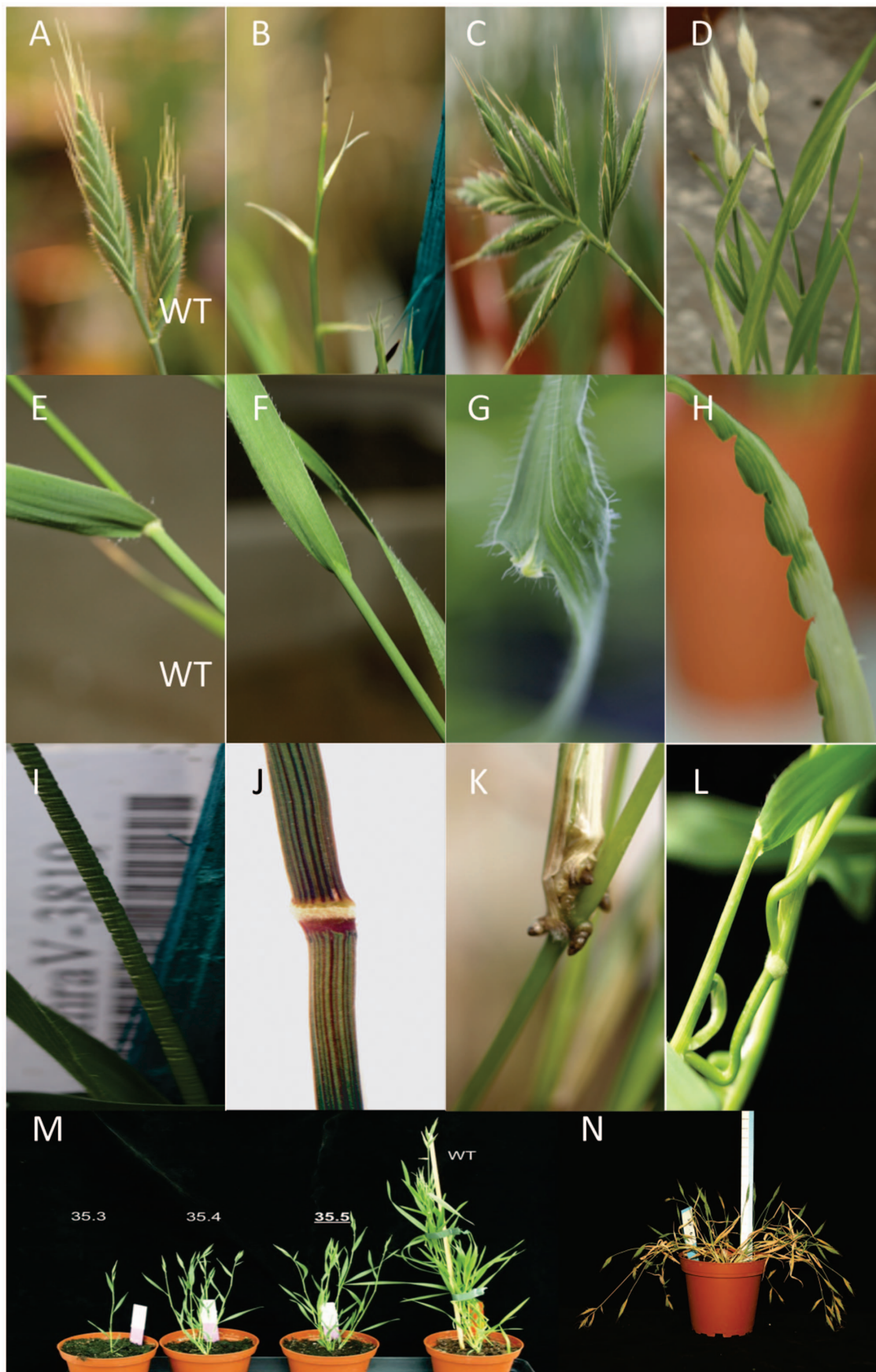


Figure 2. Examples of phenotypes detected in the *Brachypodium* mutant collection. A. Spikelets of wild-type plants. B–D Aborted or abnormal spikelets in mutants. E. Ligule of wild-type plant. F. Abnormal ligule in mutant. G, H. Mis-shaped leaves in mutants. I. Crumple stem in mutant. J. Coloured stem in mutant. K. adventitious roots in mutant. L. Curved stems in mutant. M. Segregant phenotype for tiller formation in M2 plants compared to WT (right). N. Floppy stems in mutant.
doi:10.1371/journal.pone.0065503.g002

<http://www.greenphylog.org>) and aligned with Clustalw2 (pairwise alignment) at (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Phylogenetic analysis was performed with TreeTop (http://www.genebee.msu.su/services/phree_reduced.html). Cluster algorithm was used and 100 bootstrap were done. Final construction of tree was made with TREX (Treeview Newick Viewer option) at <http://www.trex.uqam.ca/>. Bootstrap values are expressed in percentages and placed at nodes of the trees. The 3D-structure of the BdCOMT6 protein was predicted from the crystallized ryegrass enzyme [24] with the molecular modeling program Geno3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr/>) and UCSF Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

Lignin Analyses

All reagents and solvents were high-quality grade commercial reagents employed without further purification. Dried mature stems (3 month old) from wild-type (WT) plants or from azygous (mutagenized plants segregating the *WT* allele for the studied locus) or homozygous mutant plants were ground to 0.5 mm before exhaustive extraction with water, then ethanol in a Soxhlet apparatus. The lignin content was measured on the recovered extractive-free samples and by the Klason method [25]. Lignin structure was evaluated by thioacidolysis performed from 10 to 20 mg of extractive-free sample put together with 0.5 mg of C21 internal standard in 10 mL of reagent (dioxane/ethanethiol 9/1 V/V, containing 0.2 M BF₃ etherate) and incubated at 100°C for 4 h. After the reaction, the lignin-derived monomers were extracted with methylene chloride as previously described [26], the

combined organic extracts were concentrated to about 2 mL and then 4 µL of the sample were silylated by 100 µL BSTFA and 5 µL pyridine before injection onto a DB1 supelco capillary columns (carrier gas helium, constant flow rate 1 mL/min) operating from 40 to 180°C at +30°C/min, then 180 to 260°C at +2°C/min and combined with an ion trap mass spectrometer (Varian Saturn2100) operating in the electron impact mode (70 eV), with ions detected on the 50–600 m/z range. The surface area of the *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), syringyl (S) and 5-hydroxyguaiacyl (5-OH G) monomers were measured on specific ion chromatograms, at m/z 239, 269, 299, and 357 respectively.

Results and Discussion

Production of a Mutagenized Collection

When grown under long-day conditions in our greenhouses (18 h light, Figure 1A), the life cycle was about 12 weeks. Sodium azide (NaN₃) was used to mutagenize *B. distachyon* Bd21-3 seeds. This compound is commonly used for mutagenesis of grasses [15] and the frequency of chromosome breakage is relatively low. To establish a dose-response kill curve, we determined the fraction of M1 seeds that germinated after imbibition with increasing NaN₃ concentrations (Figure 1B). The lowest germination frequency was 28% for 10 mM NaN₃. The frequency of albino M2 seedlings (Figure 1C) and miniature/dwarf plants (Figure 1D) also showed a dose-dependent increase with for instance a maximum frequency of 3.3% and 1.3% albinos respectively for 10 mM and 3 mM NaN₃ (Figure 1D). We concluded that 3 mM and 10 mM NaN₃ provided a good compromise combining high mutation rate and

Table 1. Types of phenotypes observed on 565 phenotyped lines (3360 plants).

Major category	Phenotype sub-category ^a	Number of families affected	% of families affected
Dead	Not emerged or early death	340	
Plant development	Delay Plant development	87	15.4
Plantlet	Albino	20	3.5
Leaf	Size	129	22.8
	Color	121	21.4
	Appearance	125	22.1
	Shape and arrangements	9	1.6
Stem	Shape	112	19.8
	Color	19	3.3
Node	Shape	1	0.2
Spike	Flowering time	52	9.2
	Spike organisation	62	11
	Reproductive organs	15	2.6
	Spike color	62	11
Plant architecture	Architecture	394	69.7
	Height and appearance	146	25.8
	Tillers	70	12.4
	Branching type	47	8.3

^aphenotypes are available at <http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>.
doi:10.1371/journal.pone.0065503.t001

Table 2. Tilled genes and mutation frequency in the mutant collection with 5530 M2 families screened.

Target names	Accession number	Amplicon size (bp)	GC content (%)	Identified mutants	Mutation frequency
COMT	Bradi3g16530	1245	65	23	1/300 kb
Laccase	Bradi1g74320	2372	43	17	1/771 kb
Laccase	Bradi1g66720	2607	51	18	1/801 kb
4CL	Bradi3g05750	735	68	17	1/239 kb
C4H	Bradi2g31510	643	65	14	1/254 kb
C4H	Bradi2g53470	728	63	12	1/335 kb
C4H	Bradi3g43160	829	61	27	1/170 kb
TOTAL		9159	59	128	1/396 kb

doi:10.1371/journal.pone.0065503.t002

sufficient germination frequency. These concentrations were used to generate the mutagenized population of 5530 individual families.

Plant Phenotyping

The phenotypes (shape, color and size) of a subset of mutants were recorded, using an ontology developed for sorghum [27], at three developmental stages: Germination/seedling stage, vegetative stage (before flowering) and reproductive stage (after flowering). Phenotypes were organized in a phenotypic tree available at <http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>. Figure 2 and Table 1 illustrate the most striking phenotypes of greenhouse-grown mutants.

TILLING Genes Involved in Lignin Biosynthesis

B. distachyon is increasingly used as a model for bioenergy grasses [28,29]. Lignins are the main obstacle in the enzymatic conversion of cellulose into fermentable sugars. We therefore chose to screen the mutant collection for genes involved in lignin biosynthesis as a validation of the tilling method [29]. We focused on seven genes belonging to multigene families that are potentially involved in monolignol biosynthesis (Table 2): one caffeic acid *O*-methyltransferase gene (*Bradi3g16530*), two laccase genes (*Bradi1g74320*, *Bradi1g66720*), one 4-coumarate:coenzyme A ligase gene (*Bradi3g05750*) and three cytochrome P450 genes (*Bradi2g31510*, *Bradi2g53470*, *Bradi3g43160*).

We identified a total of 128 mutations. The nucleotide changes induced by NaN_3 are mainly G/A and C/T substitutions similar to those induced by ethyl methane sulfonate (EMS) for instance [30,31]. Only 9% other mutations were detected (Table 3). We identified 63% non-synonymous mutations (including 53% and 5% inducing amino acid changes or stop codons, respectively). One line showed a mutation in a splicing region. Extrapolating from this small set of genes, we calculated an average mutation rate of one in around 400 kb (Table 2) or 700 mutations per genome for a genome size of 272 Mb [2]. This frequency of induced mutations is similar to that found in EMS-mutagenized rice (1/294 kb, [23]) or in barley treated with NaN_3 (1/374 kb, [22]) or EMS (1/500 kb, [20]).

We also used our mutagenized population to estimate the 'Genetically Effective Cell Number (GECN)'. This is the number of cells within the shoot meristem of the embryo that will contribute to the seed output. The GECN is usually estimated by determining the proportion of mutant seedlings in M2 families [32,33]. We took advantage of our sequencing data on M2 families from individual M1 plants segregating mutations in 4 genes. In 584 lines from 30 different families (between 9 and 49 M2 independent lines were analyzed per family) we detected 38

unusual nucleic acid transitions. This is the number of cells within the shoot meristem of the embryo that will contribute to the seed output. The GECN is usually estimated by determining the proportion of mutant seedlings in M2 families [32,33]. We took advantage of our sequencing data on M2 families from individual M1 plants segregating mutations in 4 genes. In 584 lines from 30 different families (between 9 and 49 M2 independent lines were analyzed per family) we detected 38

Table 3. Frequencies of induced mutations types in tilled gene-coding regions.

	Accession number	Missense ^a	Nonsense ^b	Splicing ^c	Silent ^d	Unusual nucleic transition ^e
COMT	Bradi3g16530	13	0	0	10	0
Laccase	Bradi1g74320	8	3	0	6	0
Laccase	Bradi1g66720	8	0	1	5	3
4CL	Bradi3g05750	13	0	0	4	4
C4H	Bradi2g31510	10	1	0	3	1
C4H	Bradi2g53470	6	1	0	4	1
C4H	Bradi3g43160	13	1	0	13	2
TOTAL		71	6	1	45	11
TOTAL (%)		57.7	4.8	0.8	36.7	8.6

^anucleic acid transition is a non-synonymous mutation and induce amino acid change in the translated protein.

^bnucleic acid transition produces a stop codon and may induce a truncated protein.

^cnucleic acid transition is located in splicing motif.

^dnucleic acid transition induces a synonymous mutation and then no change in the translated protein.

^eother nucleic acid transition than guanine to adenine and cytosine to thymine.

doi:10.1371/journal.pone.0065503.t003

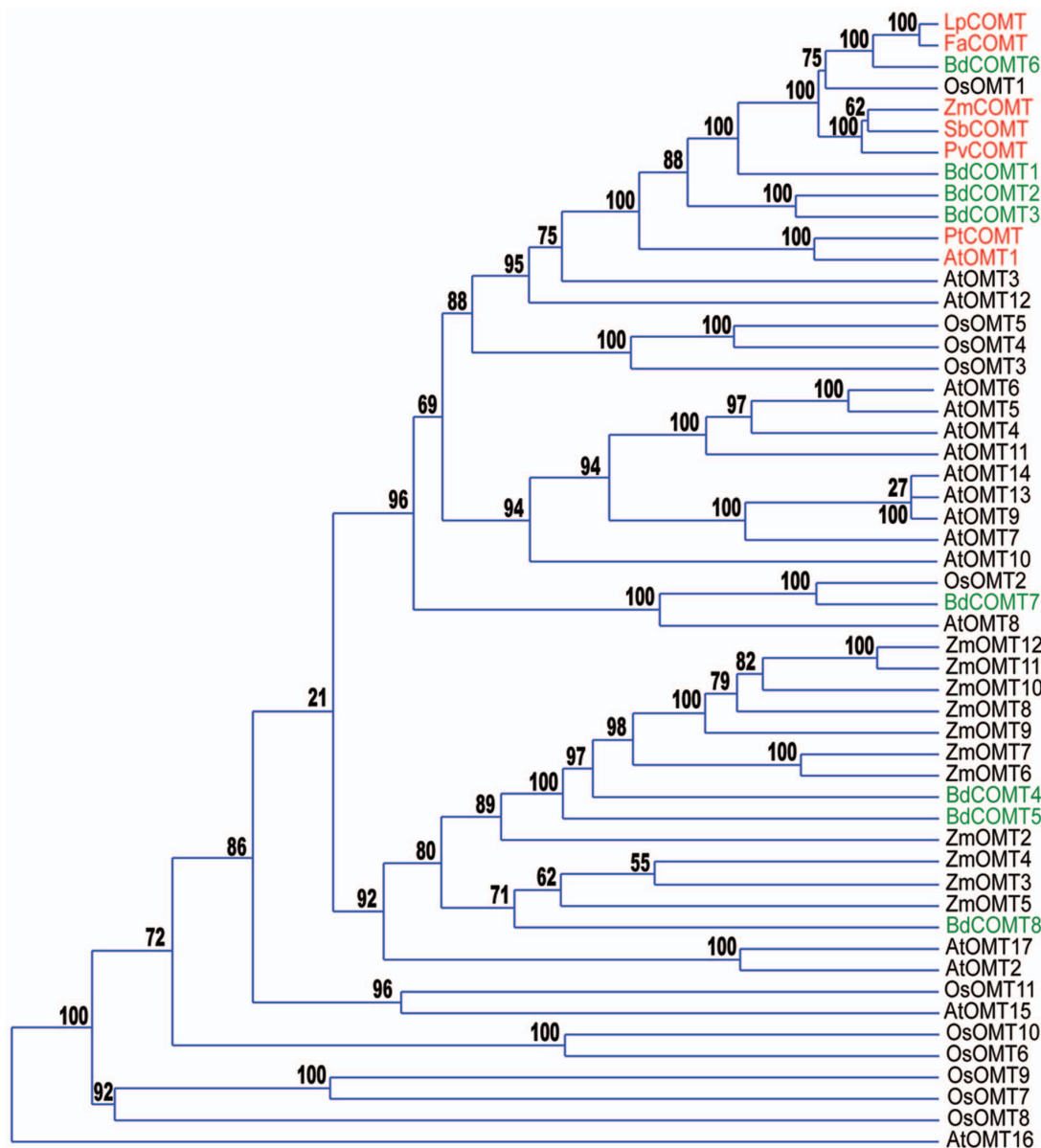


Figure 3. Phylogenetic analysis of putative COMT proteins. Phylogeny tree (phylogram) made with OMT proteins from *Brachypodium* (BdCOMT), rice (OsOMT), maize (ZmOMT) and *Arabidopsis* (AtOMT). The proteins known to be involved in lignification in ryegrass (LpCOMT), sorghum (SbCOMT), switchgrass (PvCOMT), fescue (FaCOMT) and poplar (PtCOMT) are included in the analysis and shown in red in the phylogram as well as *Arabidopsis* (AtOMT1) and Maize (ZmCOMT1) proteins. *Brachypodium* proteins (BdCOMT) are shown in green. Protein sequences are available in Information S1. Bootstrap values indicating the level of support for the displayed representation after re-sampling are shown on each node. doi:10.1371/journal.pone.0065503.g003

homozygous mutations corresponding to a ratio of 1:15.3 (= 38/584). The 1:15 ratio corresponds to a GECN of 4. This is higher than in *Arabidopsis* (GECN=2) but in accordance with the number found in other grass species [33,34].

Identification of a Caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) Gene Potentially Involved in Internode Lignification

B. distachyon lignins, like those in other grasses, are mainly composed of guaiacyl (G) and syringyl (S) units, with low amounts of *p*-hydroxyphenyl (H) units [35] [36]. These H, G and S lignin units respectively originate from the three monolignols, namely *p*-coumaryl, coniferyl, and sinapyl alcohols that differ only in the

degree of methoxylation of the phenolic ring [37]. The main role of the COMT involved in lignification is the methylation of 5-hydroxyconiferaldehyde to produce sinapaldehyde, which is reduced by another enzyme to sinapyl alcohol, the precursor of S lignin units. The COMT enzyme belongs to the S-Adenosyl methionine (SAM)-dependent *O*-methyltransferases. It is active as a homodimer and does not need any metal ion as cofactor. The hallmark of transgenic or mutant angiosperms with strongly repressed COMT activity is a reduction of the amount of S lignin units (or of the S/G ratio) together with the appearance of easily detectable amounts of 5-hydroxyguaiacyl (5-OH G), which is present only in trace amounts in the WT [38] [39,40,41,42]. Another trait of some COMT-mutant grass lines, referred to as the brown-midrib mutants, is a lower lignin level resulting in a higher

Table 4. Allelic series of mutations in *BdCOMT6* gene identified by TILLING.

Nucleic acid transition ^a	Amino acid substitution ^b	SIFT ^c	Family name
G37A	Asp13Asn	0.18	5645
G117A	Leu39Leu	–	5714
C498T	Asp166Asp	–	5588
G588A	Glu196Glu	–	8240
C600T	Tyr200Tyr	–	5827
G616A	Gly206Ser	0.01	6840
G638A	Gly213Asp	0.26	3380
G638A	Gly213Asp	0.26	211
G672A	Gly224Gly	–	3725
G708A	Gly236Gly	–	5338
G721A	Gly241Arg	0.02	4688
G737A	Gly246Asp	0	4604
G737A	Gly246Asp	0	7480
C762T	Pro254Pro	–	5115
G767A	Gly256Asp	0	5139
G767A	Gly256Asp	0	7549
C840T	Cys280Cys	–	5348
C854T	Pro285Lys	0.02	7391
G969A	Gly323Gly	–	3730
G976A	Glu326Lys	0	4142
G1013A	Glu338Asp	0.14	5200
G1063A	Ala355Thr	0.01	4927
G1071A	Glu357Glu	–	185

^aPosition of transition in mutants are relative to the starting ATG on the coding sequence.

^bPosition of substitution in mutants are relative to the starting methionine of the encoded protein.

^cNumbers are predictive score from the SIFT software (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

doi:10.1371/journal.pone.0065503.t004

enzymatic degradability [43], and reduced levels of *p*-coumaric acid (CA) ester-linked to the cell walls [44].

To unambiguously identify the *B. distachyon* COMT gene specifically involved in lignification, protein sequences of orthologs in several species were BLASTed onto the *B. distachyon* predicted proteome sequence. Eight proteins were identified: BdCOMT1 (Bradi1g14870), BdCOMT2 (Bradi2g02380), BdCOMT3 (Bradi2g02390), BdCOMT4 (Bradi2g19830), BdCOMT5 (Bradi2g19850), BdCOMT6 (Bradi3g16530), BdCOMT7 (Bradi3g55890), BdCOMT8 (Bradi4g20020). We performed a phylogenetic analysis with the most exhaustive list of encoded OMT proteins found in *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* genomes [45,46,47] (Figure 3, Information S1). In addition, we added to the phylogenetic analysis the protein sequences for which biological data (transgenics or mutants) support indisputably a role of the corresponding protein in lignification of several grass (maize, ryegrass, tall fescue, switchgrass, sorghum) and poplar [24,39,42,48,49,50,51]. AtOMT1 was clearly identified by our group as a unique gene involved in sinapyl alcohol biosynthesis in Arabidopsis since the knockout mutant displays a lignin devoid of S units [52]. Therefore, AtOMT1 is a reference model for dicot COMT proteins as well as maize ZmCOMT1 (BM3) is a reference for grasses [49]. The phylogenetic analysis shows that

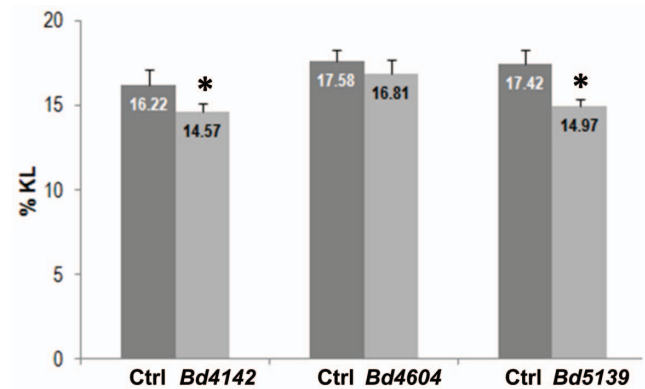


Figure 4. Klason lignin (KL) level of extractive-free mature stems of *Bd4142*, *Bd4604* and *Bd5139* lines as compared to control samples. Control samples are either wild-type (*Bd21-3*) or azygous plants grown together with the corresponding mutants. The KL level is expressed as weight percentage of the extractive-free sample. Data are means and SD from 4 or 5 plants analyzed per line. Asterisks indicate significant difference compared to the control (ANOVA value at $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0065503.g004

both dicot proteins (AtOMT1, PtOMT) cluster together whereas four members of BdCOMTs (BdCOMT3, BdCOMT2, BdCOMT1 and BdCOMT6) are grouped with the genuine grass COMT proteins, BdCOMT6 being the closest ortholog (figure 3). Consequently, *BdCOMT6* was chosen for TILLING. It is worth noting, that despite no *comt* mutant was identified in rice to our knowledge this analysis suggests strongly that OsOMT1 (Os08g06100) is involved in monolignol formation.

Mutations in *BdCOMT6* Affect the Lignification of Mature Stems

We identified 25 lines, corresponding to 22 different mutations, among which eleven missense mutations cause changes in the BdCOMT6 amino acid sequence (Table 4). No induced stop codon mutation were identified. A first analysis using the SIFT software (using 0.05 as significant threshold) indicated that the substitutions caused by the mutations in lines *Bd6840*, *Bd4688*, *Bd4604*, *Bd7480*, *Bd5139*, *Bd7549*, *Bd7391*, *Bd4142* and *Bd4927* may partially or totally disrupt the COMT activity. Among them, mutations in lines *Bd5139* and *Bd7549* were found redundant, as well as those in lines *Bd7480* and *Bd4604*, thereby reducing the number of mutations potentially affecting COMT activity to seven.

We next isolated homozygous lines for the all *comt* mutants, except for *Bd7480*. Indeed, this line failed to produce viable seeds at heterozygous stage. All genotyped plants were indistinguishable from WT plants when grown in the greenhouse except for homozygous *Bd211*, which was dwarfed. The dwarfism presumably is independent from the mutated COMT allele since *Bd3380*, which carries the same mutations was not dwarfed (Table 4). We therefore excluded *Bd211* from the subsequent analyses. We next studied the lignin composition in mature stems using thioacidolysis (reviewed in [53]). Thioacidolysis identifies H, G and S thioethylated monomers from arylglycerol- β -ether-linked H, G and S units. In addition, it allows the identification of 5-OH G monomers as observed in maize *bm3* mutants [54]. Among the various mutants analyzed (data not shown), three lines (*Bd4142*, *Bd4604*, and *Bd5139*), released 5-OH G thioacidolysis monomers in higher amounts, compared to the trace amounts detected in the control lines (Table 5). Together with the increased frequency of 5-

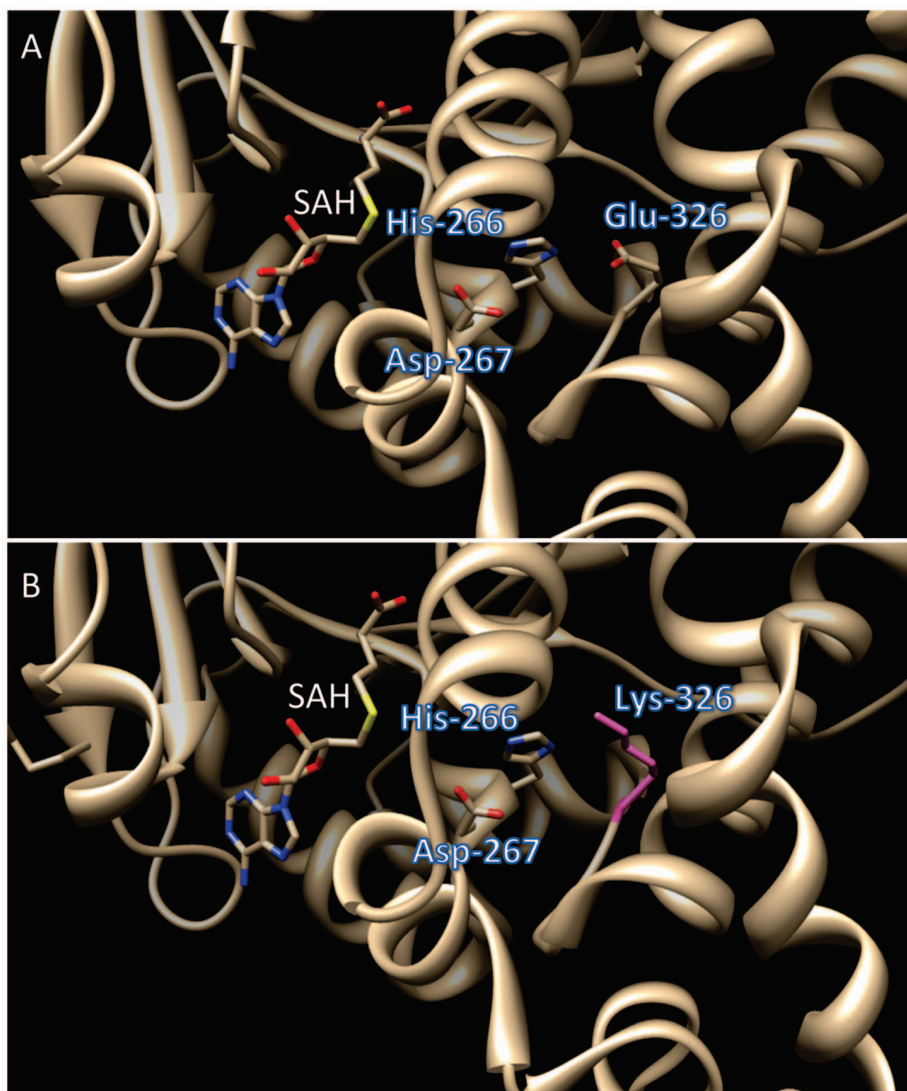
Table 5. Relative frequency (% molar) of *p*-hydroxyphenyl H, guaiacyl G, syringyl S and 5-hydroxyguaiacyl 5-OH G monomers released by thioacidolysis of mature and extractive-free stems from control (Ctrl) and mutant *Bd4142*, *Bd4604*, *Bd5139* lines.

Culture	Sample (n ^a)	% H	% G	% S	% 5-OH G	S/G molar ratio
1	Azygous Control (4)	5.9 (0.3)	37.9 (1.9)	55.7 (1.0)	0.5 (0.0)	1.47 (0.15)
	<i>Bd4142</i> (4)	6.2 (0.5)	46.5 (3.1)*	45.3 (3.3)*	2.0 (0.3)*	0.98 (0.14)*
2	Wild-type Control (2)	3.5 (0.3)	30.8 (2.3)	65.4 (2.7)	0.2 (0.0)	2.14 (0.25)
	<i>Bd4604</i> (2)	3.2 (0.0)	38.4 (0.3)*	55.1 (3.3)*	3.3 (0.3)*	1.44 (0.02)*
3	Wild-type Control (5)	3.5 (0.5)	31.4 (2.0)	64.8 (2.4)	0.3 (0.1)	2.08 (0.22)
	<i>Bd5139</i> (5)	4.0 (0.6)	42.4 (0.4)*	49.5 (1.4)*	4.1 (1.5)*	1.17 (0.04)*

Ctrl (azygous line for *Bd4142* and wild-type line for *Bd4604* and *Bd5139*) and corresponding mutant samples were recovered from plants grown together and in identical conditions.

^anumber of replicates. The data represent the means and SD (between brackets). Asterisks indicate significant differences compared to the corresponding Ctrl (ANOVA, value at $P < 0.01$).

doi:10.1371/journal.pone.0065503.t005

**Figure 5. Structural representation of the amino acid substitution of BdCOMT6 protein in the line *Bd4142*.** A. 3-D model of wild-type protein highlighting three amino acids important for proper enzymatic activities. B. 3-D model of the protein in *Bd4142* line in which Glu-326 is substituted by Lys-326. SAH, S-Adenosyl-L-homocysteine is shown to illustrate the proximity of the substituted amino acid in the substrat binding pocket.

doi:10.1371/journal.pone.0065503.g005

OH G thioacidolysis monomers, we found that S monomer levels were substantially reduced (by 30 to 40% of the control value). In contrast, H monomers were obtained as minor components (3–6% range) and no substantial difference between mutants and controls was detected. Based on the S levels or S/G thioacidolysis ratio suggests, we hypothesize that COMT activity is lower in *Bd5139* and *Bd4142* compared to *Bd4604*. This hypothesis was further supported by the lignin level of the extractive-free stems as measured by the Klason method. Compared to the corresponding control, this level was reduced by 15%, 10% and 0% in *Bd5139*, *Bd4142* and *Bd4604* respectively (Figure 4).

To further investigate how amino acid substitutions may affect BdCOMT6 activity, we used the 3-D structure, determined for the closely related (90% amino acid sequence identity) *Lolium perenne* OMT, LpOMT [24] to compare WT with mutant proteins. Both COMT enzymes belong to the plant type-1 family of SAM-dependent *O*-methyltransferases, have 360 amino acid residues and possess an auxiliary N-terminal domain that may functions in homodimerization [55,24]. The *Bd4142* mutation induces a Glu-326-Lys substitution (Figure 5). Glu-326 is thought to be one of the catalytic bases that activate the hydroxyl group of the substrate/ligand [24], whereby Glu-326 provides the hydrogen bond acceptor in an interaction with the His-266 and contributes indirectly to the deprotonation of the phenolic substrate [24]. The Glu-326-Lys substitution, inverts the charge of the amino acid and therefore is expected to alter proper protein activity and explain the severe reduction of S units detected in this line (Table 5).

The substitution observed in lines *Bd5139* and *Bd7549* is a glycine to aspartic acid at position 256, which is part of a loop facing a β -sheet carrying an amino acid involved in the substrate binding. It is worth noting that two residues (Phe-250 and Asp-248) in the vicinity of Gly-256 are also placed in this loop and are essential for stabilisation of the ligand (SAM/SAH). We speculate that the size and the charge modifications in this mutant could impact the β -sheet and destabilize the SAM binding site, disturbing its function as methyl donor and in consequence reduce the activity of the protein.

Finally, *Bd4604* carries a Gly-246-Asp substitution. This residue is located at the periphery of the protein but still in the SAM/SAH binding domain and adjacent to a α -helical layer and a β -sheet both involved in SAM/SAH binding site conformation. The lateral chain of the aspartic acid in the mutant may turn towards residues involved in the binding of the cofactor. The size and charge differences may modify this site thus hampering the binding of SAH and the activity of the protein.

References

- Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, et al. (2011) *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiol* 157: 3–13.
- Initiative TIB (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768.
- Akhunov E, Sehgal S, Liang H, Wang S, Akhunova A, et al. (2012) Comparative analysis of syntenic genes in grass genomes reveals accelerated rates of gene structure and coding sequence evolution in polyploid wheat. *Plant Physiology*.
- Mayer KF, Martis M, Hedley PE, Simkova H, Liu H, et al. (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant Cell* 23: 1249–1263.
- Murat F, Xu JH, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, et al. (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome research* 20: 1545–1557.
- Pácurar DI, Thordal-Christensen H, Nielsen KK, Lenk I (2007) A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Research* 17: 965–975.
- Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Alves SC, et al. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal* 6: 236–245.
- Vogel J, Hill T (2008) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21–3. *Plant Cell Reports* 27: 471–478.
- Thole V, Alves SC, Worland B, Bevan MW, Vain P (2009) A protocol for efficiently retrieving and characterizing flanking sequence tags (FSTs) in *Brachypodium distachyon* T-DNA insertional mutants. *Nature protocols* 4: 650–661.
- Thole V, Worland B, Wright J, Bevan MW, Vain P (2010) Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Plant biotechnology journal* 8: 734–747.
- Bragg JN, Wu J, Gordon SP, Guttman ME, Thilmony R, et al. (2012) Generation and Characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA Insertional Mutant Collection. *PLoS ONE* 7: e41916.
- Henikoff S, Till BJ, Comai L (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiology* 135: 630–636.
- Wang TL, Uauy C, Robson F, Till B (2012) TILLING in extremis. *Plant biotechnology journal* 10: 761–772.
- Chawade A, Sikora P, Brautigam M, Larsson M, Vivekanand V, et al. (2010) Development and characterization of an oat TILLING-population and

In conclusion, the three mutant lines that have an altered lignin content and/or composition share at least a mutation located in the vicinity of the SAM/SAH binding and catalytic domain. It is worth noting that the three COMT mutants do not show coloured leaf veins as observed in the brown-midrib mutants of maize, pearl millet or sorghum [56]. In addition, the levels of S units is still high in the mutants (as revealed by the 45 to 55% of S thioacidolysis monomers). This result suggests that enzymatic methoxylation at C5 of the phenolic ring of monolignol is still present in these lines. It remains to be shown whether it is due to residual enzymatic activity of the mutated proteins as shown in a similar allelic series in sorghum [57]. Finally, no grass COMT-deficient mutants or transgenic lines described so far are completely devoid of S units, in contrast to what has been reported in dicots, for example in the *Arabidopsis Atcomt1* mutant [52]. This observation suggests that an alternative pathway may produce S units in grasses.

Conclusion

We have generated a large collection of chemically-induced mutants useful for forward genetics in *B. distachyon*. A subset of the phenotypes can be consulted at <http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>. In addition, BRACHYTIL provides and efficient platform for reverse genetics. This study illustrates the power of this approach by the isolation of an allelic series for BdCOMT6 involved in monolignol biosynthesis. Next generation sequencing techniques will now greatly accelerate reverse genetics approaches in this collection.

Supporting Information

Information S1 Amino acid sequences of putative COMT proteins used for phylogenetic analysis in Figure 3.
(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to Wannes Woorend and Alexia Guillebaux for help with the TILLING of the 4CL and the COMT genes respectively. We thank Pierre Hilson for reading the manuscript and providing useful comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RS AB LJ HH. Performed the experiments: MD OD SHYK YW MBY SA LC FL EB NO CT. Analyzed the data: RS MD. Contributed reagents/materials/analysis tools: VB. Wrote the paper: RS CL HH.

- identification of mutations in lignin and beta-glucan biosynthesis genes. *BMC Plant Biology* 10: (12 May 2010).
15. Kurowska M, Daszkowska-Golec A, Gruszka D, Marzec M, Szurman M, et al. (2011) TILLING - a shortcut in functional genomics. *J Appl Genet* 52: 371–390.
 16. Slade AJ, Knauf VC (2005) TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement. *Transgenic Research* 14: 109–115.
 17. Slade AJ, McGuire C, Loeffler D, Mullenberg J, Skinner W, et al. (2012) Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biology* 12: 69.
 18. Rawat N, Schgal SK, Joshi A, Rothe N, Wilson DL, et al. (2012) A diploid wheat TILLING resource for wheat functional genomics. *BMC Plant Biology* 12: 205.
 19. Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, et al. (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology* 4: 12.
 20. Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, Lundqvist U, Stein N (2009) TILLING in the two-rowed barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC research notes* 2: 258.
 21. Weil CF (2009) TILLING in grass species. *Plant physiology* 149: 158–164.
 22. Talame V, Bovina R, Sanguineti MC, Tuberosa R, Lundqvist U, et al. (2008) TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnology Journal* 6: 477–485.
 23. Till BJ, Cooper J, Tai TH, Colowit P, Greene EA, et al. (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology* 7: 19.
 24. Louie GV, Bowman ME, Tu Y, Mouradov A, Spangenberg G, et al. (2010) Structure-function analyses of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference. *The Plant Cell* 22: 4114–4127.
 25. Dence CW (1992) The determination of lignin. In: Lin S, Y, Dence CW, editors. *Methods in Lignin Chemistry*: Springer-Verlag. 33–61.
 26. Lapierre C, Pollet B, Rolando C (1995) New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates* 21: 397–412.
 27. Xin Z, Wang ML, Barkley NA, Burow G, Franks C, et al. (2008) Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biology* 8: 103.
 28. Lee S, Warnick T, Pattathil S, Alvelo-Maurosa J, Scrapiglia M, et al. (2012) Biological conversion assay using *Clostridium* phytofermentans to estimate plant feedstock quality. *Biotechnology for Biofuels* 5: 5.
 29. Bouvier d'Yvoire M, Bouchabke-Coussa O, Voorend W, Antelme S, Cezard L, et al. (2013) Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (*BdCAD1*) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*. *Plant J*. 73: 496–508.
 30. Till BJ, Colbert T, Tompa R, Enns LC, Codomo CA, et al. (2003) High-throughput TILLING for functional genomics. *Methods in molecular biology* 236: 205–220.
 31. Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, et al. (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome research* 13: 524–530.
 32. Bretagne-Sagnard B FG, Chupeau Y (1996) Induced albina mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum*). *Journal of Experimental Botany* 47: 189–194.
 33. Page DR, Grossniklaus U (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature reviews Genetics* 3: 124–136.
 34. Gady AL, Hermans FW, Van de Wal MH, van Loo EN, Visser RG, et al. (2009) Implementation of two high through-put techniques in a novel application: detecting point mutations in large EMS mutated plant populations. *Plant Methods* 5: 13.
 35. Lapierre C (1993) Applications of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, editors. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: American Society of Agronomy Inc. 133–163.
 36. Barriere Y RC, Méchin V, Maltese S, Pichon M, Cardinal A, et al. (2007) Genetics and genomics of lignification in grass cell walls based on maize as model species. *Genes, Genomes and Genomics*: 133–156.
 37. Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519–546.
 38. Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, et al. (2003) A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Molecular Biology* 51: 973–989.
 39. Jung JH, Xiong Y, Kim JY, Fouad W, Vermerris W, et al. (2011) RNA Interference Suppresses Lignin Biosynthetic Genes Caffeic Acid 3-O-methyltransferase (COMT) and/or 4-Coumarate-CoA Ligase (4CL) in Sugarcane. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 47: S36–S36.
 40. Robert D, Piersantelli D, Jouanin L, Ferret V, Pollet B, et al. (2000) Effects of CAD and COMT down-regulation on poplar tree lignin revealed by NMR spectroscopy. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 219: U270–U270.
 41. Ralph J, Lu F, Marita J, Hatfield R, Lapierre C, et al. 5-Hydroxyconiferyl alcohol as a monolignol in COMT-deficient angiosperms.; 2001 June 11–14 2001.; Nice, France. 27–30.
 42. Chen L, Auh C-K, Dowling P, Bell J, Lehmann D, et al. (2004) Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biology* 31: 235–245.
 43. Sattler SE, Funnell-Harris DL, Pedersen JF (2010) Brown midrib mutations and their importance to the utilization of maize, sorghum, and pearl millet lignocellulosic tissues. *Plant Science* 178: 229–238.
 44. Marita JM, Vermerris W, Ralph J, Hatfield RD (2003) Variations in the cell wall composition of maize brown midrib mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1313–1321.
 45. Kim BG, Kim DH, Hur HG, Lim J, Lim Y, et al. (2005) O-Methyltransferases from *Arabidopsis thaliana*. *Agric Chem Biotechnol* 48(3): 113–119.
 46. Courtial A, Soler M, Chateigner-Boutin AL, Reymond M, Méchin V., et al. Breeding grasses for capacity to biofuel production or silage feeding value: an updated list of genes involved in maize secondary cell wall biosynthesis and assembly. *Maydica* (in press).
 47. Hamberger B, Ellis M, Friedmann M, Souza CDA, Barbazuk B, et al. (2007) Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 85: 1182–1201.
 48. Oliver AL, Pedersen JF, Grant RJ, Klopfenstein TJ (2005) Comparative Effects of the Sorghum *bmr-6* and *bmr-12* Genes: I. Forage Sorghum Yield and Quality. *Crop Sci* 45: 2234–2239.
 49. Vignols F, Rigau J, Torres MA, Capellades M, Puigdomenech P (1995) The brown midrib3 (*bm3*) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7: 407–416.
 50. Grand C, Parmentier P, Boudet A, Boudet AM (1985) Comparison of Lignins and of Enzymes Involved in Lignification in Normal and Brown Midrib (*Bm3*) Mutant Corn Seedlings. *Physiologie Vegetale* 23: 905–911.
 51. Tschaplinski TJ, Standaert RF, Engle NL, Martin MZ, Sangha AK, et al. (2012) Down-regulation of the caffeic acid O-methyltransferase gene in switchgrass reveals a novel monolignol analog. *Biotechnology for biofuels* 5: 71.
 52. Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, et al. (2003) A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol Biol* 51: 973–989.
 53. Lapierre C (2010) Determining lignin structure by chemical degradations. In: Heitner C, Dimmel D, Schmidt JA, editors. *Lignin and lignans - Advances in Chemistry*. Boca Raton, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group. 11–48.
 54. Lapierre C, Toller MT, Monties B (1988) Occurrence of additional monomeric units in the lignins from internodes of a brown-midrib mutant of maize *bm3*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, III (Sciences de la Vie)* 307: 723–728.
 55. Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, et al. (2003) Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *The Plant Cell* 15: 1704–1716.
 56. Harrington MJ, Mutwil M, Barriere Y, Sibout R (2012) Chapter 3 - Molecular Biology of Lignification in Grasses. In: Lise J, Catherine L, editors. *Advances in Botanical Research: Academic Press*. 77–112.
 57. Sattler S, Palmer N, Saballos A, Greene A, Xin Z, et al. (2012) Identification and Characterization of Four Missense Mutations in Brown midrib 12 (*Bmr12*), the Caffeic O-Methyltransferase (COMT) of Sorghum. *BioEnergy Research* 5: 855–865.

1 **Mutation in Brachypodium caffeic acid O-methyl**
2 **transferase 6 alters stem and grain lignins and improves**
3 **straw saccharification without deteriorating grain quality.**

4 Séverine Ho-Yue-Kuang^{1,2}, Camille Alvarado¹, Sébastien Antelme², Brigitte
5 Bouchet¹, Laurent Cézard², Philippe Le Bris², Frédéric Legée², Alessandra Maia-
6 Grondard², Arata Yoshinaga³, Luc Saulnier¹, Fabienne Guillon¹, Richard Sibout²,
7 Catherine Lapierre² and Anne-Laure Chateigner-Boutin¹.

8

9 **Institutions :**

10 1-INRA-UR1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, F-44316 Nantes, France

11 2-INRA-UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, F-78026 Versailles, France

12 3-Laboratory of Tree Cell Biology, Division of Forest and Biomaterials Science,
13 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502,
14 Japan

15 **Email** : severine.hyk@gmail.com; camille.alvarado@nantes.inra.fr;
16 sebastien.antelme@versailles.inra.fr; brigitte.bouchet@nantes.inra.fr;
17 laurent.cezard@versailles.inra.fr; philippe.le-bris@versailles.inra.fr;
18 frederic.legee@versailles.inra.fr; alessandra.maia-grondard@versailles.inra.fr;
19 aryosshy@kais.kyoto-u.ac.jp; luc.saulnier@nantes.inra.fr;
20 fabienne.guillon@nantes.inra.fr; catherine.lapierre@versailles.inra.fr;
21 richard.sibout@versailles.inra.fr; anne-laure.chateigner-boutin@nantes.inra.fr

22 **Corresponding author** : ALCB; INRA-UR1268 Biopolymères, Interactions,
23 Assemblages, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 03 France. Phone : 33 2 40 67 50 59
24 Fax

25 **Total word counts:** 9662

26 **Date of submission** : 28/08/2015

27 **Number of figures:** 3

28 **Figures in color:** Fig. 1, 2, and 3

29 **Supplementary materials** : 3 supplementary tables and 5 supplementary figures

30 **Short running title:** Altered lignification in stem and grain of Brachypodium *COMT*
31 mutant

1 **Highlights:** First evaluation of lignification in *Brachypodium distachyon* grain.
2 Moderately down-regulated BdCOMT6 alters grain and stem lignification, which
3 improves stem saccharification without major detrimental effect on grain
4 development and composition.

5

1 **Abstract**

2 Cereal crops by-products are a promising source of renewable raw material for the
3 production of biofuel from lignocellulose. However, their enzymatic conversion to
4 fermentable sugars is detrimentally affected by lignins. Here we report on the
5 characterization of the *Brachypodium Bd5139* mutant provided with a single
6 nucleotide mutation in the caffeic acid *O*-methyl transferase *BdCOMT6* gene. This
7 *BdCOMT6*-deficient mutant displayed a moderately altered lignification in mature
8 stems. The lignin-related *BdCOMT6* gene was also found to be expressed in grains
9 and the alterations of *Bd5139* grain lignins were found to nicely mirror those
10 evidenced in stem lignins. The *Bd5139* grains displayed similar size and composition
11 as the control. Complementation experiments carried out by introducing the mutated
12 gene into the *AtCOMT1*-deficient *Arabidopsis* mutant demonstrated that the mutated
13 *BdCOMT6* protein was still functional. Such a moderate down-regulation of lignin-
14 related COMT enzyme reduced the straw recalcitrance to saccharification, without
15 compromising the vegetative or reproductive development of the plant.

16 **Keywords :** *Brachypodium distachyon*, COMT, ferulic acid, grains, *para*-coumaric
17 acid, lignins, straw saccharification

18 **Abbreviations :** ABL, Acetyl bromide lignin; AIR, alcohol insoluble residue; Ara,
19 arabinose; Bd, *Brachypodium distachyon*; COMT, caffeic acid *O*-methyl transferase;
20 CWR, cell wall residue; DAF, days after flowering; DAG, days after germination;
21 CA, *p*-coumaric acid; FA, ferulic acid; G, guaiacyl; H, *p*-hydroxyphenyl; KL, Klason
22 lignin; S, syringyl; 5-OH G, 5-hydroxyguaiacyl.

23

24 **Introduction**

25 Grass lignocellulosics are important potential feedstocks for the production of
26 cellulosic ethanol. Cereal by-products, such as wheat straw or corn stover, and
27 dedicated-energy grass crops, such as miscanthus or switchgrass, are mainly
28 composed of cellulose, hemicellulose and lignins. However, their enzymatic
29 saccharification into fermentable sugars is detrimentally affected by lignins and their
30 cross-linking to wall carbohydrates. Indeed, lignins limit the accessibility of enzymes
31 to polysaccharides and make necessary the use of costly pretreatments aimed at

1 improving this accessibility (Yang and Wyman, 2008). Lignins are currently the
2 target of biotechnology with the objective to design plant cell walls more amenable
3 to the saccharification process. Lignin genetic engineering is still more challenging
4 for grass lignins due to the specificities of lignified grass cell walls. While grass
5 lignins are made of guaiacyl (G) and syringyl (S) units together with a lesser amount
6 of *p*-hydroxyphenyl (H) units, like any other angiosperm lignins, their major
7 peculiarity is that *p*-coumaric acid (CA) and ferulic acid (FA) substantially
8 participate to their assembly in the cell wall (Ralph, 2010). FA acylates the arabinose
9 substituents of arabinoxylans and grass lignins are oxidatively cross-linked to these
10 ferulate esters (Jacquet *et al.*, 1995). CA acylates mainly S lignin units (Ralph, 2010)
11 and to a lower extent arabinose units (Mueller-Harvey *et al.*, 1986). Designing grass
12 cell walls more amenable to bioethanol production requires to use appropriate model
13 plants provided with the unique specificities of grass lignins. So is *Brachypodium*
14 *distachyon*, a plant species whose genomic sequence is released for the Bd21
15 accession (IBI, 2010) and which has recently been championed as a model grass to
16 identify genes important for cereals and energy grasses (Draper *et al.*, 2001; Vogel *et*
17 *al.*, 2006; Opanowicz *et al.*, 2008; Bevan *et al.*, 2010; Brkljacic *et al.*, 2011; Mur *et*
18 *al.*, 2011; Rancour *et al.*, 2012). In the challenging context of designing grass cell
19 walls with improved end-uses properties, a *Brachypodium distachyon*
20 (*Brachypodium*) mutant collection associated with a TILLING (Targeting Induced
21 Local Lesion IN Genome) platform has been recently developed (Dalmais *et al.*,
22 2013). Using these tools, several *Brachypodium* mutants affected in a lignin-related
23 caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) activity were identified (Dalmais *et al.*,
24 2013).

25 In this paper, we focused our investigation on the *Bd5139* line displaying a single
26 point mutation in the *BdCOMT6* gene to demonstrate that this lignin-related gene (or
27 its homologues in other grasses) is a promising target for lignin genetic engineering.
28 The prospect of a sustainable use of cereal crops will rely on breeding programs to
29 improve by-products potential for bioethanol production while preserving grain
30 quality. We report on the impact of the *Bd5139* mutation on the cell wall phenolics
31 occurring not only in *Brachypodium* lignified stems, the most conventionally studied
32 organ in lignin-deficient mutants or transgenics, but also in *Brachypodium* grains.
33 This grain study was performed from the statement that lignins, CA and FA may

1 have important roles in the conductive and protective tissues of grass grains
2 (Beaugrand *et al.*, 2004; Barron *et al.*, 2007). It was therefore important to evaluate
3 the impact of the lignin-targeted mutation not only on stems, but also on seeds. We
4 demonstrate that this single mutation substantially affects the cell wall phenolics of
5 both stems and grains and improves the saccharification of *Brachypodium* mature
6 stems without impairing grain development and composition.

7 **Material and methods**

8 *Plant material and growth conditions*

9 The *Bd5139* mutant line mutated in the *BdCOMT6* gene was selected from a
10 *Brachypodium* mutant collection as previously described (Dalmais *et al.*, 2013).
11 *Brachypodium distachyon* L. Beauv. inbred line Bd21-3 was used as control plants.
12 *Brachypodium* plants were grown in one-liter soil pots in the greenhouse or growth
13 chambers (18 h light at 23°C, then 6 h dark at 18°C photoperiod; 60% relative
14 humidity). Stems were harvested at 40 days after germination (DAG), 60 DAG or 90
15 DAG (dried plants). Grains were harvested in batch from at least 30 plants grown in
16 a growth chamber at 11, 21 and 31 days after flowering (DAF) or from dried plants.

17 The *Arabidopsis comt-1* mutant (SALK_002373 line, Alonso *et al.*, 2003) with a T-
18 DNA insertion in AT5G54160 was used for complementation experiments.
19 *Arabidopsis* transformants were selected on Murashige and Skoog medium (MS)
20 with hygromycin 100 µM. For soluble phenolic compound analyses, seeds were
21 sown on the same medium without hygromycin. After 4 days at 4°C, seeds were
22 transferred in continuous light conditions at 21°C with a light intensity of 110 mE.m⁻².s⁻¹
23 (cool-white fluorescent tungsten tubes; OSRAM). For the analyses of soluble
24 phenolics, some plantlets were harvested at 5 DAG, weighted and immediately
25 dropped into methanol-water mixture (80/20, v/v). The methanol suspensions were
26 then stored at -80°C before analyses. Inflorescence stems were harvested at full
27 maturity.

28 *Cloning of the BdCOMT6 coding sequence and mutagenesis*

29 Stems from 60 DAG Bd21-3 plants were snap-frozen and grinded in liquid nitrogen.
30 Total RNA was extracted using the EZ-10 Total RNA Miniprep Kit (Bio Basic).

1 Contaminant DNA was removed using RNase-free DNase set (Qiagen) and DNA-
2 free RNA was concentrated using the RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)
3 following manufacturer's instructions. RNA (0.25 µg) was reverse transcribed using
4 the Transcriptor First strand cDNA Synthesis kit (Roche) with random hexamers in a
5 20 µl reaction volume.

6 The wild-type *BdCOMT6* (Bradi3g16530) full length coding sequence was amplified
7 from 1.5 µl of cDNA in a total of 25 µl with the primers BdCOMT6Attb1_ATG
8 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTTCACGGCGGC
9 GGACAT3' and BdCOMT6Attb2_stop
10 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACTTGGTGAACCTCGATG
11 GCCC3' using the KOD Hot Start DNA polymerase (Novagen) and cloned into the
12 vector pDONR207 using the Gateway© technology (Life Technology). The
13 QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) was used to introduce the
14 G767A point mutation corresponding to the mutation in the *Bd5139* line following
15 manufacturer's instructions and using the primers BdCOMT6mut_fw
16 5'CCAGAAGGTCCCCTCGGACGATGCCATCC3' and BdCOMT6mut_rev
17 5'GGATGGCATCGTCCGAGGGGACCTTCTGG3'. The mutated *BdCOMT6* gene
18 (*BdCOMT6*⁵¹³⁹) was transferred into the pIPKb2 vector containing the maize
19 ubiquitin promoter (Himmelbach *et al.*, 2007). The recombined plasmid was checked
20 by sequencing.

21 *Genetic complementation of AtCOMT1-deficient Arabidopsis mutant with the* 22 *mutated BdCOMT6 gene*

23 The T-DNA-insertion *comt-1* mutant available from the SALK collection
24 (SALK_002373) and in the Columbia Col-0 background was used for
25 complementation assays with the *BdCOMT6*⁵¹³⁹ gene according to a previously
26 published procedure (Bouvier d'Yvoire *et al.*, 2013). pIPKb2 containing
27 *BdCOMT6*⁵¹³⁹ was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* C58pMP90 strain
28 (Koncz and Schell, 1986) and *comt-1* plants were infiltrated as described in (Zhang
29 *et al.*, 2006). Transgenic plants were selected on Murashige and Skoog medium
30 containing 50 mg. l⁻¹ hygromycin.

31 *Analyses of cell wall phenolics from stem or grain samples*

1 The stem or grain samples ground to 0.5 mm were exhaustively extracted by cold
2 water, then 60°C ethanol before freeze-drying to obtain a cell wall residue CWR.

3 The Klason lignin (KL) content of stem CWR was measured by the Klason method
4 as previously described (Méchin *et al.*, 2014). The lignin content of grain CWR,
5 available in lower amount, was measured by the spectrophotometric acetyl bromide
6 method as follows. About 10 mg of dry CWR were put in a 2 ml glass screw capped
7 reaction vial (Teflon lined) together with 1 ml of freshly made 25% (v/v) acetyl
8 bromide/glacial acetic acid mixture. A blank vial was included which contained the
9 digestion reagent without any sample. The reaction vials were incubated at 55°C for
10 2h30 in an Eppendorf Thermomixer and with stirring at 500 rpm. The reaction
11 mixture was then cooled and 200 µl of the clear supernatant was diluted with 3 ml of
12 50/9 (v/v) acetic acid/2 M NaOH mixture and 500 µl of 0.5 M aqueous
13 hydroxylamine hydrochloride solution. The UV spectrum of the diluted solution was
14 registered between 400 and 250 nm and against a blank cell prepared by similar
15 dilution performed on the blank vial reaction mixture. The acetyl bromide lignin
16 (ABL) concentration was calculated from the absorbance peak at 280 nm and using
17 an extinction coefficient value of 20 g⁻¹.l.cm⁻¹.

18 The lignin structure of stem CWR was investigated using the simplified
19 thioacidolysis protocol, as previously described (Méchin *et al.* 2014). The lignin
20 structure of grain CWR was studied in a similar way, but using a modified
21 thioacidolysis reagent made from 9/1 dioxane/ethanethiol mixture containing 0.1M
22 tetrafluoroboric acid dimethylether complex (Sigma-Aldrich) as previously described
23 (Greffeuille *et al.*, 2006). The specific lignin-derived thioacidolysis monomers were
24 analyzed by gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of their
25 trimethylsilylated (TMS) derivatives (Méchin *et al.*, 2014). The determination of the
26 H, G, S and 5-hydroxyguaiacyl (5-OH G) TMS derivatives was carried out on ion
27 chromatograms respectively reconstructed at m/z 239, 269, 299, and 357, as
28 compared to the internal standard C21 hydrocarbon evaluated on the ion
29 chromatogram reconstructed at m/z (57+71+85).

30 The analysis of *p*-coumaric (CA) and ferulic (FA) acids ester-linked to the cell walls
31 was carried out by mild alkaline hydrolysis performed from about 10 mg of stem or
32 grain samples put together with 1 ml NaOH 1 M and 0.1 (for stem CWR) or 0.05 (for

1 grain CWR) mg *o*-coumaric acid internal standard overnight and on a carousel. The
2 reaction mixture was then acidified with 0.2 ml HCl 6 M. After centrifugation (1500
3 g, 10 min), about 0.5 ml of the supernatant were deposited onto a solid-phase
4 extraction cartridge (Waters Sep-pack t18) preconditioned before use (washed with 2
5 x 3 ml MeOH, then with 2 x 3 ml of water containing 0.01% HCOOH). The sample-
6 loaded cartridge was washed with acidified water and eluted with 2 ml of HPLC-
7 grade methanol. The recovered methanolic sample was stored 30 min at (-20°C) for
8 complete precipitation of insoluble components before ultrafiltration (0.45 µm) and
9 analysis by high performance liquid chromatography combined to a diode array
10 detection (HPLC-DAD). For HPLC separation, 1 µl of sample was injected onto a
11 RP18 column (4 x 50 mm, 2.7 µm particle size, Nucleoshell, Macherey-Nagel) with
12 a flow rate of 0.5 ml/min. The eluents were 0.1% formic acid in water (A) and 0.1%
13 formic acid in acetonitrile (B) and the gradient was as follows: 0-3 min, 0% B; 12
14 min, 20% B; 14 min, 80% B; 16 min, 0% B. The quantitative determination of alkali-
15 released CA and FA was performed from the 250-400 nm DAD chromatograms and
16 after calibration with authentic compounds.

17 In addition to the analysis of CA and FA ester-linked to the cell walls, the
18 determination of *p*-coumaroylated arabinose (CA-Ara) and of feruloylated arabinose
19 (FA-ara) units occurring in cell wall arabinoxylans was performed according to a
20 recently developed mild acidolysis procedure (Petrik *et al.*, 2014).

21 *Analyses of soluble phenolics from Arabidopsis plantlets*

22 The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analyses of soluble
23 phenolics extracted from 5-day old *Arabidopsis* plantlets was carried out as
24 previously described (Do *et al.*, 2006).

25 *Saccharification assays of mature stem samples*

26 The CWRs obtained from dry stems were subjected to a saccharification assay.
27 About 30 mg of stem CWR was put into a 5 ml disposable plastic tube together with
28 4 ml of 5 mM acetate buffer (pH 4.7) containing 4 mg.ml⁻¹ of a commercial cellulase
29 preparation (cellulase Onozuka-R-10 from *Trichoderma viride*, Serva) and 0.1
30 mg.ml⁻¹ NaN₃. A blank tube was prepared containing the enzyme solution without

1 any CWR. The reaction tubes (biological triplicates for each genotype plus the blank
2 tube) were put at 45°C for 72 hours and on a carousel. After centrifugation (1500 g,
3 10 min), the supernatant was subjected to glucose determination as follows. In a
4 disposable 1 ml spectrophotometric cuvette, 50 µl of the supernatant were mixed
5 together with 1 ml of Biomerieux reagent (Biomerieux Glucose RTU kit,
6 Biomerieux, Lyon, France) and the colorimetric reaction was allowed to proceed for
7 30 min. The absorbance was read at 505 nm (against a cuvette containing 50 µl H₂O
8 and 1 ml reagent) and corrected for the glucose from the blank assay. The glucose
9 amount released by enzymatic hydrolysis of the stem CWR was calculated after
10 appropriate calibration with standard glucose solutions. The pellets obtained from the
11 CWR subjected to cellulase treatment were washed twice with water (with
12 centrifugation 10 min at 1500 g between each washing) before freeze-drying and
13 weight determination.

14 *Polysaccharide analysis in grain samples*

15 The mature grain polysaccharide content and composition was analyzed after
16 recovering alcohol insoluble residue (AIR) containing cell wall polysaccharides and
17 starch. AIR was obtained as described in Guillon *et al.* (2011). Polysaccharides
18 content and composition were determined following their hydrolysis by monitoring
19 the individual neutral sugar content as described in Dervilly *et al.* (2000) according
20 to the method of Englyst and Cummings (1988).

21 *Histochemistry analyses*

22 Pieces of *Brachypodium* and *Arabidopsis* stems were embedded in 8% agarose, cut
23 into 100 µm sections and stained using the Maüle and the Wiesner (phloroglucinol-
24 HCl) reagents as described in Bouvier d'Yvoire *et al.* (2013). Cross-sections were
25 observed using a Leica DMRB microscope equipped with a Progress C10plus
26 camera.

27 To facilitate sectioning, dry grains were placed onto a moist paper for 24 h (the
28 embryo was removed prior to imbibition).

1 Grains were cut with a cryotome into 20 μm -thick sections to visualize the structure
2 or into 50- μm -thick sections for staining using the Maïle or the Wiesner reagents.
3 Grain sections were stained as described for stem in Bouvier d'Yvoire *et al.* (2013).
4 Observations were carried out using a Multizoom macroscope (AZ100M, NIKON).
5 Grains were fixed overnight in 3% (w/v) paraformaldehyde and 0.5% (w/v)
6 glutaraldehyde in 0.1 M Na-phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS). Fixed samples
7 were washed, impregnated and embedded with London Resin White acrylic as
8 described in Chateigner-Boutin *et al.* (2014). The fixed samples were cut into semi-
9 thin sections (1 μm) with an ultramicrotome (UC7, LEICA) and used for differential
10 interference contrast (DIC) imaging, toluidine blue staining, and immunolabelling.
11 Sections were directly observed with a microscope (DMRB, LEICA) equipped with
12 standard DIC optics using a Plan-APO 20X objective and Nikon DS-1QM camera.
13 Toluidine blue staining was used to better visualize the testa cell layers. The sections
14 were stained with toluidine blue O 0.1% (w/v) as described in Chateigner-Boutin *et al.*
15 (2014) before observation with a microscope (Axiovert 135, ZEISS) equipped
16 with a QImaging Retiga 2000R Scientific CCD Camera.
17 For immunolabelling, the semi-thin sections were incubated in a blocking buffer (1%
18 bovine serum albumin BSA, 0.1% NaN₃ in TBS pH8.2) for 1 h at room temperature.
19 Thereafter, sections were incubated in KM1 ascites fluid (Kiyoto *et al.* 2013, 1:100
20 dilution in blocking buffer) for 2 days at 4°C. After three 5-min-long washes with
21 TBS, sections were incubated with goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen,
22 USA, 1:50 dilution in blocking buffer) for 4 h at 35°C. After three 5-min-long
23 washes with TBS, sections were water-washed, dried and then observed under a
24 fluorescence microscope (BX50, OLYMPUS Japan) equipped with a filter set
25 (Semrock TxRed-4040C, Opto-Line Inc., Tokyo, Japan) and a CCD camera (DP72,
26 OLYMPUS Japan). A control experiment was conducted omitting the primary
27 antibody to check for autofluorescence and non-specific labelling.

28

29 **Results and discussion**

30 *The lignin-related BdCOMT6 gene is expressed both in stem and in grain*

1 In a recent study (Dalmais *et al.*, 2013), *Brachypodium* mutants for the *BdCOMT6*
2 gene were identified in a sodium azide-induced mutant collection established in the
3 Bd21-3 genetic background. Several mutant lines displayed a lower lignin content in
4 mature stems together with a reduced frequency of S lignin units and *Bd5139* was the
5 most affected line (Dalmais *et al.*, 2013). These results established that the
6 *BdCOMT6* gene is involved in lignification of *Brachypodium* stems.

7 To further characterize the *BdCOMT6* gene, its expression pattern was obtained
8 using the online expression platform PlaNet/Brachypodium ([http://aranet.mpimp-](http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/)
9 [golm.mpg.de/](http://aranet.mpimp-golm.mpg.de/); Mutwil *et al.*, 2011). This investigation revealed a wide expression
10 pattern of the *BdCOMT6* gene. It was found to be expressed not only in vegetative
11 lignified organs, such as nodes and internodes, but also in grains (Supplementary
12 Figure S1). The *BdCOMT6* expression level was found to be similar in the WT and
13 the *BdCOMT6*-deficient *Bd5139* lines (Supplementary Figure S1).

14 *The Bd5139 mutant has a normal growth phenotype, but an altered*
15 *lignification in stem and grain*

16 As compared to the WT line, the *Bd5139* mutant did not show any visible growth or
17 developmental phenotype when grown in a growth chamber or in a greenhouse even
18 though stem biomass was found slightly reduced (Supplementary Figure S2). In 40
19 day-old plants, Maüle staining revealed the occurrence of S lignin units (Nakano and
20 Meshitsuka, 1992) in the cell walls of several stem tissues (epidermis, sclerenchyma,
21 and vascular bundles) without any noticeable difference between the WT and the
22 *Bd5139* lines (Figure 1). This result suggests that the *Bd5139* mutation might not
23 affect the frequency of S lignin units to a large extent.

24 It is now well established that lignin-related COMT enzymes of angiosperm species
25 catalyze the 5-OH group methylation on the pathway towards sinapyl alcohol, the
26 precursor of S lignin units (Bonawitz and Chapple, 2010; Vanholme *et al.* 2010).
27 According to several studies, their most likely *in vivo* substrates would be 5
28 hydroxyconiferaldehyde and 5-hydroxyconiferyl alcohol (Zubieta *et al.*, 2002; Louie
29 *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2014). By contrast, caffeic acid, which has been shown to
30 be an *in vitro* COMT substrate converted into ferulic acid (FA) (Higuchi, 2006),
31 would be a poor *in vivo* candidate (Parvathi *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2014).
32 Manipulation of lignin in plants has repeatedly been carried out by targeting the

1 lignin-related COMT genes, which most often resulted in a deficit of S lignin units
2 and the appearance of unusual levels of 5-OH G units (reviewed in Rastogi and
3 Dwivedi, 2008). In agreement with a preliminary study on COMT-deficient
4 *Brachypodium* lines (Dalmais *et al.*, 2013), both lignin content and lignin structure
5 were found to be affected by the single Gly256Asp mutation occurring in the *Bd5139*
6 line (Table 1). Relative to the WT level, the lignin content of *Bd5139* stem CWR was
7 moderately reduced by about 10%. Lignin structure was more markedly affected by
8 the *BdCOMT6* mutation as revealed by thioacidolysis (Table 1). This method
9 provides specific monomers from lignin units that are only involved in labile β -O-4
10 bonds. When expressed relative to the Klason lignin content, the total yield of
11 thioacidolysis monomers released from *Bd5139* lignins was found lower than the WT
12 value. This reduced yield is diagnostic for an increased frequency of resistant
13 interunit bonds in lignins. In addition, the relative frequency of S thioacidolysis
14 monomers was reduced by the mutation whereas 5-OH G monomers were recovered
15 in unusually high amount. As previously described in maize *bm3* mutant (Lapierre *et al.*,
16 1988; Barrière *et al.*, 2004), sorghum *bmr12* mutant (Palmer *et al.*, 2008),
17 Arabidopsis *Atomt1* mutant (Goujon *et al.*, 2003), COMT1-silenced transgenic
18 tobacco (Pinçon *et al.*, 2001) or COMT-deficient transgenic poplars (Lapierre *et al.*,
19 1999; Jouanin *et al.*, 2000), these alterations in lignification are the hallmarks of
20 lignin-related COMT deficiency in angiosperms, the most diagnostic signature being
21 the increased frequency of lignin 5-OH G units. While these 5-OHG units were
22 found to substantially build up in the lignins of *Bd5139* stems (up to 5% of the total
23 amount of thioacidolysis monomers), the frequency of S thioacidolysis monomers
24 was found to be only moderately reduced (from 66% in WT to 57% in *Bd5139*,
25 Table 1). This result is consistent with the observation that the Maüle stain, specific
26 for S lignin units, was not affected to a large extent in *Bd5139* mature stem cross
27 sections (Figure 1) in contrast to the observations made for severe *comt* mutants
28 (Jouanin *et al.*, 2000; Pinçon *et al.*, 2001) . Taken together, these data reveal that the
29 biosynthesis of sinapyl alcohol is affected to a noticeable but limited extent in the
30 *Bd5139* stems.

31 As *BdCOMT6* was found to be expressed in grains and as it is now well established
32 that lignins occur in the outer layers of grass grains (Desvignes *et al.*, 2006;
33 Grefeuille *et al.*, 2006), the lignins from *Brachypodium* grains were studied. The

1 occurrence and distribution of lignins in grain tissues were first studied on grain
2 cross sections using the Wiesner and the Maïle tests, two commonly used stains
3 specific for lignified tissues. The Wiesner test stains reddish-purple the *p*-
4 hydroxycinnamaldehyde end-groups occurring in native lignins (mainly as
5 coniferaldehyde end-groups) while the Maïle test stains deep-purple S lignin units
6 (Nakano and Meshitsuka, 1992). *Brachypodium* grains are hulled grains consisting of
7 the caryopsis surrounded by two husks, a large lemma and a small palea (Guillon *et*
8 *al.*, 2011; Evers and Millar 2002). The lemma can be easily removed while the palea
9 adheres to the pericarp in the crease. In the palea, both the Wiesner and the Maïle
10 tests positively stained the epidermis and vascular bundles (Fig. 2E,G,H), which
11 establishes the occurrence of lignin coniferaldehyde end-groups and of S lignin units
12 in this protective husk. In addition, the outer layer of the seed testa (t2 in Fig. 2C,F)
13 was positively stained by the Maïle reagent whereas no positive Maïle staining
14 could be detected in the brownish-pigmented t1 layer. The Maïle-stained t2 layer did
15 not positively react to the Wiesner test, a phenomenon likely accounted for by
16 distinct detection sensitivity level of these lignin staining methods. Consistently with
17 the positive Wiesner and Maïle stainings of the seed palea and t2 testa,
18 immunolabelling experiments carried out with an antibody targeting a β -5 dimer of
19 coniferyl alcohol (Kiyoto *et al.*, 2013) confirmed the occurrence of lignins in the
20 grain palea and testa (Figure 2J).

21 To evaluate the impact of BdCOMT6 deficiency on grain lignin level, the WT and
22 *Bd5139* grain CWR were subjected to the acetyl bromide lignin (ABL)
23 determination. The ABL lignin content was found to be similar in the *Bd5139* and
24 WT grain samples (Table 2), by contrast to the mature stem samples (Table 1). We
25 then subjected CWR samples prepared from whole grain to thioacidolysis with the
26 objective to find a more diagnostic lignin signature. In agreement with previous
27 studies performed on wheat grains (Desvignes *et al.*, 2006; Grefeuille *et al.*, 2006),
28 thioacidolysis unambiguously revealed the occurrence of H, G and S lignin units in
29 *Brachypodium* whole grains and from the detection of H, G and S thioacidolysis
30 monomers (Table 2). The relative frequency of H thioacidolysis monomers was
31 found to be higher from grain CWR compared to the levels observed from stem
32 CWR. In addition, the relative frequency of S thioacidolysis monomers was found to
33 be substantial (60% of thioacidolysis monomers for the WT sample, Table 2), in

1 agreement with the Maïle positive staining of the palea and of the outer t2 testa
2 layer. More importantly and relative to the WT sample, lignins of *Bd5139* grain
3 displayed severe structural alterations, namely a reduced frequency of S monomers
4 together with an increased frequency of 5-OH G monomers (up to 10% of the
5 thioacidolysis monomers, Table 2 and Supplementary Figure S3). When expressed
6 relative to the ABL lignin content, thioacidolysis yield was found to be reduced by
7 the *Bd5139* mutation, which reveals that *Bd5139* grain lignins are richer in resistant
8 interunit bonds than WT ones. Taken together, the present results establish that the
9 alterations induced by the *Bd5139* mutation in the lignins of mature grains mirror
10 those observed in mature stems. In both samples and relative to the WT, we can
11 observe marked lignin structural alterations, namely a lower frequency of S units
12 together with an increased frequency of 5-OH G units and of resistant interunit
13 bonds. In both *Bd5139* stem and grain samples and surprisingly enough, the
14 frequency S units was found to be reduced, but only to a moderate extent. This
15 persistence of substantial levels of S units in *Bd5139* lignins suggests that some
16 enzyme activity survives in the mutated BdCOMT6 protein.

17 *Evaluation of p-coumaric and ferulic acid linked to Brachypodium stem and grain* 18 *cell walls*

19 It is now well established that *p*-coumaric acid (CA) and ferulic acid (FA) are linked
20 to the polymers of grass cell walls (reviewed in Ralph, 2010). For many grass
21 species, such as maize, sorghum, miscanthus, or wheat, CA and FA units are quite
22 distinctly distributed between the wall polymers of lignified stems. While FA
23 predominantly acylates the arabinose substituents of arabinoxylans, CA is primarily
24 ester-linked to S lignin units. However, such a distinct distribution is not as clearly
25 observed in *Brachypodium* cell walls which contain a substantial proportion of CA
26 acylating arabinoxylans (Christensen *et al.*, 2010; Petrik *et al.*, 2014).

27 The effect of the *Bd5139* mutation on the amount of CA or FA ester-linked to the
28 cell wall polymers was monitored by mild alkaline hydrolysis (Table 3). Mature stem
29 cell walls were found to contain higher amounts of CA and FA esters than mature
30 grain cell walls. This compositional trait reflects the higher abundance of lignins and
31 arabinoxylans in stems than in grains, as lignins and arabinoxylans respectively are
32 the major *p*-coumaroylated and feruloylated wall polymers.

1 Relative to the WT level, the amount of FA released by mild alkaline hydrolysis was
2 not affected in the *Bd5139* stem CWR and slightly decreased in the mutant grain
3 CWR. This result suggests that BdCOMT6 deficiency has no or little effect on the
4 level of FA released by mild alkaline hydrolysis of *Brachypodium* cell walls. By
5 contrast, mature internodes of COMT-deficient *bm3* maize (Provan *et al.*, 1997;
6 Marita *et al.*, 2003; Barrière *et al.*, 2004) or *bmr12* sorghum (Palmer *et al.*, 2008)
7 lines have been shown to release more FA when subjected to mild alkaline
8 hydrolysis, a phenomenon related to their markedly lower lignin level as measurable
9 FA is reduced by lignification (Grabber *et al.*, 2004). These results confirm that *in*
10 *planta* the lignin-related COMT activity is not involved in the synthesis of FA that
11 subsequently acylates arabinoxylans.

12 Relative to WT values, the content of CA esters was reduced by 30 and 40% in
13 *Bd5139* stem and grain samples, respectively (Table 3). A similar reduction of CA
14 units ester-linked to stem cell walls has been reported for maize *bm3* and sorghum
15 *bmr12* mutant lines (Barrière *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2008). On the rationale that
16 CA mainly acylates maize or sorghum S lignin units, the CA reduction observed in
17 these COMT-deficient lines could be directly assigned to the COMT deficiency-
18 induced reduction of S lignin units. Contrary to maize or sorghum cell walls, a
19 noticeable amount of CA units acylates the arabinoxylans of *Brachypodium* cell
20 walls. It was therefore necessary to clarify whether the lower level of CA esters in
21 *Bd5139* samples affected only lignins or both lignins and arabinoxylans. To address
22 the issue of CA acylation targets, we employed a recently developed mild acidolysis
23 method which efficiently releases *p*-coumaroylated arabinose (CA-Ara) and
24 feruloylated arabinose (FA-Ara) from grass arabinoxylans (Petrik *et al.*, 2014). The
25 CA-Ara quantities released from *Bd5139* stem CWR were found to be very close to
26 the WT values (Supplementary Table 2). On this basis, we could ascertain that the
27 *BdCOMT6* mutation specifically reduces lignin *p*-coumaroylation in *Bd5139* CWR
28 whereas the *p*-coumaroylation of arabinoxylans is not affected. Similar to what was
29 reported in COMT-deficient *bm3* maize or *bmr12* sorghum lines, the *BdCOMT6*
30 mutation affects the biosynthesis of sinapyl alcohol and thereby of sinapyl *p*-
31 coumarate, the precursor of *p*-coumaroylated S lignin units.

32 *Complementation experiments reveal that the mutated BdCOMT6 protein is*
33 *still functional in the Bd5139 mutant*

1 The mutation in *Bd5139* changed a relatively conserved glycine-256 residue into an
2 aspartic acid residue (Supplementary Fig S4). The overall impact of this single
3 mutation in the BdCOMT6 protein was found to mimic the impact of the *bm3* or
4 *bmr12* mutations on the lignification of maize or sorghum mutant lines, respectively,
5 but to a less severe extent. Indeed, S thioacidolysis monomers accounted for about
6 56% of the total amount of thioacidolysis monomers recovered from stem *Bd5139*
7 lignins (versus 67% for the WT, Table 1). By contrast, their frequency was reduced
8 to a value close to zero in the lignins of a *bmr12* sorghum mutant (Palmer *et al.*,
9 2008) and to a twice lower value relative to the WT level in *bm3* lignins (Barrière *et*
10 *al.*, 2004). To evaluate the functionality of the mutated BdCOMT6 protein
11 (BdCOMT6⁵¹³⁹), we performed complementation experiments in an *Arabidopsis*
12 *comt-1* mutant which is almost completely depleted in S lignin units (Vanholme *et*
13 *al.*, 2012; Van Acker *et al.*, 2013). Such a complementation experiment was
14 performed in order to determine to which extent the *BdCOMT6*⁵¹³⁹ allele was able to
15 rescue the biosynthesis of syringyl lignin units in the *Arabidopsis comt-1* mutant.

16 Not unexpectedly, the Maïle reagent specific for S lignin units negatively stained
17 *Arabidopsis* stem cross-sections from the *comt-1* line (Fig. 3). A positive Maïle
18 staining was restored in *Arabidopsis comt-1* samples complemented with the
19 *BdCOMT6*⁵¹³⁹ (Fig. 3). This result revealed that the *BdCOMT6*⁵¹³⁹ protein has
20 conserved enough activity to catalyze the methylation step involved in the pathway
21 to sinapyl alcohol. To more precisely evaluate the functionality of the mutated
22 protein, we examined the impact of the complementation on the frequency of lignin-
23 derived H, G, S and 5-OH G thioacidolysis monomers specifically released from the
24 lignins of mature *Arabidopsis* stems (Table 4). As expected and relative to the WT
25 levels, the relative frequency of the 5-OH G monomers was dramatically increased
26 while that of S monomers was reduced to less than 3% in the *comt-1 Arabidopsis*
27 mutant. The transformation of this mutant with *BdCOMT6*⁵¹³⁹ rescued the S lignin
28 units to a frequency that surprisingly exceeded that of the WT sample and for 3
29 different complemented lines (Table 4). In addition, the frequency of 5-OH G
30 thioacidolysis monomers was decreased to a value close to the WT one. These
31 thioacidolysis results unambiguously confirmed that the mutated BdCOMT6 has
32 conserved enough enzyme activity so as to efficiently rescue the COMT-deficient
33 *Arabidopsis* mutant. The surprisingly higher frequency of S units in the

1 complemented lines and relative to the control value might be accounted for by the
2 employed promoter, the strong maize ubiquitin promoter, which would lead to a non
3 specific overexpression of the mutated *BdCOMT6*⁵¹³⁹ gene as compared to the
4 regulated wild-type *AtCOMT1* transcript.

5 In previous studies, it has been shown that an Arabidopsis T-DNA mutant knockout
6 for the lignin-specific *comt1* gene was not only affected in stem lignification, but
7 also in the pool of soluble phenolics (Goujon et al., 2003; Do et al., 2007). This
8 mutant contained a severely reduced level of sinapoyl malate (SIM) and abnormal
9 amounts of 5-hydroxyferuloyl malate (5-OH FM). In addition and at the plantlet
10 stage, *AtCOMT1* deficiency induced the complete disappearance of isorhamnetin
11 glycosides. These results established that the *AtCOMT1* enzyme is involved not only
12 in the lignin pathway, but also in the synthesis of sinapoyl malate and of methylated
13 flavonol derivatives (i.e. isorhamnetin derivatives). To further establish the
14 functionality of the mutated *BdCOMT6* protein, we investigated the impact of the
15 complementation experiment on the soluble phenolics of *comt-1* Arabidopsis 5-day
16 old plantlets. In agreement with previous results (Do et al., 2007) and relative to the
17 WT values, the *comt-1* plantlets contained a severely reduced SIM level, this
18 reduction being partially compensated for by the appearance of 5-OH FM
19 (Supplementary Table 3). In addition, isorhamnetin derivatives that could be
20 observed as minor soluble phenolics of WT plantlets were entirely absent from *comt-*
21 *1* plantlets. The complementation with the mutated *BdCOMT6* protein efficiently
22 restored the SIM and the isorhamnetin levels to the WT value and induced the total
23 disappearance of the 5-OH FM.

24 Taken together, these results ascertained that the mutated *BdCOMT6* gene introduced
25 in the *AtCOMT1*-deficient Arabidopsis mutant was able to rescue not only its altered
26 stem lignification, but also its reduced pool of methylated soluble phenolics. A
27 similar rescue of syringyl units and of sinapate esters has been reported for the *fah*
28 Arabidopsis mutant complemented by the *Eucalyptus globulus* coniferaldehyde -5
29 hydroxylase (Garcia et al., 2014). In the present study, such an efficient
30 complementation was done with the mutated *BdCOMT6* gene, which definitely
31 established that the mutated *BdCOMT6* protein is still functional.

1 *The Bd5139 mutant displays an improved saccharification of mature stems*
2 *without major alteration in grain quality*

3 A promising breeding strategy of cereal crops would consist in making their straw
4 more amenable to saccharification, through appropriate changes in lignin content
5 and/or structure, without introducing deleterious effects on biomass production and
6 on grain quality. Indeed, as lignins are essential to plant health and development,
7 substantial lignin reduction would inevitably reduce the agricultural fitness of grass
8 crops (Pedersen *et al.*, 2005).

9 Many studies of COMT-deficient transgenic or mutant angiosperms have established
10 that their reduced lignin level was associated with improved digestibility (Cherney *et al.*,
11 *et al.*, 1991; Bernard-Vailhé *et al.*, 1996; Sewalt *et al.*, 1997; Goujon *et al.*, 2003;
12 Barrière *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Trabucco *et al.* 2013) or saccharification
13 (Chen and Dixon, 2007; Dien *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012; Van
14 Acker *et al.*, 2013; Baxter *et al.*, 2014). The currently studied *Bd5139* mutant
15 displayed moderate lignin reduction as the BdCOMT6 mutated protein, provided
16 with a single point mutation, has kept enough enzyme activity to ensure a lignin level
17 reduced only by 10-15%. On this basis, we investigated the impact of the mutation
18 on the saccharification of mature stems.

19 A saccharification assay was conducted on small amounts (30 mg) of stem CWR
20 without any pretreatment and using a commercially available cellulase preparation
21 (cellulase Onozuka from *T. viride*, provided with cellulase, hemicellulase and beta-
22 glucosidase activities). The efficiency of cell wall enzymatic hydrolysis was
23 evaluated both as the weight loss induced by the enzyme treatment and as the
24 glucose amount released from the cell walls. Both evaluation methods consistently
25 revealed that the saccharification efficiency of the stem CWR was improved (by
26 about 20%) by the mutation and relative to the WT values (Table 5). Such a result is
27 consistent with the lower lignin level of *Bd5139* stems as lignins detrimentally affect
28 the enzymatic degradation of lignocellulosic biomass.

29 Lignins are important components of the stem vascular tissues necessary to convey
30 water and nutrients to the developing grain. In addition, lignins occur in several grain
31 outer layers that fulfill protective and nutritive functions towards the developing
32 seed. Lignin mutants with seed defects have been reported. Maize field trials where

1 *bm3* lines were assessed revealed a reduced grain yield that was explained by a lower
2 number of ears per plant and by lower number of kernels per ear (reviewed in
3 Pedersen *et al.*, 2005). Several *Arabidopsis* mutants altered in lignin polymerization
4 exhibit seed phenotypes such as defects in seed pigmentation, permeability and
5 germination (Liang *et al.*, 2006) or increased number of siliques and enlarged seeds
6 (Wang *et al.*, 2014). The *Bd5139* line was assessed to evaluate the effect of moderate
7 changes in lignin content and composition on cereal grains. Grain size and
8 morphology were not affected in the *Bd5139* line (Supplementary Figure S5). No
9 major effect was noticed on grain histology or development (Supplementary Figure
10 S5). No effect of the *Bd5139* mutation could be evidenced on grain polysaccharide
11 storage compounds (Supplementary Table S3). Therefore, the moderate decrease in
12 grain lignins and CA esters does not seem to affect grain development and
13 polysaccharide composition.

14 *Conclusion*

15 In this study focused on the *Bd5139 Brachypodium* mutant, we have established that
16 modifying the lignin-related *BdCOMT6* gene induced alterations in grain lignins
17 which nicely mirrored those observed in stem lignins. The accumulation of 5-OH G
18 units, which is the most specific signature for COMT-deficiency, was reported here
19 for the first time in the grain of a COMT grass mutant. The single mutation in the
20 *BdCOMT6* protein did not completely annihilate its enzyme activity. It induced
21 substantial alterations in lignin structure but only a moderately reduced lignin level.
22 The moderate lignin reduction did not compromise the vegetative and reproductive
23 development of the *Brachypodium* plant model, but facilitated the straw
24 saccharification opening the possibility of a sustainable cereal grain production with
25 improved straw end-use potential.

26 **Supplementary data**

27 **Supplementary Fig. S1 :** Expression profile of *BdCOMT6*

28 **Supplementary Fig. S2 :** Phenotype of *Bd5139* compared to WT(*Bd21-3*) plants

29 **Supplementary Fig. S3 :** Partial GC-MS traces of the lignin-derived thioacidolysis
30 monomers (analyzed as their silylated derivatives) released from WT and *Bd5139*
31 grain CWR

1 **Supplementary Fig. S4** : Sequence alignment of BdCOMT6 and characterized
2 COMTs showing residues described as essential for COMT activity

3 **Supplementary Fig. S5** : Grain development and grain size are not affected in
4 *Bd5139*

5 **Supplementary Table S1** : Determination of *p*-coumaric acid (CA) and of 5-O-*p*-
6 coumaroyl arabinose (CA-Ara) released by mild acidolysis (dioxane/water 9/1, v/v,
7 containing 0.2M HCl, 50°C overnight) of wild type (WT, accession Bd21-3) and
8 *Bd5139* cell wall residues (CWR) prepared from mature stem samples.

9 **Supplementary Table S2** : LC-MS determination of sinapoyl malate (SIM), 5-
10 hydroxy feruloyl malate (5-OH FM) and isorhamnetin-3-O-glucoside-7-O-
11 rhamnoside (IGR) extracted from 6-day old Arabidopsis plantlets. The examined
12 Arabidopsis genotypes are the wild-type (WT) Col0 one, the *comt-1* mutant and three
13 lines (Cp-line) obtained by complementation of the *comt-1* mutant with the mutated
14 *BdCOMT6* gene. The results are expressed in mg/g fresh weight.

Supplementary Table S3 : Sugar composition of the alcohol insoluble residues
prepared from whole grain of wild type (WT, accession Bd21-3) WT and *Bd5139*
lines. Arabinose (Ara), xylose (Xyl), glucose (Glu), mannose (Man) and galactose
(Gal) content was determined by gas-liquid chromatography of alditol acetates.

15

16 **Acknowledgements**

17 This research was supported by INRA-CEPIA and INRA-BAP doctoral fundings for
18 SHYK. We are indebted to S. Daniel and A. Boudier for their technical assistance.
19 We thank M.-F. Devaux for her help to take photos of Brachypodium grains.

References

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK,
Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema
E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M,
Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P,
Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E,

Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, and Ecker JR. 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* *Science* **301**, 653-657.

Barrière Y, Ralph J, Méchin V, Guillaumie S, Grabber JH, Argillier O, Chabbert B, Lapierre C. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 847-860.

Barron C, Surget A, Rouau X. 2007. Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science* **45**, 88-96.

Baxter HL, Mazarei M, Labbe N, Kline LM, Cheng Q, Windham MT, Mann DG, Fu C, Ziebell A, Sykes RW, Rodriguez M, Davis MF, Mielenz JR, Dixon RA, Wang ZY, Stewart CN. 2014. Two-year field analysis of reduced recalcitrance transgenic switchgrass. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 914-924.

Beaugrand J, Cronier D, Thiebeau P, Schreiber L, Debeire P, Chabbert B. 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 7108-7117.

Bernard-Vailhé M-A, Migné C, Cornu A, Maillot M-P, Grenet E, Besle J-M, Atanassova R, Martz F, Legrand M. 1996. Effect of Modification of the O-Methyltransferase Activity on Cell Wall Composition, Ultrastructure and Degradability of Transgenic Tobacco. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **72**, 385-391.

Bevan MW, Garvin DF, Vogel JP. 2010. Brachypodium distachyon genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 211-217.

Bonawitz ND, Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics* **44**, 337-363.

Bouvier d'Yvoire M, Bouchabke-Coussa O, Voorend W, Antelme S, Cézard L, Legée F, Lebris P, Legay S, Whitehead C, McQueen-Mason SJ, Gomez LD, Jouanin L, Lapierre C, Sibout R. 2013. Disrupting the cinnamyl alcohol

dehydrogenase 1 gene (BdCAD1) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*. *The Plant Journal* **73**, 496-508.

Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt BF, Hong SY, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LA, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP. 2011. *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiology* **157**, 3-13.

Chateigner-Boutin AL, Bouchet B, Alvarado C, Bakan B, Guillon F. 2014. The wheat grain contains pectic domains exhibiting specific spatial and development-associated distribution. *PLoS One* **9**, e89620.

Chen F, Dixon RA. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* **25**, 759-761.

Chen L, Auh CK, Dowling P, Bell J, Lehmann D, Wang ZY. 2004. Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Functional Plant Biology* **31**, 235-245.

Cherney J, Cherney DJR, Akin DE, Axtell JD. 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advances in Agronomy* **46**, 157-198.

Christensen U, Alonso-Simon A, Scheller HV, Willats WG, Harholt J. 2010. Characterization of the primary cell walls of seedlings of *Brachypodium distachyon*--a potential model plant for temperate grasses. *Phytochemistry* **71**, 62-69.

Dalmais M, Antelme S, Ho-Yue-Kuang S, Wang Y, Darracq O, d'Yvoire MB, Cézard L, Légée F, Blondet E, Oria N, Troadec C, Brunaud V, Jouanin L, Höfte H, Bendahmane A, Lapierre C, Sibout R. 2013. A TILLING Platform for Functional Genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* **8**, e65503.

Dervilly G, Saulnier L, Roger P, Thibault J-F. 2000. Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 270-278.

Desvignes C, Olivé C, Lapierre C, Rouau X, Pollet B, Lullien-Pellerin V. 2006. Effects of calcium chloride treatments on wheat grain peroxidase activity and outer layer mechanical properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 1596–1603.

Dien BS, Miller DJ, Hector RE, Dixon RA, Chen F, McCaslin M, Reisen P, Sarath G, Cotta MA. 2011. Enhancing alfalfa conversion efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering lignin composition. *Bioresource Technology* **102**, 6479-6486.

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

Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP. 2001. Brachypodium distachyon. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* **127**, 1539-1555.

Englyst H, Cummings J. 1988. Improved method of measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **71**, 808-814.

Evers T, Millar S. 2002. Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science* **36**, 261-284.

Fu C, Mielenz JR, Xiao X, Ge Y, Hamilton CY, Rodriguez M, Chen F, Foston M, Ragauskas A, Bouton J, Dixon RA, Wang ZY. 2011. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **108**, 3803-3808.

García JR, Anderson N, Le-Feuvre R, Iturra C, Elissetche J, Chapple C, Valenzuela S. 2014. Rescue of syringyl lignin and sinapate ester biosynthesis in Arabidopsis thaliana by a coniferaldehyde 5-hydroxylase from Eucalyptus globulus. *Plant Cell Report* **33**, 1263-1274.

Goujon T, Sibout R, Pollet B, Maba B, Nussaume L, Bechtold N, Lu F, Ralph J, Mila I, Barrière Y, Lapierre C, Jouanin L. 2003. A new Arabidopsis thaliana

mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Molecular Biology* **51**, 973-989.

Grabber JH, Ralph J, Lapierre C, Barrière Y. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* **327**, 455-465.

Green AR, Lewis KM, Barr JT, Jones JP, Lu F, Ralph J, Vermerris W, Sattler SE, Kang C. 2014. Determination of the Structure and Catalytic Mechanism of Sorghum bicolor Caffeic Acid O-Methyltransferase and the Structural Impact of Three brown midrib12 Mutations. *Plant Physiology* **165**, 1440-1456.

Grefeuille V, Abecassis J, Lapierre C, Lullien-Pellerin V. 2006. Bran Size Distribution at Milling and Mechanical and Biochemical Characterization of Common Wheat Grain Outer Layers: A Relationship Assessment. *Cereal Chemistry* **83**, 641-646.

Guillon F, Bouchet B, Jamme F, Robert P, Quémener B, Barron C, Larré C, Dumas P, Saulnier L. 2011. Brachypodium distachyon grain: characterization of endosperm cell walls. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1001-1015.

Higuchi T. 2006. Look back over the studies of lignin biochemistry. *Journal of Wood Science* **52**, 2-8.

Himmelbach A, Zierold U, Hensel G, Riechen J, Douchkov D, Schweizer P, Kumlehn J. 2007. A set of modular binary vectors for transformation of cereals. *Plant Physiology* **145**, 1192-1200.

IBI International Brachypodium Initiative. 2010. Genome sequence analysis of the model grass Brachypodium distachyon. *Nature* **463**, 763-768.

Jacquet G, Pollet B, Lapierre C, Mhamdi F, Rolando C. 1995. New ether linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2746-2751.

Jouanin L, Goujon T, de Nadaï V, Martin MT, Mila I, Vallet C, Pollet B, Yoshinaga A, Chabbert B, Petit-Conil M, Lapierre C. 2000. Lignification in

transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiology* **123**, 1363-1374.

Jung JH, Fouad WM, Vermerris W, Gallo M, Altpeter F. 2012. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. *Plant Biotechnology Journal* **10**, 1067-1076.

Kiyoto S, Yoshinaga A, Tanaka N, Wada M, Kamitakahara H, Takabe K. 2013. Immunolocalization of 8-5' and 8-8' linked structures of lignin in cell walls of *Chamaecyparis obtusa* using monoclonal antibodies. *Planta* **237**, 705-715.

Koncz CK, Schell J. 1986. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* **204**, 383-396.

Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple JC, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L. 1999. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiology* **119**, 153-164.

Lapierre C, Tollier MT, Monties B. 1988. Occurrence of additional monomeric units in the lignins from internodes of a brown-midrib mutant of maize bm3. *Compte-rendus de l'Académie des Sciences* **307**, 723-728.

Liang M, Davis E, Gardner D, Cai X, Wu Y. 2006. Involvement of AtLAC15 in lignin synthesis in seeds and in root elongation of *Arabidopsis*. *Planta* **224**, 1185-1196.

Louie GV, Bowman ME, Tu Y, Mouradov A, Spangenberg G, Noel JP. 2010. Structure-function analyses of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference. *The Plant Cell* **22**, 4114-4127.

Marita JM, Vermerris W, Ralph J, Hatfield RD. 2003. Variations in the cell wall composition of maize brown midrib mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1313-1321.

- Mueller-Harvey I, Hartley RD, Harris PJ, Curzon EH.** 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research* **148**, 71-85.
- Mur LA, Allainguillaume J, Catalán P, Hasterok R, Jenkins G, Lesniewska K, Thomas I, Vogel J.** 2011. Exploiting the Brachypodium Tool Box in cereal and grass research. *New Phytologist* **191**, 334-347.
- Mutwil M, Klie S, Tohge T, Giorgi FM, Wilkins O, Campbell MM, Fernie AR, Usadel B, Nikoloski Z, Persson S.** 2011. PlaNet: combined sequence and expression comparisons across plant networks derived from seven species. *The Plant Cell* **23**, 895-910.
- Méchin V, Laluc A, Legée F, Cézard L, Denoue D, Barrière Y, Lapierre C.** 2014. Impact of the brown-midrib bm5 mutation on maize lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 5102-5107.
- Nakano J, Meshitsuka G.** 1992. The detection of lignin. In: Dence C, Lin S, eds. *Methods in Lignin Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, 23-32.
- Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH.** 2008. Brachypodium distachyon: making hay with a wild grass. *Trends In Plant Science* **13**, 172-177.
- Palmer NA, Sattler SE, Saathoff AJ, Funnell D, Pedersen JF, Sarath G.** 2008. Genetic background impacts soluble and cell wall-bound aromatics in brown midrib mutants of sorghum. *Planta* **229**, 115-127.
- Parvathi K, Chen F, Guo D, Blount JW, Dixon RA.** 2001. Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *The Plant Journal* **25**, 193-202.
- Pedersen JF, Vogel KP, Funnell DL.** 2005. Impact of Reduced Lignin on Plant Fitness. *Crop science* **45**, 812-819.
- Petrik DL, Karlen SD, Cass CL, Padmakshan D, Lu F, Liu S, Le Bris P, Antelme S, Santoro N, Wilkerson CG, Sibout R, Lapierre C, Ralph J, Sedbrook JC.** 2014. p-Coumaroyl-CoA:monolignol transferase (PMT) acts specifically in the

lignin biosynthetic pathway in *Brachypodium distachyon*. *The Plant Journal* **77**, 713-726.

Pinçon G, Maury S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. 2001. Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* **57**, 1167-1176.

Provan GJ, Scobbie L, Chesson A. 1997. Characterisation of lignin from CAD and OMT deficient Bm mutants of maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**, 133-142.

Ralph J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Review* **9**, 65-83.

Rancour DM, Marita JM, Hatfield RD. 2012. Cell wall composition throughout development for the model grass *Brachypodium distachyon*. *Frontiers In Plant Science* **3**, 266.

Rastogi S, Dwivedi UN. 2008. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science* **174**, 264-277.

Sewalt V, Ni W, Blount JW, Jung HG, Masoud SA, Howles PA, Lamb C, Dixon RA. 1997. Reduced Lignin Content and Altered Lignin Composition in Transgenic Tobacco Down-Regulated in Expression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase or Cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiology* **115**, 41-50.

Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler TC, Sarath G, Hazen SP. 2013. Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid O-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnology* **13**, 61.

Van Acker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W. 2013. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology For Biofuels* **6**, 46.

Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**, 895-905.

Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K, Boerjan W. 2012. A Systems Biology View of Responses to lignin Biosynthesis Perturbations in Arabidopsis. *The plant Cell* **24**, 3506-3529.

Vogel JP, Gu YQ, Twigg P, Lazo GR, Laudencia-Chingcuanco D, Hayden DM, Donze TJ, Vivian LA, Stamova B, Coleman-Derr D. 2006. EST sequencing and phylogenetic analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Theoretical and Applied Genetics* **113**, 186-195.

Wang CY, Zhang S, Yu Y, Luo YC, Liu Q, Ju C, Zhang YC, Qu LH, Lucas W, Wang W Chen YQ. 2012. MiR397b regulates both lignin content and seed number in Arabidopsis via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 1132-1142.

Yang B, Wyman C. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2**, 26-40.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* **1**, 641-646.

Zubieta C, Kota P, Ferrer JL, Dixon RA, Noel JP. 2002. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *The Plant Cell* **14**, 1265-1277.

Tables

Table 1. Lignin content and structure of cell wall residues (CWR) prepared from wild-type (WT, accession Bd21-3) and *Bd5139* 3-month old mature stems. Lignin content is evaluated as the Klason Lignin (KL) level and lignin structure is evaluated by thioacidolysis.

Line	% KL	Main H, G, S and 5-OH G thioacidolysis monomers (total yield and relative mol%)				
		Yield	%H	%G	%S	%5-OH G
		($\mu\text{mol/g}$ KL)				
WT	19.57 $\pm$ 0.30	1258 $\pm$ 30	3.1 $\pm$ 0.2	29.3 $\pm$ 1.2	66.9 $\pm$ 1.1	0.8 $\pm$ 0.0
<i>Bd5139</i>	17.66 $\pm$ 0.93*	888 $\pm$ 31**	2.9 $\pm$ 0.2	36.4 $\pm$ 1.2**	55.6 $\pm$ 1.5**	5.1 $\pm$ 0.4**

Values are means $\pm$ SD from 3 different plants. The KL level is expressed as weight percentage of the stem cell wall residue. Asterisks indicate significant differences (*t*-test) compared to the WT value at * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$

Table 2. Lignin content and structure of cell wall residues (CWR) prepared from wild-type (WT, accession Bd21-3) and *Bd5139* whole grain samples. Lignin content is evaluated as the acetyl bromide lignin (ABL) level and lignin structure is evaluated by thioacidolysis.

Line	% ABL	Main H, G, S and 5-OH G thioacidolysis monomers (total yield and relative mol%)				
		Yield ($\mu\text{mol/g}$ ABL)	%H	%G	%S	%5-OH G
WT	3.66 ± 0.50	208 ± 27	5.9 ± 0.1	33.8 ± 2.7	60.2 ± 2.7	Tr
<i>Bd5139</i>	3.62 ± 0.15	$115 \pm 31^{**}$	6.2 ± 0.6	$39.5 \pm 1.8^{**}$	$44.1 \pm 2.4^{**}$	$10.1 \pm 2.6^{**}$

Whole grain samples correspond to the whole caryopsis with the adhering palea. Four biological replicates were prepared for each genotype, with 70 to 100 grains collected per replicate. Values are means $\pm$ SD. The ABL level is expressed as weight percentage of the sample cell wall residue. Tr: trace amount. Asterisks indicate significant differences (*t*-test) compared to the WT value at $^{**}p < 0.01$.

Table 3. Determination of *p* coumaric acid (CA) and of ferulic acid (FA) released by mild alkaline hydrolysis (NaOH 1M, room temp., overnight) of wild type (WT, accession Bd21-3) and *Bd5139* cell wall residues CWR prepared from mature stem or whole grain samples.

Line	Mature stem CWR		Mature whole grain CWR	
	CA mg/g	FA mg/g	CA mg/g	FA mg/g
WT	8.88 ± 0.41	5.25 ± 0.48	0.98 ± 0.1	1.83 ± 0.47
<i>Bd5139</i>	6.30 ± 0.66*	5.33 ± 0.17	0.59 ± 0.04*	1.55 ± 0.11*

Whole grain samples correspond to the whole caryopsis with the adhering palea. Four biological replicates were prepared for each genotype, with 70 to 100 grains collected per replicate. Values are means ± SD (n=3). Asterisks indicate significant differences (*t*-test) compared to the WT value at **p* < 0.05.

Table 4. Relative molar frequency of the *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), syringyl (S) and 5-hydroxyguaiacyl (5-OH G) monomers released by thioacidolysis of the cell wall residues from *Arabidopsis* mature stems. The examined genotypes (in the Col0 background) are the wild-type (WT) one, the *comt-1* mutant and three lines (Cp-line) obtained by complementation of the *comt-1* mutant with the mutated *BdCOMT6* gene.

Genotype	%H	%G	%S	% 5-OH G
WT	0.83 ± 0.02 ^a	69.3 ± 0.2 ^a	29.3 ± 0.4 ^a	0.51 ± 0.02 ^a
<i>comt-1</i>	0.84 ± 0.04 ^a	90.4 ± 0.6 ^b	2.40 ± 0.69 ^b	6.34 ± 0.09 ^b
Cp line 4-7	1.63 ± 0.10 ^b	59.6 ± 0.2 ^c	38.2 ± 0.3 ^c	0.59 ± 0.01 ^a
Cp line 7-5	1.74 ± 0.19 ^b	59.7 ± 0.3 ^c	38.0 ± 0.2 ^c	0.60 ± 0.02 ^a
Cp line 15-6	1.57 ± 0.12 ^b	58.7 ± 0.5 ^c	39.1 ± 0.4 ^c	0.61 ± 0.03 ^a

Values are means ± SD (with 3 biological replicates). Within each row, different superscripts indicate significant differences (one way ANOVA) at $p < 0.01$.

Table 5. Saccharification assays of wild type (WT, accession Bd21-3) and *Bd5139* cell wall residues CWR prepared from mature stem samples. Saccharification efficiency is measured as the weight loss induced by the enzymatic treatment (as percentage of the initial weight) and by the glucose released from the cell walls.

Line	Weight loss %	Glucose mg/g ^a
WT	23.0 ± 1.5	80.9 ± 3.1
<i>Bd5139</i>	27.7 ± 1.0**	97.7 ± 2.5**

Values are means ± SD (n=6 with 3 biological replicates, each one analysed as analytical duplicates). Asterisks indicate significant differences (*t*-test) compared to the WT value at ** $p < 0.01$.

^a expressed as anhydroglucose equivalent.

Figure legends

Figure 1: Maïle staining of stem cross-sections of *Brachypodium* WT (Bd21-3) and *Bd5139* lines. *Brachypodium* Bd21-3 (WT; A) and Bd5139 (B) stem cross-sections from 40 day-old plants were stained with the Maïle reagent that stains in pink S-lignin units. e: epiderm, if: interfascicular fibers, s: sclerenchyma, vb: vascular bundle.

Figure 2: Cytological observations of *Brachypodium* grain. *Brachypodium* Bd21-3 (WT) mature grain cross-sections. (A) Unstained sections of a whole grain with labelled frames indicating the corresponding areas in the subsequent parts of the figure. (B) Unstained section and (C) section stained with toluidine blue focusing on the testa area to visualize the two layers of the testa t1 and t2. (D) Unstained section focusing on one vascular bundle of the grain palea. (E) Section stained with phloroglucinol-HCl revealing positive staining in the palea epidermis and vascular bundle. (F, G, H) section stained with Maïle reagent revealing positive staining in the testa outer layer t2, in the palea epidermis and vascular bundle. (J) Section labelled with KM1 an antibody targeting a lignin β -5 structure and showing a positive signal in the testa and in the palea epidermis and vascular bundle, to be compared with (I) the corresponding control without primary antibody. al: aleurone, e: epiderm, ne: nucellar epidermis, p: pericarp, pal: palea, sc: silica cells, se: storage endosperm, t: testa, t1: testa inner layer pigmented, t2: testa outer layer not pigmented but lignified, vb: vascular bundle.

Figure 3: *Arabidopsis comt-1* complementation assays using mutated *BdCOMT6*. Stem cross-sections of *Arabidopsis thaliana* stained using the Maïle reagent to reveal S lignin units in pink. (A) WT (Col-0) with intense positive staining in lignified interfascicular fibers, (B) *comt-1* mutant depleted in S lignin units (negative Maïle staining), (C) *comt-1* line complemented with the mutated *BdCOMT6* gene under the control of the maize ubiquitin promoter (restoration of positive Maïle staining). Scale bar: 100 μ m (A,B,C).

Figure 1

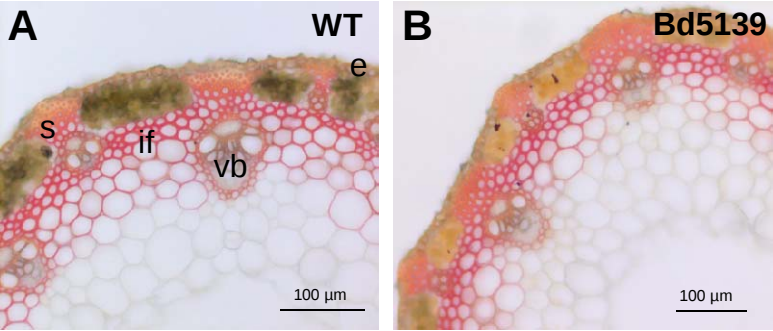


Figure 2

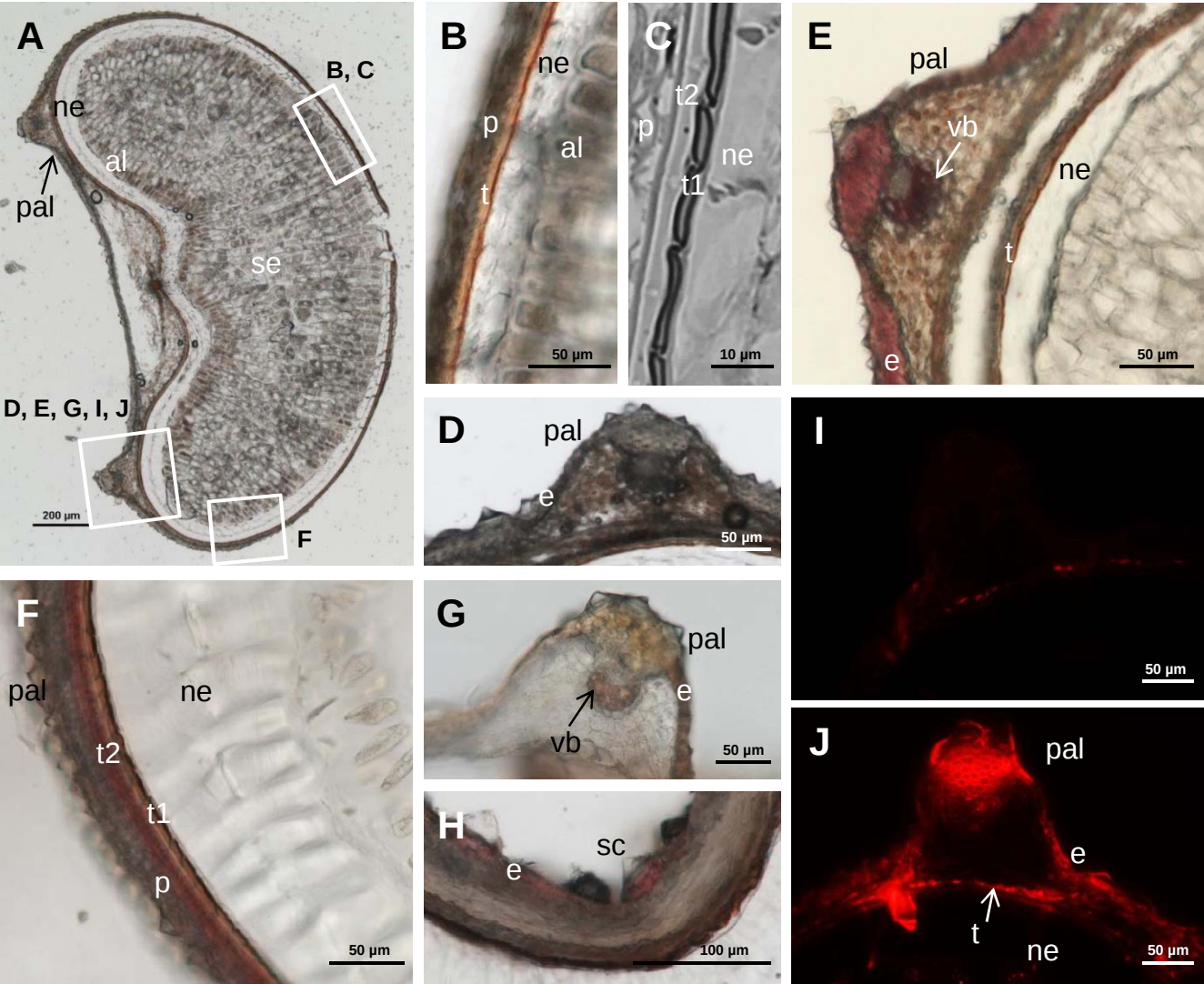
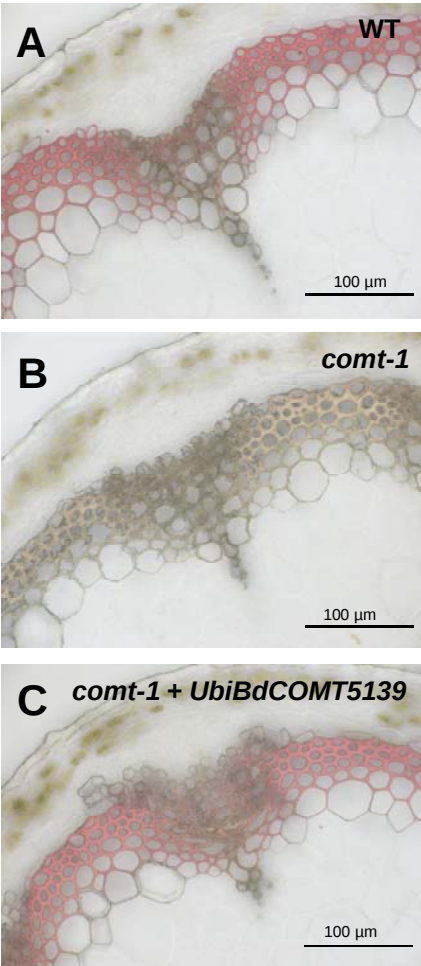


Figure 3



Thèse de Doctorat

Séverine HO-YUE-KUANG

Exploration des voies de biosynthèse de l'acide férulique dans les grains et tiges de *Brachypodium distachyon*

Exploration of ferulic acid biosynthesis pathways in grains and stems of *Brachypodium distachyon*

Résumé

L'acide férulique joue un rôle clé dans les parois cellulaires des *Poaceae* en permettant la réticulation des chaînes de polysaccharides entre elles et avec les lignines. La connaissance de sa biosynthèse peut améliorer l'usage des céréales en permettant de moduler les propriétés mécaniques des parois et leur digestibilité enzymatique. La plante modèle des *Poaceae*, *Brachypodium distachyon*, a été utilisée pour explorer les voies de synthèse de l'acide férulique. Une stratégie de génétique inverse a été mise en place afin d'étudier deux enzymes candidates, la COMT et la CCoAOMT sélectionnées pour leur capacité à produire *in vitro* respectivement l'acide férulique et le féruloylCoA. Ces OMT étant codées par des familles multigéniques, la sélection des gènes candidats a été basée sur des analyses phylogénétiques et transcriptomiques. Des lignées mutantes ont été obtenues par mutagenèse chimique et identifiées par TILLING pour le gène *BdCOMT6*. L'analyse de ces lignées a montré que *BdCOMT6* est une COMT impliquée dans la synthèse des lignines des tiges et des grains de *B. distachyon*. Elle ne serait pas impliquée dans la synthèse de l'acide férulique lié aux parois. Des lignées d'interférence ARN ciblant cinq gènes *CCoAOMT* appartenant à un clade spécifique des *Poaceae* ont été générées. De l'acide férulique lié aux parois a été détecté dans les tiges des plantes régénérées. L'analyse des générations suivantes est en cours pour déterminer la fonction de ces gènes. Les lignines des tiges de *B. distachyon* ont été étudiées en détail ces dernières années, ce travail de doctorat a permis de caractériser pour la première fois les structures des lignines présentes dans les grains.

Mots clés

Acides hydroxycinnamiques, COMT, CCoAOMT, lignines, xylanes, paroi cellulaire, *Poaceae*, céréales

Abstract

Ferulic acid plays a key role in grass cell walls, allowing the reticulation between chains of polysaccharides and with lignins. The understanding of its biosynthesis could improve cereals end-uses in allowing the modulation of the cell wall mechanical properties and enzymatical digestibility. The model plant of *Poaceae*, *Brachypodium distachyon*, was used to explore the ferulic acid biosynthesis pathways. A reverse genetic strategy has been established to study two candidate enzymes, the COMT and the CCoAOMT selected for their capacity to produce *in vitro* ferulic acid and feruloylCoA respectively. Since these OMTs are encoded by multigenic families, a selection of candidate genes has been performed based on phylogenetic and transcriptomic analyses. Mutant lines have been obtained through chemical mutagenesis and identified by TILLING for the *BdCOMT6* gene. The analysis of these lines showed that *BdCOMT6* is a COMT involved in lignin biosynthesis in *B. distachyon* stems and grains. However it would not produce the ferulic acid linked to cell walls. RNA interference lines targeting five *CCoAOMT* genes belonging to a *Poaceae* specific clade have been generated. Ferulic acid linked to stem cell walls was detected by preliminary analyses of the regenerated plants. Complementary analyses of the next generations are in progress, they will allow to determine if these *CCoAOMT* genes have a role in the biosynthesis of ferulic acid linked to cell wall. Lignins have been studied in details over the last few years, only stem lignins were characterized in *B. distachyon*, this doctoral work allowed to precisely characterize, and for the first time, the structure of the grain lignins.

Key Words

Hydroxycinnamic acids, COMT, CCoAOMT, lignins, xylans, cell wall, *Poaceae*, cereals