



**HAL**  
open science

## Variabilité biologique des lignines

Bernard B. Monties

► **To cite this version:**

Bernard B. Monties. Variabilité biologique des lignines. Cellulose Chemistry and Technology, 2005, 39 (5-6), pp.341-367. hal-02672471

**HAL Id: hal-02672471**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02672471v1>**

Submitted on 31 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## VARIABILITÉ BIOLOGIQUE DES LIGNINES

BERNARD MONTIES

*INRA: Equipe Parois Végétales et Matériaux Fibreux, CRA, 51686, Reims*

*INA P-G: Chaire de Chimie Biologique, Campus de Grignon, 78760, Thiverval-Grignon, France*

This paper is dedicated to Prof. Cr. I. Simionescu to greet his tenacious and steady contribution to the development of open and free scientific exchanges, 'dans le respect de la diversité culturelle de chacun'.

Received February 24, 2004

This review is strictly focussed on macromolecular chemistry views concerning the relations between the molecular structure of lignins, the possible self-organisation of lignin networks during plant cell walls lignification and the mechanical properties of woody plants and of their related products (pulp and papers, wood as composite material). Recent advances in genetic manipulations and biotechnological improvement of lignification cell walls and related products is emphasized as introduction. Then, the molecular organisation of lignins, the supramolecular aspects of lignification and, finally, some mechanisms of chemical morphogenesis and biomimetic synthesis are reviewed. A spatial-temporal model, combining activation and inhibition effects, is proposed to account the formation of lignin clusters observed during *in situ* lignification and *in vitro* synthesis of lignin polymers (DHP). This model and the corresponding molecular organisation hypothesis are discussed in relation to the so called 'self-organisation' effects, as depending on the cooperative interactions between cell wall components, including water, on autocatalytic initiation of lignin polymerisation by peroxidases, and on some physical and chemical intermolecular chain arrangement and rearrangement observed or suggested to occur during chemical pulping and mechanical deformation of wood. An English translation of this paper, more exactly expressed here in French, is in preparation for 'Internet open access', as the last of three reviews concerning the 'biological variability the states and processes of lignification' and the corresponding 'mechanical behaviour of woody plants and products'.

**Key words :** plant cell wall, xylem, morphogenesis, self-organisation, cooperative interactions, metachromatic behaviour, paper, wood material, cellulose, hemicellulose, pectin, lignin, lignin polysaccharide complex, LCC, DHP, fibre.

## INTRODUCTION

Durant ces vingt dernières années, les progrès significatifs en matière de biologie moléculaire végétale ont permis de mieux connaître la multiplicité des voies de métaboliques ainsi que la complexité des mécanismes génétiques qui contrôlent la biosynthèse des unités monomères constitutives des lignines. Complémentaires des connaissances établies déjà par les chimistes, polyméristes et mécaniciens des tissus de soutien végétaux, des bois, des pâtes et des papiers, ces avancées ont suscité de grandes espérances en matière de valorisation de ces composés lignocellulosiques naturels et de leurs produits dérivés : bois, papiers. De nombreuses publications et revues détaillées ont illustré cet engouement et les espoirs suscités par la possibilité de manipulation génétique de la lignine et des propriétés de ces produits lignifiées : seulement quatre d'entre elles, parmi les plus récentes et exhaustives, ne sont citées ici qu'à titre d'exemples,<sup>1-4</sup> faute de place.

Dans les domaines moléculaires de la biologie, des manipulations génétiques avancées ont, en effet, contribué à faire mieux identifier la diversité des 'lignines transformées', la variabilité des parois lignifiées correspondantes ainsi que la plasticité génétique et épigénétique des états et des processus de lignification. Par contre coup, elles ont aussi conduit, à retrouver plus exactement et à reconnaître plus généralement, certains aspects caractéristiques des 'lignines naturelles' déjà bien identifiés et définis<sup>1</sup> dans les végétaux non transformés. Telles sont par exemples, dans les domaines de la biochimie, la variabilité de leur composition monomérique et des types de liaisons entre monomères des diverses lignines<sup>1,5</sup> ainsi que, dans les domaines de cytochimie et biologie générale, leurs différents types de localisation subcellulaire et de morphologie tissulaire observées entre les cultivars, les variétés, les espèces, les écotypes et les mutants.<sup>3,6</sup> Ces caractéristiques originales étaient pourtant déjà très clairement envisagée et discutée en détail dans les ouvrages 'anciens', édités respectivement dès 1952 et 1971 par F.E. Brauns et par K.V. Sarkanen,<sup>7,8</sup> par exemple.

Dans la perspective actuelle de valorisations des composés lignocellulosiques évoquées plus haut, la situation est pourtant devenue plus compliquée en terme de l'interprétation des résultats de ces transformations et donc de la prévision des effets de ces manipulations génétiques.

Ainsi, au plan de la prévision des résultats tant mécaniques que papetiers, des effets spécifiques et parfois très spectaculaires, d'ingénierie génétique ont été prévus et obtenus quand à la composition en monomères et leurs modes de liaisons entre monomères.<sup>2,4</sup> Concernant des gènes particuliers à la biosynthèses des monomères, ces transformations pourtant bien ciblées, ont cependant permis de constater l'existence de multiples 'autres effets imprévus' sur les lignines en tant que polymères,<sup>9a</sup> ainsi que sur les parois végétales en tant que systèmes macromoléculaires organisés.<sup>9b</sup> Ces effets inattendus sont en général globalement expliqués en termes d'interactions et régulations métaboliques<sup>10</sup> et génétiques.<sup>3</sup> Des effets comparables, de types pléiotrope et épigénétique ont été d'ailleurs rapportés

aussi chez des mutants et cultivars de plantes non manipulées.<sup>11-13</sup> Affectant la structure et la biosynthèse et donc l'organisation pariétale non seulement des lignines, mais aussi des celluloses et des autres polymères osidiques, ces observations ont rendu plus difficile l'analyse moléculaire de ces effets, et donc la prévision fine des propriétés ultimes des parois végétales et des produits dérivés. Elles confirment encore,<sup>9a, 9b, 11, 12</sup> la nécessité de prendre plus finement en compte les mécanismes physico-chimiques d'organisation macromoléculaire 'spontanée' de ces systèmes, dont la diversité est souvent encore dissimulée sous le concept unitaire de 'autoorganisation'. De plus, ces observations laissent souvent sans réponse, la question du contrôle et de la régulation, par un ou plusieurs facteurs, de ces processus et des états correspondants de lignification. Bien que essentielle<sup>3</sup> en vue de la maîtrise ultime de la qualité des parois et produits lignocellulosiques, cette dernière question n'est pas considérée dans cette revue qui concerne surtout le domaine de la biochimie structurale. En dépit de ces limites, des relations originales et significatives ont été mises en évidence entre les 'propriétés de produits lignifiés' et 'les variations d'organisation moléculaires, au sens large, des lignines'. La grande variabilité de la lignification est maintenant ainsi bien démontrée<sup>1-6</sup> tant au plan de la production biologique que de celui des transformations technologiques. Dans le domaine de la papeterie, ce fait a été clairement exprimé par D. Dimmel et col.<sup>13a, 13b</sup> qui ont souligné, que '*la composition et la structure des lignines peuvent être manipulées bien au delà de ce qui avait été anticipé autrefois*' et que '*certaines qualités inusuelles des produits pourraient résulter de modifications du mode de dépôt des composantes des parois végétales en réponse à, et en compensation de, l'altérations de la structure de la lignine*'; ces deux aspects sont précisés par la suite.

Dans le domaine de la mécanique des parois végétales et de la technologie du 'bois-matériau', ces deux remarques sont tout autant applicables. Cependant, concernant l'interprétation des observations et la prévision des effets de transformations biotechnologiques, l'analyse des relations entre 'structure moléculaire' et 'propriété mécanique' est plus compliquée encore puisque les connaissances macromoléculaires des lignines sont beaucoup moins avancées que dans le domaine papetier. En matière d'effets moléculaires mécaniques de 'la' lignine, les analyses n'étaient qu'à peine ébauchées il y a quelques décades.<sup>7,8</sup> Elles ne sont encore actuellement que rarement pratiquées et interprétées en termes d'interactions moléculaires, de structures macromoléculaires et surtout d'organisation spatiale<sup>14,15</sup> des constituants des parois végétales. Actuellement, les comportements macromécaniques des bois et composites lignocellulosiques peuvent pourtant être représentés précisément au moyen de relations mathématiques multivariées prédictives des comportements des couches subcellulaires;<sup>16</sup> ils sont aussi analysés au plan micromécanique, en termes d'ultrastructure orientée des fibres végétales dans les couches pariétales et des interactions entre les polymères constitutifs des bois.<sup>9b, 16, 17</sup> Parallèlement, le

comportement mécanique des composantes fibreuses de celluloses amorphes, soit indépendantes soit réticulées, peut être fidèlement simulées<sup>18a,b</sup> grâce aux procédures de mécanique moléculaire qui permettent de prévoir quantitativement l'importance des effets de déformations, de glissement et de fluage entre les chaînes polymères cellulosiques. Ces modélisations ont conduit à souligner l'importance mécanique générale des dimensions des interfaces, 'interphases polymères', dans les parois cellulaires des bois.<sup>19</sup> De plus, l'importance mécanique de tels effets aux 'interphases' est en accord avec les observations résultant de synthèses biomimétique récentes de composites mécaniquement résistants, comparables aux complexes lignine-polyosides naturels, et réalisés autant après modification de la surface de fibres cellulosiques<sup>20</sup> que après des mélanges avec des polymères naturels, amidons, que artificiels.<sup>21</sup> L'ensemble de ces données ouvre donc, malgré tout, des perspectives encourageantes de modifications tant biomimétiques que biotechnologiques des propriétés mécaniques et de l'organisation dite 'spontanée' des systèmes lignocellulosiques.

En fait, il s'agit là d'effets généraux d'auto-organisation, reconnus largement par ailleurs en biochimie<sup>22a,b,c</sup> et plus récemment en génomique appliquée.<sup>23</sup> Au plan strictement macromoléculaire de l'organisation des parois végétales secondaires et de leur lignification, ces potentialités peuvent être par exemples, déjà clairement illustrées: 1) au niveau organisation, par l'agencement hélicoïdal préférentiel de xylanes et de microfibrilles cellulosiques ensuite consolidé par lignification,<sup>14</sup>: 2) au niveau morphogenèse, par l'organisation progressive dans la paroi végétale *in vivo* de complexes lignine-hémicellulose sous forme de 'modules tubulaires' constituées de structures ressemblant à billes alignées, 'grains en chapelet'<sup>15</sup> et enfin: 3) au niveau biomimétique, par l'organisation spatio-temporelle *in vitro* de dehydropolymères modèles de lignines (DHP) tant à l'interface air/eau 'liquide'<sup>24</sup> que en phase 'solide' pecto-cellulosique;<sup>25</sup> ces trois aspects sont précisés par la suite.

## OBJECTIF DE LA REVUE

Orientée par des perspectives de chimie macromoléculaires applicables aux propriétés mécaniques des parois et produits lignifiées, cette revue concerne avant tout les points de vue envisagés plus haut d'organisation et de morphogenèse chimique et biomimétique. Appliquée aux domaines papetiers et bois-matériau, elle vise les aspects moléculaires d'organisation et de morphogénèse des lignines tant *in vitro* que *in situ*, en prenant pour base quelques articles 'choisis' en complément des références citées en Introduction. En aucun cas, cette revue ne prétend donc à exhaustivité. Elle correspond plutôt à une version détaillée d'hypothèses présentées oralement par ailleurs, avec résumé,<sup>26</sup> concernant la 'Variabilité chimique et biologique des états de lignification' qui à fait suite à des revues plus biologiques.<sup>9,11,12</sup>

L'accent est donc mis ici sur la possibilité d'effets d'autoorganisation, impliquant des interactions moléculaires 'coopératives', susceptibles de conduire par autocatalyse à la formation de structures organisées,<sup>15,25</sup> d'agrégats résultant d'associations intermoléculaires 'colloïdales'.<sup>7,8,22</sup> C'est dans la perspective d'identification d'interactions moléculaires internes et externes à des complexes lignine-polyosides que sont envisagées par exemples ensuite, l'organisation des lignines d'échantillons de bois déstructuré par contrainte mécanique,<sup>27</sup> celle de structures fibreuses lignifiées tant *in situ*<sup>14,15</sup> que *in vitro*<sup>24,25</sup> et celle de tiges de mutants d'*Arabidopsis*<sup>28a</sup> et de *Riz*<sup>28b,c</sup> dont la déficience en cellulose est corrélée à des augmentations de teneurs globales en hémicelluloses et lignines sans que le déterminisme de ces 'effets de lignification' soit encore expliqué en termes de génétique appliquée aux particularités macromécanique du végétal.<sup>9b,12</sup>

## ORGANISATION ET PROPRIETES DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES

Une des difficultés majeures rencontrée au plan structure moléculaire lors des tentatives d'explication des relations 'structure-propriétés' des composés lignocellulosiques est classiquement représentée par l'emboîtement hiérarchisées d'éléments, allant de 'l'échantillon de bois' aux 'molécules' tout en passant par les 'fibres végétales' et les 'couches subcellulaires'. Les figures 1 de deux articles cités<sup>17,23</sup> illustrent bien cet aspect. En effet, elles présentent ces 'éléments' constitutifs des parois végétales, rangés par ordre de taille, depuis la tige à la molécule. Au risque de devenir 'illisibles' de telles figures ne peuvent cependant pas rendre compte aussi, des interactions multiples, inter- et intra- éléments, qui font de la 'structure composée' représentée un 'système', c'est-à-dire un '*ensemble dans lequel du fait de ses interactions, chacun des éléments perd toute ou partie de l'individualité symbolisée par l'image individualisée, artificielle et donc parfois artéfactuelle, qui spécifie chacun de ses éléments*', et qui ne leur est conférée que par le mode même de représentation. Outre l'énorme disparité d'échelle des tailles entre ces éléments, du nanomètre au centimètre, c'est surtout par la prise en compte de ces interactions, que sont donc abordées ici, les relations entre propriétés mécaniques et l'organisation macromoléculaire des composés lignocellulosiques.

Dans le domaine papetier, le caractère réussi, original et très significatif de certaines transformations génétiques réalisées a déjà été souligné en Introduction. Dans le cas de Peupliers 'transgéniques' pour la biosynthèse de différents monomères de lignine,<sup>2,30</sup> il a, par exemple, été possible d'expliquer les avantages techniques des conditions de mise en pâte, 'pulpage' chimique et de blanchiment, par des variations de 'simple' composition moléculaire des lignines (teneurs en liaisons  $\alpha$ - et  $\beta$ -aryl-alkyl-éther labiles ainsi que en fonctions phénoliques ionisables) sans avoir à prendre en compte leur 'complexe' organisation supramoléculaire. Par

contre, dans le cas des performances macromécaniques, résistance à l'éclatement, à la traction de formettes des pâtes chimiques et surtout des pâtes mécaniques correspondantes, le degré de condensation des lignines s'est avéré bien moins discriminant et des propriétés physiques macromoléculaires telles que la transition vitreuse des lignines et le gonflement des polyosides ont du être impliqués, surtout dans le cas des pâtes mécaniques.<sup>30</sup> Un type d'effets semblable a été rapporté dans le cas cette fois de mutants 'naturels' de Pin, <sup>13a,b</sup> dont les caractéristiques macromoléculaires des lignines ont été analysée avec plus de détails, isolement et mesure de 'masses moléculaires' et de volumes hydrodynamiques de fractions de lignine, comparaison des cinétique des trois phases de cuissons alcalines et kraft, indice  $\chi$  de permanganate des pâtes, formation et aspects de feuilles et formettes. Des différences significatives de qualité de ces produits ont été décrites et rapportées non pas seulement à la composition moléculaires des lignines et des polyosides mais aussi aux modifications correspondantes de leurs propriétés macromoléculaires et des interactions entre ces polymères ainsi qu'à l'arrangement spatial des 'fibres' dans les formettes de papiers. Bien que établies pour le moment sur la base de comparaisons d'un nombre limité d'arbres, ces données démontrent, sans ambiguïté, l'importance des modifications du mode de dépôt, morphogenèse, des divers polymère dans les parois végétales en réponse aux modifications génétiques et épigénétiques,<sup>12</sup> corrélatives à l'altérations de la 'structure' de la lignine'; tel est certainement aussi le cas des mutants d'Arabidopsis et de Riz 'à tiges cassantes', cités plu haut. De nettes différences ayant été de plus observées sur ces effets en fonction de l'âge, du génome et de la provenance de ces Pins mutants, ainsi que des Peupliers transgéniques, l'ensemble de ces résultats conduit à souligner l'importance des conditions biologiques de développement et donc des modalités de leur morphogenèse, tant biologique que chimique, envisagée ici ensuite.

A ce titre, l'importance relative des mécanismes de déformation entropiques des fibrilles élémentaires de cellulose, qui sont susceptible d'expliquer le retrait longitudinal des fibres papetières pendant leurs délignifications industrielle,<sup>30 a-c</sup> mérite une évaluation beaucoup plus fine. Il en va de même pour l'application de théories plus 'modernes', percolation dans les réseaux polymères par études de diverses délignifications papetières en réacteur à écoulement, qui ont confirmé l'existence d'au moins deux 'types de lignines' suggérée bien avant.<sup>7-9a-b,12</sup> Ces études ont permis, en effet, d'identifier deux sortes de fractions de réseaux polymères, 'gel de lignine', de polydispersités et dimension fractales différentes et qui proviendraient respectivement de la lamelle mitoyenne et de la paroi secondaire cellulaire.<sup>31</sup>

Dans le domaine du bois matériaux, le récent compte rendu de conférence de la Société Européenne de Mécanique du Bois édité par L. Salmen, l'ensemble des communications sur le thème 'Micromecanics' et les publications plus spécifiques de cet auteur<sup>17,32</sup> ainsi que d'autres déjà cités<sup>12,16,19</sup> ont montré sans ambiguïté l'importance de l'orientation préférentielle des diverses composantes polymères fibreuses et amorphes, y compris des lignines<sup>16,17,20,32 b,c</sup> dans l'explication des

performances mécaniques statiques et dynamiques des bois 'natifs', non transformés, et des matériaux dérivés. La situation est tout aussi clairement illustrée dans les cas de plantes transgéniques et de mutants, déjà évoqué plus haut. Dans le cas des mutants à tige cassantes d'Arabidopsis,<sup>28a</sup> de très significatives réductions de la contrainte maximum et du module de flexion trois points, des tiges ont été observées et mises en corrélation avec une forte réduction de leur teneur en cellulose, sans que soit cependant observée de nette variations des teneurs globales en hémicellulose et lignine, ce qui n'est cependant pas le cas chez les deux mutants de Riz.<sup>28b,c</sup> Pour expliquer la faible résistance relative des tiges d'Arabidopsis mutants à la compression, en absence de variations claires de lignification et alors que les teneurs en lignines sont couramment corrélées à ce mode de résistance, dans les bois de compression par exemple,<sup>27, 33</sup> il est raisonnable d'admettre avec ces auteurs que c'est l'organisation spatiale même des lignines, qui est modifiée en conséquence de la déficience correspondante de la structure cellulosique. Dans le cas des Riz mutants, par contre, une 'compensation' mécanique par lignification est envisageable; elle pourrait résulter non seulement d'un effet 'quantitatif' de masse de matière mais aussi 'qualitatif' de réticulation, d'organisation spatiale et de réarrangement spatial des enchaînements polymères pariétaux. Cette hypothèse, qui mérite cependant validation, est cohérente avec de nombreuses autres observations biologiques, concernant a: l'orientation anisotrope des monomères des lignines au contact des fibres cellulosiques, b: la réorientation de fibres cellulosiques des parois secondaires en cours d'épaississement lors de leur lignification, c: la modification par des inhibiteurs de la biosynthèse des celluloses, des modalités de dispersion des lignines dans les trachées vasculaires de Zinia, et enfin d: la similitude de comportement avec d'autres mutants à tige cassantes, Riz et Fétuques, qui ont déjà été revus par ailleurs.<sup>9a,b,11,12</sup>

De plus, toujours dans la perspective de la caractérisation fine des propriétés mécano-chimiques des assemblages lignocellulosiques, il est important de considérer aussi l'existence d'effets de solvatation *in situ* des composantes polymères par des molécules 'simples', de l'eau en particulier. L'existence d'intenses effets mécaniques de plastification de systèmes polymères par solvatation et hydratation a été clairement décrite et précisée depuis longtemps de façon générale<sup>34</sup> ainsi que dans les cas spécifiques de fibres papetières<sup>30a,b</sup> et des bois.<sup>17</sup> Une illustration complémentaire est fournie par les modifications des propriétés viscoélastiques de tiges de Tabacs pourtant peu lignifiées,<sup>35</sup> induites par manipulation génétique de lignification. Comparant les modes de relaxation des contraintes et les composantes des modules viscoélastiques dynamiques des xylèmes normaux et manipulés de ces tiges à différentes vitesses, humidités et températures, les auteurs ont observé des comportements reproductibles, mais différents de ceux de bois mature. Ces comportements rappellent ceux de gels peu réticulés ou de solutions de polymères très enchevêtrés. L'existence d'importants effets de déformation permanente, observés surtout chez les plantes modifiées



conduit donc à admettre, avec ces auteurs, une réduction du degré de réticulation des polymères pariétaux dans les transformants, en particulier celle de leurs éventuels complexes lignine-hémicellulosiques. Comme de plus ces effets dépendent de la température et sont accentués à l'état humide, il est justifié d'admettre aussi, au niveau moléculaire, l'existence d'un déploiement par fluage sous contrainte des chaînes polymères, 'désenchevêtrement', facilité par l'hydratation, 'plastification', de ces enchaînements. Ces chaînes et complexes polyosidiques éventuellement lignifiés, seraient ainsi préalablement repliés en 'pelote', dans l'état 'natif' du xylème. Alors que nombre d'autres possibilités d'explications sont évoquées par les auteurs, un tel modèle par 'déploiement - repliement', classique<sup>34</sup> et simple, semble suffisant et cela, même si les interprétations proposées par ces auteurs des résultats d'extraction, d'identification et de plastification chimique d'une 'fraction' de lignine, dites 'soluble', exige absolument validation.

Au total, et quelles que soient donc les interprétations sur ces derniers points, ces observations, jointes aux précédentes, confirment l'intérêt de tenter de formuler plus en détail, *au niveau moléculaire*, des '*possibilités d'interactions susceptibles d'affecter les propriétés supramoléculaires des systèmes lignocellulosiques*'. A ce titre, trois aspects structuraux, évidemment non exhaustifs, sont donc abordés par la suite; ils concernent, respectivement, l'organisation supramoléculaire puis la morphogénèse chimique et biologique d'agrégats de lignines et enfin, pour terminer, des aspects plus biologiques, hétérogénéité correspondante des fractions de lignine et mécanisme de peroxydases amorçant la polymérisation des précurseurs phénoliques.

## **STRUCTURE ET ORGANISATION DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES**

Concernant d'abord, l'organisation supramoléculaire des lignines *in situ* tout en restant dans le domaine de la macromécanique des bois, des observations cytochimiques faites après coloration métachromatique de faciès d'organisation d'échantillons de fibres papetières isolées<sup>36</sup> et de bois avant<sup>37-39</sup> et après contrainte mécanique<sup>27</sup> permettent de préciser le premier aspect. En effet, des travaux parfois relativement anciens et confirmés ont démontré de nettes différences, 'séparations de couleur', de coloration induites par des colorants définis en présence de différents substrats. Ces séparations sont dépendantes à la fois de la concentration en colorant cytochimique, de l'état du 'milieu solvant' environnant et du traitement physico-chimique préalable des substrats observés et, ici lignifiés. Ces observations ont été interprétées en terme d'association-dissociation des molécules de colorants au contact de ces objets, donc en fonction de la réactivité de surface des interfaces correspondantes, et donc aussi en particulier ici, de celles des lignines. Ainsi, dans

le cas de fibres papetières isolées,<sup>36</sup> des variations de couleurs du rouge au vert clair, 'métachromatisme', d'acridine orange adsorbée sur des fibres, thermo-mécaniques et chimiques, ont été attribuées à la présence de lignines parce que la fraction 'cellulosique' n'est pas alors affectée. L'intensité de ces variations a été corrélée aux quantités de lignine résiduelle liée à ces fibres papetières purifiées. Ces effets métachromatiques sont donc attribués à l'adsorption du colorant sous formes respectivement de monomères pour la couleur verte et de dimères et oligomères pour la couleur rouge. Dans le cas de désorganisations mécaniques par contrainte délibérée<sup>27</sup> ou accidentelle lors de coupes cytologiques<sup>37,38b,39</sup> ou de prétraitement chimiques,<sup>38a</sup> des effets métachromatiques analogues, qui peuvent être aussi envisagés comme des artéfacts analytiques,<sup>9b</sup> ont été décrits avec d'autres molécules simples colorantes et/ou fluorescentes. Spécifiquement rapportées à l'état local de la lignification et non pas seulement aux quantités globales de lignines, ces changements de colorations ont été aussi attribués à la rupture de liaisons entre lignine et cellulose démasquant cette dernière.<sup>27</sup> Attribuables aussi à l'existence d'associations réversibles entre molécules adsorbées de colorants, elles semblent donc résulter d'interactions plutôt supra- et macro-moléculaires colloïdales, impliquant des complexes ligno-cellulosiques pariétaux au sens large. Dans la première perspective, la possibilité de rupture mécano-chimique de liaisons de valence, avec formations de radicaux libres et désorganisation de la phase lignifiée supportée, ne peut être exclue a priori.<sup>40</sup> La possibilité et même l'activation de tels clivages de liaisons covalentes lors de confinement de sites réactifs aux interphases est en effet démontrée expérimentalement.<sup>41,42</sup> Cependant, la possibilité de modification des modalités d'interactions non covalentes, de type ioniques, hydrogène et surtout dipolaires à courte distance, dites 'hydrophobes', semble au moins tout autant à prendre en considération dans la mesure où chacune d'elle est susceptible de faciliter l'organisation de systèmes supramoléculaires stabilisés par interactions de coopérativité lors de la formation de ces liaisons. Cette dernière modalité conférerait ainsi au processus moléculaire global d'organisation le caractère spontané d'autoorganisation observé. Dans ces conditions, la possibilité d'intercalation de molécules monomères de colorants par 'face à face' entre les cycles aromatiques des lignines dans les agrégats préexistants des réseaux polymères de lignine reste possible ; elle a été clairement démontrée.<sup>43</sup> Ce dernier mécanisme est suffisant pour rendre compte des différents effets métachromatiques cités plus haut, par un effet non covalent, dit 'monomérisant', attribués aux lignines 'natives'. Déplaçant les équilibres d'associations, dimérisation non covalente, établis en phase aqueuse entre molécules monomères de colorants, la combinaison de ces interactions provoquerait la recombinaison d'associations stables inhibant le métachromatisme, même en milieu aqueux concentré. Cependant, il est vraisemblable que le processus de 'monomérisation' soit en fait plus compliqué comme semblent l'indiquer quelque observation spectroscopique des interactions

entre des colorants et des complexes lignine- hémicelluloses pectiques, des lignines et même des acides phénoliques.<sup>44a,b,c,45</sup> Ces dernières observations suggèrent, en effet, l'existence de transferts électroniques et complexes par transfert de charges dont les particularités ne peuvent être discutées davantage ici. Visant surtout les aspects mécano-chimiques des parois lignifiées, ces données et hypothèses conduisent à expliquer, au moins en grande partie, ces effets métachromatiques mécaniques<sup>27,37,38b</sup> par des modification de l'organisation même des lignines déposées au cours de la biosynthèse au contact du 'réseau fibreux cellulosique', au sens large. Une telle réorganisation serait ainsi induite en conséquence de la déformation par 'déploiement-repliement', des structures fibreuses lignifiées qui seraient donc ensuite susceptibles de stabilisations ultérieures, biologique et/ou technologique, évoquée en Introduction.<sup>13,14,19,28</sup> Les facteurs, 'moteur moléculaires', en seraient donc surtout la réorganisation sous contrainte des interactions hydrogènes et à courte distance consécutives au dépliement par fluage relatif des chaînes polymères en particulier polyosiques,<sup>34,18a,b</sup> mais aussi très vraisemblablement des fractions les plus souples, peu réticulées et plus linéaires, des réseaux lignines.<sup>12,31,35</sup> Le mécanisme mis en jeu serait alors analogues à ceux déjà analysés et bien admis dans le cas des acides nucléiques<sup>46</sup> et plus récemment étendu à des structures composites d'hétéroglycanes, de protéiques fibreuses<sup>63</sup> mais aussi globulaires plus ou moins repliés des ARN et ADN.<sup>47</sup> Les effets métachromatiques observés après désorganisation mécaniques du bois<sup>27</sup> résulteraient alors de la désorganisation des agrégats de lignines induite par la déformation par extension irréversible des chaînes polyosidiques non cristallines pariétales. Ces dernières seraient auparavant statistiquement repliées en pelote dans leur état biosynthétique 'natif'. Les molécules de colorant adsorbés auraient d'autant plus de possibilité d'interactions stables que elles seraient supportées à distance et donc encore 'monomérisées' par les chaînes plus souples des 'pelotes repliées' polyosidiques, à la stabilisation des quelles elles contribueraient de plus. Sur cette base, il semble raisonnable d'admettre l'existence d'une '*organisation supramoléculaire concertée*' entre les réseaux de lignines et ceux des structures fibreuses non seulement glycosiques et hémicellulosiques mais aussi protéiques qui préexistent dans les diverse couches des parois primaires végétales. De tels effets concertés pourraient avoir lieu autant durant le 'dépôt' des lignines par biosynthèse, que après lors du vieillissement et les transformations industrielles technologiques par voies mécaniques et ou chimiques des produits lignocellulosiques. Seul, le premier de ces aspects est envisagé par la suite.

Enfin, et toujours en terme d'organisation, la présence d'importantes quantités relatives d'eau, déjà envisagée plus haut, eau dite 'libre', de 'solvation', de 'structure', etc. ..., dans tous ces produits mérite d'être soulignée, l'eau devant être de ce fait considérée, au même titre que les polymères majeurs en masse, comme une des quatre 'éléments' qualitativement majeurs et intégrant des

'systèmes' ligno- héli-cellulosiques. Extrapolant aux monomères et surtout aux oligomères phénoliques moins polaires des lignines, une des relations formulée récemment à propos du comportement des colorants métachromatiques,<sup>47</sup> il semble possible de représenter le comportement associatif des complexes solvatés entre 'les' lignines : L, et 'les' fibres cellulosiques : C, en milieu solvant : S, ici l'eau, par la relation (1):

$$(1) \quad (L - S) + (P - S) = (LC - S) + (S - S)$$

dans laquelle S représente non pas la seule molécule d'eau mais ses agrégats supramoléculaires. Une telle relation suffit pour exprimer ici, le fait que des réarrangements du 'solvant' aux interphases de ces composantes, interviendraient tout autant en terme d'organisation, structurale et thermodynamique, qu'interviendraient aussi des réarrangements des polymères, eux même solvatés, lors des transitions d'état et de déploiement – repliement de leurs chaînes sous contraintes, envisagés plus haut. Faute de données quantitatives plus précises sur ces complexes LC, il n'est pas possible d'en prolonger davantage la discussion. Au total, il suffit alors de souligner que de nombreuses publications peuvent dès à présent servir de base pour aborder, sous ces aspects d'organisation moléculaire, les mécanismes chimiques et biologiques qui déterminent la mise en forme des lignines en présence de polymères osidiques. C'est le cas pour des polyosides plutôt 'acides', hémicellulosiques et riches en pectine,<sup>14,25,44a,b</sup> de ceux plutôt 'neutres', à base de celluloses,<sup>13, 17, 18, 20, 21, 29</sup> tous considérés comme 'hydrophiles' alors que la polarité des lignines serait de l'ordre de celle d'alcools à courte chaîne: propanol,<sup>25</sup> et cela, sans oublier l'existence de fonctions ionisables de type carboxyles et surtout phénoliques dont l'acidité activée par des effets de confinement<sup>42</sup> justifierait les effets métachromatiques de 'la' lignine avec les 'colorants basiques'.<sup>9b,36-39</sup>

## STRUCTURE ET MORPHOGENESE DES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES

L'existence d'arrangements structuraux caractéristiques de 'la' lignine dans les parois végétales à l'échelle du micromètre est établie depuis longtemps.<sup>7,8,14</sup> Des données précises concernant la morphogénèse des parois lignifiées et la mise en forme des lignines en présence des microfibrilles cellulosiques, à l'échelle supramoléculaire du nanomètre, n'ont pu être obtenues que récemment.<sup>14,15,51</sup> Elles montrent que, en présence de fibres cellulosiques, la lignification est distribuée, parfois très régulièrement, sous forme d'agrégats, de granules de lignine, de tailles diverses de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, et qui suivent l'orientation des microfibrilles. En accord avec les publications moins récentes, ces observations

sont interprétées, comme indiquant que l'organisation et donc la polymérisation des lignines est affectée mais affecte aussi celle des polyosides pariétaux préexistants. A ce titre, les données et conclusions de N. Terashima et de ses collaborateurs<sup>15</sup> sont très significatives au plan de la formation de 'lignine macromoléculaire'. Dans le cas du xylème d'un type de conifère, *Gingko*, ces auteurs ont montré l'existence de dépôts granulaires, alignés en chapelet au long des microfibrilles de celluloses qui sont elle même engainées de diverses hémicelluloses. Ils ont fourni une estimation des dimensions respectives de ces grains, 'modules de lignine', et de la part relative des ces composantes en suggérant des possibilités d'un contact 'intime' entre hémicelluloses et lignines. Ces dernières seraient ainsi synthétisées et réparties de façon hétérogène. Soulignant aussi l'existence, en cours de lignification, d'un alignement relatif et régulier de ces 'grains de lignine' dans les couches de la paroi secondaire, mais non pas dans les coins plus lignifiés des même cellules, ces auteurs ont de plus admis l'existence de sites de 'nucléation', point d'amorçage localisé de la polymérisation des lignines, qui serait dans ces conditions, déterminée par la structure moléculaire répétitives d'hémicelluloses spécifiques, en accord à d'autres publications.<sup>4,51b</sup>

Significatives et importantes au plan expérimental, les observations de ces auteurs concernant la morphologie et la variété de répartition des 'grains de lignine' *in situ* méritent aussi commentaire au plan méthodologique. Bien que établies et discutées de façon extrêmement précise et rigoureuse, ces interprétations et hypothèses ne sont fondées, pour le moment en effet, que sur des observations cytochimiques d'un seul type de bois mature. Très encourageantes, elles méritent cependant validation en terme de structure moléculaire par d'autres méthodes et d'autres plantes. Par exemple, elles pourraient être parallèlement validées par une approche 'plus biologique' de cette 'mise en forme structurale' au cours de lignification, en utilisant, en particulier, des mutants ou plantes transgéniques, évoqués en Introduction. Ce type d'étude systématique de morphogenèse *in vivo*, n'a pas été encore rapportée à notre connaissance. La complexité d'interprétation des résultats envisagée en Introduction suggère même qu'elle serait aussi lourde à conduire que délicate à contrôler et surtout à interpréter. Ces contraintes nous ont ainsi encouragé à poursuivre une approche plus 'chimique' de la mise en forme macromoléculaire des lignines, par modélisation et synthèses de types biochimiques<sup>52a,b</sup> et enzymologiques<sup>52c</sup> qui ont déjà permis de confirmer la possible 'hétérogénéité moléculaire' *in vivo* des lignines.<sup>9a,11,12</sup>

Artificielle, simplifiée mais classique car depuis longtemps reconnue comme source d'hypothèses et d'informations pertinentes dans le domaine de la biosynthèses des lignines, la synthèse *in vitro* de DHP, modèles de lignines par dehydro-polymérisation oxydative, a donc été conduite avec B. Cathala, en équipes, par analyses des aspects physico-chimiques de la formation de DHP en phases aqueuses hétérogènes, 'morphogenèse chimique', tant aux interfaces, qu'en 'solution' et 'phase colloïdale' à base de pectines avec présence éventuelle de fibres de cellulose bactérienne.<sup>52,5 3a,b,c</sup>

Premièrement, concernant des synthèses réalisées aux interfaces<sup>24c, 53a</sup> les analyses ont montré des effets sur la composition moléculaire, structure primaire,<sup>6</sup> des DHP par modifications de la fréquence relative des types de liaisons intermonomères,<sup>24a</sup> mais aussi sur les structures secondaire et tertiaire, organisation intra- et supra-moléculaire, avec augmentation des tailles moléculaires, rayons hydrodynamiques,<sup>24b</sup> ainsi que de la fréquence relative des liaisons aryl-alkyl- $\beta$ -éther, en présence de pectines.<sup>24c</sup> En accord avec de précédentes observations,<sup>52</sup> ces résultats confirment en particulier, la possible existence *in vivo*, de deux types extrêmes de fractions de lignine à structure secondaire de type soit plutôt ramifié, en bloc, soit plus linéaire et enrichie en liaisons aryl-alkyl- $\beta$ -éther déjà décrites par ailleurs (Figures 1<sup>9b,11,12</sup>) et qui, elles même seraient finalement agrégées *in situ*, 'cluster'.<sup>7,12</sup> Il convient de souligner à ce propos que la biosynthèse du second type de lignine, enrichie en liaisons  $\beta$ -aryl-alkyl-éther, a été suggérée aussi en fin de lignification dans la paroi secondaire du *Ginkgo* par N. Terashima *et al.*<sup>15</sup> Ces auteurs ont proposé en effet, qu'il y ait formation de ce type particulier de liaison à l'extrémité même des lignines en croissance pour expliquer le fait que les structures granulaires ne soient plus observées et donc moins bien individualisées en fin de différenciation des parois secondaires. Ils ont rappelé à ce propos la possibilité d'une organisation macromoléculaire 'modulaire', selon M. Waymann qui est discutée ici par la suite.

Secondement, concernant la morphogenèse de lignines en présence de solutions aqueuses de pectines, des synthèses de DHP ont été faites avec polymérisation peroxidasique, par addition lente, durant 10 heures, du monomère alcool coniférylique et de peroxyde d'hydrogène dans une solution aqueuse de pectine.<sup>25a</sup> Dans ces conditions, il y a formation d'une solution colloïdale stable de complexe LC, DHP-pectine, à l'opposé d'addition plus rapide qui entraîne leur précipitation.<sup>25b</sup> Leur caractérisation physique a révélé trois principaux ensembles de résultats.

D'abord, **A**, la formation progressive en solution colloïdale, de microdomaines de faible polarité relative, 'hydrophobes', mise clairement en évidence après moins d'une heure de réaction par la modification caractéristique des bandes de fluorescence du pyrène moléculaire, utilisé comme sonde monomoléculaire,<sup>25a</sup> et cela sans évidence de localisation macromoléculaire confondue des DHP et des pectines.

Ensuite, **B**, confirmant la possibilité d'hétérogénéité locale des ces complexes LC, des observations par diffusion de lumière visible ainsi que de neutrons,<sup>25b</sup> ont permis de décrire la dynamique d'organisation spatiale de ces complexes sous forme d'agrégats, de forme globalement semblable à celles des 'grains modulaires' du xylème de *Ginkgo*.<sup>15</sup> Dans le cas de ces DHP, les agrégats hydrophobes et restant stables lors de dilutions, présentent une organisation très hétérogène en trois phases avant tout aqueuse puis pectique et polyphénolique, DHP. Ces deux dernières phases sont denses et homogènes à l'échelle de 5 nanomètre alors que les

agrégats qu'elles forment ont une dimension caractéristique, en diffusion des neutrons, de la dizaine de nanomètres, voisine de celle des 'grains de lignine' déjà rapportés *in situ*.<sup>15</sup> De plus, et alors que ces phases sont séparées, la croissance relative de leurs interfaces a lieu cependant de façon parallèle, observation qui conforte les suggestions de '*compensation concertée*' entre dépôts de cellulose et lignines de plantes modifiés par transgénèse.<sup>13,28</sup>

Enfin, C, au long de ces dix heures de réactions morphogénétiques, la densité locale moyenne globale des agrégats est multipliée sensiblement par un facteur 3 alors que la quantité relative en interfaces varie en sens opposé.<sup>25a</sup> Cette évolution est corrélative à une forte densification nette de la phase pectique (300 %) mais, à l'opposé, très faible pour la phase DHP, qui de façon inattendue diminue même légèrement (40 %) et cela, d'abord de façon monotone puis avec des oscillations significatives après 6 heures de réaction. Conduisant ainsi à la formation d'agrégats complexes pectino-ligneux, hétérophasiques d'abord très fortement gonflés d'eau puis devenant plus 'hydrophobes' et rétractés au cours du temps, cette évolution correspond à un processus de 'morphogénèse chimique'<sup>56b</sup> qui se traduit par une perte progressive d'eau liée à la phase pectique des agrégats et qui correspondrait vraisemblablement à un repliement, 'en pelote', des chaînes pectiques en conséquence du '*dépôt de lignine exerçant dans ces conditions un rôle moteur et déterminant dans ce processus par la mise sous contrainte mécanique de l'ensemble*'.

Troisièmement, concernant la morphogénèse en présence de fibres cellulosiques incorporées de pectine, des synthèses de DHP ont été réalisées dans un réacteur comportant une cellule à membranes semi perméables, séparant des solutions d'alcool coniférylique et de peroxyde d'hydrogène, par diffusion et polymérisation peroxidasique durant 10 jours.<sup>53a</sup> Par référence à la synthèse sur cellulose seule, la pectine, pourtant présente en faible teneur relative de 10%, exerce dans ces conditions un effet de compatibilisation entre DHP et cellulose, qui est particulièrement bien révélée par la 'forme' même des agrégats de lignine observés en surfaces des fibres composites (Fig. 1). De forme ovoïde et de taille variée en absence de pectines, les agrégats visualisés par microscopie électronique à balayage sont répartis de façon plus uniforme en présence de pectine en surface du matelas fibreux; ils sont d'une taille moyenne plus faible, de l'ordre du micromètre et ils recouvrent plus uniformément les fibres, 'compatibilisation'. De plus, alors que seulement une faible fraction, environ 25%, de DHP reste insolubilisée sur le matelas fibreux, cette fraction de DHP est significativement enrichie en liaisons  $\beta$ -aryl-alkyl-ether. Cette dernière constatation d'une variabilité de la structure primaire des DHP, et donc vraisemblablement des lignines, concorde bien avec celles déjà rapportées lors de synthèses analogues conduites en 'solution concentrée' de pectine<sup>52a</sup> mais non en conditions différentes, plus diluée.<sup>25b</sup> Déjà mentionnées plus haut et discutés aussi par ailleurs,<sup>53a</sup> cette variabilité ne peut être davantage discutée encore ici du fait du nombre élevé de facteurs, '*complexité*', qui semblent la déterminer.

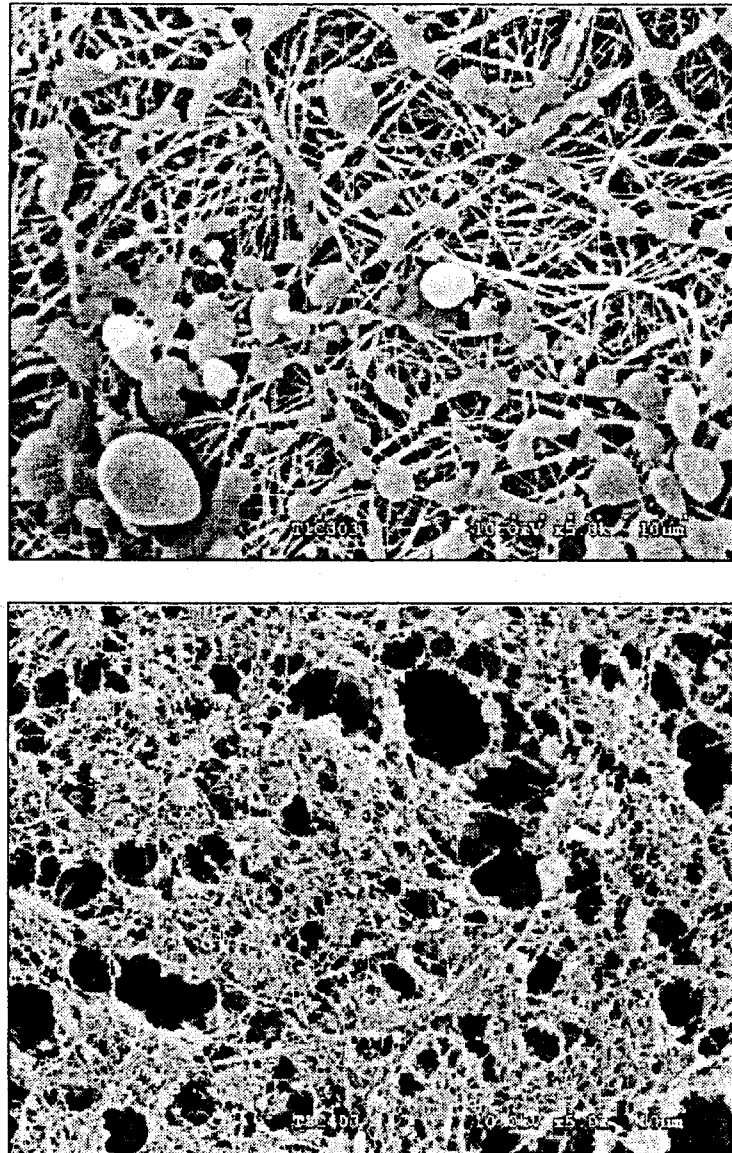


Fig. 1. – Organisation spatiale de DHP, vue par microscopie électronique à balayage, en surface des matelas composites fibreux formés au contact de la membrane semi perméable du réacteur à diffusion du côté  $H_2O_2$ , en surface des fibres de cellulose bactérienne, en absence (**vue de gauche**) et en présence de pectine (**vue de droite**); la largeur totale de chaque vue correspond à 25 micromètres.

(DHP spatial arrangement, shown by scanning electron microscopy, at the surface of fibrous composite mats in contact to the hydrogen peroxide side of the semi permeable membranes reactor synthesized along the bacterial cellulose fibres without (**left view**) or with (**right view**) of pectin occurrence; the total width of each view correspond to 25 micromètre.)

Au total, ce triple ensemble d'observations montre donc, sans ambiguïté, la possibilité de morphogenèse chimique de LC tout en confirmant la valeur descriptive et prédictive de l'approche expérimentale de la variabilité des processus de lignification par synthèse chimique modèles. Elles conduisent de plus à envisager aussi de façon plus fondamentale, ici en termes d'effets thermodynamiques



d'organisation spontanée et d'auto-organisation, cités en Introduction, l'ensemble de ces mécanismes moléculaires, simplifiées, mais cependant 'complexes', qui déterminent les particularités structurales et la dynamique de mise en place de ces modèles LC. En effet, prenant base les formulations théoriques dues à I. Prigogine et son école,<sup>55</sup> les termes 'simple', 'complexe' et 'auto-organisation' signifient ici que les modèles LC, de synthèse, sont relativement plus simples que les parois biologiques, car ils impliquent moins de facteurs explicatifs, mais qu'ils sont cependant encore suffisamment 'complexes', voir ici aussi la variabilité primaire des DHP, pour permettre l'existence d'états stationnaires de non équilibres<sup>55a</sup> et donc pour pouvoir, 'donner naissance, sous certaines conditions, à des phénomènes d'autoorganisation à l'échelle macroscopique sous forme de rythmes temporels et de motifs spatiaux'.<sup>55b</sup> D'après ces principes, les processus d'organisation spontanée sont initiés à l'échelle moléculaire, microscopique<sup>55c</sup> par des 'fluctuations', événements thermodynamiques localisés à l'échelle microscopique.<sup>55a,b</sup> Au plan de la chimie macromoléculaire structurale, la proposition faite ici n'est pas fondamentalement originale; la formation de structures organisées discontinues dans des réacteurs à diffusion, par 'morphogenèse chimique', a été décrite depuis longtemps,<sup>56a</sup> selon ces principes, et elle est largement et clairement confirmée.<sup>56b</sup> Par contre, au plan de la biologie générale<sup>55c</sup> et plus particulièrement ici, des processus de lignification tant *in vivo* que *in vitro*, cette possibilité ne semble avoir été envisagée que récemment.<sup>11,12</sup> Dans le règne animal cependant, la différenciation de structures ainsi que des cas spécifiques de morphogenèse chimique ont été analysés depuis plus longtemps et dans cette même perspective par H. Meinhardt et A. Gierer.<sup>57</sup> Soulignant l'insuffisance des effets d'inhibition à distance pour expliquer la création de formes, ces auteurs ont très clairement démontré la nécessité d'effets complémentaires d'activation auto-catalytique permettant de justifier que la structure en formation puisse inhiber celle de ses voisines sans être inhibée par elle-même, explicitant ainsi aussi concept flou d'autoorganisation, comme déjà tenté ici en Introduction. Un 'modèle moléculaire de morphogenèse chimique appliqué à la lignification' est donc proposé ici (Fig. 2). Faute de données expérimentales plus systématiques, il vise seulement à expliciter un mécanisme moléculaire global; la Figure 2 propose donc une représentation spatio-temporelle de formation, compétitive et concertée, d'agrégats de DHP et donc indirectement de lignines. Selon ces principes, la formation d'agrégat serait initiée par 'fluctuation' locale de, par exemples, la composition en substrats, les conditions de diffusion, les 'activités', affinité chimique et potentiel thermodynamique, mais aussi les conditions locales de milieu, acidité et surtout potentiel redox. La polymérisation oxydasique étant ainsi amorcée, la combinaison de radicaux libres conduirait à une accumulation de DHP, avec insolubilisation localisée d'autant plus forte que elle serait rapide. L'activation autocatalysée de formation de radicaux libres monomères, observée avec de nombreuses peroxydases, en serait le facteur

déterminant ; cet aspect est précisé par la suite. En fonction du temps, il y aurait donc d'abord accumulation localisée (courbes en cloche continues: Fig. 2) suivie d'inhibition de cette dernière par compétition au niveau des radicaux libres monomères et même oligomères. Elles procéderaient donc par réactions 'activatrices' au niveau du site catalytique et réactions 'inhibitrices' de combinaison avec les fonctions les plus réactives et nouvellement formées par polymérisation en surface du DHP (courbes en cloche discontinues: Fig. 2). En accord avec des mécanismes établis, l'intensité relative de ces dernières réactions dépendrait non seulement de conditions physiques, adsorption et transferts d'états électroniques<sup>58a,b</sup> mais aussi de facteurs chimiques, potentiel redox et couplages électroniques et complexes par transfert de charges.<sup>59a,b</sup> La formation des agrégats à distance régulière ou non,

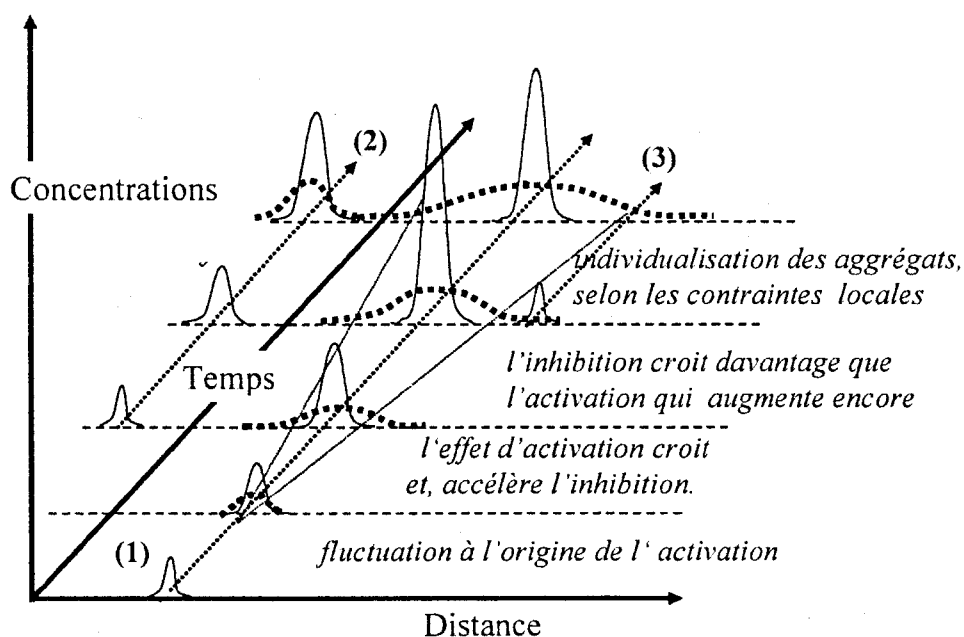


Fig. 2. – Formation d'agrégats, structures granulaires de DHP, par 'morphogénèse chimique', combinant des effets antagonistes d'activation et d'inhibition des réactions de polymérisation de monomères et de fragments oligomères de lignines. La formation d'un premier agrégat (1), initiée par 'fluctuation locale', induit en fonction du temps l'activation autocatalysée de radicaux monomères, entraînant la polymérisation de chaînes oligomères formant l'agrégat par leur accumulation d'abord localisée et rapide (courbes continues de distribution en cloche) puis plus étendue et plus lente en extrémités des enchainements polymères (courbes discontinues). La formation des agrégats (2) et (3) est affectée par de la présence des chaînes voisines ; elle est alors possible (2) ou non (3) en fonction des types de 'distances' et des interactions moléculaires coopératives, voir texte.

Fig. 2. Formation of 'clusters', granular structures of DHP, during 'chemical morphogenesis' involving the antagonist effects of activation and inhibition of the polymerisation reactions of free radical monomers and of oligomeric fractions of lignins. The formation of a first aggregate (1), initiated by 'local fluctuation', induces as function of time, an autocatalyzed activation of monomers with formation of the aggregate by accumulation first localized and fast (continuous bell-shaped distribution curves) then more extended and slower (discontinuous curves). The formation of other aggregates is possible (2) or not (3) depending of the 'distance' types and the cooperative molecular interactions, see text.

dépendrait donc finalement à la fois de leur 'distance spatiale', suivant les repliements des enchainements de fibres et de leur 'distance réactionnelle', fonction des vitesses et durées relatives de diffusion des radicaux et espèces en interactions.<sup>57</sup> Les effets métachromatiques, les phénomènes de 'monomérisation' par intercalation de molécules solvatées simples et le désenchevêtrement des chaînes lignocellulosiques sous contraintes, envisagées plus haut, sont compatibles avec ce modèle et paraissent susceptibles de bien le valider. D'une part, la lignification des agrégats, provoquant leur rétraction, mettrait sous contrainte de compression les chaînes polyosidiques, en accord avec les mécanismes moléculaires couramment admis lors de la formation des bois de compression.<sup>27,33</sup> D'autre part, les déstructurations mécaniques et pulpées, relaxeraient ces contraintes, d'autant plus aisément qu'interviendraient aussi des effets coopératifs de clivages de liaisons et des effets entropiques de réorganisation des couches de solvation.<sup>30a</sup> La formation de lignines de type plutôt 'tridimensionnel' ou plutôt 'linéaire', envisagée aussi ensuite, pourrait affecter aussi la dynamique et les effets de ces associations, par la modification de la conformation supramoléculaire, quaternaire,<sup>9a</sup> des chaînes osidiques lignifiées. Les différences d'intensités métachromatique décrite selon les tissus végétaux<sup>37,38a</sup> et après simple déformation réversible en résulteraient donc aussi, comme semblent susceptibles d'être aussi modifiées les identifications immunocyto-chimiques correspondantes.

Les bases macromoléculaires de 'morphogenèse chimiques' du modèle étant présentées, des aspects plus dynamique, métaboliques et physiologique, sont envisagés, en quatre points, dans une perspective correspondante modèle de 'morphogenèse biologique'.

Le premier point concerne le modèle macromoléculaires, 'en modules', proposé par N. Terashima<sup>15</sup> suivant M. Waymann.<sup>60</sup> Il fut établi globalement, sur la base de synthèse de DHP, de dépolymérisation chimique par 'pulpage' de bois et DHP et enfin de fractionnements par perméation sur gels des composés obtenus. Sur la base de distributions bimodales, qui sont compatibles avec des données plus récentes,<sup>25b</sup> ces auteurs ont proposé l'existence de deux sortes de fractions, 'assemblages stables', à partir des DHP et des lignines natives, dont le degré de polymérisation serait de l'ordre respectivement de 500 et de 20. Ils les ont définis comme 'modules'. Selon ce modèle, la formation des macromolécules de DHP et lignines aurait alors lieu par '*polymérisation additive entre les modules*', mettant en cause des liaisons plus labiles et dont il est, actuellement, raisonnable de proposer qu'elles soient de type  $\beta$  et surtout  $\alpha$ -aryl-alkyl-éther. Ces interprétations sont compatibles avec celles de K. Freudenberg, de H. Bolker et de J.F. Yann, discutées par ailleurs.<sup>8,9a</sup> Cependant, des données expérimentales plus récentes et surtout leurs interprétations théoriques en terme de dimension fractales de ces fractions et de réticulation des réseaux polymères par percolation entre 'clusters', agrégats, de DHP ou lignines, rapportées par de Leclerc et Olson,<sup>31</sup> mais aussi celles de Gravitis,<sup>54a,b</sup> semblent devoir être prises en compte, au moins tout autant. Elles

semblent préférables car plus fines et informatives au plan supramoléculaire.<sup>9b</sup> Malgré tout, dans l'état actuel des observations et du présent modèle morphogénétique, le processus 'modulaire' mérite d'être retenu, mais validé, car il est simple. En plus de l'accord sur la formation de 'modules' par réticulation de courts 'enchaînements en bloc oligomères', qui seraient plutôt riches en liaisons 'condensées'<sup>11</sup> puisque formés en phase de croissance rapide (Fig. 2), il permet en effet aussi de justifier, en phase terminale d'agrégation, la réunion et le masquage des agrégats<sup>15</sup> par la formation, plus lente car inhibée (Fig. 2), de lignines plus riches en liaisons relativement plus fragile, plus aisément clivées par pulpages, qui seraient de type  $\beta$ - et  $\alpha$ -aryl-alkyl-éther,<sup>15</sup> entre autres types de liaisons<sup>61</sup> avec moindre désordre,<sup>59</sup> et qui libéreraient alors ces 'modules' ou 'clusters' de plus petites tailles.

Le second point concerne les interactions intra- et inter-moléculaires au niveau des fonctions aromatiques des DHP et lignines. Concernant la formation des agrégats, le caractère peu polaire des monomères et plus encore des oligomères, pourrait contribuer au rôle moteur de la lignification dans la mise sous contrainte mécanique de l'ensemble pariétal lignines – réseau de fibres polyosiques, évoqué plus haut. Par référence aux mécanismes de fixation des molécules solvatés de colorants, adsorption sur les chaînes polymères, ainsi que à leurs associations moléculaires métachromatiques, dépendant de leurs arrangements spatiaux<sup>46,47</sup> cités plus haut, il est proposé que la perte progressive d'eau liée à la phase pectique des agrégats et le repliement corrélatif, en pelote, des chaînes pecto-cellulosiques<sup>25</sup> résulte d'une part, non seulement d'interactions de type coopératives selon les modalités déjà analysées sur les polymères linéaires<sup>62</sup> et depuis reconnues entre les colorants aromatiques basiques et les polymères polyosiques polyanioniques<sup>48,50</sup> et d'autre part de réarrangements thermodynamiquement favorables des couches d'eau de solvation suivant la relation (1). L'importance biologique vraisemblable de ce dernier type d'effet dans le cas des LC, invoquée ailleurs,<sup>26</sup> n'a pas fait, récemment à notre connaissance, l'objet de rapport détaillé. Confirmant cependant ces propositions et les précieux mais anciens résultats de Stöckmann<sup>30</sup> cités plus haut, des études analogues plus récentes ont été conduites sur des systèmes protéiques hydrophobes fibreux animaux.<sup>26</sup> Elles démontrent, sans ambiguïté, l'importance majeure de tels effets chimico-mécaniques. Il se pourrait donc qu'une partie significative des effets de types 'compensation' suggérés dans les cas de transgénèse affectant l'ensemble du complexe lignocellulosique<sup>13a,25a,28,35</sup> de manière globale résulte aussi de tels réarrangement 'entropiques' accompagnés des effets de 'compatibilisation', cités plus haut. Dans ce cadre de morphogénèse biologique, ils feraient donc intervenir les réseaux pectiques par leur caractère polyanionique<sup>50</sup> d'où leur solubilité remarquable,<sup>25</sup> mais aussi des lignines, comme semblent bien l'indiquer les variations métachromatiques en présence des 'colorants basiques'<sup>39,43</sup> dépendantes d'activation électronique localisée et fluctuations de fonction phénoliques définies.

Le troisième point concerne l'hétérogénéité moléculaire des fractions de lignine dans la perspective de leur formation autoorganisée dans les agrégats. L'existence même de fractions de lignines de type 'en bloc', plutôt tridimensionnelles et dites plus 'condensées', et de type 'en ligne', plutôt monodimensionnelles et dites moins ou 'non condensées', proposée depuis longtemps<sup>7,8</sup> discutée ailleurs,<sup>1,11</sup> est de plus en plus fréquemment invoquée et admise, en particulier lors des caractérisations immunocytochimiques<sup>14,61,64</sup> de l'organisation de la lignification dans les parois végétales. Elle concorde avec les données plus modernes de cinétiques et effets de percolation lors de diverses sortes de pulpages chimiques, déjà cités, qui sont interprétés en terme de 'dégelation' de deux types de réseaux LC, interpénétrés et de polydispersité différentes.<sup>31</sup> Suivant le modèle proposé ici et, en accord avec les observations *in situ* sur xylème du Ginkgo,<sup>15</sup> la formation de lignine enrichie en liaisons aryl-alkyl-éther, ' $\beta$ -O-4, dibenzodioxocine,  $\alpha$ -O-4, ...', aurait donc lieu en phase terminale lente (Fig. 2), ralentie par inhibition compétitive lors de la morphogenèse des parois. Soulignée déjà en principe comme condition de morphogenèse,<sup>57</sup> l'absence d'autoinhibition de l'agrégation par elle-même ne dépendrait pas des seuls facteurs autocatalytiques, concernant la formation oxydasique des radicaux, mais aussi à l'activation des extrémités phénoliques des oligomères déjà réticulés dans ces agrégats. Mettant en jeu des complexes, par intercalation<sup>43</sup> et des transfert de charges<sup>45,58b,c</sup> capables d'affecter les potentiels redox et donc la modes de liaison intermonomères,<sup>59</sup> la polymérisation 'biologique' serait dans ces conditions contrôlée par '*séquestration réversible des radicaux libres en extrémité de chaîne*'. Ce type mécanisme radicalaire bien que relativement nouveau, est reconnu;<sup>65</sup> il n'est pas original dans le domaine de la chimie macromoléculaire. Dans son principe, il est en effet, similaire aux réactions de polymérisations ionique dites 'vivantes' parce que leur propagation dépend d'une réaction démasquage du groupement réactif terminal qui est sans cela est non réactive et dite 'dormante'.<sup>65a,d</sup> Il est donc proposé ici que la réaction de polymérisation radicalaire des DHP et lignines soit de ce type. En effet mettant en jeu des radicaux suffisamment stabilisés et séquestrés pour avoir des caractères 'dormant' puis 'vivant' selon les conditions locales d'agrégation, elle permettraient en fin de croissance des réactivations radicalaires et la propagation terminale de chaînes oligomères entre les agrégats en conditions ainsi lentes et relativement contrôlées (Fig. 2). Le processus 'biologique' serait ainsi assimilable à celui de réaction 'chimiques' radicalaires déjà décrites en phase hétérogène, dans le cas de miniémulsions par séquestration de chaînes dormantes, mais aussi lors de synthèses de polymères en bloc, reliés par des segments amorphes<sup>65b,c</sup> et qui tous aboutissent, après éventuels transferts et fragmentations de chaîne oligomères<sup>65d</sup> à la condensation terminale des blocs d'un agrégat, polymère 'mort'. Les connaissances actuelles concernant les mécanismes d'oligomérisation et de réticulation modèle des DHP et des lignines sont encore trop globales et fragmentaires pour tenter de valider davantage ces propositions. Bien que frappantes, les ressemblances ne sont peut être hélas, que fortuites.

Le quatrième et dernier point concerne le rôle des peroxydases dans la formation de structures organisées. La possibilité de former de structures spatio-temporelles par réactions peroxidasique n'a été rapportée que récemment. Elle a été observée à partir de solutions aqueuses d'amidon soluble du commerce, par réaction d'iode et de peroxyde d'hydrogène catalysée par la présence de lactoperoxydase immobilisée sur les parois du réacteur.<sup>66a</sup> Ces données sont en complet accord avec les principes théoriques d'autoorganisation<sup>55b</sup> et avec leurs validations expérimentales en réacteur,<sup>56a</sup> déjà citées. Par la suite, étudiant très systématiquement les aspects biophysiques des activités peroxydasiques, ces premiers auteurs ont démontré de plus l'existence d'organisations temporelles correspondantes, oscillations et dynamique complexe, des réactions 'oxydatiques', par production de  $H_2O_2$  par activation catalytique de  $O_2$ , induites en présence de substrats et cofacteurs phénoliques simples par de peroxydases diverses.<sup>66b,c</sup> Plus récemment, analysant de façon détaillée les nombreuses étapes de ce type de réaction à partir de donneurs organiques d'électrons, et de NADH en particulier, ils ont aussi proposé que cette dynamique enzymatique complexe exerce un effet protecteur contre les réactions d'inactivation induites sur les peroxydases elle mêmes, par les produits intermédiaires d'oxydation.<sup>66d</sup> Enfin, ils ont aussi décrit l'induction rapide de bifurcations entre voies métaboliques qui, dans ces conditions et du fait des principes de 'complexité'<sup>55b</sup> déjà citée, ne nécessiteraient pas de changement génétique régulateur.<sup>66e</sup> Bien que très pertinents et rigoureusement établis, ces résultats originaux et ces hypothèses de biophysique générale ne sont pas souvent systématiquement pris en compte dans les publications correspondantes, spécifiquement biochimiques et biologiques, qui concernent les peroxydases 'végétales', y compris dans des revues récentes, pourtant approfondies, visant aussi la lignification.<sup>67</sup> Par contre, l'importance des activités oxydatiques des peroxydases *in vitro* et durant la lignification *in situ* des parois végétales est par plus souvent reconnue. Elle a été récemment analysée et son importance a été confirmée par des études originales approfondies.<sup>67c,68a,b,c</sup> A ce propos, ces auteurs ont suggéré que la formation d' $H_2O_2$  utilisée lors de la biosynthèse des lignines provienne de réactions d'autoxydation de l'alcool coniférylique ionisé et non pas d'une activation indirecte de  $O_2$  par la peroxidase elle-même.<sup>68c</sup> Un tel mécanisme autocatalytique bimoléculaire est compatible avec le modèle proposé et les principes cités; l'initiation de la polymérisation des lignines par fluctuations locales proposée dans la Figure 2 peut lui correspondre. Ainsi, en matière de morphogenèse, biologique ou non, l'intérêt de ces données biophysique et physiologiques semble clair dans la mesure ou les observations de ces auteurs, confirmant d'abord l'existence d'effets spatio-temporels d'organisation catalysés par des peroxydases, montrent aussi la diversité des mécanismes oxydatifs envisageables<sup>66b,c</sup> ainsi que leur dépendance en fonction du pH du milieu.<sup>69</sup> Par rapport à la lignification des DHP, il suffit donc de rappeler que de tels effets du PH ont été déjà montrés sur la composition moléculaire des DHP et des LC<sup>70a,b</sup> de

même que ceux du potentiel redox.<sup>59a,b</sup> Comme ci dessus, les connaissances actuelles concernant les mécanismes macromoléculaire de polymérisation oxydative des DHP et des lignines sont encore trop mal connus pour permettre de valider une fonction morphogénétique directe aux peroxydases. Cependant, l'observation d'oscillations significatives après 6 heures de réaction pendant la densification des agrégats de DHP en présence de pectine,<sup>25a</sup> déjà citée, pourrait en constituer un indice. Concernant encore, les mécanismes physiologiques de polymérisation oxydative des lignines, la possibilité de couplages entre voies métaboliques méritent commentaire aussi. Concernant le métabolisme général de lignification<sup>10,11</sup> ils affecteraient le métabolisme énergétique oxydatif, en particulier des NAD(P)H déjà envisagés, mais cette fois au niveau du transfert des monomères de lignines *via* le plasmaleme vers la parois végétale en vue de leur oxydation au cours de lignification. La possibilité d'un tel couplage a été proposée récemment dans le cas de Tabac dont les peroxydases associées à la lignification avaient été modifiées par transgénèse.<sup>67c</sup> Observant des réductions semblables à la fois des teneurs et des composition en monomères mono- et di- méthoxylés, ces auteurs ont suggéré que l'existence d'un mécanisme physiologique de rétro-régulation qui inhiberait leur transfert vers la parois à la condition que la capacité oxydative soit diminuée. Il est évident que l'existence, proposée ici, de l'implication d'une activité oxydative dans la polymérisation des lignines qui serait particulièrement consommatrice de 'pouvoir réducteur cellulaire,' sous forme de NADH, ne ferait que conforter l'effet d'un tel mécanisme de rétro-régulation. En accord avec ces auteurs, il convient de souligner que les manipulations génétiques des activités peroxydasiques ont abouti, dans d'autres cas cependant, à des effets différents. Des réductions ou des augmentations des activité peroxydasiques ont été corrélées soit à des diminutions soit à de augmentations de 'teneurs totale' en lignine chez respectivement des Peupliers<sup>71a</sup> et des Tabacs,<sup>71b</sup> avec cependant dans ce dernier cas une absence de modification nette de composition en monomères non condensés. Déjà analysée bien en détail,<sup>10</sup> en terme de coût relatif des diverses voies métaboliques globales de lignification,<sup>11</sup> cette notion de couplage métabolique semble mérite ici d'autant plus intérêt en terme de morphogenèse des parois lignifiées que, précisant des observations anciennes,<sup>72 a,b</sup> l'existence d'une périodicité journalière de dépôt d'hémicelluloses et des lignine, en tant que matrice amorphe entre les fibres cellulosiques des couches pariétales, a été rapportée et confirmée.<sup>72c</sup> Ce processus a de plus été mis en relation avec des cycles de mise en compression des parois végétales en cours de croissance aboutissant à l'établissement de contraintes mécanique de compression<sup>71c</sup> en cohérence avec une fonction morphogénétique globale. Au total, une fonction organisatrice des '*activités métaboliques intégrées*' de polymérisation des lignines dans les parois végétales semble donc possible; les données invoquées ici en sa faveur ne sont qu'indirectes cependant. Comme précédemment, ces rapprochements ne sont peut être hélas, que fortuits; l'enjeu considérable que représente la maîtrise des processus de lignification semble quand même, mériter leur validation.

## CONCLUSIONS

Alors que des propositions plus pratiques ont été déjà formulées, seules quelques idées directrices de cette revue sont regroupées en cinq points.

En premier lieu, il est admis comme hypothèse de départ, la plus couramment retenue actuellement, que la formation des lignines et le processus de lignification des parois végétales sont amorcés par une 'réaction', de type enzymatique, et qu'elles se réalisent par des mécanismes non enzymatiques de façon dite pour cette raison 'spontanée'.

Ces processus aboutiraient ainsi à la formation d'un 'système ligno-cellulosique pariétal', ensemble dans lequel des 'éléments' macromoléculaires ou non sont liées par de multiples interactions croisées. Ce 'système composite pariétal' serait, dans ces conditions, 'composé' essentiellement de quatre sortes d'éléments organisés : des fibres cellulosiques, des matrices de type hémicelluloses et de type lignines, hétérogènes au plan moléculaire, et enfin d'eau, elle-même organisée aussi autant par adsorption aux interphases que en elle-même, contribuant alors de ce fait à des effets entropiques organisateurs, statiques et dynamiques, de l'ensemble.

Le phénomène d'organisation spontanée de cet ensemble résulterait ainsi du caractère coopératif et réversible, à l'état de gel 'colloïdal', de ces interactions. Elles mettraient principalement en jeu des 'liaisons' de type éventuellement ionique mais surtout hydrogène et hydrophobes. Leur formation concertée, en cascade, déterminerait la stabilisation d'états du système, configurés de façon d'abord plutôt réversible de type parois primaires, puis plutôt irréversibles, après réticulation, de type parois secondaires. Dans ces conditions, l'organisation des 'chaînes polymères' serait aussi modifiée et réorganisable. Ces modifications autoriseraient, par 'déploiement-repliement' des enchaînements polymères, la formation, déformation et reformation de ces systèmes structurés fibreux, aboutissant à des états définis particuliers, 'formes', relativement stables au plans mécanique et plus généralement thermodynamique.

La formation progressive et localisée de lignine en forme de grains, agrégats, résulterait, dans le cadre d'un modèle proposé (Fig. 2), d'effets antagonistes inhibiteur et activateur autocatalysé, conformes aux principes physico-chimiques très généraux de l'autoorganisation des systèmes thermodynamiquement complexes qui furent établis<sup>55</sup> et validés expérimentalement,<sup>56</sup> par ailleurs. Ce modèle simplifié, combinant ces facteurs sur la base de fluctuation autoxydation et autocatalyse qui activeraient la polymérisation des lignines suffit pour décrire qualitativement les observations faites tant *in situ* que *in vitro*. Il vise à permettre des hypothèses plus détaillées des mécanismes moléculaires tant biologiques que technologiques, évoquées en Introduction.

A ce propos, il convient enfin de souligner le caractère très schématique des mécanismes invoqués ici lors de séparations de phases, de l'individualisation, de la rétraction et de la fusion des agrégats et modules de lignine pendant la formation



des parois lignifiées ainsi lors des effets mécaniques de mise sous contrainte des tissus de réaction ainsi que de déformation ou ruptures mécaniques. De même, les suggestions concernant le désenchevêtrement des chaînes lignocellulosiques sous contraintes et leur réorganisation qui seraient susceptibles de contribuer à la stabilisation biologique et/ou technologique ultérieure des parois végétales et produits dérivés sont très simplifiées. Elles semblent pourtant utiles car elles sont susceptibles de fournir des bases moléculaires théoriques, en vue de la description de phénomènes biologiques complexes, tels que l'établissement des contraintes de croissance et la formation des bois de réaction. Elles pourraient même conduire à expliciter en terme de mécanismes moléculaire des concepts encore trop souvent flous ou seulement finalistes, d'états, de structures ou d'organisations 'plus adaptées biologiquement', et même les termes tels que 'autoorganisation' ou 'compatibilisation'. Bien que regrettées, ces simplifications sont cependant difficiles à éviter. Elles tiennent au caractère de 'systèmes complexe' que constituent en général les composés lignocellulosiques. Leur étude est donc faite 'à l'approche du complexe';<sup>5b</sup> elle nécessite et encourage donc des démarches pluridisciplinaires, en équipe, dont le besoin et l'intérêt général a été, encore récemment, souligné<sup>2,73</sup> mais qui, concernant ici les domaines vastes de la chimie, la biologie, la physique et les technologies, n'ont pu faire l'objet ici, que de vues simplifiées.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> M. Baucher, B. Monties, M. van Montagu and W. Boerjan, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, **17**, 125 (1998).
- <sup>2</sup> M. Baucher, C. Halpin, M. Petit-Conil and W. Boerjan, *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*, **38**, 305 (2003).
- <sup>3</sup> L. A. Rogers and M.M. Campbell, *New Phytol.*, **164**, 17 (2004).
- <sup>4</sup> Y. Barrière, J. Ralph, V. Méchin *et al.*, *C. R. Biologies*, **327**, 847 (2004) et les deux articles précédents de cette série, respectivement aux pages: 455 et 467.
- <sup>5</sup> B. Monties, in "Plant Phenolics", vol 1, "Methods in Plant Biochemistry" Series, J.B. Harborne (Ed.) Academic Press, pp. 113-157 (1989).
- <sup>6</sup> B. Monties, *Polymer Deg. Stab.*, **59**, 53 (1998).
- <sup>7</sup> F.E. Brauns, "The Chemistry of Lignin", Academic Press, (1952), voir aussi le 'Supplement Volume' avec D.A.Brauns (1960).
- <sup>8</sup> K.V. Sarkanen, C.H. Ludwig, "Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions", John Wiley and Son (1971).
- <sup>9a,b</sup> (a) B. Monties, *Polymer Deg. Stability*, **59**, 53 (1998), and (b) B.Monties and K. Fukushima, in, "Biopolymers": vol:1, "Lignin, Humic Substances and Coal, A. Steinbüchel (Ed.) Wiley VCH, p. 1 (2001).
- <sup>10</sup> J.S. Amthor, *Ann. Bot.*, **91**, 673 (2003).
- <sup>11</sup> B. Monties, in, "Advances in Phytochemistry", Research Signpost, F. Imperato (Ed.) p: 1 (2003).
- <sup>12</sup> B. Monties, *Proc. Second Int. Conf. of the European Soc. Wood Mechanics*, (L. Salmen, Ed.) p. 1, STFI- Packforsk (2004).
- <sup>13a, b</sup> (a) D.R. Dimmel, J.J. MacKay, E.M. Althen, C. Parks and R.R.Sedoroff, *J. Wood Chem. Technol.*, **21**, 1 (2001), and (b) D.R. Dimmelet al., *J. Wood Chem. Technol.*, **22**, 235 (2002).
- <sup>14</sup> D. Reis and B. Vian, *C.R. Biologies*, **327**, 785 (2004).
- <sup>15</sup> N. Terashima, T. Awano, K. Takabe and M Yoshida, *C.R. Biologies*, **327**, 903 (2004).

- <sup>16</sup> J. Gril, D. Hunt and B. Thibault, *C.R.Biologies*, **327**, 881 (2004).
- <sup>17</sup> L. Salmen, *C.R.Biologies*, **327**,873 (2004) et surtout *Proc. Sec. Int. Conf. European Soc. Wood Mechanics*, L. Salmen (Ed.), 388 p., STFI- Packforsk, Stockholm (2004).
- <sup>18 a, b</sup> W. Chen, G.C. Lickfield and C.Q. Chang, *Polymer*, **45**, (a) part I: 1063 and (b) part II: 7357
- <sup>19</sup> P. Fratzl, I. Burgert and H.S. Gupta, *Phys. Chem., Chem. Phys.*, **6**, 5575 (2004).
- <sup>20</sup> S.E. Gradwell, S. Rennekar, A.R. Esker, T. Heinze, P. Gattenholm, C. Vaca-Garcia and W. Glasser, *C.R.Biologies*, **327**, 945 (2004).
- <sup>21</sup> C. Pouteau, S. Baumberger, B. Cathala and P. Dole, *C.R.Biologies*, **327**, 935 (2004).
- <sup>22</sup> J.E. Varner, in, "Self-Assembling Architecture", J.E. Varner (Ed.), A.R.Liiss Pub, p. I, 97 (1988), voir aussi les 'Perspectives de J.M. Lehn, *Angew.Chem., Int. Ed.*, 1304 (1999), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 4763 (2002) et de J.M. Whiteside, M. Boncheva, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 4761 (2002).
- <sup>23</sup> P. Colonna, V. Planchot and M. Axelos, in, « La Génomique en Biologie Végétale », J.-F. Morot-Gaudry, J.-F. Briat (Eds.), INRA Science Update pub, p: 493 (2004).
- <sup>24 a, b, c</sup> B. Cathala, N. Puff, V. Aguié-Béghin, R.Douillard and B. Monties, *A.C.Symp. Ser.*, **742**, 278 (2000), (b) B. Cathala, L.T. Lee, V. Aguié-Béghin, R.Douillard and B. Monties, *Langmuir*, **16**, 10444 (2000), (c) B. Cathala, V. Aguié and R. Douillard, *C. R. Biologies*, **327**, 777 (2004), .
- <sup>25 a, b</sup> (a) D. Lairez, B. Cathala, B. Monties, F. Bedos-Leval, H. Duran and L. Gorrichon, *Biomacromolécules*, **6**, 763 (2005), (b) B. Cathala and B. Monties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **29**, 45 (2001).
- <sup>26</sup> B. Monties, in, *Proc. Internat. WURC* (Wood Ultrastructural Research Center), G. Daniel (Ed.), Swed. Land. Uppsala Pub. P. 2 (2004).
- <sup>27</sup> K. Bamber, *IAWA Journal*, **22**, 205 (2001).
- <sup>28 a, b, c</sup> (a) S.R. Turner, C.R. Sommerville, *Plant Cell.*, **9**; 689 (1997) (b) Li Y *et al.*, *Plant Cell*, **15**, 2020 (2003), (c) U. Sharma *et al.*, *Agronomie*, **6**, 265 (1986).
- <sup>29</sup> M. Petit-Conil, C. Chirat *et al.*, *Proc. 2000 TAPPI Engen. Pulping Conf. on Process and Product Quality*, PULP0036, p: 43, CD-ROM , TAPPI Atlanta Press Pub.
- <sup>30 a, b, c</sup> W. Stöckmann, (a) *J. Polym. Sci.*, Part C, **36**, 363 (1971), (b) *Biopolymers*, **11**, 251 (c) TAPPI *J.* **54**, part 1: 2033, part 2: 2038 (1971).
- <sup>31</sup> D.F. Leclerc and J.A. Olson, *Macromolécules*, **25**, 1667 (1992).
- <sup>32 a, b, c</sup> L. Salmen, (a) in, *Proc. Second Int. Conf. European Soc. Wood Mechanics*, p:III, L. Salmen (Ed.),153 – 224, STFI- Packforsk (2004), (b) M. Akerholm and L.Salmen, *Holzforschung*, **57**, 459, (2003), (c) L. Salmen and A.-M. Olsson, *J. Pulp Paper Sci.*, **24**, 99 (1998)
- <sup>33 a, b</sup> (a) T. Okuyama, H.Takeda, H. Yamamoto and M. Yoshida, *J. Wood Sci.*, **44**, 83 (1998), (b) H. Yamamoto, Y. Kojima, T. Okuyama, W. Abasolo and J. Gril, *Trans. ASME*, **124**, 432 (2002).
- <sup>34</sup> G. Champetier and L. Monerie, "Introduction à la Chimie Macromoléculaire", **3<sup>ème</sup> part.-chap. II**, 471, Masson et cie Pub. (1969).
- <sup>35</sup> D.G. Hepworth, J.F. Vincent and W.Schuch, *Ann. Bot.*, **81**, 729 (1998).
- <sup>36</sup> K. Li and D.W. Reeve, *J. Wood Chem. Tech.*, **24**, 169 (2004).
- <sup>37</sup> J.J. Balatinecz and R.V. Kennedy, *Forest Prod. J.*, **17**, 57 (1967).
- <sup>38 a, b</sup> W. M. Harlow, *Paper Trade J.*, TAPPI sec., 33 (part II) et aussi 31 (part I) (1941).
- <sup>39</sup> N. P. Kutscha and J.R. Gray, *Tech. Bull.*, **53**, Life Sci. Agric. Exp. Station, Maine Univ. Orono (1972).
- <sup>40</sup> A.M. Dubinskaya, *Russian Chem Rev.*, **68**, 637 (1999)
- <sup>41</sup> J. Ahmad and K.B. Austin, *Langmuir*, **6**, 1797 (1990).
- <sup>42</sup> B. Dordi, H. Schönherr and G.J. Vansco, *Langmuir*, **19**, 5780 (2003).
- <sup>43</sup> J.C. Stockert, M. Cañete and O.D. Colman, *Cell. Molec. Biol.*, **30**, 503 (1984).
- <sup>44 a, b</sup> T. Koshijima, T. Watanabe and F. Yaku, *A. C. S. Series*, **397**, 11 (1989) et aussi F. Yaku *et al.*, *Holzforschung*, **33**, 54 (1979).
- <sup>45</sup> B. Monties, *C. R. Acad. Sci. Paris*, **277**, 1167 (1973).

- <sup>46</sup> P. Gaham, "Plant Histochemistry and Cytochemistry", p: 4-6 et 34-35, Academic Press Pub. (1984).
- <sup>47</sup> P. Prento, *Biotechnol.Histochem.*, **76**, 137 (2001).
- <sup>48 a, b</sup> (a) J.B. Lawton and G.O. Phillips, *J. Chem.Soc.*, Perkin II Trans. 38 (1977), (b) R.B.Cundall and J.B. Lawton, *J. Chem.Soc.*, Perkin II Trans. 879(1979).
- <sup>49</sup> G.C. Hochberg, *Colloïd Polymer Sci.*, **272**, 409 (1994).
- <sup>50</sup> A. Mitra and A.K. Chakraborty, *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.*, **37**, 418 (1998), et aussi A.K. Bhattacharyya and N.C. Chakravorty, *J. Indian Chem. Soc.*, **68**, 447 (1991).
- <sup>51 a, b</sup> (a) M. Micic, M. Jeremic and K. Radotic, *J. Colloïd Interface Sci.*, **231**, 190 (2000) (b) J. Fromm, B. Rockel, S. Lautner, E. Widnesstein and G. Wanner, *J. Struct. Biol.*, **143**, 77 (2003).
- <sup>52 a, b, c</sup> (a) N. Terashima, R.H. Atalla, S.A. Ralph, L.L. Landucci, C. Lapierre and B. Monties, *Holzforchung*, (a) **50**, 9 (1996), (b) **49**, 521 (1995) et aussi (c) M.T. Tollier, C.Lapierre, B. Monties, C. Francesch and Ch. Rolando, *Proc. 6th. Int.Symp. Wood Pulplng Chem. (ISWPC)*, **1**, 35 (1991).
- <sup>53 a, b</sup> (a) J.-P. Touzel, B. Chabbert, B. Monties, P. Debeire and B.Cathala, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 981 (2003), (b) B. Cathala and B. Monties, *J. Int. Biol. Macromolecules*, **29**, 45 (2001).
- <sup>54a, b</sup> (a) J. Gravitis and P. Erins, *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.*, **37**, 421 (1983), voir aussi ref. in (b) B. Monties, *Ann. Proc. Phytoch. Soc. Europe*, **25**, 161 (1985)
- <sup>55 a, b, c</sup> (a) I. Prigogine, in "Introduction à la Thermodynamique des Processus Irréversibles", Dunod Pub., chap. 4 et 6 (1968), (b) G. Nicolis and I. Prigogine, in "A la Recherche du Complexe", P.U.F. Pub., chap 1,2 et 5 : Les bases microscopiques de la complexité (1989), (c) I. Prigogine and I. Stengel, "La Nouvelle Alliance : Métamorphose de la Science", Gallimard Pub., Chap. V, VI : L'ordre par fluctuation , 2<sup>eme</sup> ed. (2000).
- <sup>56 a, b</sup> (a) V. Castets, E. Dulos, J. Boissonade and P. De Kepper, *Phys. Rev. Letters*, **64**, 2953 (1990), (b) G. Dewel *et al.*, *Physica*, A **213**, 181 (1995), P. De Keppers *et al.* *La Recherche*, **305**, 84 (1998) voir aussi J. Boissonade, *Phys. Rev. Letters*, **90**, 188302 – 1,4 – (2003).
- <sup>57</sup> H. Meinhardt and A.Gierer, *BioEssay*, **22**, 753 (2000) et références citées.
- <sup>58 a, b, c</sup> (a) P. Pietikäinen and P. Aldercreutz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 455 (1990), (b) S. Barsberg and L. Thygesen, *Arch.Biochim.Biophys.*, Gen. Subj. 1472, 625 (1999) et (c) S. Barsberg *et al.*, in U.Schmitt and P. Ander (Eds). *Cost Action E20 Wood Fiber Cell Wall Structure Proc*, E.C. Pub., p. 231 (2003).
- <sup>59 a, b</sup> (a) K. Syrjanen and G. Brunow, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 3425, (1998), (b) G. Brunow *et al.*, *A.C.S. Symp. Ser.*, **697**, 131 (1998).
- <sup>60</sup> M. Wayman and T.I. Obiaga, *Canad. J. Chem.*, **52**, 2102 (1974).
- <sup>61</sup> E. Kukola, S.Koutaniemi, E. Pöllänen, T. K. Lundell, P. Saranpää, I. Kipeläinen, T.H. Teeri and K.V. Fagerstedt, *Planta*, **218**, 497 (2004) et **217**,229 (2003).
- <sup>62</sup> G. Schwarz, *European J. Biochem.*, **12**, 442 (1970).
- <sup>63</sup> J.M. Gosline, F.F.Yew and T. Weis-Fogh, *Biopolymers*, **14**, 1811 (1975) , voir aussi M. Miao *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48553 (2003).
- <sup>64</sup> J.P. Joseleau, O. Faix, K.- I. Kuroda and K. Ruel, *C.R.Biologies*, **327**,809 (2004).
- <sup>65 a, b, c, d</sup> (a) A. Butté, G. Storti and M. Morbidelli, *Macromolecules*, **34**, 5885 (2001), (b) C. A. Barbosa, M.R. Coelho and A.I. Gomes, *Makromolekulare Chemie*, **168**, 91 (2001), (c) H. de Brouwer, J.G. Tsavalas, F.J.Schorck and M.J. Monteiro, *Macromolecules*, **33**, 9239 (2000) (d) G. Moad *et al.*, *Polymer Int.*, **49**, 993 (2000).
- <sup>66 a, b, c, d, e</sup> (a) U. Kummer and G. Baier, *Naturwissenschaften*, **83**, 522 (1996), (b) B.J.M. Hauser and L. F. Olsen, *Biochemistry*, **37**, 2458 (1998), (c) U. Kummer, M.J.B. Hauser, K. Wegmann, L.F. Olsen and G. Baier, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2084 (1997), (d) M.J.B. Hauser, U. Kummer and L. F. Olsen, *Faraday Discuss.*, **120**, 215 (2001), (e) L. F. Olsen, M.J.B. Hauser and U. Kummer, *European J. Biochem.*, **270**, 2796 (2003).
- <sup>67a, b, c</sup> (a) N.G. Veitch, *Phytochemistry*, **65**, 249 (2004), W. Boerjan, J. Ralph and M. Baucher, *Ann. Rev. Plant. Biol.*, **54**, 519 (2003), (c) K.A.Blee, J.W. Choi, A.P. O'Connel, W. Schuch, N.G. Lewis and G.P. Bolwell, *Phytochemistry*, **64**, 163 (2003).

- <sup>68</sup> a, b, c (a) M.A. Ferrer, M.A. Pedreño, R. Munoz and A. Ros Barcelò, *FEBS Letters*, **276**, 127 (1990), (b) A. Ros Barcelo and F. Pomar, *Phytochemistry*, **57**, 1105 (2001), (c) F. Pomar, N. Caballero, M.A. Pedreño and A. Ros Barcelò, *FEBS Letters*, **529**, 198 (2002).
- <sup>69</sup> G. Baier, P. Strasser and U. Kummer, *Z. Naturforschung, A: Physical Sect.*, **50**, 1147 (1995).
- <sup>70</sup> a, b (a) J. Sipila and G. Brunow, *Holzforschung*, **45**, part 2: 275 et 1: 9 (1991) (b) J.H. Grabber, R.D. Hatfield and J. Ralph, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4984 (2003).
- <sup>71</sup> a, b (a) Y. Li, S. Kajita, S. Kawai, Y. Katayama and N. Morohosshi, *J. Plant Res.*, **116**, 175 (2003), (b) B. Chabbert, B. Monties, Y.T. Liu and M. Lagrimini, *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Ind.*, (Kyoto, Japan) p. 481 (1992).
- <sup>72</sup> a, b, c (a) M. Bobák and V. Necesný, *Biol. Plant*, (Praha) **9**, 195 (1967), (b) S. Mizuta and S. Wada, *Plant Cell. Physiol.*, **23**, 257 (1982), (c) M. Yoshida, Y. Hosoo and T. Okuyama, *Holzforschung*, **54**, 469 (2000).
- <sup>73</sup> A.-M. Catesson, *C.R. Biologies*, **327**, 775 (2004).