

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA ROULURE CHEZ LE CHATAIGNIER

### ETUDE EXPERIMENTALE DES CONSEQUENCES D'AMENDEMENTS CALCIQUES II - EFFET DU CALCIUM SUR LE CONTENU PECTIQUE DU BOIS

FREYSSAC V., LAROCHE A., CARLUE M., MORVAN H.

Laboratoire de Biologie Cellulaire Végétale et Valorisation des Espèces Ligneuses  
Faculté des Sciences- 123, Avenue A. Thomas- 87060 Limoges Cédex

#### RESUME

Une expérimentation sous serre a été menée sur de jeunes plants de châtaignier issus d'un même clone. Elle a consisté à contrôler la nutrition calcique de ces plants. Les résultats obtenus montrent une modification quantitative et qualitative des pectines du bois. Lorsque le substrat est enrichi en calcium, les chaînes principales des pectines possèdent davantage d'acides galacturoniques, responsables de la cohésion entre les molécules pectiques. Ces polymères pariétaux pourraient ainsi intervenir plus efficacement dans la cohésion de la lamelle moyenne grâce à leur capacité à former des liaisons intermoléculaires *via* l'ion calcium.

MOTS CLES : châtaignier, lamelle moyenne, pectines, calcium.

#### EXPERIMENTAL STUDIES ON RINGSHAKE IN CHESTNUT TREES

##### RESULTS OF DIFFERENTIAL CALCIUM NUTRITION II - EFFECT OF CALCIUM ON PECTINS IN THE WOOD

#### SUMMARY

The aim of the cultivation, under glass, of young chestnut plants was to control their calcic nutrition. The results show a modification of the pectic content in woods. A high calcium concentration in soil induces an important production of galacturonic acid in pectins backbone. This acid is responsible of the inter and intra molecular cohesion of pectic chains. Thus, these cell wall polymers could improve the middle lamella cohesion thanks to their binding capacity *via* calcium.

KEY WORDS : chestnut, middle lamella, pectins, calcium.

## INTRODUCTION

La roulture est un décollément entre deux cernes de bois d'années successives. CHANSON *et al.* (1989) ont localisé plus précisément ce phénomène au niveau de la lamelle moyenne des cellules. De plus, les observations de LACHAUSSEE (1953) chez le chêne montrent que les sols à faible rapport Ca/Fe auraient une forte incidence sur la roulture. Des études menées au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire et Valorisation des Espèces Ligneuses ont cherché à mettre en relation des amendements calciques et la teneur en éléments minéraux dans les bois de châtaignier (FREYSSAC, 1994).

DAVIS (1949) et KALRA (1956) ont émis l'hypothèse qu'une carence en calcium dans le sol provoquerait une fragilisation des tissus au niveau de la lamelle moyenne. Comme son appellation l'indique, cette partie de la paroi constitue la limite de mitoyenneté entre les cellules adjacentes et assure leur plus ou moins bonne cohésion. Elle est essentiellement constituée de pectines, polymères dont la structure a été rappelée par THIBAUT (1980).

Ce travail se propose d'étudier l'influence d'une nutrition calcique différentielle sur la composition en pectines de bois de châtaigniers nouvellement formés. L'expérimentation a consisté à cultiver de jeunes plants de châtaigniers sur un même substrat avec des apports calciques différents.

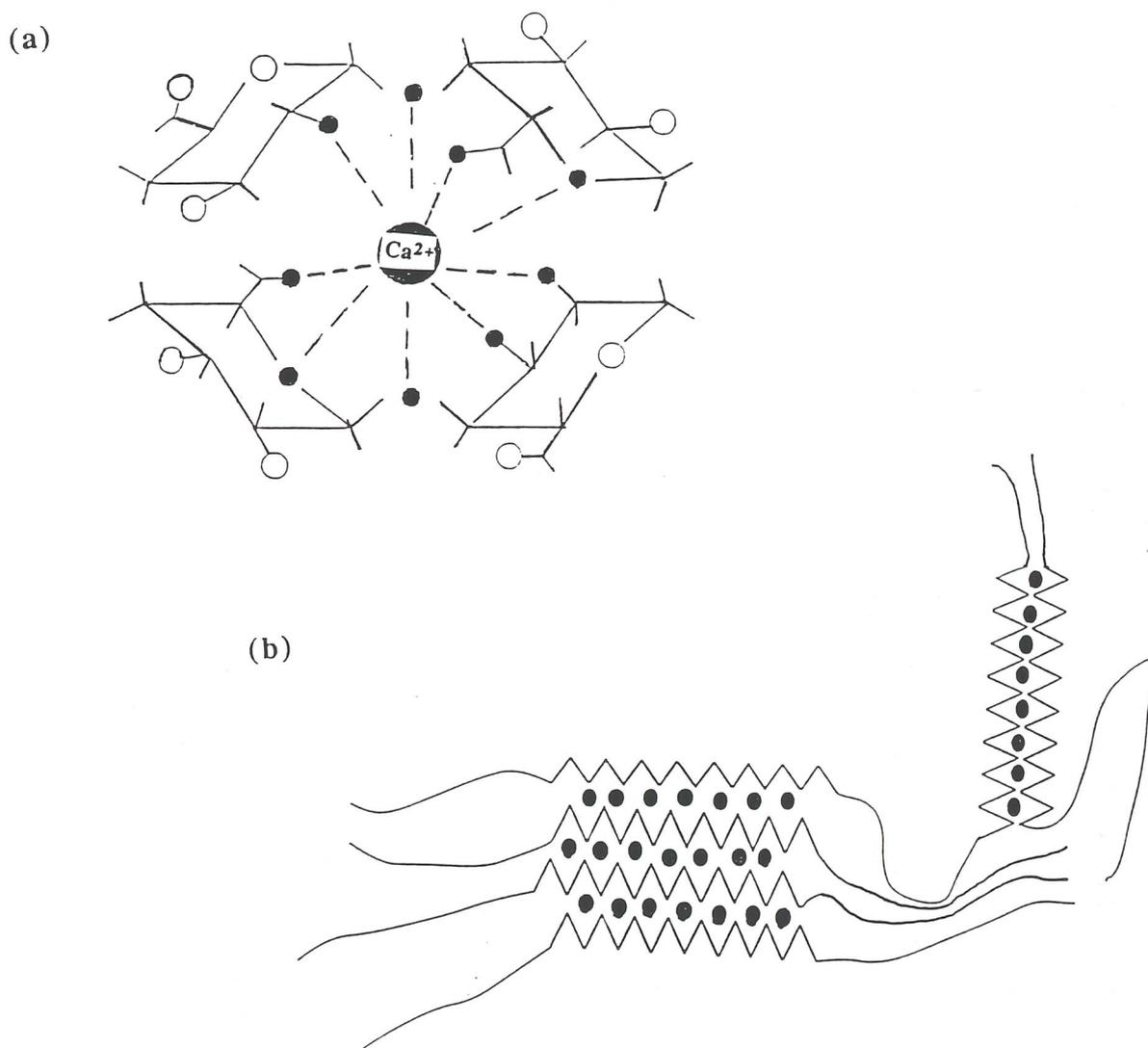
## GENERALITES SUR LES PECTINES

Les pectines sont constituées d'une chaîne principale d'acides D-galacturoniques estérifiés ou non par du méthanol (méthylation) et reliés entre eux par des liaisons  $\alpha$  (1-4). Certains d'entre eux s'associent avec des résidus L-rhamnosyls pour former des unités disaccharidiques de  $\alpha$ -D-GalA (1-2)-L-Rha liées entre elles par des liaisons  $\alpha$  (1-4). Les résidus rhamnosyls peuvent également être substitués par des chaînes latérales formées d'arabinose et de galactose pouvant constituer jusqu'à 25 % de la totalité des pectines (KENNEDY et WHITE, 1988).

Pour les pectines faiblement méthylées, GRANT *et al.* (1973) a proposé le modèle de la boîte à oeufs ("egg-box") comme arrangement spatial au sein de la paroi. L'ion calcium prendrait part à neuf liaisons de coordination avec 2 oxygènes des liaisons glycosidiques, 2 oxygènes des cycles, 2 fonctions acides et 3 fonctions alcools (figure n°1a). Cette structure en "egg-box" n'est réalisable que dans des conditions bien précises. Tout d'abord, les chaînes principales doivent contenir un nombre important d'acides galacturoniques successifs. De plus, les fonctions carboxyliques de ces acides ne doivent pas être méthyl-estérifiées. Finalement, les chaînes latérales fixées sur les résidus rhamnosyls proches de blocs d'acides galacturoniques ne doivent pas être trop volumineuses, pour ne pas provoquer d'encombrement stérique autour des carboxyles.

Ces structures en "egg-box" permettent la formation de liaisons intermoléculaires (figure n°1b) entre les chaînes pectiques. Ainsi, l'organisation des pectines (JARVIS, 1984), constituées de blocs alternés et inégalement répartis de zones fortement branchées et méthyl-estérifiées et de zones homogalacturoniques diversement estérifiées explique l'hétérogénéité qui caractérise la répartition des structures en "egg-box" le long des chaînes pectiques, la plus ou moins grande densité des liaisons intermoléculaires et les différences dans les propriétés de gélification.

La roulure étant un décollement de la lamelle moyenne, nous avons émis l'hypothèse que la fréquence de ces structures en "egg-box" avait une certaine influence sur la cohésion de cette partie de la paroi. Le défaut pourrait provenir d'un déficit d'ions calcium n'assurant plus leur rôle de coordinants au sein de la structure. Indépendamment de son rôle cohésif, le calcium influence la croissance des végétaux en agissant sur la déstructuration acido-dépendante des polymères pariétaux (TEPFER et TAYLOR, 1981). Ainsi, il est imaginable qu'une privation de calcium aboutisse à des modifications profondes du métabolisme pectique, non seulement selon le modèle proposé par REES (1977), *via* le contrôle d'activités enzymatiques pariétales telles que les pectine-méthyl-estérases et les endopolygalacturonases (MOUSTACAS *et al.*, 1986 ; GOLDBERG, 1984), mais également au niveau des méthyltransférases endomembranaires (KAUSS et HASSID, 1967 ; VANNIER *et al.*, 1992).



**Figure n°1** : Mécanisme d'association des chaînes pectiques, décrit par Grant *et al.* (1973).

a : structure en « egg-box », en présence de l'ion  $Ca^{2+}$ , 9 liaisons de coordination (---) sont réalisées avec 4 acides galacturoniques non méthylés (O, atome d'oxygène ne participant pas à la liaison avec le calcium, ●, atome d'oxygène lié avec le calcium).

b : associations intermoléculaires de chaînes pectiques de type « egg-box » (●, ion calcium).

## MATERIEL ET METHODES

### 1 - ORIGINE ET CULTURE DU MATERIEL BIOLOGIQUE

Des plants de châtaigniers hybrides clonés (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*, cv Marsol C07) issus de culture *in vitro* ont été répartis en quatre lots homogènes (A, B, C, D) de 25 plants. Un premier lot (A) a été sacrifié avant culture afin d'établir un état de référence de la composition en pectines des bois. Les trois autres lots (B, C, D) ont été cultivés pendant trois mois sur un même substrat pauvre en ions échangeables, notamment en calcium (0,3 meq pour 100 g de sol sec), provenant d'un horizon C de sol de châtaigneraie (Domaine de Brie, commune de Champagnac-la-Rivière, Haute-Vienne). Ces différents lots ont reçu des amendements calciques variables (B:0, C:2, D:4 meq.l<sup>-1</sup>). Le calcium a été apporté sous forme CaCl<sub>2</sub> dans l'eau d'arrosage en alternance avec un apport d'oligoéléments (H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 4 mM - MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 1 mM - ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 1mM - Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, 1mM - CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O, 1mM).

Les racines des plants sont débarassées du substrat de culture utilisé en pépinière, rincées à l'eau déminéralisée et pralinées. Les plants sont arrosés à l'eau déminéralisée, pendant les trois premières semaines de culture, afin de limiter le choc minéral lors de l'enracinement.

Après trois mois de culture en serre, les plants sont récoltés et fractionnés en plusieurs types d'échantillons. Après excision des racines et des feuilles, les parties néoformées des axes sont séparés des parties plus anciennes, déjà existantes lors de la plantation. Les différents types de bois sont écorcés. Sur chaque rameau néoformé, les deux entre-noeuds terminaux, c'est à dire les plus récents, sont recueillis séparément. Chaque zone du végétal ainsi prélevée est placée à l'étuve 2 heures à 80 °C et 36 heures à 60 °C. Elles sont ensuite réduites en poudre à l'aide d'un broyeur à billes (PROLABO).

### 2 - METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE

#### 2.1 - Extraction des pectines

L'extraction se fait en trois étapes. Chaque étape consiste à mettre en suspension le même échantillon de poudre végétale (1,5 g) dans trois solvants successifs. Les polymères seront « extraits » s'ils passent en solution dans le solvant en question. Ils sont alors séparés de la poudre de bois par centrifugation. La première phase d'extraction consiste à mettre la poudre en suspension dans 20 ml d'eau déminéralisée sous agitation (4 °C, 16 h). Après centrifugation (30 min à 12000 g), le culot est repris dans 20 ml d'eau déminéralisée et porté à reflux (120 °C, 1h). Une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que la précédente permet d'effectuer sur la poudre résiduelle une dernière extraction dans 20 ml de CDTA (acide 1,2 diaminocyclo-hexane-N,N, N', N'-tétra-acétique), 22 h à 4 °C, sous agitation. Une dernière centrifugation permet d'isoler le troisième surnageant d'extraction.

A chaque étape, 2 ml de chacun des surnageants sont prélevés pour l'analyse minérale. Le reste est lavé à l'acétate d'éthyle (v/v, 1/1) afin d'éliminer les tanins susceptibles d'interférer lors des dosages colorimétriques. Une dialyse de 36 h contre de l'eau déminéralisée permet d'évacuer les ions et les molécules de masse moléculaire inférieure à 6000 Da (Spectrapor membrane MWCO : 6-8000). Les trois extraits dialysés sont ensuite stockés à -20 °C avant analyse.

## 2.2 - Méthodes d'analyse

### *Dosages colorimétriques*

Les oses totaux sont dosés d'après la méthode au phénol sulfurique de DUBOIS *et al.* (1956). Les acides uroniques sont quantifiés par la méthode au méthahydroxydiphényl (MHDP) de BLUMENKRANZ et ASBOE-HANSEN (1973). L'interférence des oses neutres et des acides uroniques dans les deux dosages précédents peut être corrigée par la méthode de calcul établie par MONTREUIL et SPICK (1963).

### *Microanalyse directe*

Une méthode de microanalyse directe par chromatographie liquide gaz (CLG), mise au point au sein du laboratoire (MARGA, 1993), permet de déterminer la composition en monosaccharides de la poudre de bois (1 mg) sans avoir recours à des étapes préalables d'extraction. Les conditions d'hydrolyse, de dérivation et de séparation des monosaccharides sont celles décrites par KAMERLING *et al.* (1975) modifiée par MONTREUIL *et al.* (1986).

### *Analyse minérale*

Les ions des 2 ml de surnageant de chaque extraction, prélevés avant dialyse ont été dosés au spectrophotomètre d'absorption atomique ou à émission de flamme (ATOMSPEK H 1170 - Hilger et Watts).

## RESULTATS

L'amendement calcique induit une augmentation de la teneur en éléments minéraux, aussi bien dans les écorces que dans les bois des plants de châtaigniers (FREYSSAC, 1994). De ce fait, la première étape du travail consiste à mesurer la fraction ionique dans les extraits de poudre de bois.

Les teneurs en calcium dans les surnageants d'extraction (tableau I) sont globalement plus fortes lorsqu'il y a eu un amendement calcique (4 meq.l<sup>-1</sup>) par rapport à un sol carencé (augmentation de 38 %). Cette variation affecte plus particulièrement les extraits à l'eau froide (F1).

	F1	F2	F3	Total
0	2,00	1,97	7,50	11,47
2	3,69	1,55	8,67	13,91
4	4,70	3,52	7,47	15,69

0, 2, et 4 sont les doses de calcium administrées pendant la culture (meq.l<sup>-1</sup>)  
F1 : Fraction extraite à l'eau froide  
F2 : Fraction extraite à l'eau bouillante  
F3 : Fraction extraite au CDTA

**Tableau I : DOSAGE DU Ca<sup>2+</sup> DANS CHAQUE FRACTION DE L'EXTRACTION A PARTIR DU BOIS NEOFORME.**

Les teneurs sont exprimées en meq. pour 100g de bois sec

A l'inverse, l'extrait au CDTA (F3) contient des quantités relativement stables. Le léger excès observé à 2 meq.l<sup>-1</sup> peut simplement être la conséquence du déficit constaté lors de l'extraction précédente (F2).

Dans un deuxième temps, la composition des polysaccharides contenus dans les bois nouvellement formés selon que le substrat ait été plus ou moins enrichi en calcium (tableau II) montre qu'il y a, au total, une prédominance des oses neutres sur les acides uroniques. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux acides uroniques (AU) considérés comme marqueurs des pectines, on constate qu'ils sont répartis de manière homogène dans les fractions F1, F2 et F3, avec néanmoins une teneur plus élevée dans F2 (extraction à l'eau bouillante). Ces AU sont, au total, présents en plus grande quantité lorsqu'on apporte du calcium exogène (augmentation de 60 %). Cet effet du traitement calcique constaté au niveau du total extrait est aussi observé dans chacune des trois fractions.

	F1		F2		F3		Total extrait	
	AU	ON	AU	ON	AU	ON	AU	ON
B <sub>nf</sub> 0	1,5	37,0	2,2	53,6	1,1	13,5	4,8	104,1
B <sub>nf</sub> 2	1,4	18,4	3,5	36,4	1,6	18,5	6,4	73,3
B <sub>nf</sub> 4	2,1	39,3	3,4	44,8	2,2	11,6	7,7	90,4

**Tableau II : QUANTITES D'OSSES NEUTRES (ON) ET D'ACIDES URONIQVES (AU) PRESENTS DANS CHACUNE DES ETAPES D'EXTRACTION A PARTIR DU BOIS NEOFORME** (exprimées en  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de bois sec). Les valeurs ont été obtenues par dosages colorimétriques (DUBOIS *et al.*, 1956; BLUMENKRANZ et ASBOE-HANSEN, 1973).

0, 2 et 4 sont les doses de calcium administrées pendant la culture (meq.)

F1 : Fraction extraite à l'eau froide

F2 : Fraction extraite à l'eau bouillante

F3 : Fraction extraite au CDTA

Pour tenter de préciser les caractéristiques de la fraction pectique, la composition monosaccharidique a été établie par la méthode de microanalyse directe sur les deux entre-noeuds les plus récents, réduits en poudre. Les résultats présentés (tableau III) ne prennent en compte que les monosaccharides constitutifs des chaînes principales des pectines : acide galacturonique (GalA) et rhamnose (Rha). L'effet d'un traitement par le calcium se traduit par une augmentation de la teneur en GalA d'une part (100 %) et du rapport molaire GalA/Rha d'autre part (72 %). L'ensemble de ces observations sur la teneur en polysaccharides montre que dans les extraits de bois jeunes de châtaignier, le rapport AU/ON (oses neutres) est très faible. Les extraits contiennent sans doute des mélanges hétérogènes de polymères parmi lesquels ceux qui nous intéressent pour leur capacité bien connue de fixation du calcium, à savoir les pectines. Elles sont à l'évidence minoritaires dans chaque extrait.

	0 meq. <sup>-1</sup>	2 meq. <sup>-1</sup>	4 meq. <sup>-1</sup>
GalA ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	38,4	45,0	70,5
GalA/Rha	1,8	2,3	3,1

**Tableau III : MICROANALYSE DIRECTE SUR LES ENTRE-NOEUDS LES PLUS RECEMMENT FORMES.**

Quantité d'acide galacturonique (GalA) dosé par cette méthode en  $\mu\text{g}$  par mg de bois sec, calcul du rapport molaire GalA/Rhamnose (Rha). Les valeurs ont été calculées en considérant tous les rendements d'hydrolyse égaux à 1.

Les résultats obtenus par la méthode de microanalyse directe (tableau III) confirment ceux obtenus sur les extraits indiquant que l'effet du calcium est double : il modifie qualitativement et quantitativement les pectines, indépendamment de sa présence dans la fraction ionique associée aux polymères extraits.

## DISCUSSION

Au vu de ces résultats, deux questions se posent. La première est relative à l'effet de l'amendement calcique sur la structure chimique des pectines et l'analyse des conséquences possibles en terme de cohésion intercellulaire. La deuxième consiste à interpréter la relation entre la fraction calcique des extraits et leur contenu en pectines. La présence du calcium dans les extraits peut résulter soit d'un simple déplacement par diffusion en fonction du gradient de concentration, d'une solubilisation de concrétions minérales, de la déstructuration de concrétions organiques de type oxalate, ou enfin de l'association intermoléculaire (« egg-box ») par l'intervention d'un agent chélateur (CDTA). Dans les tissus de châtaignier, l'augmentation de la teneur en calcium dans les fractions aqueuses relève, sans doute du premier type de considération, puisque ce paramètre évolue dans ces fractions en fonction de l'existence ou non d'un amendement calcique. Par contre, l'effet du CDTA dans la fraction F3 permet de constater effectivement une augmentation de la teneur en acides uroniques (AU) donc, à priori une déstructuration des liaisons en « egg-box ». La teneur en calcium ne suit pas la même évolution, ce qui indique qu'une partie du calcium présent a une autre origine, notamment les concrétions organiques dont la présence a été signalée (FREDON J.J., communication personnelle).

Par ailleurs, les résultats de la microanalyse directe montrent que le traitement calcique a pour premier effet d'augmenter la teneur en AU des tissus jeunes. L'hétérogénéité des chaînes pectiques, due à la répartition en bloc de zones homogalacturonique et rhamnogalacturonique (JARVIS, 1984) peut être appréciée grossièrement par le rapport molaire GalA / Rha. En effet, ce rapport donne une image de la possibilité de branchement des chaînes latérales. S'il est égal à 1, les zones polygalacturoniques sont, à priori, inexistantes et les liaisons intermoléculaires de type « egg-box » irréalisables. Toute augmentation de ce paramètre peut provenir d'une synthèse de blocs polygalacturoniques rendant possible la mise en place d'une structure en « egg-box ». Toutefois, le paramètre GalA / Rha ne donne qu'une image imparfaite puisqu'il ne permet pas de discriminer réellement la distribution des deux types de zones (rhamnogalacturonanes et homogalacturonanes), or, seuls les fragments suffisamment longs de blocs polygalacturoniques permettent l'établissement de liaisons intermoléculaires de type "egg-box". Dans l'état actuel des recherches, il est donc difficile de conclure sur le rôle réel du calcium dans la structuration intermoléculaire des chaînes pectiques et, par conséquent, d'évaluer son action sur la cohésion intercellulaire. Toutefois, cette hypothèse ne peut pas non plus être rejetée dans la mesure où les pectines synthétisées sur un sol amendé en calcium sont plus riches en AU que celles formées sur un sol carencé, ceci aussi bien dans le total extrait que dans les résultats de microanalyse directe.

## CONCLUSION

Les données concernant la composition polysaccharidique du bois de châtaignier étant rares, nos résultats apportent des précisions et confirment ainsi d'autres données acquises récemment dans le laboratoire. En outre, leur caractère préliminaire ne les empêchent pas d'être en accord avec l'hypothèse

de départ suggérant une corrélation entre la cohésion de la lamelle moyenne, la teneur en calcium et la richesse des structures en « egg-box ». Il apparaît aujourd'hui que la teneur en calcium dans les tissus augmente si le sol de culture a été enrichi en calcium. De plus, la nutrition calcique influence le métabolisme des pectines du bois de châtaignier puisque les quantités de pectines extraites ou synthétisées sont plus importantes dans les parties néoformées des plants ayant reçu un apport, résultat observé avec deux types d'analyses (avec ou sans extraction). De plus, la structure de ces polysaccharides est également modifiée. Il apparaît qu'un apport calcique augmente sensiblement la possibilité d'établissement des « egg-box » en favorisant la synthèse d'acides galacturoniques supplémentaires sur la chaîne principale des pectines. Ainsi, il semble plausible que le calcium puisse intervenir sur la biosynthèse des chaînes pectiques en modifiant la proportion d'acide galacturonique. Ce fait doit être vérifié et ne doit pas faire oublier les autres aspects bien connus dans d'autres modèles, notamment les variations du taux d'estérification des blocs homogalacturoniques (JARVIS, 1984). Dans ces conditions, il sera possible de confirmer si oui ou non le calcium est impliqué dans la cohésion du bois de châtaignier en général et dans l'origine de la roulure, en particulier.

### BIBLIOGRAPHIE

- BLUMENKRANZ N., ASBOE-HANSEN G., 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, 54, 484-489.
- CARPITA N.C., GIBEAUT D.M., 1993.- Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3 (1), 1-30.
- CHANSON B., LEBAN J.M., THIBAUT B., 1989.- La roulure du châtaignier (*Castanea sativa* Mill.). *Forêt méditerranéenne*, XI (1), 15-34.
- DAVIS D. E., 1949.- Some effect of calcium deficiency on the anatomy of *Pinus tadea*. *Am. J. Bot.*, 36, 276-282.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F., 1956.- Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- FREYSSAC V., 1994.- Influence de la nutrition calcique sur la composition en pectines des tissus de jeunes plants de châtaigniers cultivés en conditions contrôlées. DEA, Université Scientifique et Technique, Clermont-II, 36 p.
- GOLDBERG R., 1984.- Changes in the properties of cell wall pectinmethylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Physiol. Plant.*, 61, 58-63.
- GRANT G.T., MORRIS E.R., REES D.A., SMITH P.J.S., THOM D., 1973.- Biological interactions between polysaccharides and divalents cations : the egg-box model. *F.E.B.S. Letters*, 32, 195-198.
- JARVIS M.C., 1984.- Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Environ.*, 7, 153-164.
- KALRA G. S., 1956.- Response of the tomato plant to calcium deficiency. *Bot. Gaz.*, 118 (1), 18-37.
- KAMERLING J.P., GERWIG G. S., VLIEGENTHART J.F.G., CLAMP J. R., 1975.- Characterisation by gas liquid chromatography mass of permethylsilyl glycosides obtained in methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem. J.*, 151, 491-495.

- KAUSS H., HASSID W.Z., 1967.- Enzymatic introduction of the methylester groups of pectin. *J. Biol. Chem.*, 242, 3449-3453.
- KENNEDY J.F., WHITE C.A., 1988.- The plant, algal and microbial polysaccharides. *In Carbohydrate Chemistry*, Kennedy, ed.. Clarendon Press-Oxford Univ. Press, Oxford, 220-262.
- LACHAUSSEE E., 1953.- Note upon shake and forest crack of *Quercus robur*.. *For. Prod. Abstr.*,15, (1598).
- MARGA F., 1993.- Caractérisation de désordres physiologiques de microplants de pommier cultivés en milieu liquide. Thèse, Université Technologique, Compiègne, France, 122 p.
- MOUSTACAS A.M., NARI J., DIAMANTIDIS G., NOAT G., CRASNIER M., BOREL M., RICARD J., 1986.- Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reading at the surface of plant cells. II- The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J. Biochem.*, 155, 191-197.
- MONTREUIL J., SPIK G., 1963.- Microdosage des glucides, Fasc. 1 : Méthodes colorimétriques de dosages des glucides totaux. Laboratoire de chimie biologique, Fac. Sci., ed., Lille, 148 p.
- MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G., STRECKER G., 1986.- Glycoproteins. *In : Carbohydrate analysis, a practical approach*. Chaplin M.F. & Kennedy J.F., eds., IRL Press Oxford, Washington DC, 143-204.
- REES D.A., 1977.- Outline studies in biology. Polysaccharide shapes. Chapman & Hall, eds., London, Engl., 80 p.
- TEPFER M., TAYLOR I.E.P., 1981.- The interaction of divalent cations with pectic substances and their influence on acid-induced cell wall loosening. *Can. J. Bot.*, 59, 1522-1595.
- THIBAUT J.F., 1980.- Les substances pectiques. *In : Les polymères Végétaux*. Gauthier-Villars, eds., Paris. 232-251.
- VANNIER M.P., THOIRON B., MORVAN C., DEMARTY M., 1992.- Localization of methyltransferase activities throughout the endomembrane system of flax hypocotyls. *Biochem. J.*, 286, 863-868.