



HAL
open science

Etude des mécanismes de régulation de la formation du bois en réponse aux contraintes de l'environnement

Fabien Mounet

► **To cite this version:**

Fabien Mounet. Etude des mécanismes de régulation de la formation du bois en réponse aux contraintes de l'environnement. Biologie du développement. Université Paul Sabatier (Toulouse 3), 2023. tel-04718047

HAL Id: tel-04718047

<https://hal.science/tel-04718047v1>

Submitted on 2 Oct 2024

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.

Public Domain

Université Paul Sabatier (Toulouse III)
Ecole Doctorale SEVAB

Demande d'Habilitation à diriger des recherches (HDR)

Discipline : Sciences de la vie

Spécialité : Physiologie Végétale

**Etude des mécanismes de régulation de la formation du
bois en réponse aux contraintes de l'environnement**

Document de synthèse présenté par

Fabien Mounet-Gilbert

Maître de Conférences



Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV)

UMR 5546 UPS-CNRS-INP

24, Chemin de Borde Rouge

31320 AUZEVILLE TOLOSANE - FRANCE

Soutenance le 7 Juillet 2023 devant le jury composé de:

Examinatrice : Chantal Teulières (Pr UPS)

Examinatrice : Elisabeth Jamet (DR CNRS)

Rapporteur : Christian Dubos (DR INRAe)

Rapporteur : Marie Baucher (Pr ULB)

Rapporteur : Gilles Pilate (DR INRAe)

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma famille car il est difficile de trouver le juste équilibre entre le métier d'enseignant – chercheur, le rôle de conjoint et celui de père de famille. Merci Louise de m'avoir motivé pour passer mon HDR et pour ton soutien indéfectible. Violette, Lucien, vous m'avez généreusement accordé quelques minutes par jour pour travailler sur ce manuscrit, je vous en remercie. Je vous aime tous les trois. Ce travail m'offre une fois de plus la possibilité d'envoyer une pensée à mes parents et mes grand-mères.

J'ai aussi envie de revenir en arrière pour remercier tous les « vieux copains de la science », des gens formidables qui ont une place de choix dans mes souvenirs, en particulier Cécile et Yo, toujours là et toujours les mêmes. Merci à Martine, Annick, Christophe et Pierrot. Merci à Michel et Armand.

Je tiens à remercier l'équipe de recherche qui m'a adopté. En tout premier lieu merci à Jacqueline qui m'a tant appris au niveau professionnel et personnel : 12 années de partage et de confiance, je signe pour 12 de plus quand tu veux !! Merci à Chantal et Hua pour tous les bons moments passés au labo, à l'université et en dehors. Merci au duo de choc, Annabelle et Nathalie : bonne humeur, gentillesse, humour et tellement d'autres qualités vous caractérisent. J'ai adoré et j'adore encore travailler avec vous... il reste tellement de bêtises à dire que ce serait dommage de s'arrêter en si bon chemin ! J'ai bien besoin de deux féministes pour me recadrer. Merci à tous les anciens « non perm » de l'équipe bien sûr, mais je ne peux m'empêcher d'avoir une pensée particulière pour Raphael et Inès. Des moments inoubliables pour moi et l'immense fierté d'avoir participé à une étape qui compte dans votre vie. Quelle chance j'ai eu de vous avoir comme doctorants.

Je remercie bien entendu tous les collègues du LRSV, qui contribuent à me donner envie de pousser la porte du labo chaque jour (ou presque !). Je remercie tous les collègues de l'équipe pédagogique de Physiologie Végétale : c'est bien agréable d'être dans le même bateau... alors *continuons à écoper ensemble* ! Je souhaite adresser des remerciements à Nicolas, mon binôme indéfectible de L1, toujours motivé et toujours de bonne humeur. C'est super de travailler et d'enseigner à tes côtés. Je remercie les milliers d'étudiants de tous niveaux que je côtoie chaque année et qui font de ce métier un éternel renouvellement.

Enfin je remercie chaleureusement les membres du jury qui ont accepté d'allouer du temps pour évaluer mes travaux et lire les quelques idées que j'ai péniblement jetées sur le papier en espérant que certaines pourraient être originales ou pertinentes.

Table des matières

Curriculum Vitae

1 Etat Civil.....	1
2 Diplômes et formations.....	1
3. Cursus professionnel.....	1
4. Bilan des publications.....	2
5. Participation à des projets nationaux et internationaux.....	13
6. Activités d'enseignement.....	15
7. Responsabilités administratives.....	19

Chapitre 1 : Travaux de thèse

1.1 Introduction.....	25
1.2 Profils métaboliques des différents tissus du fruit.....	27
1.3 Etude des mécanismes régulant l'expansion cellulaire dans le mésocarpe et le tissu loculaire par des approches intégratives.....	33
1.4. Rôle du transport de l'auxine dans le développement précoce du fruit.....	39

Chapitre 2 : Travaux de Postdoctorat

2.1 Caractérisation du rôle de l'enzyme GDGL Lipase 1 dans la polymérisation de la cutine chez la Tomate.....	49
2.2 Identification de nouveaux mécanismes de résistance aux stress abiotiques par criblage d'une population d' <i>A. thaliana</i> transgéniques.....	57

Chapitre 3 : Travaux de recherche en tant que Maître de Conférence

3.1 Régulation et dynamique de la formation du bois	
3.1.1 Introduction.....	65
3.1.2 Thématiques de recherche de l'équipe d'accueil.....	73
3.1.3 Mes premiers pas dans le « bois ».....	75
3.2 Régulation de la formation du bois en réponse au stress froid	
3.2.1 Remodelage des tissus du bois en réponse au froid chez l'Eucalyptus.....	83
3.2.2 Les CBF sont impliqués dans le remodelage du xylème.....	101
3.2.3 Identification des cibles transcriptionnelles des CBF dans le xylème.....	121
3.3 Régulation de la formation du bois en réponse au stress hydrique	
3.3.1 Le manque d'eau et la disponibilité en K ⁺ influencent la xylogénèse.....	131
3.3.2 La perception du sodium induit une balance entre croissance et réponse au stress dans le xylème.....	153

Chapitre 4 : Projet de recherche

4.1 Comment les signaux de stress peuvent-ils orienter les trajectoires de développement des cellules du xylème ?.....	175
4.2. Quels rôles jouent les régulations post transcriptionnelles dans la dynamique de formation des tissus vasculaires en condition de stress ?.....	179
4.2.1 Rôle de l'épissage alternatif des ARN messagers.....	179
4.2.2 Rôle des protéines Musashi dans le développement du bois.....	183
4.3 Quelle est la contribution des tissus vasculaires dans la tolérance des arbres vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques ?.....	187
4.3.1 Les contraintes abiotiques.....	187
4.3.2 Les contraintes biotiques.....	193

Curriculum Vitae

1. Etat Civil:

Fabien Mounet-Gilbert

Né le 03.12.1981 à Bergerac (24)

Marié - 2 enfants

Coordonnées personnelles:

2, chemin de la lacade

31320 Auzeville Tolosane

Tél.: 06 51 71 59 03

Email: fabmounet@hotmail.com

Coordonnées professionnelles :

UMR5546 UPS-CNRS-INP - Laboratoire de
Recherche en Sciences Végétales

24 Chemin de Borderouge

31320 Auzeville Tolosane

Tél.: 05 34 32 38 25

Email: fabien.mounet@univ-tlse3.fr

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6632-3070>

2. Diplômes et formations

- **Doctorat (2004 - 2008)** : Ecole doctorale de l'Université Bordeaux 2.
- **Master II Génétique et Développement des Plantes (2003-2004)** : Universités Bordeaux 1 et 2.
- **Master I Biotechnologie et développement des plantes (2002-2003)** : Université Bordeaux 2.
- **Licence Biologie cellulaire et Physiologie (2001-2002)** : Université Bordeaux 2.
- **DEUG Sciences de la vie (1999-2001)** : Université Bordeaux 2.
- **Baccalauréat série S option Biologie mention Européenne Anglais (1998-1999)** : Lycée François Magendie (académie de Bordeaux).

3. Cursus professionnel

Activités de recherche :

- **2011 - 2023 : Maître de Conférence dans l'Equipe « Régulation et Dynamique de la formation du bois chez l'Eucalyptus » (LRSV - Université Toulouse III).**

Etude des mécanismes de régulation de la formation du bois en réponse à des contraintes abiotiques chez l'Eucalyptus (*Cao et al., 2015, Soler et al., 2016, N'Guyen et al., 2017, Ployet et al; 2018, 2019; Camargo et al., 2019; Favreau et al., 2019, Cao et al., 2020 ; Dai et al., 2020, Yu et al., 2022 ; Hadj Bachir et al., 2023 in press*) .

- **2010- 2011 : Stage post doctoral (Université de Malaga, laboratoire LBBV)**

Criblage d'une collection de plantes transgéniques et isolation des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana* (Superviseur : Miguel Angel Botella)

- **2008- 2010 : Stage post doctoral (UR BIA, INRA de Nantes)**

Caractérisation fonctionnelle d'une GDSL lipase impliquée dans l'assemblage des assises cuticulaires à la surface du fruit de tomate (Girard*, Mounet* *et al.*, 2012). Superviseurs : D. MARION et B. BAKAN)

- 2004 - 2008 : Doctorat de Biologie-Santé (UMR 619 BF, INRA de Bordeaux)

Le développement précoce du fruit de tomate :Analyse globale du caractère charnu et étude de la contribution du transport de l'auxine (Mounet *et al.*, 2007, 2009, 2012; Lemaire-Chamley *et al.*, 2019). Superviseurs : A. MOING et M. LEMAIRE-CHAMLEY)

- Juillet - Aout 2004 : CDD (UMR 619 BF, INRA de Bordeaux)

Phénotypage d'une collection de mutants Microtom, approche TILLING (Superviseur : D. JUST)

- Janvier - juin 2004 : Stage de Master II (UMR 619 BF, INRA de Bordeaux)

Etude de la voie de biosynthèse de la vitamine C chez des transformants de tomate (Alhagdow *et al.*, 2007). Superviseur : P. BALDET)

- Mai - Juillet 2003 : Stage de Maîtrise (UMR 619 BF, INRA de Bordeaux)

Rôle et régulation du gène ORFX chez la tomate (Baldet *et al.*, 2006). Superviseur : P. BALDET)

Activités d'enseignement :

- 2011 - 2023 : Maître de Conférence à l'Université Paul Sabatier (Toulouse III)

- 2011 : Cours de génomique au sein du module « Genomica, Proteomica y Metabolomica » (6h de cours magistraux, Superviseur Miguel Angel Botella)

- 2007 - 2008 : ATER Université Bordeaux 2

Travaux pratiques de biologie végétale en Licence 1, 2 et 3 (140h de TP, tuteur : Martine Dieuaide-Noubani)

- 2004 - 2007 : Monitorat Université Bordeaux 2

Travaux pratiques de biologie végétale en Licence 2 et 3 (96h de TP par an, tuteur : Martine Dieuaide-Noubani)

4. Bilan des publications

Articles en tant que premier auteur: 4

Article en tant que dernier auteur: 2

Articles en tant que co-auteur:11

Chapitre de livre: 2

Communications orales: 7

Brevets: 1

Autres (Congrès locaux, posters, co-auteur de communications): 29

Publications avec comité de lecture:

- Takawira LT, Hadj Bachir I, Ployet R, Tulloch J, San Clemente H, Christie N, Ladouce N, Dupas A, Grima-Pettenati J, Myburg AA, Mizrachi E, **Mounet F**, Hussey SG (2023) Functional investigation of five R2R3-MYB transcription factors associated with wood development in Eucalyptus using DAP-seq-ML. *Plant Mol. Biol. In press*

- Yu H, Li M, Zhu Z, Wu A, **Mounet F**, Pesquet E, Grima-Pettenati J, Cassan-Wang H, (2022) Overexpression of EgrIAA20 from *Eucalyptus grandis*, a non-canonical Aux/IAA gene, specifically decouples lignification of the different cell-types in Arabidopsis secondary xylem. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23

- Dumond L, Lam PY, Van Erven G, Kabel M, **Mounet F**, Grima-Pettenati J, Tobimatsu Y, Hernandez-Raquet G (2021) Termite Gut Microbiota Contribution to Wheat Straw Delignification in Anaerobic Bioreactors. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9, 5, 2191–2202
- Dai Y, Hu G, Dupas A, Medina L, Blandels N, San Clemente H, Ladouce N, Badawi M, Hernandez-Raquet G, **Mounet F**, Grima-Pettenati J and Cassan-Wang H (2020) Implementing the CRISPR/Cas9 technology in Eucalyptus hairy roots using wood-related Genes. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3408
- Cao PB, Ployet R, Nguyen C, Dupas A, Ladouce N, Martinez Y, Grima-Pettenati J, Marque C, **Mounet F** and Teulières C (2020) Wood architecture and composition are deeply remodeled in frost sensitive Eucalyptus overexpressing CBF/DREB1 transcription factors. *Int. J. Mol. Sci.* 21:3019
- Ployet R, Veneziano Labate MT, Regiani Cataldi T, Christina M, Morel M, San Clemente H, Denis M, Favreau B, Tomazello Filho M, Laclau JP, Labate C, Chaix G, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2019) A systems biology view of wood formation in Eucalyptus grandis trees submitted to different potassium and water regimes. *New Phytol* 223: 766–782
- Favreau B, Denis M, Ployet R, **Mounet F**, Da Silva HP, Franceschini L, Laclau JP, Labate C, Carrer H (2019) Distinct leaf transcriptomic response of water deficient Eucalyptus grandis submitted to potassium and sodium fertilization. *PLoS One* 14(6): e0218528
- Lemaire-Chamley M, **Mounet F**, Deborde C, Maucourt M, Jacob D, Moing A (2019) NMR-Based Tissue and Developmental Metabolomics of Tomato Fruit. *Metabolites* 9: 93
- Ployet R, Soler M, Carocha V, Ladouce N, Alves A, Rodrigues J-C, Harvengt L, Marque C, Teulières C, Grima-Pettenati J, **Mounet F** (2018) Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in Eucalyptus. *Tree Physiol* 1–14
- Soler M, Plasencia A, Lepikson-Neto J, Camargo ELO, Dupas A, Ladouce N, Pesquet E, **Mounet F**, Larbat R, Grima-Pettenati J (2016) The Woody-Preferential Gene EgMYB88 Regulates the Biosynthesis of Phenylpropanoid-Derived Compounds in Wood. *Front Plant Sci.* 7:1422
- Sixto H, González-González BD, Molina-Rueda JJ, Garrido-Aranda A, Sanchez MM, López G, Gallardo F, Cañellas I, **Mounet F**, Grima-Pettenati J, Cantón F (2016) Eucalyptus spp. and Populus spp. coping with salinity stress: an approach on growth, physiological and molecular features in the context of short rotation coppice (SRC). *Trees - Struct Funct* 30:1873–1891.
- Cao PB, Azar S, SanClemente H, **Mounet F**, Dunand C, Marque G, Marque C, Teulières C. (2015) Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in Eucalyptus grandis: an intriguing over-representation of stress-responsive DREB1/CBF genes. *PLoS One* 10(4):e0121041
- Girard AL *, **Mounet F** *, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J, Runavot JL, Germain V, Rothan C, Marion D and Bakan B (2012). The tomato (*S. lycopersicum*) GDSL-lipase SlGDSL1 is required for the assembly of the cutin polyester in fruit cuticles. *The Plant Cell* 24: 3119-3134
- * These authors contributed equally to this work.
- **Mounet F**, Moing A, Kowalczyk M, Petit J, Garcia V, Maucourt Mickaël, Yano K, Deborde C, Aoki K, Bergès H, Rolin D, Granell A, Bellini C, Rothan C and Lemaire-Chamley Martine (2012). Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato leads to a transient auxin level alteration in the ovary and induces fruit parthenocarpy. *J Exp Bot* 63(13):4901-17
- **Mounet F**, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C, Bernillon S, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, Giraudel JL, Rolin D, Rothan C and Lemaire-Chamley M (2009) Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiol* 149: 1505-1528
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Cabasson C, Giraudel J-L, Deborde C, Lessire R, Gallusci P, Bertrand A, Gaudillère M, Rothan C, Rolin D, and Moing A (2007) Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA. *Metabolomics* 3:273-288
- Alhagdow M, **Mounet F**, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiol* 145: 1408-1422
- Baldet P, Hernould M, Laporte F, **Mounet F**, Just D, Mouras A, Chevalier C, Rothan C. (2006) The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *J Exp Bot.* 57(4):961-702

Chapitres de livre:

- Hadj Bachir I, Ployet R, Teulières C, Cassan-Wang H, Mounet F, Grima-Pettenati J (2022) Regulation of secondary cell wall lignification by abiotic and biotic constraints, en cours d'édition
- Camargo E, Ployet R, Cassan-Wang H, Mounet F, Grima-Pettenati J (2019). Digging in wood: New insights in the regulation of wood formation in tree species. *Advances in Botanical Research* 89: 201-233.

Congrès et colloques:

Les références listées ci-dessous représentent les travaux les plus significatifs sélectionnés pour des présentations orales. Les publications dans des ouvrages collectifs (Actes de congrès) sont identifiées par le symbole §.

- Hadj Bachir I, Ployet R, Cao PB, N'guyen C, Dupas A, Ladouce N, San Clemente H, Grima-Pettenati J, Hussey S, Teulières C and **Mounet F** (2022) Crosstalk between cold signaling involving CBF transcription factors and regulation of wood formation in Eucalyptus. Plant Cell Wall, Michigan, USA
- Takawira LT, Hadj Bachir I, Ployet R, Tulloch J, San Clemente H, Christie N, Ladouce N, Dupas A, Grima-Pettenati J, Myburg AA, Mizrahi E, **Mounet F**, Hussey SG (2022) Functional investigation of five R2R3-MYB transcription factors associated with wood development in Eucalyptus. ComBio, Melbourne, Australia.
- Ployet R, Cao PB, N'guyen C, Hadj Bachir I, Dupas A, Ladouce N, San Clemente H, Grima-Pettenati J, Teulières C and **Mounet F** (2019) Crosstalks between wood formation and cold signalling pathways in Eucalyptus. IUFRO Tree Biotechnology Conference. Raleigh, USA. §
- Ployet R, Veneziano Labate M T, Regiani Cataldi T, San Clemente H, Christina M, Favreau B, Morel M, Laclau J-P, Denis M, Labate C A, Chaix G, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2018) Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in Eucalyptus. IUFRO Eucalyptus 2018: Managing Eucalyptus plantation under global changes. Montpellier, France. §
- Ployet R, Veneziano Labate M T, Regiani Cataldi T, San Clemente H, Christina M, Favreau B, Morel M, Laclau J-P, Denis M, Labate C A, Chaix G, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2018) Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in Eucalyptus. The biology of wood: from cell to trees. 42nd New Phytologist Symposium. Lake Tahoe City, USA. §
- Ployet R, Soler M, Ladouce N, Rodrigues JC, Marque C, Teulieres C, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2016) Low temperatures induce secondary cell wall remodeling in Eucalyptus through a complex network of transcription factors. IUFRO Genomics and Forest Tree Genetics Conference. Arcachon, France. §
- R. Ployet, **F. Mounet**, J.C. Rodrigues, C. Marque, C. Teulières, J. Grima-Pettenati. (2015) Cold regulation of genes related to secondary cell wall biosynthesis affects wood structure and composition. Tree Biotechnology Conference. Forest: the importance to the planet and society. Florence, Italy. §
- **Mounet F**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Deborde C, Bernillon S, Legall G, Colquhoun IJ, Defernez M, Giraudel J, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M. (2008) Integration of cytological, metabolome and transcriptome data in relation with the acquisition of the fleshy trait in tomato pericarp and locular tissue. 3èmes Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Bordeaux 7-8 Février 2008.
- **Mounet F**, Moing A, Kowalczyk M, Petit J, Garcia V, Maucourt M, Deborde C, Bellini C, Aoki K, Bergès H, Granell A, Rolin D, Rothan C and Lemaire-Chamley M. (2008) Functional characterization of a tissue-specific auxin efflux transport protein (PIN) during tomato fruit development. EU-SOL Module 1 meeting, Bordeaux, France.

Brevet:

- Bakan B, Rothan C, Chamlay M, Marion D, Girard ML, **Mounet F** (2009) Isolated plant GDSL lipase déposé le 21/12/09 App N° 09306299.0 – 2403.

Autres (Congrès locaux, posters, co-auteur de communications):

Communication orales:

- Ployet R, Veneziano Labate M T, Regiani Cataldi T, San Clemente H, Christina M, Favreau B, Morel M, Laclau J-P, Denis M, Labate C A, Chaix G, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2018) Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in *Eucalyptus*. InterLabEx AGRO CeMEB TULIP. Banyuls-sur-Mer, France

- Wang H, Teulières C, **Mounet F**, Grima-Pettenati J (2018) Regulatory networks underlying wood formation during development and in response to abiotic stresses in *Eucalyptus*. International symposium on forest tree molecular biology and biotechnology. Harbin, China.

- Nguyen, C., Cao P.B., Marque C, Ployet R., **Mounet F**, Nassuth A, Grima-Pettenati J, Teulières C (2015). Towards elucidating the role of DREB 1 and DREB 2 transcription factors in *Eucalyptus* whole plants under abiotic stresses: gene regulation in leaves, stems or roots. IUFRO Tree Biotechnology Conference 2015, Florence, Italy.

- Rothan C., **Mounet F**, Aboul-Soud M., Gonzalez N., Gevaudant F., Hernould M., Moing A., Rolin D., Bres C., Garcia V., Just D., Petit J., Lemaire-Chamley M., Chevalier C. (2007) Early fruit development in tomato, SOL International Meeting, Jeju Island, Korea, Sept 9-13 2007.

- Gonzalez N., Gévaudant F., Chevalier C., **Mounet F.**, Moing A., Rolin D., Bres C., Garcia V., Just D., Petit J., Lemaire-Chamley M., Rothan C. (2006) Relationship between early fruit development and fruit composition in tomato, International Symposium on Tomato Genome Research, Tsukuba, Japan, 4-5 February 2006.

- Moing A., Deborde C., **Mounet F.**, Lemaire-Chamley M., Cabasson C., Maucourt M., Renaud C., Gaudillère J.P.,

Pereira G.E., Rolin D. (2005) Profils quantitatifs et empreintes métaboliques par RMN pour étudier la qualité des fruits, Premières Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Toulouse.

- **Mounet F.**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Deborde C, Bernillon S, Legall G, Colquhoun IJ, Defernez M, Giraudel J, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M. (2008) Integration of cytological, metabolome and transcriptome data in relation with the acquisition of the fleshy trait in tomato pericarp and locular tissue. 3^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Bordeaux 7-8 Février 2008.

- Defernez M., Bernillon S., Colquhoun I., Le Gall G., Kemsley K., Moing A., **Mounet F.**, Tapp H.S. (2008) Getting relevant chemical and biological information from metabolomics data, 3^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Bordeaux, France, 7-8 Février 2008.

- **Mounet F.**, Moing A, Kowalczyk M, Petit J, Garcia V, Maucourt M, Deborde C, Bellini C, Aoki K, Bergès H, Granell A, Rolin D, Rothan C and Lemaire-Chamley M. Functional characterization of a tissue-specific auxin efflux transport protein (PIN) during tomato fruit development. EU-SOL Module I meeting, Bordeaux, April 3-4 2008.

- Moing A., **Mounet F.**, Deborde C., Maucourt M., Petit J., Garcia V., Bernillon S., Le Gall G., Colquhoun I., Defernez M., Giraudel J.L., Baldet P., Talon G., Ferrand C., Rothan C., Lemaire-Chamley M., Rolin D. (2008) Plant Metabolomics at Bordeaux: practical implication on tomato, 5th International Conference on Plant Metabolomics, Yokohama, Japan, 15-18 July 2008.

Posters:

- Ramirez Sanchez D, Ladouce N, Hussey S, **Mounet F** and Grima Pettenati J (2019) Deciphering the role of MYB Transcription factors in the regulation of secondary cell wall formation in *Eucalyptus grandis*. IUFRO Tree Biotechnology Conference. Raleigh, USA.

- Ployet R, Veneziano Labate M T, Regiani Cataldi T, San Clemente H, Christina M, Favreau B, Morel M, Laclau J-P, Denis M, Labate C A, Chaix G, Grima-Pettenati J and **Mounet F** (2018) Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in *Eucalyptus*. IUFRO *Eucalyptus* 2018: Managing *Eucalyptus* plantation under global changes. The biology of wood: from cell to trees. 42nd New Phytologist Symposium. Lake Tahoe City, USA

- Ployet R, Favreau B, Denis M, San Clemente H, Rodrigues JC, Laclau JP, Labate M, Tomazello M, Labate C, Grima-Pettenati J, Chaix G and **Mounet F** (2016) Impact of potassium and sodium fertilization on secondary cell wall formation in *Eucalyptus grandis*: integration of transcriptomic and metabolomics data. IUFRO Genomics and Forest Tree Genetics Conference. Arcachon, France.

- Ployet, R, **Mounet F.**, Rodrigues JC, Marque C, Grima-Pettenati J and Teulières (2014) Cold regulation of genes related to secondary cell wall biosynthesis affects wood

structure and composition. 10th French Cell Wall Meeting. Amiens, France.

- **Mounet F.**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Bernillon S, Deborde C, Cabasson C, Gallusci P, Rolin D, Rothan C, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, Lemaire-Chamley M (2007) *Cell expansion in tomato mesocarp and locular tissues: integration of transcriptome and metabolome data*, Metabolomics Society 3rd Annual Conference, Manchester, UK.

- Bernillon S, **Mounet F.**, Le Gall G, Maucourt M, Deborde C, Lemaire-Chamley M, Cabasson C, Bertrand A, Gallusci P, Rothan C, Rolin D, Colquhoun I, Defernez M, Moing A (2007) LC-MS metabolomic profiling of mesocarp tissue during tomato fruit development: comparison of different data pre-processing methods and analyses, Metabolomics Society 3rd Annual Conference, Manchester, UK.

- **Mounet F.**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Bernillon S, Deborde C, Cabasson C, Gallusci P, Rolin D, Rothan C, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, Lemaire-Chamley M (2007) Cell expansion in tomato mesocarp and locular tissues: integration of transcriptome and metabolome data, Metabolomics Society 3rd Annual Conference, Manchester, UK.

- Bernillon S, **Mounet F**, Le Gall G, Maucourt M, Deborde C, Lemaire-Chamley M, Rolin D, Colquhoun I, Defernez M, Moing A (2007) LC-MS metabolomic profiling of mesocarp and locular tissues during tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit development, Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomiques 2007, Pau, France
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Cabasson C, Giraudel JL, Deborde C, Rothan C, Rolin D, Moing A (2006) *1H-NMR metabolic profiling reveals tissue specificity in tomato fruit*, 4th International Conference on Plant Metabolomics, Reading, UK.
- **Mounet F**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Deborde C, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M (2006) *Contribution of tomato fruit tissues to the acquisition of the fleshy trait*, XV Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon, France.
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Cabasson C, Giraudel JL, Deborde C, Rothan C, Rolin D, Moing A (2006) *1H-NMR metabolic profiling reveals tissue specificity in tomato fruit*, 4th International Conference on Plant Metabolomics, Reading, UK.
- **Mounet F**, Moing A, Petit J, Maucourt M, Garcia V, Deborde C, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M (2006) *Contribution of tomato fruit tissues to the acquisition of the fleshy trait*, XV Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon, France.
- Lemaire-Chamley M, **Mounet F**, Montfoulet C, Moing A, Rothan C (2006) *Functional characterization of a tissue specific PIN auxin efflux transporter during tomato fruit development*, XV Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, Lyon, France.
- Bernillon S, **Mounet F**, Le Gall G, Maucourt M, Deborde C, Lemaire-Chamley M, Cabasson C, Bertrand A, Gallusci P, Rothan C, Rolin D, Colquhoun I, Defernez M, Moing A (2006) *Metabolomic profiling of two tissues during tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit development: cross-validation of LC, LC/MS and NMR approaches*, Deuxièmes Journées Scientifiques du Réseau français de Métabolomique et Fluxomique, Clermont-Ferrand (France).
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Deborde C, Rothan C, Rolin D, Moing A (2005) *Tissular specificity of metabolic profiles during tomato fruit development*, 6^{ème} Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale, Arcachon.
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Deborde C, Rothan C, Rolin D, Moing A (2005) *Metabolic profiling of fruit tissues during tomato development*, Premières Journées Scientifiques du Réseau français de Métabolomique et Fluxomique, Toulouse, 1-2 December
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M., Maucourt M., Deborde C., Rothan C., Rolin D., Moing A. (2005) *Tissular specificity of metabolic profiles during tomato fruit development*, 6^{ème} Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale, Arcachon.
- Deborde C, Fourloubey G, Jacob D, **Mounet F**, Cabasson C, Maucourt M, Rolin D, Moing A (2005) *Chemical fingerprinting for the evaluation of polar and non polar metabolite changes during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*) by means of ¹H-NMR*, 6^{ème} Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale, Arcachon.
- **Mounet F**, Lemaire-Chamley M, Maucourt M, Deborde C, Rothan C, Rolin D, Moing A (2005) *Metabolic profiling of fruit tissues during tomato development*, Premières Journées Scientifiques du Réseau français de Métabolomique et Fluxomique, Toulouse.

5. Participation à des projets nationaux et internationaux

- **Projet européen Tree 4 Joules** (Plant KBBE, Knowledge-based Bio-economy, 2011-2015). Ce projet, coordonné par J. Grima-Pettenati, impliquait 13 partenaires publics ou privés en France, en Espagne, en Allemagne et au Portugal. Il avait pour objectif l'identification des facteurs régulant les propriétés physico-chimiques des parois secondaires des cellules du bois, chez l'Eucalyptus et le Peuplier. Bien que lancé avant mon recrutement, j'ai été impliqué dans ce projet dès mon arrivée dans l'équipe (analyses de données, analyses transcriptomiques, meetings, construction d'une base de données) et associé aux travaux qui en découlent (Soler *et al.*, 2016; Ployet *et al.*, 2018).

- **Projets locaux Université Paul Sabatier** (2012) : « Appel d'offre projets de recherche labellisés par le Pôle des Sciences du Vivant (AO1) » et « Appel d'offre des actions transverses du Conseil Scientifique (AO4) ». Ces deux financements m'ont été attribués pour étudier la régulation de la formation du bois en conditions de stress abiotiques chez l'Eucalyptus. Ils m'ont permis de financer des outils pour mettre en place des conditions de stress abiotiques contrôlées et de procéder aux premières analyses reliées aux travaux de thèse de Raphael Ployet (Ployet *et al.*, 2017)

- **Projet international France-Brésil** (Agropolis – Capes, 2013-2016) coordonné par Gilles Chaix (CIRAD, Montpellier). Pour ce projet, l'équipe ReDyWood a collaboré avec 3 laboratoires de l'université de Sao Paulo et un laboratoire du CIRAD de Montpellier. J'ai été impliqué pour superviser les approches de caractérisation histochimique du bois, de transcriptomique et d'intégration de données. Les résultats de ce projet s'inscrivent dans la thèse de Raphael Ployet et ont été valorisés par deux articles (Favreau *et al.*, 2019; Ployet *et al.*, 2019) et un projet de publication en cours (Ployet et al., 2023 in prep) .

- **Projet IDEX Euowood (ANR IDEX UNITI 2013-2017)** : J'ai personnellement coordonné ce projet, qui impliquait l'équipe de Statistique et Probabilité (Institut de Mathématiques de Toulouse), ainsi qu'une structure privée de R&D dans le domaine forestier (FCBA, Bordeaux). Ce financement nous a permis d'obtenir (1) le cœur des résultats de thèse de Raphael Ployet concernant la réponse au froid des tissus du bois chez l'Eucalyptus (Ployet *et al.*, 2017) et (2) les données nécessaires pour débiter la thèse d'Ines Hadj Bachir (Hadj Bachir et al., 2023 in prep). Il a été déterminant, à la fois pour l'accès à des ressources biologiques uniques (différents génotypes d'Eucalyptus adultes cultivés en conditions forestières), mais aussi pour le développement de nouvelles stratégies d'intégration de données par des outils statistiques.

- **Projet Européen H2020 B4EST (2018-2022)** : Au sein de ce projet, coordonné par C. Bastien (INRAe d'Orleans), je suis impliqué, en tant que chercheur de l'équipe ReDyWood, dans 3 Workpackages concernant le modèle Eucalyptus: (1) l'acquisition et l'analyse de phénotypes engendrés par les contraintes abiotiques, (2) l'identification de marqueurs génomiques qui peuvent influencer ces phénotypes et (3) la dissémination des connaissances obtenues au travers d'écoles thématiques.

- **Projet PEPR « TYPEX » (2023-2029)** : L'objectif du projet TYPEX, coordonné par PM Delaux (LRSV) et F. Nogué (IJPB), est de permettre à la communauté française des scientifiques et des sélectionneurs de maîtriser l'édition précise du génome végétal, et ce, chez un nombre important d'espèces modèles et cultivées. Notre équipe est impliquée dans le Workpackage 3 qui vise à adapter des systèmes optimisés de prime editing, basé sur des variantes du complexe CRISPR-Cas, chez des espèces récalcitrantes à la transgénèse. Nous utiliserons notre savoir-faire et nos compétences pour répondre à cet objectif chez l'Eucalyptus.

6. Activités d'enseignement

6.1 Enseignements universitaires

J'ai eu l'opportunité d'exercer une activité d'enseignement au cours de ma thèse en tant que moniteur (64h d'équivalent TD par an), puis dans le cadre d'un contrat d'ATER à mi temps (96h d'équivalent TD par an). En interaction avec l'équipe pédagogique de la section de Biologie Végétale de l'université Victor Ségalen (Bordeaux 2). J'ai été associé à la mise au point et à la réalisation de travaux pratiques illustrant les mécanismes qui sont impliqués dans le développement des végétaux : photosynthèse, respiration, assimilation des nutriments, régulations hormonales, etc... Lors de mon CDD post doctoral en Espagne, j'ai été chargé de dispenser des cours magistraux de biologie végétale au sein de l'université de Huelva dans le cadre du module « GENÓMICA, PROTEÓMICA Y METABOLÓMICA ».

Depuis mon recrutement en tant que MCF, j'interviens au sein d'une équipe pédagogique de 20 MCF et PR, pour enseigner la physiologie végétale:

- **En Licence 1^{ère} année**, je réalise des cours magistraux (CM), des Travaux Dirigés (TD) et des Travaux pratiques (TP) dans l'Unité d'Enseignement (UE) de "Physiologie Végétale" dispensée à plus de 900 étudiants chaque année (responsables: **F. Mounet** et N. Frei-Dit-Frey), ce qui représente >600h annuelles réalisées par une équipe d'environ 15 enseignants, doctorants et vacataires. Nous y abordons des notions fondamentales de la biologie des plantes: le fonctionnement des méristèmes, les grandes étapes du développement des organismes végétaux, les voies de signalisations hormonales, la réponse des plantes aux contraintes de l'environnement et la germination des graines.

- **En Licence 2^{ème} année**, je réalise des Travaux Dirigés (TD) et des Travaux pratiques (TP) dans l'UE de "Biologie du Développement" (responsable: D. Aldon). Nous y abordons les mécanismes impliqués dans le fonctionnement des méristèmes, la perception du signal lumière, la fécondation et la remobilisation des réserves lors de la germination.

- **En Licence 3^{ème} année**, je réalise des CM et des TD dans l'UE de "Valorisation du Végétal" (responsable: **F. Mounet**). Dans cette UE, nous essayons de sensibiliser les étudiants aux procédés de valorisation des ressources végétales. J'ai l'occasion d'accompagner les étudiants lors de la visite de plateformes de service associées à GENOTOUL (Get-Plage, TPMP, TRI), de centres de conservation des ressources génomiques de plantes (CNRGV) et de laboratoire (LRSV). J'encadre également l'intervention de chercheurs issus de laboratoires publics ou privés.

- **En Master 1^{ère} année**, je réalise des CM et des TP de bioanalyse dans l'UE "Approche pluridisciplinaire de l'adaptation des végétaux" (responsables : C. Teulières et **F. Mounet**). Je forme les étudiants à l'utilisation d'outils de bio-statistiques pour faire ressortir des informations biologiques à partir de grands jeux de données de transcriptomique. Nous abordons également l'intérêt des analyses *in silico* à partir des bases de données en ligne (Genevestigator, PlantgenIE, NCBI, TAIR)

pour étudier la réponse des plantes aux stress abiotiques.

Enfin, j'interviens ponctuellement dans les évènements pédagogiques organisés par l'université (Infosup), la Fédération de Recherche IFRAIB (Jeudi sciences, Summer School IDEX TULIP 2012, Journées InterLabex), ou le laboratoire LRSV (Fêtes de la Science).

6.2 Encadrement d'étudiants de 2nd et 3^{ème} cycles

De par mon rôle d'enseignant en Licence et Master, et de chercheur au sein du LRSV, j'ai été amené à m'investir chaque année en tant que tuteur, responsable pédagogique ou superviseur d'étudiants de second cycle qui ont réalisé leur stage au sein du laboratoire ou dans d'autres structures de recherche publiques ou privées. Le tableau ci-dessous mentionne les stages de 2nd cycle que j'ai supervisés personnellement.

Nom	Niveau	Diplôme	Date	Durée	Rapport écrit	Présentation orale
Rakontondrasoavina Aina Elodie	Master 1	BBT	2012	6 mois	oui	oui
Ployet Raphael	Master 2	Master ADAM	2013	6 mois	oui	oui
Guillaumeau Pauline	Licence 1	Licence SVT	2014	1 mois	non	non
Desplat Arthur	Ecole d'ingénieur (2ieme année)	Ingénieur Agronome (ENSAT)	2015	3 mois	oui	non
Gauthier Antoine	Licence 3 Professionnelle	Licence GeMAP	2015	5 mois	oui	oui
Lang Qing	Bachelor	Université ChongQing - Chine	2016	6 mois	oui	oui
Raboin Caroline	Master 2	Master ADAM	2016	6 mois	oui	oui
Morel Marie	Ecole d'ingénieur (2ieme année)	Ingénieur Agronome (ENSAT)	2017	5 mois	oui	non
Wang Yawang	Bachelor	Université ChongQing - Chine	2018	6 mois	oui	oui
Ichard Floriane	Licence 2	Licence BCP	2019	1 mois	non	non
Hadj Bachir Ines	Master 2	Master ADAM	2019	6 mois	oui	oui
Vincent Rudy	Master 1	Master ADAM	2020	2 mois	oui	-
Mickael Zayerh	Licence 3	Licence BCP	2020	2 mois	oui	oui
Ines Durand	Master 1	Master ADAM	2021	5 mois	oui	oui
Clotilde Nigon	Ecole d'ingénieur (2ieme année)	Ingénieur Agronome (ENSAT)	2022	3 mois	oui	non
Maxime Lavaud	BTS	BTS alternance	2022	2 ans	oui	oui
Jade Delsouc	Licence 3 Professionnelle	Licence GeMAP	2022	5 mois	oui	oui
Simon Skrypyzck	Master 1	Master BPMA	2023	2 mois	oui	oui
Hugo Genie	Master 2	Master BPMA	2023	5 mois	oui	oui

Les résultats du stage de Marie Morel ont été inclus dans un article publié dans la revue *New Phytologist* (Ployet *et al.*, 2019).

A l'exception de Caroline Raboin qui n'a pas souhaité poursuivre dans cette voie (bien que major de sa promotion de Master), tous les étudiants que j'ai encadrés et qui avaient pour objectif de réaliser une thèse ont réussi à obtenir une bourse : Marie Morel a bénéficié d'une bourse de thèse financée par l'Institut Pasteur (Paris), Raphael Ployet et Ines Hadj Bachir ont obtenu une bourse en participant au concours de l'école doctorale SEVAB.

Dans le cadre de la thèse de Raphael Ployet (2014 à 2017), supervisée par Jacqueline Grima-Pettenati (DR CNRS) et Chantal Teulières (PR UPS), j'ai participé au jury de soutenance en tant qu'encadrant non officiel. Ces travaux ont été valorisés par deux publications dont je suis le dernier auteur (Ployet *et al.*, 2018, 2019). Depuis octobre 2019, j'ai co-encadré, en binôme avec Chantal Teulières, les travaux de thèse d'Ines Hadj Bachir, valorisés par un chapitre de livre (Hadj Bachir *et al.*, 2022), un article pour lequel je suis correspondant (Hadj Bachir *et al.*, 2023) et un article en préparation (Hadj Bachir *et al.*, 2023 *in prep*).

7. Responsabilités administratives

7.1 Responsabilités au sein du laboratoire LRSV

- Animation des commissions « génomique et séquençage » (2016-2018) et « équipement » (à partir de 2018).
- Référent de l'équipe GFE au sein des commissions « biochimie » (depuis 2012) et « communication » (2012-2014)
- Co-direction puis direction de l'équipe GFE/ReDyWood (effectif à partir de Janvier 2021 et Mars 2022 respectivement)
- Participation au conseil scientifique du LRSV
- Supervision des personnels techniques Annabelle Dupas (AI UPS) et Nathalie Ladouce (AI CNRS)

7.2 Responsabilités universitaires

- Co-responsable de l'enseignement de l'UE de physiologie végétale en L1 (depuis 2016).
- Responsable de l'UE de Valorisation du Végétal en L3 (depuis 2016) et de l'UE ReVe (2023)
- Responsable de la gestion des budgets de Travaux Pratiques (TP de la licence au Master) de la commission pédagogique de Physiologie Végétale (2012-2022)
- Référent disciplinaire de la commission de Physiologie Végétale depuis 2018 auprès du département Biologie & Géoscience de l'Université Paul Sabatier. A ce titre, j'ai supervisé, en tant que supérieur hiérarchique, Didier Martinez (2018 - 2022) et Josiane Chourré (2018 - ce jour), deux agents BIATSS impliqués dans la préparation des Travaux Pratiques de Physiologie Végétale, respectivement pour 100% et 80% de leur temps de travail. J'ai également contribué à la supervision de deux agents non permanents (BTS en alternance) impliqués dans la préparation des Travaux Pratiques de Physiologie Végétale : Corentin Mounic (2019-2020) et Maxime Lavaud-Roscop (2022-2023).
- Je suis membre du Groupe de Travail « Pédagogie » du Département Biologie et Géosciences (depuis 2022)

Chapitre 1 :
Travaux de thèse

Université Victor Ségalen Bordeaux 2

Année 2008

Thèse n°1531

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement le 27 Juin 2008

Par

Fabien MOUNET

Le développement précoce du fruit de tomate : ANALYSE GLOBALE DU CARACTERE CHARNU ET ETUDE DE LA CONTRIBUTION DU TRANSPORT DE L'AUXINE

Membres du jury :

M. J. Vidal, Directeur de recherche (IBP, Orsay)

M. A. Granell, Directeur de recherche (CSIC, Valencia)

M. R. Hall, Directeur Bioscience (PRI, Wageningen)

M. D. Rolin, Professeur (Université Bordeaux 2)

Mme A. Moing, Directeur de recherche (INRA, Bordeaux)

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Directeur de thèse

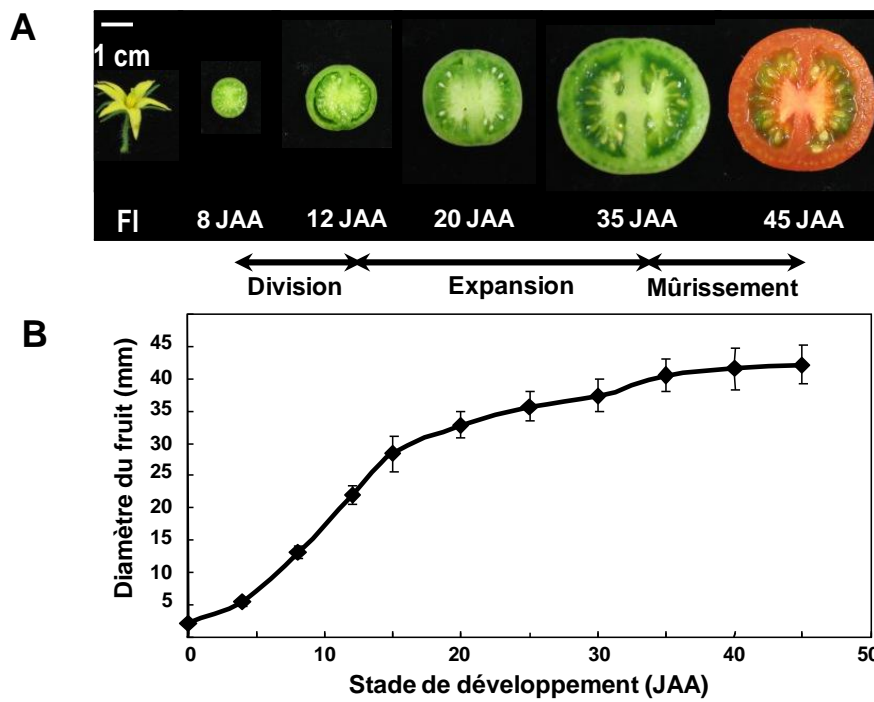


Figure 1 : Développement du fruit de tomate (adapté de Mounet et al., 2007). **A**, Stades de développement du fruit, de l'anthèse au fruit mûr, qui peuvent être séparés en 3 phases : division des cellules, expansion cellulaire et murissement. **B**, Evolution du diamètre du fruit au cours de son développement. JAA, jour après anthèse.

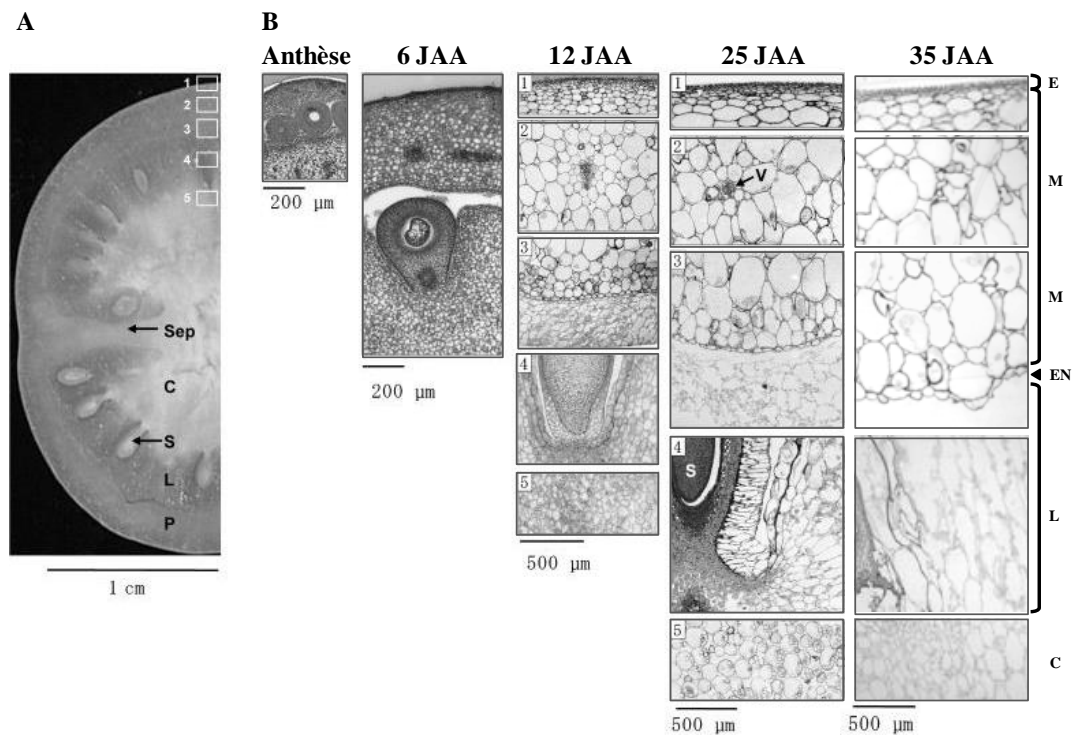


Figure 2 : Structure du fruit de tomate au cours de son développement (adapté de Lemaire-Chamley et al., 2005). **A**, Section transversale de fruit frais réalisées à main levée au stade 22 JAA. Les numéros 1 à 5 indiquent les régions du fruit concernées par les grossissements observés dans la partie B. **B**, Sections transversales de fruit (épaisseur 1µm) réalisées au microtome à différents stades de développement (Anthèse, 6, 12, 25 et 35 JAA) et colorées au bleu de toluidine. JAA, jours après anthèse ; P, péricarpe; Sep, septum; E, exocarpe; M, mésocarpe; EN, endocarpe; L, tissu loculaire; S, graines; C, columelle; V, vaisseaux.

1.1 Introduction

J'ai débuté mes recherches de doctorat en 2004 sous la supervision de A. Moing (DR INRA) et M. Lemaire-Chamley (CR INRA), au sein de deux équipes « Génomique Fonctionnelle et Développement du Fruit » (dirigée par C. Rothan) et « Métabolisme » (dirigée par D. Rolin) du laboratoire de « Biologie du fruit » (renommé depuis "Biologie du fruit et Pathologie", UMR 1332, INRAE de Bordeaux). Les axes de recherches développés au sein de ce laboratoire avaient pour objectifs d'approfondir la connaissance des mécanismes qui interviennent dans le développement et la qualité des fruits. Une part importante des recherches étaient effectuées sur la tomate, qui représente un modèle d'étude pour les fruits charnus.

Chez la tomate, la mesure du diamètre du fruit fait apparaître 3 étapes distinctes : deux phases de développement précoce qui sont marquées par la division puis l'expansion des cellules, et qui sont suivies d'une phase de mûrissement (**Figure 1**). Si l'activité de division cellulaire définit la taille potentielle du fruit, c'est l'expansion des cellules qui en détermine la taille finale. Au cours du mûrissement, le fruit subit de nombreuses modifications biochimiques qui aboutissent à un fruit charnu, coloré, sucré et de texture molle. L'**acquisition du caractère charnu du fruit** implique, après la phase de division, la formation de larges cellules différenciées, fortement vacuolarisées (**Figure 2**), qui accumulent de l'eau, des sucres, des acides organiques, ainsi que des métabolites secondaires (tel que les caroténoïdes, les terpénoïdes, les composés phénoliques et l'acide ascorbique). Les processus physiologiques qui surviennent durant la **phase d'expansion des cellules** contribuent au goût, à la texture et à la qualité générale du fruit mûr.

Lorsque j'ai débuté mes travaux, de nombreuses études portaient sur les modifications biochimiques qui caractérisent le mûrissement du fruit dans sa globalité, mais peu de données concernaient la **composition des différents tissus** du fruit au cours de son développement précoce. Certains travaux mettaient cependant en évidence de nombreuses spécificités tissulaires, tant au niveau du métabolisme central que du métabolisme secondaire. Parallèlement, des analyses par microarrays réalisées au sein du laboratoire avaient comparé les profils d'expression de gènes entre des fruits de tomate à différents stades de développement, et entre différents tissus d'un même fruit (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Cette approche avait révélé que la plus forte proportion de gènes dont la fonction est inconnue est détectée à 8 JAA, ce qui souligne la nécessité d'approfondir les études menées sur le **développement précoce du fruit**. Certains de ces gènes semblaient être reliés à la composition du fruit, au métabolisme central de la cellule, aux mécanismes d'expansion cellulaire, ainsi qu'à la synthèse, au transport et la signalisation de l'auxine.

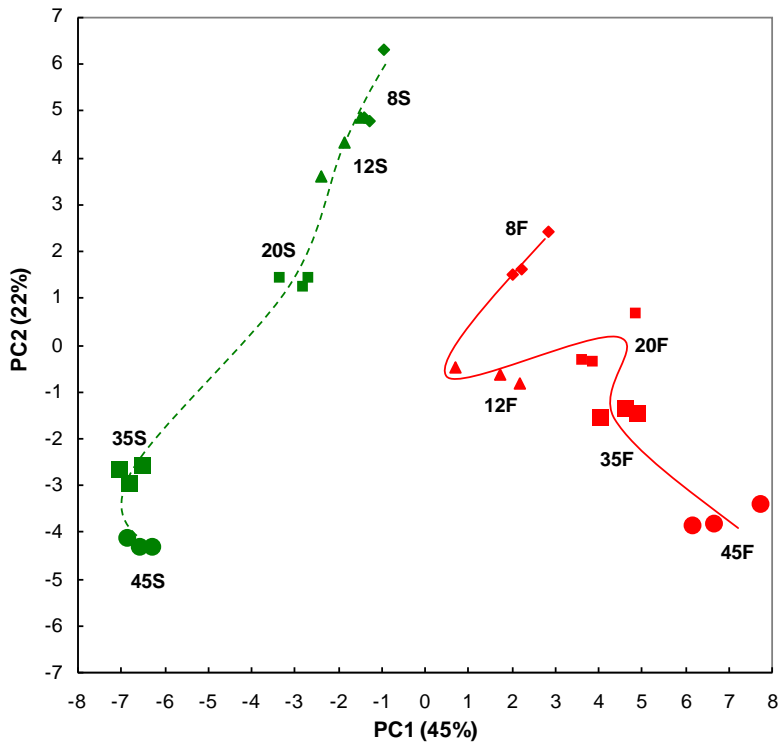


Figure 3 : Analyse en Composante Principale de la composition de la chair et des graines issues du fruit de tomate au cours du développement (adapté de Mounet *et al.*, 2007). Les données analysées sont issues de la quantification absolue de 44 métabolites par RMN-¹H, GC-FID et LC-DAD. Cette figure représente les deux premières composantes expliquant respectivement 45% et 22% de la variabilité totale. On peut observer que les deux tissus, qui ont une composition similaire entre 8 et 12 JAA, présentent des trajectoires métaboliques divergentes dans les stades plus tardifs de développement. Les variables expliquant l'établissement des axes 1 et 2 (loadings), ainsi que la liste des métabolites quantifiés, sont précisées en annexe 1 de ce document. S, graines ; F, chair. Les numéros 8, 12, 20, 35 et 45 correspondent au nombre de jours après anthèse.

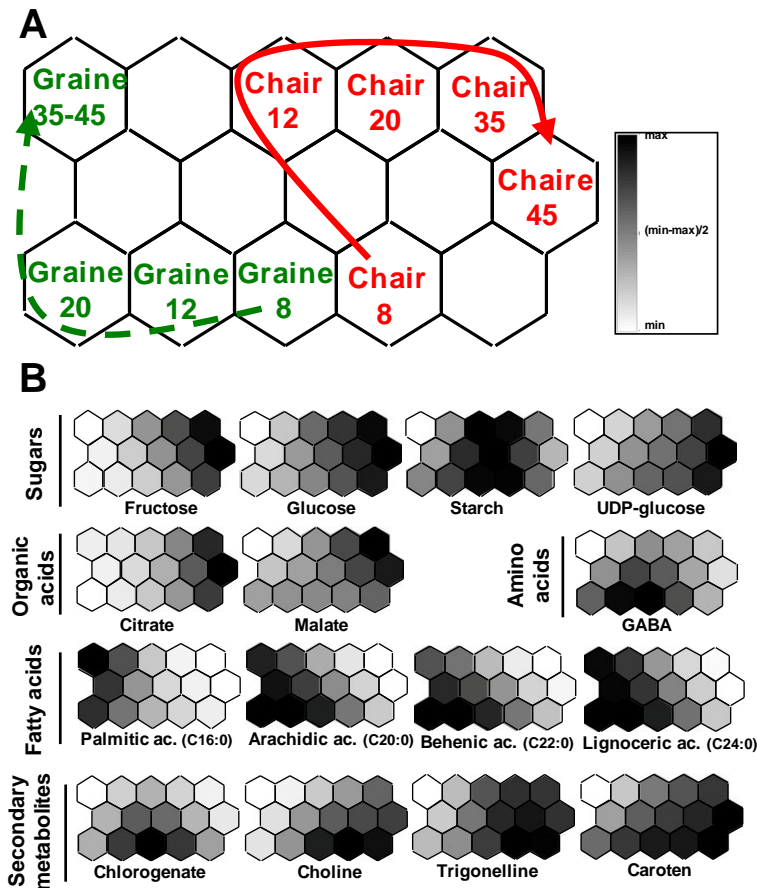


Figure 4 : Comparaison des profils métaboliques de la chair et des graines au cours du développement de la tomate (adapté de Mounet *et al.*, 2007). **A**, Carte de Kohonen de 15 unités illustrant la trajectoire métabolique divergente des deux tissus au cours du développement du fruit. Chaque unité de la carte représente un tissu virtuel dont la composition est calculée à partir de la quantification absolue des 44 métabolites dans les deux tissus aux 5 stades de développement. **B**, Représentation de la valeur de certains métabolites au sein de chaque unité, affichée sous forme de gradient. Cette représentation permet d'établir une corrélation visuelle entre les échantillons étudiés et les profils métaboliques des variables analysées. Les données complémentaires de cette étude sont consultables en annexe 1 de ce document.

L'objectif de mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de cette approche et a concerné l'étude des mécanismes impliqués dans l'expansion des cellules au cours du développement précoce du fruit de tomate. Le but de cette étude était de caractériser plus particulièrement le processus d'expansion cellulaire dans différents tissus du fruit, et de déterminer le rôle respectif de ces tissus dans la qualité finale du fruit. Je me suis intéressé à la composition métabolique et aux variations des profils globaux d'expression de gènes dans ces tissus, ainsi qu'à certaines régulations hormonales plus fines qui interviennent au cours du développement du fruit.

1.2 Profils métaboliques des différents tissus du fruit

Cette partie de mon travail de thèse décrit les résultats obtenus par l'analyse de la composition biochimique des différents tissus du fruit, au cours de son développement. Les profils métaboliques des graines, de la totalité de la chair et des tissus séparés (exocarpe, mesocarpe, tissus loculaire et columelle) ont été obtenus selon deux approches : une approche non ciblée qui a permis d'analyser par RMN du proton l'ensemble des métabolites polaires, et une approche ciblée qui a permis de quantifier les teneurs en isoprénoïdes et esters d'acides gras par chromatographies liquide (HPLC-DAD) et gazeuse (GC-MS). Il s'agissait aussi de mettre en place des outils analytiques et statistiques, et de les tester afin de révéler les similitudes et les différences entre les tissus du fruit (**Figure 3 et 4**). Avec l'aide de JL Giraudel (Equipe Périgourdine de Chimie Appliquée), nous avons utilisé un algorithme particulier d'analyse par réseau de neurones, les cartes auto-organisatrices de kohonen, qui met en jeu un mécanisme d'apprentissage compétitif non supervisé couplé à une représentation visuelle de la valeur des variables. Cette technique permet de traiter des données hétérogènes et de comparer les échantillons grâce à une représentation graphique en deux dimensions (**Figure 4**).

Une première publication compare la composition de la chair et des graines au cours du développement du fruit (Mounet *et al.* 2007). Les analyses statistiques multivariées non supervisées, réalisées sur les données de quantification des métabolites, ont révélé que les deux tissus présentaient de fortes similitudes aux stades précoces de développement, mais qu'ils divergeaient considérablement au cours des stades plus tardifs (**Figures 3 et 4**). Entre 8 et 12 JAA, les graines et la chair, qui sont pourtant très différents au niveau structurel, présentent une composition similaire. De fortes teneurs en acide gras et en choline, un précurseur de la phosphatidylcholine (le plus important phospholipide composant les membranes cellulaires chez les plantes), sont mesurées dans les deux tissus du jeune fruit.

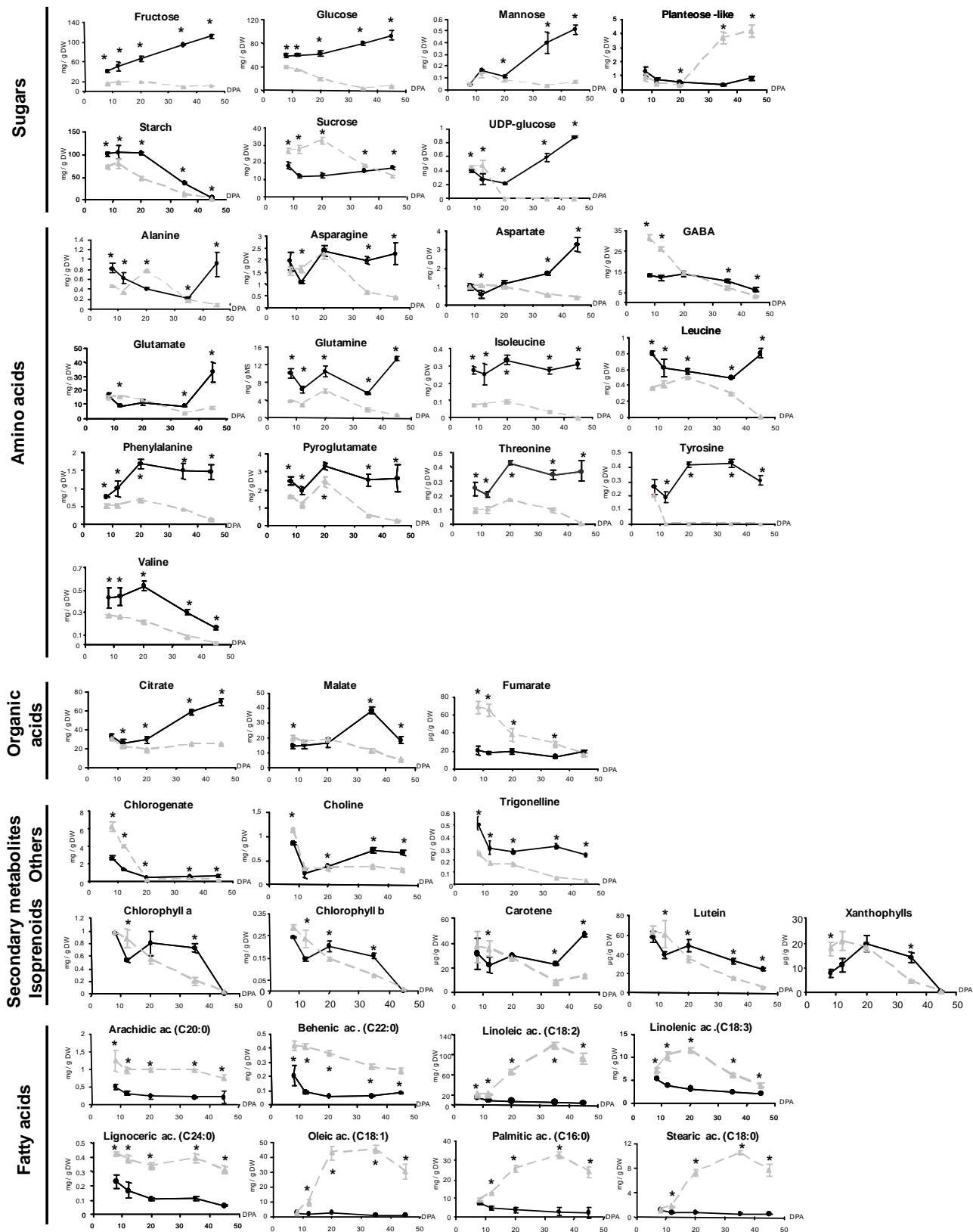


Figure 5 : Quantification absolue de 39 métabolites dans la chair et les graines du fruit de tomate au cours du développement (Mounet *et al.*, 2007). Les données analysées sont issues d'analyses par RMN-¹H, GC-FID et LC-DAD. La courbe noire continue correspond à la chair et la courbe grise en pointillée correspond aux graines. Pour chaque stade de développement, l'étoile indique une différence significative entre la chair et les graines ($p < 0.05$, test Student). DPA, nombre de jours après anthèse.

Des profils parallèles sont observés pour certains métabolites secondaires comme la trigonelline, le chlorogénate, ainsi que les acides arachidique et lignocérique (**Figure 5**). Ces résultats soulignent la transition entre une intense activité de division cellulaire et le début d'un mécanisme de différenciation au sein de ces deux tissus. Il est intéressant d'observer que la chair, tout comme les graines, accumule de l'amidon entre 8 et 12 JAA. Cependant, ce dernier est remobilisé afin d'alimenter des métabolismes différents dans ces deux tissus aux stades plus tardifs de développement.

Après 20 JAA, la composition de la chair se différencie de celle des graines car elle contient une plus forte quantité de sucres et d'acides organiques (**Figures 4 et 5**), qui contribuent à l'acquisition du caractère charnu du fruit. En s'accumulant dans les vacuoles, ces osmolytes permettent d'attirer l'eau et d'augmenter la pression de turgescence, ce qui joue un rôle majeur dans la croissance des cellules. Lorsque le fruit entre dans sa phase de murissement, nous avons détecté une forte concentration de pigments comme le lycopène et le carotène, qui participent au changement de couleur du fruit. Durant cette phase, nous avons aussi observé une forte accumulation de mannose (un constituant majeur des polymères pariétaux) et d'UDP-glucose (un précurseur des polysaccharides de la paroi), ce qui reflète probablement le changement de structure de la paroi qui accompagne la dégradation des composés pariétaux et le ramollissement du fruit.

Au contraire de la chair, à partir de 12 JAA, le métabolisme des graines est orienté vers la production de composés qui servent de stockage de l'énergie et de protection contre la dessiccation. C'est le cas du plantéose, dont la concentration augmente dans les graines au cours du développement, et qui joue un rôle d'osmoprotectant, aussi bien que de réserve de carbone lors de la germination. Nous avons pu observer qu'à partir de 12 JAA, la teneur en acides gras à très longue chaîne diminue au profit de lipides plus courts, comme l'acide linoléique, qui représente plus de 50% de la concentration totale de lipides de la graine mature (**Figure 5**). Ceci témoigne de la synthèse des principales réserves lipidiques de la graine sous forme de triacylglycérols. Encore aujourd'hui, la composition des graines de tomate reste peu étudiée, en particulier avant leur maturité. Certaines études récentes montrent que le métabolisme de la graine est un élément majeur qui conditionne sa viabilité et donc la survie de la future plante (Leprince *et al.*, 2017). Chez la tomate, ce métabolisme est influencé par des marqueurs génétiques qui déterminent la performance des semences (Kazmi *et al.*, 2017).

Cette première étude a donc permis de développer des techniques d'analyse globales et ciblées, afin de caractériser le métabolome de la tomate. Nous avons également mis en place des stratégies d'analyse statistiques pour intégrer des données issues de différentes méthodes. L'objectif de ma thèse n'était pas seulement d'analyser la composition

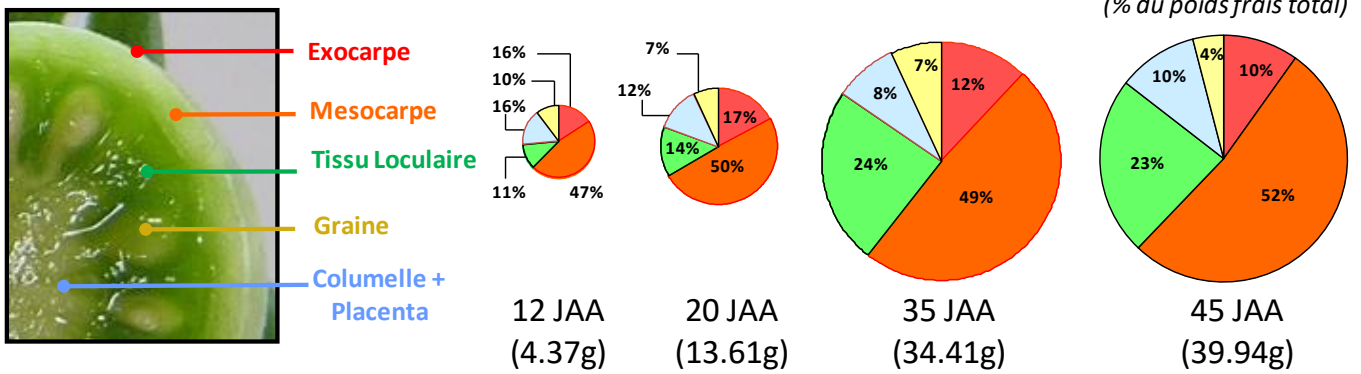


Figure 6 : Evolution du poids frais des différents tissus chez une tomate de calibre moyen (var. Ailsa Craig) à différents stades de développement (adapté de Lemaire-Chamley *et al.*, 2019). Le stade de développement (en nombre de jours après anthèse, JAA) ainsi que le poids frais total du fruit sont indiqués sous chaque graphique. Ces données sont des moyennes obtenues à partir de 3 lots indépendants de 5 fruits par stade.

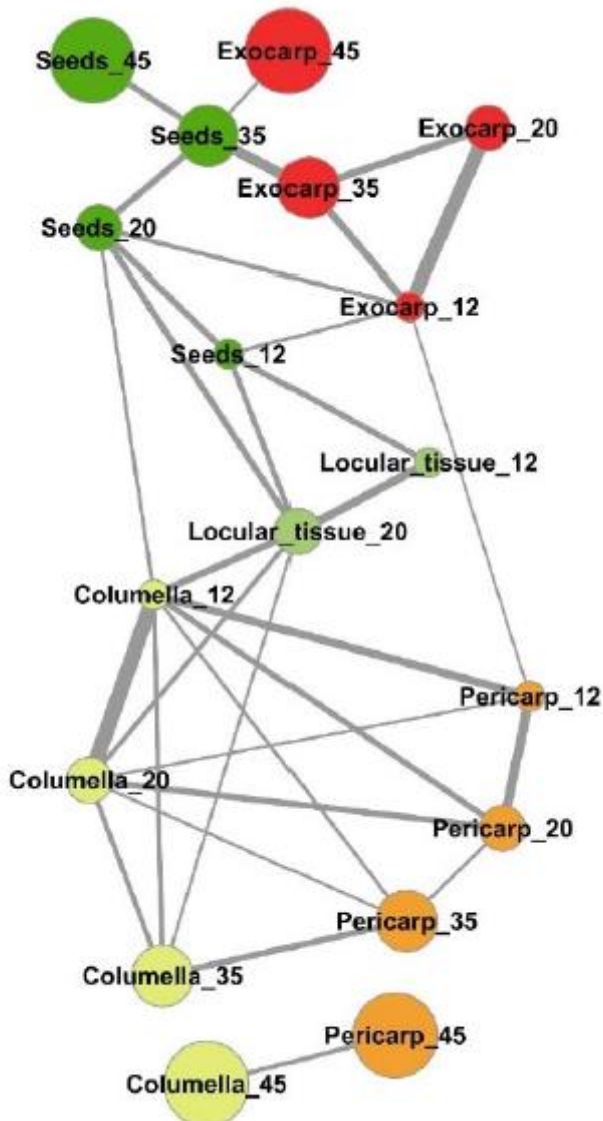


Figure 7 : Représentation des distances entre les tissus de la tomate à différents stades de développement en fonction de leur profil métabolique (adapté de Lemaire-Chamley *et al.*, 2019). Les distances euclidiennes ont été calculées à partir des valeurs de quantification de 39 métabolites (données centrées réduites) dans 5 tissus à 4 stades de développement et utilisées pour représenter graphiquement les edges (distances) entre les nodes (tissus). L'exocarpe, le mésocarpe, la columelle (+placenta), le tissu loculaire et les graines sont représentés en rouge, orange, jaune, vert clair et vert foncé, respectivement. Les stades de développements en nombre de jour après anthèse ou JAA (DPA) sont indiqués à côté des tissus. Seules les distances euclidiennes inférieures à 0.5 ont été représentées, ce qui explique que le tissu loculaire à 35 et 45 JAA, qui présente une composition particulière, ne figure pas sur ce graphique.

du fruit entier, ce qui avait déjà été fait dans d'autres études, mais bien celle des différents tissus. J'ai donc séparé, à partir de la chair, l'exocarpe, le mésocarpe, le tissu loculaire et la columelle (**Figure 6**) pour en analyser le métabolome au cours du développement du fruit. Ces données n'ont été valorisées par une publication que très récemment, rédigée par M. Lemaire-Chamley et ses collaborateurs (2019) à partir des résultats de mon travail de thèse. Cette étude montre que, malgré leur proximité spatiale, ces tissus évoluent différemment au cours du développement du fruit, tant en terme de structure que de composition, ce qui laisse suggérer une contribution spécifique de chaque tissu au développement du fruit et à ses qualités organoleptiques

Le mésocarpe et le tissu loculaire sont les seuls tissus dont la proportion augmente entre 12 et 45 JAA, pour occuper 75% de la matière fraîche du fruit (**Figure 6**). Au contraire, la proportion de l'exocarpe, de la columelle et des graines diminue. Le tissu loculaire présente de grandes cellules aux parois très fines en comparaison des autres tissus. A l'opposé, l'exocarpe est composé de petites cellules cutinisées. La columelle et le péricarpe sont, quant à eux, fortement vascularisés et présentent des tailles de cellules hétérogènes. Au niveau de leur composition, nous avons confirmé que chacun de ces tissus présentait des trajectoires métaboliques distinctes au cours du développement. Les métabolites analysés dans ces échantillons sont majoritairement des sucres, des acides aminés et des acides organiques, ainsi que certains métabolites secondaires et un panel représentatif des principaux acides gras. Ces données ont été analysées par des outils d'intégration impliquant la construction de réseaux. Celui de la **Figure 7** compare la composition de 5 tissus à 4 stades de développement sous la forme de liens (edges) dont la taille est inversement proportionnelle à la valeur de la distance euclidienne entre les échantillons, calculée à partir de la quantification des métabolites. Dans la **Figure 8**, ce sont les corrélations entre les profils d'accumulation des différents métabolites quantifiés dans 4 tissus entre 12 et 45 JAA qui sont représentés. Cette visualisation permet de mettre en évidence des liens statistiques entre les données et de les représenter visuellement pour faire apparaître des groupes de variables (modules ou clusters) qui pourraient contribuer à des processus biologiques communs, impliqués dans le développement du fruit de tomate.

Ces outils permettent ainsi de voir qu'aux stades précoces, les différents tissus se ressemblent au niveau de leur composition, mais durant la phase d'expansion, leur trajectoire métabolique se spécialise, à l'exception de l'exocarpe et des graines, qui présentent une composition très proche à tous les stades. Cette observation surprenante est probablement due à leur teneur en lipides, qui sont utilisés pour produire la cuticule, au niveau de l'exocarpe, et en tant que réserve dans les graines.

Le péricarpe apparaît comme le tissu le plus riche comme en témoigne son réseau métabolique. L'accumulation d'une plus grande quantité de métabolites primaires souligne

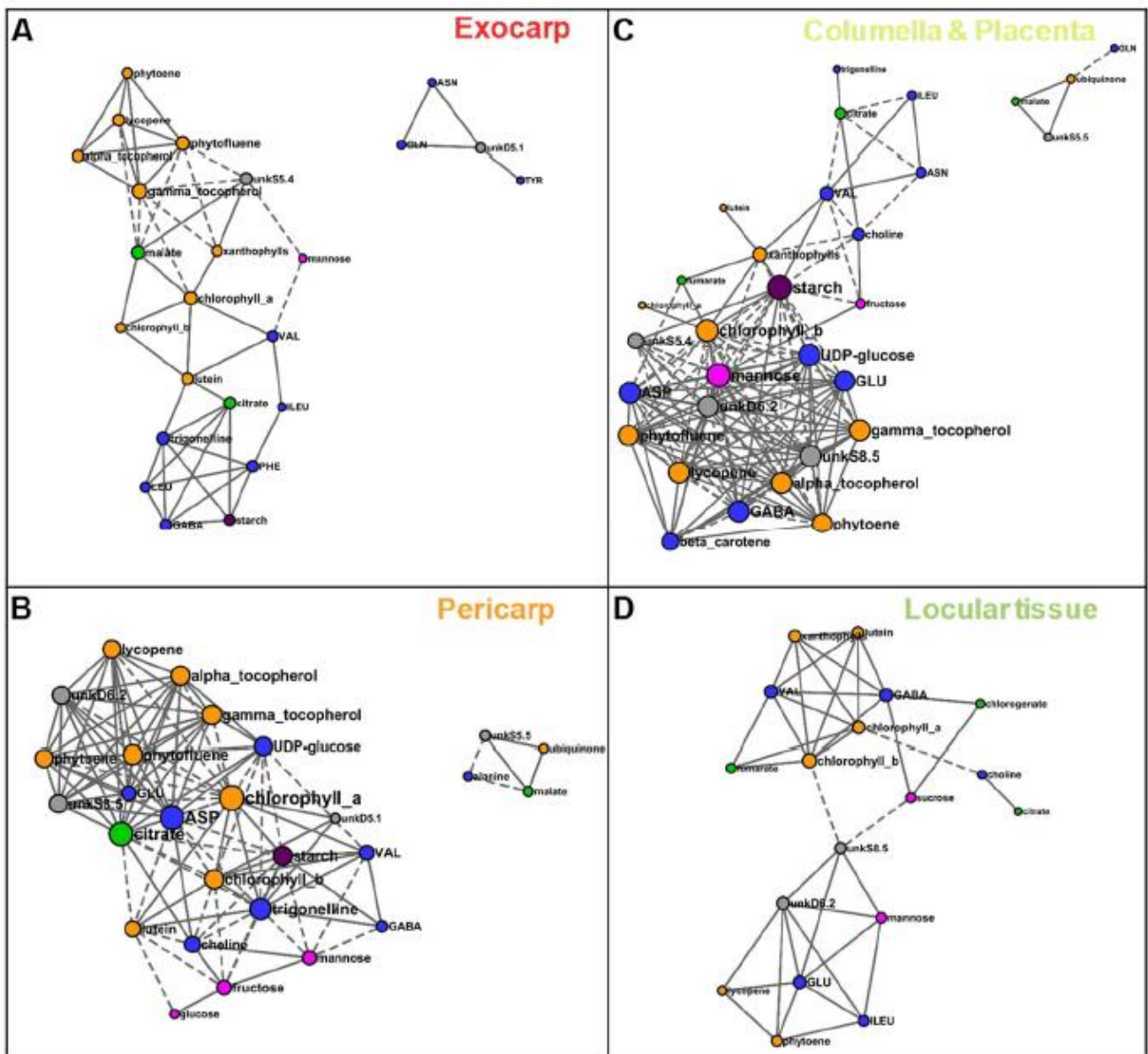


Figure 8 : Réseaux de corrélation entre les métabolites dans les différents tissus qui composent la chair du fruit de tomate au cours du développement (adapté de Lemaire-Chamley *et al.*, 2019). Chaque tissu possède un réseau métabolique spécifique : **(A)** Exocarpe, **(B)** Péricarpe, **(C)** Columelle et placenta et **(D)** Tissu loculaire. Les distances entre les nœuds sont calculées à partir des valeurs de corrélation de Pearson, basées sur les données de métabolomique acquises à 12, 20, 35 et 45 jours après anthèse. Seules les corrélations avec un seuil inférieur à 0.5 et une p value inférieure à 0.001 (False Discovery Rate, FDR) sont représentées. Les lignes pleines représentent les corrélations positives et les lignes en pointillés, les corrélations négatives. Chaque nœud représente un métabolite. La couleur dépend de la famille biochimique : sucre (rose), acides organiques (vert), acides aminés (bleu), isoprénoides (orange) et amidon (violet). La taille des nœuds dépend du nombre de connexions.

l'intense activité d'expansion cellulaire qui s'y déroule. Sa composition est cependant comparable à celle de la columelle. Ces tissus présentent des réseaux métaboliques similaires, avec des métabolites très connectés (appelés hubs) appartenant à la famille des sucres (amidon, UDP-Glucose) ou des acides aminés (glutamate, aspartate). Péricarpe et columelle sont fortement vascularisés et très hétérogènes en termes de taille cellulaire. Leur proximité métabolique est probablement due à leur origine ontologique commune. En effet, la columelle apparaît à partir de la fusion des parois du carpelle. De la même façon, le tissu loculaire, qui se développe à partir des cellules du placenta après la fécondation, présente une composition proche de celle de la columelle et du péricarpe aux stades les plus précoces (12 et 20 JAA). En revanche, la représentation des réseaux métaboliques (**Figure 7**) montre que le tissu loculaire suit une évolution très différente durant les stades plus tardifs. Le tissu loculaire et le mésocarpe semblent donc accumuler, dès le développement précoce du fruit, des composés qui assureront la qualité finale du fruit, comme les acides organiques et les sucres. Bien qu'ils présentent tous les deux une expansion cellulaire intense, nous avons déterminé que certains métabolites s'y accumulent de façon différente. Dans le tissu loculaire, les composés les plus abondants sont des acides organiques, ainsi que des acides aminés et des sucres solubles différents de ceux accumulés dans le péricarpe. Ce dernier renferme majoritairement des hexoses, d'autres acides aminés et de l'amidon. La composition de ces deux tissus semble suggérer l'implication de mécanismes partiellement différents pour assurer le grandissement des cellules. Les acides organiques et les sucres sont des métabolites majeurs qui interviennent dans la qualité organoleptique des fruits.

Nous avons donc décidé d'approfondir les mécanismes impliqués dans l'expansion des cellules en développant une approche de biologie intégrative. Ces résultats représentent ma première expérience d'intégration de données issues de différentes techniques d'analyses. Ils ont été valorisés par une publication dans *Plant Physiology* à la fin de mon doctorat (Mounet *et al.*, 2009) et sont décrits dans le paragraphe suivant.

1.3 Etude des mécanismes régulant l'expansion cellulaire dans le mésocarpe et le tissu loculaire par des approches intégratives

Afin d'approfondir la connaissance des mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expansion des cellules dans le fruit de tomate, nous avons entrepris l'analyse comparée de deux tissus qui présentent une forte expansion cellulaire en intégrant des données de cytologie, de métabolomique et de transcriptomique. Le péricarpe et le tissu loculaire ont été isolés à partir de fruits en cours d'expansion à 12, 20 et 35 jours après anthèse. Les profils métaboliques ont été obtenus par RMN du proton, HPLC-DAD et LC-MS, et l'analyse des profils d'expression de gènes a été réalisée par microarray (TOM1).

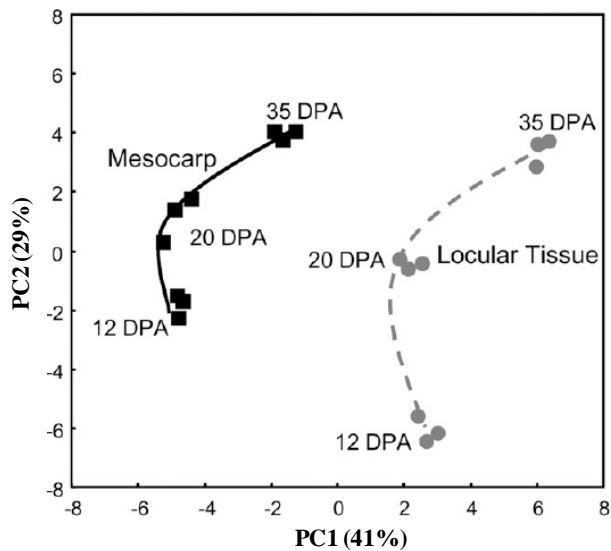


Figure 9 : Analyse en Composante Principale de la composition du mésocarpe et du tissu loculaire récoltés durant la phase d'expansion cellulaire du fruit de tomate (adapté de Mounet *et al.*, 2009). Les données analysées sont issues de la quantification absolue de 34 métabolites par RMN-¹H, GC-FID et LC-DAD dans des échantillons de mésocarpe (noir) et de tissu loculaire (gris) récolté à 12, 20 et 35 JAA (DPA, jours après anthèse) à partir de tomate var. Ailsa Craig. Cette figure représente les deux premières composantes expliquant respectivement 41% et 29% de la variabilité totale. On peut observer que les deux tissus présentent des trajectoires métaboliques parallèles mais une composition différente quel que soit le stade de développement. Les variables expliquant l'établissement des axes 1 et 2 (loadings), ainsi que la liste des métabolites quantifiés, sont précisées dans la publication.

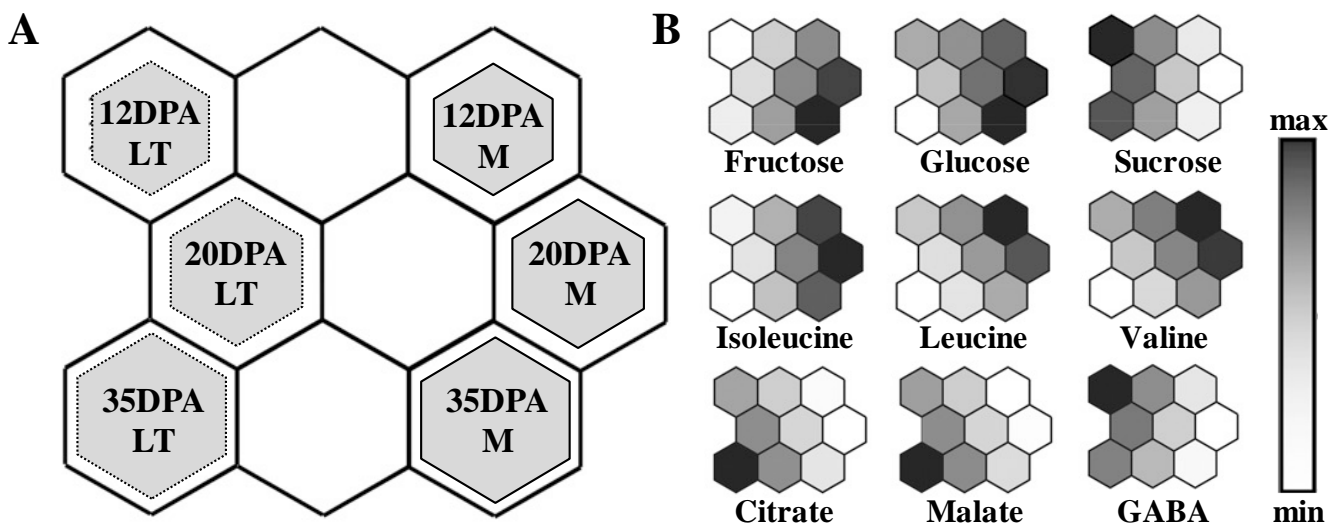


Figure 10 : Comparaison des profils métaboliques du mésocarpe et du tissu loculaire au cours de la phase d'expansion du fruit de tomate (adapté de Mounet *et al.*, 2009). **A**, Carte auto-organisatrice de Kohonen de dimension 3x3, séparant les 2 tissus aux 3 stades de développement, en fonction de leur composition métabolique. L'analyse prend en compte la quantification absolue de 34 métabolites, par des techniques de ¹H-NMR, LC-DAD, ou de dosages enzymatiques. **B**, Représentation de la concentration de différents marqueurs métaboliques dans les cases de la carte, sous la forme d'un gradient noir et blanc. Les métabolites représentés en guise d'exemples appartiennent aux familles des sucres, des acides organiques et des acides aminés. Ils sont accumulés dans le mésocarpe (à droite) ou dans le tissu loculaire (à gauche), en début de phase d'expansion (en haut) ou à la fin (en bas). LT, tissu loculaire ; M, mésocarpe ; 12/20/35 DPA, nombre de jours après anthèse.

Les analyses multivariées (analyse en composantes principales et cartes auto-organisatrices de Kohonen) réalisées sur l'ensemble des données de métabolome ont permis de comparer la composition du mésocarpe et celle du tissu loculaire (voir Mounet *et al.*, 2009). Si leur trajectoire métabolique, qui reflète l'évolution de la composition de ces tissus au cours du développement du fruit, sont parallèles, ils présentent néanmoins des métabolismes différents (**Figure 9 et 10**). Le tissu loculaire accumule beaucoup plus d'acides organiques (citrate et malate) que le mésocarpe. Les profils d'accumulation des sucres sont également différents : le mésocarpe accumule plutôt des hexoses (glucose et fructose) alors que le tissu loculaire est plus riche en saccharose. Alors que le mésocarpe contient plus d'acides aminés hydrophobes (valine, leucine et isoleucine), le tissu loculaire est plus riche en acides aminés chargés négativement (GABA et aspartate). Le mésocarpe et le tissu loculaire, qui présentent un ratio sucre sur acides opposé, semblent donc influencer de façon différente la qualité finale du fruit.

A l'instar de ce que nous avons observé au niveau du métabolisme, le transcriptome obtenu à partir du mésocarpe et du tissu loculaire présente plus de différences aux stades tardifs (entre 20 et 35 JAA) qu'aux stades précoces (entre 12 et 20 JAA) ce qui témoigne d'une spécialisation de ces tissus au cours du développement du fruit (voir **Figure 6** de Mounet *et al.*, 2009). La majorité des gènes différentiellement exprimés entre 12, 20 et 35 JAA concernent des catégories fonctionnelles reliées au métabolisme photosynthétique (avec une forte répression des gènes dans le mésocarpe), au transport de molécules (avec une nette surexpression des gènes dans le tissu loculaire), ainsi qu'à de multiples mécanismes de régulation. Tout d'abord la régulation de l'activité des protéines, avec de nombreux gènes codant pour des protéines kinases ou phosphatases, des protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation (protéases ou partenaires du protéasome), des protéines chaperonnes ou encore des régulateurs du statut d'oxydoréduction des protéines. Deuxièmement, de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription sont différentiellement exprimés au cours du développement du fruit, tout particulièrement dans le tissu loculaire en fin de phase d'expansion. Et enfin des gènes impliqués dans de multiples signalisations hormonales présentent une expression différentielle entre 12 et 35 JAA dans les deux tissus. Un petit nombre sont reliés aux voies des gibbérellines, des cytokinines, de l'acide abscissique et des brassinostéroïdes. La plupart sont reliés aux voies de signalisation répondant à l'auxine et à l'éthylène. Ces résultats suggèrent qu'une interaction entre ces deux voies de signalisation hormonales pourrait jouer un rôle important pour l'expansion cellulaire dans les tissus du fruit. Nous avons montré que les profils d'expression de nombreux gènes reliés à des mécanismes de régulation sont directement corrélés à l'accumulation de certains métabolites essentiels pour la croissance cellulaire et la

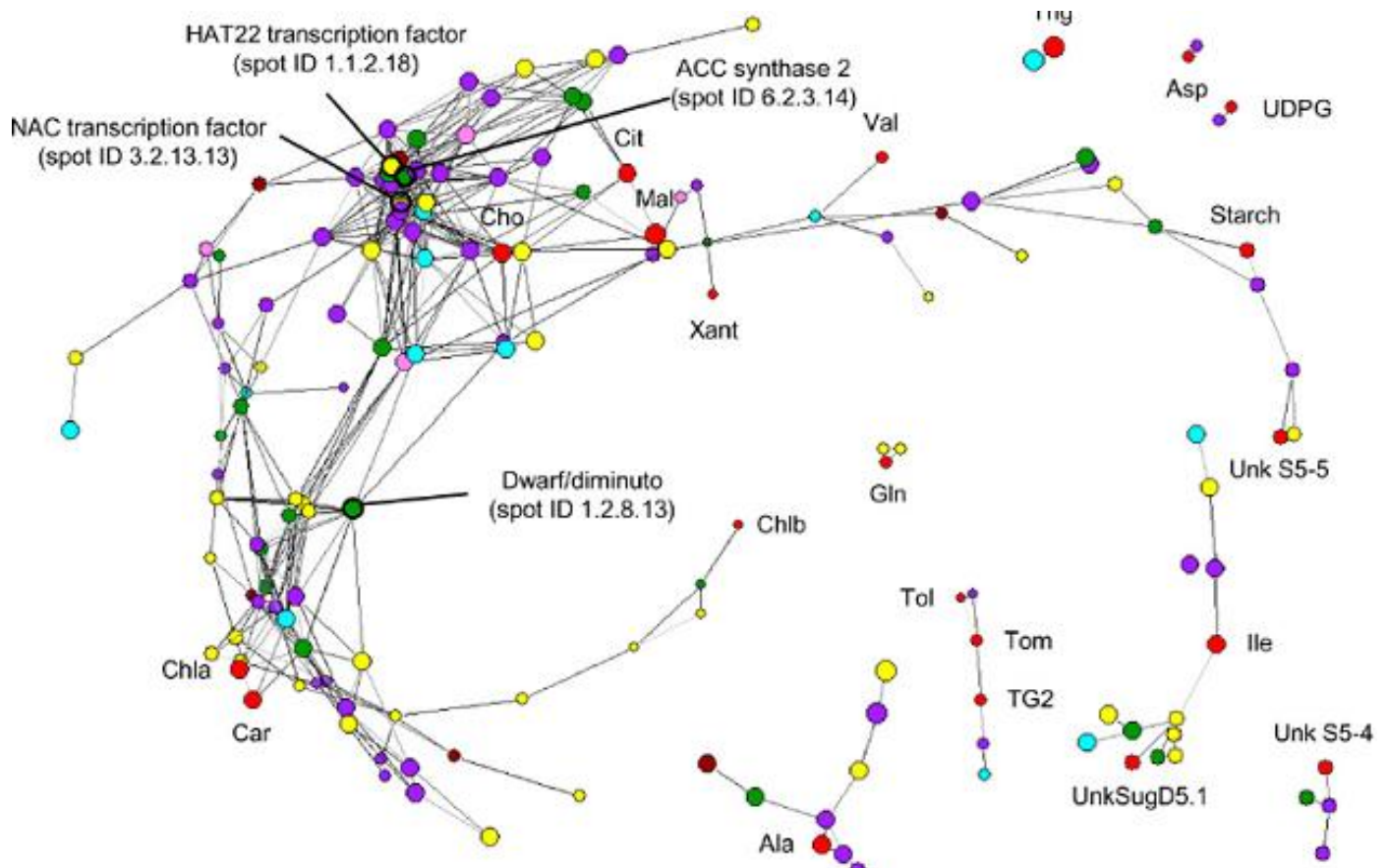


Figure 11 : Réseau de co-régulation impliqué dans le contrôle de l'expansion cellulaire au cours du développement précoce du fruit de tomate (adapté de Mounet *et al.*, 2009). Chaque nœud représente le profil d'expression d'un gène régulateur ou le profil d'accumulation d'un métabolite. La longueur de chaque lien (ou edge) entre les nœuds est calculée à partir de la valeur de la corrélation de Pearson (positive ou négative) entre les profils des différentes variables (distance = 1 – valeur absolue de la corrélation). La couleur de chaque nœud dépend de sa fonction biologique : les métabolites sont en rouge, les gènes sont en vert (régulations hormonales), en turquoise (régulations rédox), en jaune (facteurs de transcription), en violet (régulation de l'activité des protéines), en rose (régulation épigénétiques) et en marron (transduction des signaux). Les quatre gènes identifiés sont des exemples de « Hubs » : leur expression est corrélée à un grand nombre d'autres gènes et/ou métabolites. Car, Carotène; Chloa, chlorophylle A; Chlob, chlorophylle B; Chol, choline; Cit, citrate; Mal, malate; Tol, tomatidénol; Tom, tomatidine; TG2, tomatidine 2-glycoside; Trig, trigonelline; UDPG, UDP-Glc; UnkS5.4, sucre inconnu S5.4; Xant, xanthophylles.

qualité du fruit (voir **Figure 7** de Mounet *et al.*, 2009). Par exemple, l'évolution de la quantité de citrate, un acide organique qui s'accumule fortement dans le tissu loculaire au cours de la phase d'expansion, est corrélée à l'expression de gènes codant pour des IAA (facteurs de réponse à l'auxine) ou des GA20 oxydase (métabolisme des gibbérellines). Nous avons identifié des corrélations entre les profils d'accumulation de certains acides aminés et l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription, des kinases ou des phosphatases. Certains de ces acides aminés, particulièrement riches dans le mésocarpe, contribuent directement aux qualités nutritionnelles et organoleptiques du fruit ou constituent des intermédiaires dans le métabolisme de composés volatils reliés à la fragrance. L'identification de régulateurs associés à leur synthèse peut donc représenter un enjeu important.

Il est possible de représenter toutes ces paires de corrélations au sein d'un réseau plus large comme le montre la **Figure 11**. Chaque corrélation entre deux variables est affichée sous la forme de points (node) représentant un gène et/ou un métabolite, reliés par une ligne (edge) dont la longueur est inversement proportionnelle à la valeur de cette corrélation. Un algorithme d'optimisation de la répartition des points dans l'espace peut être appliqué pour exacerber la formation de groupes de variables très corrélées, appelés clusters ou modules. Les variables regroupées présentent un profil similaire au sein des échantillons testés, et elles ont de fortes chances d'être impliquées dans le même processus biologique. Cette technique d'analyse, qui associe le traitement statistique des données (ANOVA, calcul de p-value et corrélation de Pearson) et des outils de visualisation des résultats (couleur des nœuds, longueur des liens, regroupement de variables) est particulièrement adaptée à la compréhension de larges jeux de données. Cela nous a permis, en particulier, d'identifier 40 gènes régulateurs (hubs) présentant une très forte connectivité (nombre de lien) avec d'autres gènes ou des métabolites. Bon nombre de facteurs de transcription de type bZIP, MYB ou zinc finger sont par exemple corrélés aux profils d'accumulation d'acides aminés et donc potentiellement impliqués dans la régulation de ce métabolisme. De nombreux hubs sont reliés aux régulations hormonales, celle des brassinostéroïdes (HAT22 ou DWARF), de l'éthylène (RIN ou ACC synthase) ou de l'auxine (plusieurs acteurs appartenant aux familles des ARF ou des AuxIAA). Ces gènes reliés à la signalisation auxinique sont fortement exprimés dans les grandes cellules du tissu loculaire, riches en GABA et en acides organiques. Cette dernière observation était particulièrement intéressante pour nous puisqu'elle faisait écho à des résultats obtenus précédemment (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005), qui suggéraient un rôle prépondérant de la signalisation par l'auxine dans les mécanismes d'expansion cellulaire. Nous avons voulu approfondir ce rôle de l'auxine par des approches de génétique inverse visant à évaluer l'implication du transport de cette hormone dans le développement précoce des tissus du fruit de la tomate.

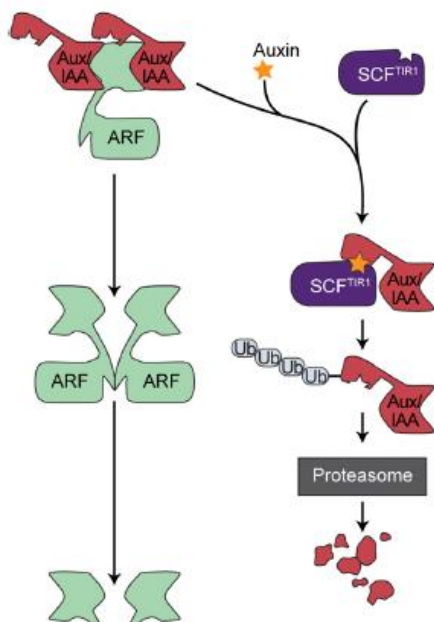


Figure 12 : Schéma de la voie de signalisation à l'auxine impliquant le complexe SCF^{TIR1} (Enders and Strader, 2015). L'activité des facteurs de transcription de la famille ARF (Auxin response factor) est inhibée en présence de leur partenaire protéique Aux/IAA (Auxin/Indole-3-Acetic Acid family). La fixation d'une molécule d'auxine sur le complexe SCF^{TIR1} entraîne l'ubiquitination des Aux/IAA et leur dégradation par le protéasome. Sans l'effet inhibiteur des Aux/IAA, les facteurs ARF régulent la transcription des gènes de réponse à l'auxine. L'interaction entre les partenaires ARF et les Aux/IAA, qui appartiennent à des familles multigéniques dont chaque membre présente une spécificité d'expression et de partenaire, entraîne une grande complexité dans la réponse à l'auxine et assure un rôle spécifique de cette hormone dans de nombreux mécanismes de développement des plantes.

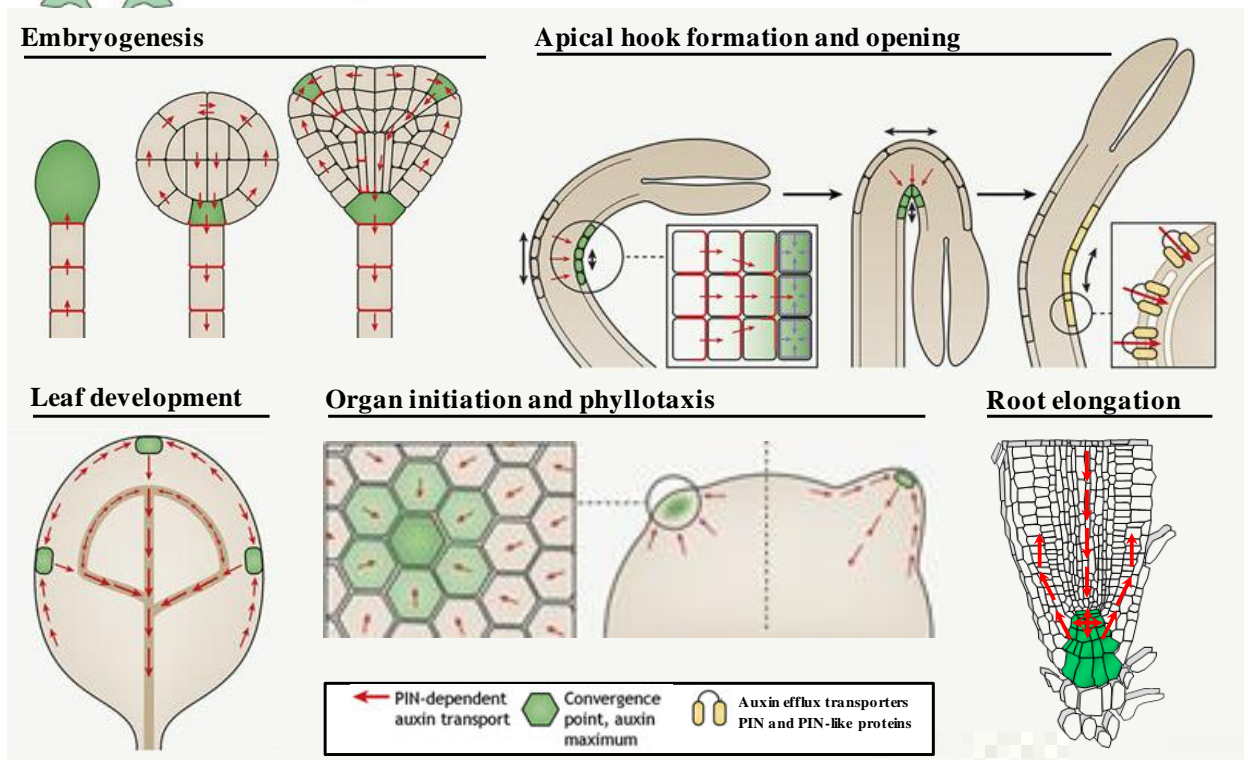


Figure 13 : Rôle de la polarisation des transporteurs PIN dans la formation des organes chez les plantes (adapté de Sauer and Kleine-Vehn, 2019). Les transporteurs d'efflux PIN peuvent être localisés de façon asymétrique au niveau de la membrane des cellules végétales, assurant ainsi la mise en place d'un transport polarisé de l'auxine (Flèches rouges). La convergence de l'auxine (zones vertes) constitue un signal qui influence le développement des organes de la plante, notamment au niveau de l'embryon, de la tige, des feuilles, des racines, ainsi que des méristèmes apicaux et racinaires.

1.4 Rôle du transport de l'auxine dans le développement précoce du fruit

L'auxine (acide indole acétique, AIA) est considérée comme la principale hormone retrouvée chez tous les clades végétaux : des algues aux plantes vasculaires (Tivendale, Ross and Cohen, 2014). Son effet est pléiotrope : elle est présente dans tous les tissus de la plante, induit des réponses qui apparaissent différentes mais sont toujours nécessaires à la croissance et au développement des organes. L'action de l'auxine dépend de la régulation de sa concentration dans les tissus de la plante. Cette homéostasie est contrôlée à trois niveaux : le métabolisme de l'hormone, son transport et la transduction du signal auxinique. La biosynthèse de l'AIA par les plantes emprunte deux types de voies (Tivendale and Millar, 2022): des voies dépendantes de l'acide aminé tryptophane (Trp) et une voie indépendante du Trp. A la synthèse *de novo* d'auxine libre s'ajoute l'action de multiples formes de stockage de l'auxine par « conjugaison » avec d'autres molécules. Fixées principalement à des sucres ou des acides aminés, l'AIA peut être rapidement remobilisée en hormone active, ou envoyée vers des voies de dégradation. De plus, si l'acide indole acétique est l'auxine majoritaire chez les plantes, d'autres molécules, pourvues d'un cycle indole et d'une chaîne carbonée acide, peuvent également induire une réponse de type auxinique au niveau des cellules de la plante. Cette réponse est initiée suite à la reconnaissance d'une molécule d'AIA par le récepteur intracellulaire soluble, appelé TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB), qui fixe directement l'auxine au sein d'une cavité hydrophobe (**Figure 12**). L'hypothèse, longtemps admise, de l'existence d'un récepteur extracellulaire capable de fixer l'AIA (nommé ABP1), a été récemment remise en question par une série de travaux infirmant le rôle de cette protéine dans la voie de signalisation de cette hormone (Habets and Offringa, 2015). TIR1/AFB, quant à elle, est une protéine qui appartient à la grande famille des F-BOX, impliquées dans les voies de dégradation par le protéasome. Elle s'associe avec les protéines SKP1 et CULLIN pour former un complexe nommé SCF^{TIR1}. Ce dernier joue le rôle d'une ligase d'ubiquitine (E3) qui intervient dans la dernière étape de la voie d'ubiquitylation des protéines cibles afin d'engendrer leur dégradation par le protéasome (Enders and Strader, 2015). La réponse à l'auxine fait donc intervenir un récepteur soluble qui occupe deux fonctions au sein de ce complexe, il assure la perception de la concentration en AIA et confère la spécificité du complexe d'ubiquitylation SCF^{TIR1}, qui est au centre de la régulation des gènes de réponse à l'auxine: les AUX/IAA et les ARF (**Figure 12**).

Les effets de l'auxine sur le développement de la plante passent par une augmentation locale de sa concentration grâce à un flux parfaitement contrôlé dans la plante (**Figure 13**). L'utilisation d'auxine marquée radioactivement a permis de mettre en évidence

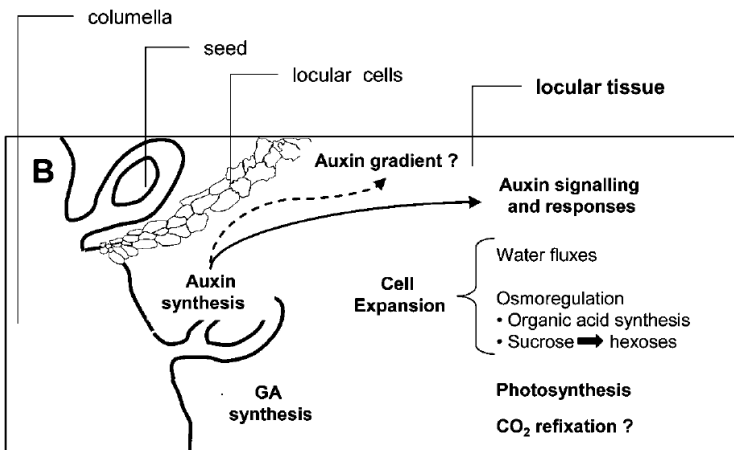


Figure 14 : Catégories fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés entre une petite cellule de l'exocarpe et une grande cellule du tissu loculaire chez la tomate au cours de la phase précoce de développement (adapté de Lemaire-Chamley *et al.*, 2012). Les gènes impliqués dans la synthèse et la signalisation par l'auxine sont préférentiellement exprimés dans les grandes cellules du gel. Ces résultats suggèrent que l'auxine pourrait contrôler le développement du fruit en régulant l'expansion cellulaire dans les tissus charnus.

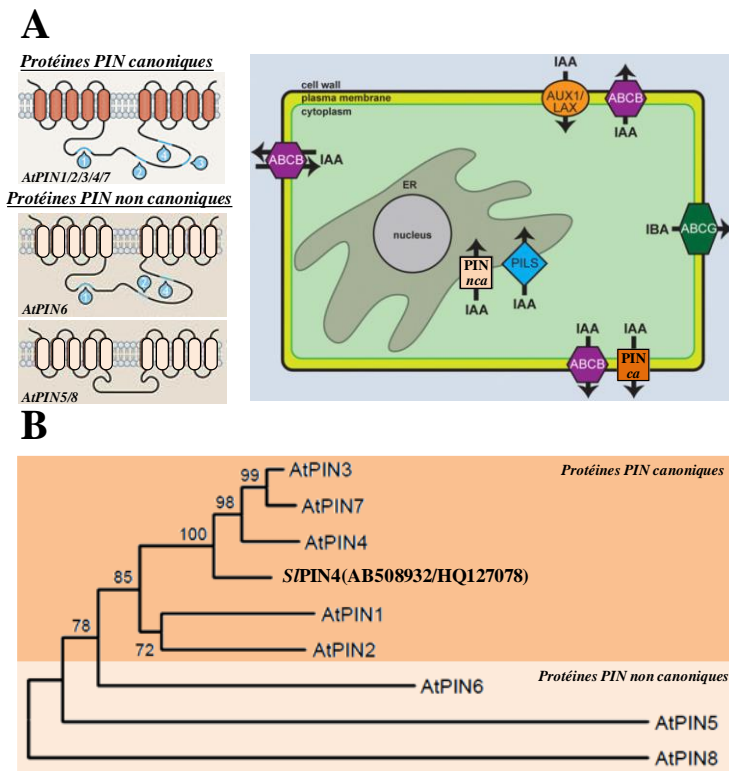


Figure 15 : Le gène candidat *S/PIN-like*, impliqué dans le développement du fruit, serait l'orthologue du gène *AtPIN4*. **A**, Structure et fonction des 8 protéines PIN d'Arabidopsis. (adapté de Sauer et Kleine-Vehn, 2019 ; Enders et stader, 2015). Les 5 PINs dits « canoniques » (*ca*), qui assurent le transport d'efflux d'auxine, possèdent 4 longs domaines intracellulaires très conservés et sont adressés à la membrane plasmique. Au contraire, les 3 PINs dits « non canoniques » (*nca*) ont des domaines plus courts et plus variables, ils présentent des localisations intra cellulaires. **B**, Le gène candidat de tomate *S/PIN-like* (AB508932/HQ127078), qui serait impliqué dans l'expansion des cellules du tissu loculaire, code pour une protéine dont le plus proche orthologue chez Arabidopsis est *AtPIN4* (adapté de Lemaire-Chamley *et al.*, 2005).

deux voies de transport (Galweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2022): un transport passif assurant une circulation de l'auxine des tissus sources vers les tissus puits via les vaisseaux du phloème, et un transport actif polarisé (TPA, pour transport polarisé d'auxine) qui s'effectue de cellule à cellule de façon unidirectionnelle. Ce dernier est mis en place par des transporteurs d'influx et d'efflux transmembranaires, positionnés de façon asymétrique sur les différentes faces des cellules végétales. Dans les zones méristématiques, le TPA engendre une forte accumulation d'AIA au sein de quelques cellules, ce qui constitue un signal pour réguler l'apparition des primordia et la croissance des organes. Ce transport d'auxine agit tout au long du cycle de vie de la plante (**Figure 13**): dès le stade embryonnaire, pour mettre en place la polarité de l'embryon et définir les territoires des futurs organes, au cours de la phase végétative, au sein des méristèmes apicaux, racinaires et caulinaires, et enfin au cours des différentes étapes du développement de la fleur et du fruit. De nombreuses études montrent que l'auxine influence le développement du fruit par le biais des gènes qui assurent son homéostasie ou la transmission du signal qu'elle engendre. Elle intervient à différents niveaux : (i) dans la fleur au cours du développement du carpelle, (ii) lors de la mise à fruit et (iii) au cours du développement précoce du fruit. Les données obtenues par mon équipe d'accueil, avant ma thèse, mettent en évidence la différence d'expression de gènes liés au transport et à la signalisation par l'auxine entre des tissus situés au centre du fruit et des tissus périphériques. Ils suggèrent qu'un gradient d'auxine pourrait contribuer à la mise en place des tissus du fruit durant la phase d'expansion (**Figure 14**). En particulier, le profil d'expression d'un gène codant pour un transporteur d'efflux d'auxine laissait suggérer un rôle important dans la différenciation des cellules au niveau du tissu loculaire. Afin d'étudier le rôle du transport de l'auxine dans l'expansion des cellules, j'ai initié une stratégie de perte de fonction (RNAi) en générant des lignées transgéniques stables de tomate sous exprimant le gène *SPIN-like* (AB508932/HQ127078). La caractérisation de ces lignées m'a permis de montrer que la sous expression de ce gène entraînait une perturbation du signal auxinique aboutissant à la formation de fruits parthénocarpiques dont la structure et la composition sont fortement altérées.

Chez *Arabidopsis*, les transporteurs d'efflux PIN sont des protéines enchâssées dans la membrane plasmique, qui sont encodées par une famille de huit gènes (**Figure 15**). Bien que le génome de la tomate ne soit pas encore disponible à l'époque, la richesse des bases de données en séquence EST m'a permis de déterminer que l'orthologue le plus proche de *SPIN-like* AB508932/HQ127078 serait *AtPIN4*. C'est un transporteur PIN à la structure canonique impliqué majoritairement, comme les PIN 1,2,3 et 7 dans la croissance en réponse à une stimulation tropique, à l'organogenèse, à la maintenance des méristèmes apicaux et racinaires, et enfin au développement précoce de l'embryon.

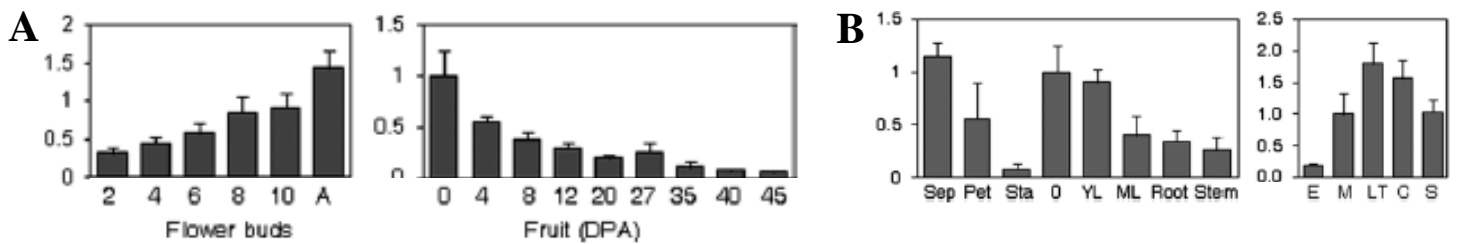


Figure 16 : Profil d'expression du gène *SPIN4* dans les organes végétatifs, les organes floraux et les tissus du fruit de tomate au cours du développement (Mounet *et al.*, 2012). L'expression du gène *SPIN4* a été réalisée par RT-PCR en temps réel. **A**, Expression dans les bourgeons floraux (stades 2mm à l'anthèse) et le fruit entier (de l'anthèse à 46 jours après anthèse). **B**, Expression dans les différents tissus de la plante, de la fleur et du fruit. Sep, sépales ; Pet, pétales ; Sta, étamines ; O, ovaire ; YL, jeunes feuilles ; ML, feuilles matures ; E, exocarpe ; M, mésocarpe ; LT, tissu loculaire ; C, columelle ; S, graines.

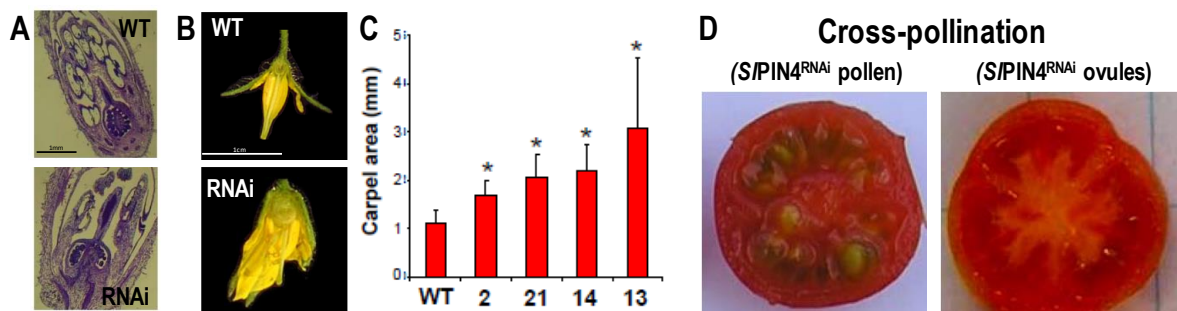


Figure 17 : La sous expression du gène *SPIN4* entraîne la formation de fruits parthénocarpiques (adapté de Mounet *et al.*, 2012). **A**, Le diamètre de l'ovaire est beaucoup plus important dans les lignées transgéniques $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$ en comparaison des fleurs WT, dès le stade 4mm. **B**, au stade anthèse, le diamètre de l'ovaire est jusqu'à 3 fois plus important dans certaines lignées transgéniques. **C**, L'absence de graine ne provient pas d'une stérilité des gamètes mâles car la pollinisation d'ovules WT avec du pollen de plante $SPIN4^{RNAi}$ permet d'obtenir des graines (photo de gauche) et la pollinisation d'ovules $SPIN4^{RNAi}$ par du pollen WT ne permet pas la formation de graines (photo de droite).

Parmi les 10 gènes PIN-like identifiés dans le génome de la tomate sur la base de l'orthologie de séquence avec les gènes d'*A. thaliana*, *SPIN4* est le plus fortement exprimé dans la fleur et le fruit. Son expression augmente lors de la formation de la fleur, atteint un maximum à l'anthèse, puis diminue dans le fruit au cours de son développement (**Figure 16**). Bien qu'il montre une forte expression également dans les feuilles et les sépales, c'est bien dans les tissus au centre du fruit (tissu loculaire et columelle) que ce gène est le plus exprimé, ce qui laisse suggérer un rôle dans le développement de ces tissus.

Afin d'étudier la contribution de *SPIN4* dans l'établissement d'un gradient d'auxine qui pourrait être impliqué dans le développement des tissus charnus du fruit, j'ai généré des lignées de plantes de tomates transgéniques $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$ sous exprimant ce gène. Les effets observés sur le fruit se sont révélés beaucoup plus précoces que nous ne l'envisagions. Dès le stade 4mm, alors que la fleur est encore loin de l'anthèse, la perturbation du transport de l'auxine dans les lignées transgéniques $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$ engendre un grossissement anormal de l'ovaire (**Figure 17 A**). Au moment de l'anthèse, qui marque la fécondation et la reprise des divisions dans l'ovaire de la plante sauvage, le diamètre de la zone carpellaire est beaucoup plus important dans les lignées transgéniques (**Figure 17 A-C**). Lors de mes travaux, j'ai pu montrer que, sans fécondation, l'ovaire sauvage périclité et disparaît (Mounet *et al.*, 2012), alors que les ovaires des lignées $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$ poursuivent leur développement pour donner des fruits dits parthénocarpiques (i.e. fruit formé sans fécondation des ovules et qui ne contient pas de graines). L'absence de graines dans ces fruits n'est pas due à une stérilité du pollen, mais résulterait du développement précoce de l'ovaire, empêchant ainsi la fécondation (Mounet *et al.*, 2012). L'utilisation d'un inhibiteur du transport d'efflux d'auxine bien connu, le NPA (acide naphtylphthalamique), entraîne le même phénotype (Mounet *et al.*, 2012). L'initiation du développement du fruit avant l'anthèse serait donc due à une perturbation du signal auxinique dans les plantes $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$, comme le suggèrent les dosages des formes libres et conjuguées de cette hormone, ainsi que l'expression des gènes impliqués dans cette voie de signalisation (AuxIAA et ARF). La comparaison des profils d'expression de gènes entre les lignées fertiles et les lignées parthénocarpiques $P_{35S}:SPIN4^{RNAi}$, réalisée à partir de données de micro array, a permis de mettre en évidence des gènes potentiellement impliqués dans le développement précoce du fruit. Certains d'entre eux codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation croisée de plusieurs voies hormonales, comme les orthologues des gènes *AtMYB21* et *24*, depuis identifiés comme des régulateurs de la biosynthèse de l'acide jasmonique, de l'auxine et des gibbérellines (Schubert *et al.* plant cell 2019). Ces travaux ont permis d'améliorer de façon significative notre compréhension des processus qui se déroulent dans le jeune fruit et qui semblent avoir un impact fort sur son développement.

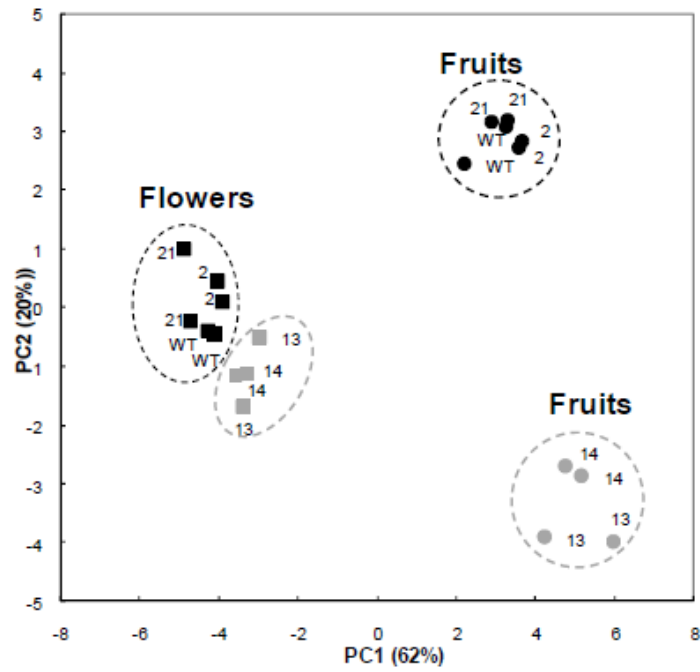


Figure 18 : Analyse en Composante Principale de la composition des fleurs et des jeunes fruits (adapté de Mounet *et al.*, 2012). Les données analysées sont issues de la quantification absolue de 26 métabolites par RMN-¹H, GC-FID et LC-DAD dans des échantillons de fleur (stade 4mm) et de fruits (stade 4 DPA), issus de lignées fertiles (noir) et de lignées parthénocarpiques (gris). On peut observer que la composition des fleurs et des jeunes fruits dans des lignées parthénocarpiques est très différente de celle des lignées fertiles. Les concentrations en sucres, en acides aminés et en acides organiques jouent un rôle majeur dans la séparation des échantillons. La perturbation du transport de l'auxine, engendrée par la dérégulation de l'expression du gène *SPIN4*, modifie fortement la composition précoce de l'ovaire et influence la composition du fruit.

Les données acquises dans le cadre de ce travail montrent que les modifications métaboliques, détectées très tôt au sein de l'ovaire dans les lignées parthénocarpiques P_{35S}:S/PIN4^{RNA}, s'amplifient au cours du développement précoce du fruit pour aboutir à une composition très différente du fruit à maturité (**Figure 18** et données non présentées). Ces différences concernent des sucres, des acides organiques et des acides aminés qui jouent un rôle majeur dans la qualité organoleptique de la tomate. Longtemps négligées au profit des profonds changements qui s'opèrent lors de la crise climactérique (mûrissement), les régulations qui dominent le développement précoce du fruit de tomate pourraient donc faire l'objet de stratégies de sélection visant à améliorer les qualités organoleptiques du fruit de tomate.

En conclusion, les différentes approches réalisées au cours de mon travail de thèse ont permis de mieux caractériser les trajectoires de développement des différents tissus qui composent le fruit de la tomate, en s'attachant à leur structure, leur composition et leur profil transcriptomique. La prise en compte de ces spécificités tissulaires ouvre donc de nouvelles perspectives pour l'amélioration de la qualité du fruit, mais aussi pour la compréhension des mécanismes de développement chez les plantes. L'analyse intégrée du transcriptome et du métabolome a identifié de nouveaux gènes candidats potentiellement impliqués dans les mécanismes assurant l'expansion des cellules. Si une attention particulière a été portée sur le rôle de l'auxine dans le développement précoce du fruit, j'ai également initié, pendant ma thèse, la caractérisation fonctionnelle de plusieurs autres gènes candidats en générant et en analysant des lignées transgéniques de tomates sous exprimant ces gènes. L'un d'entre eux code pour une enzyme de type GDSL Lipase. Cette protéine fait l'objet d'une attention particulière de la part de l'équipe ELIPS de l'INRAe de Nantes (unité Biopolymères, Interaction et Assemblage) au regard de son abondance dans la cuticule des plantes, une barrière hydrophobe qui recouvre la partie aérienne de toutes les plantes terrestres. J'ai eu l'opportunité de poursuivre mes recherches en effectuant un post doctorat dans cette équipe, et de contribuer à démontrer que la GDSL Lipase est une enzyme qui assure la polymérisation de la cuticule.

Chapitre 2 :
Travaux de post-doctorat

Première expérience post-doctorale

Caractérisation du rôle de l'enzyme GDSL Lipase 1 dans la polymérisation de la cutine chez la Tomate

*Equipe ELIPS (Edifices Lipoprotéiques et Protéo-Saccharidiques)
Laboratoire Biopolymères, Interaction et Assemblage (BIA)
INRAe de Nantes*

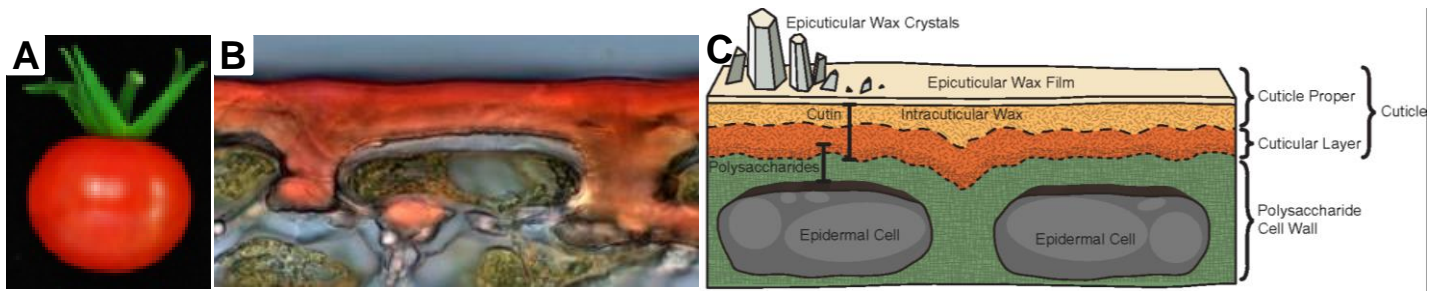


Figure 19 : Structure de la cuticule dans la peau de tomate. **A**, Fruit de tomate à maturité de la variété WVA106, utilisée pour caractériser la fonction de la GDSL lipase 1 dans l'étude Girard *et al.* (2012). **B**, Image obtenue en microscopie optique champ clair de l'épiderme d'un fruit de tomate coloré au Rouge Soudan (source : SOL Gebomic Network, <https://solgenomics.net/>). **C**, Représentation schématique de la structure de la cuticule qui recouvre l'épiderme des parties aériennes chez les plantes terrestres (Yeats and Rose, 2013). Au niveau de la paroi des cellules épidermiques, différents polymères se déposent en couches : les polysaccharides de la paroi, les polymères d'acides gras de la cutine et les cires.

Les assises cuticulaires sont des structures complexes recouvrant l'épiderme des organes aériens chez les végétaux (**Figure 19**). Ces édifices sont composés d'une matrice polymérique appelée cutine dans et sur laquelle se déposent des cires intra- et épicuticulaires. Les cires sont composées majoritairement d'esters, d'aldéhydes, d'alcane et de cétones, synthétisées à partir d'acides gras à très longue chaîne (VLCFAs) et se retrouvent en surface de la cuticule mais aussi imbriquées plus en profondeur dans la matrice de cutine. La cutine constitue le squelette de la cuticule, c'est un polyester fortement ancrée aux structures pariétales polysaccharidiques composé d'acides gras hydroxylés et époxydés, et de glycérol. Cutine et cires constituent ce qu'on appelle la cuticule.

Au niveau biologique, les assises cuticulaires constituent une barrière physico-chimique hydrophobe entre la plante et le milieu extérieur dont l'intégrité est indispensable à la survie des organes et plus généralement de la plante. Elles contrôlent notamment les échanges d'eau entre la plante et le milieu extérieur et constituent un frein au développement des microorganismes. Enfin comme l'ont révélé certains mutants de fusion d'organes chez *A.thaliana*, la cuticule est indispensable au développement de la plante.

Au niveau technologique, les assises cuticulaires sont impliquées dans le fractionnement des grains (adhésion enveloppes-couche à aleurone du blé), la texture et la conservation post-récolte des végétaux. De plus, elles représentent un co-produit important des industries de transformation des fruits. En France on estime qu'environ 6 000 tonnes d'assises cuticulaires sont produites rien que par les usines de transformation de tomates. Ces déchets constituent une source non négligeable de molécules originales utilisables et recherchées par l'industrie chimique (acides gras hydroxylés). Si les voies de biosynthèse des monomères de cutine étaient en partie connues lorsque j'ai débuté ce travail (Pollard *et al.*, 2008), l'assemblage de ces édifices supramoléculaires qui détermine leurs propriétés fonctionnelles restaient mal connues. En particulier, le transport des précurseurs lipidiques qui constituent la cutine, ainsi que la réaction enzymatique permettant leur polymérisation, restaient deux étapes mal caractérisées.

Pour identifier les mécanismes impliqués dans la polymérisation de la cutine, deux démarches ont été entreprises, en utilisant le fruit de tomate comme modèle : (1) L'analyse ciblée d'un gène candidat appartenant à la famille des GDSL-lipases/hydrolases (GLIP1 ou GDSL1) et (2) le screening phénotypique d'une collection de mutants EMS de tomate affectés dans la structure de la cuticule du fruit (Microtom <http://cbi.labri.fr/outils/MMDB>). Dans le cadre de mon CDD post-doctoral, j'ai contribué à la première approche.

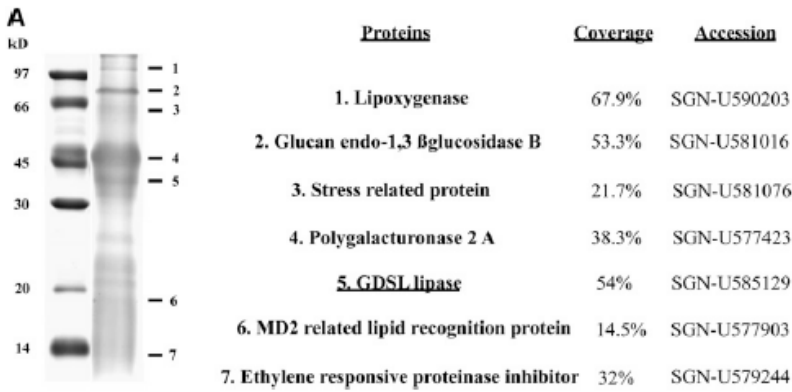


Figure 20 : Identification des protéines dans la peau du fruit de tomate mûre Girard *et al.* (2012). Mise en évidence par westernblot, les protéines les plus abondantes sont identifiées par spectrométrie de masse après digestion à la trypsine.

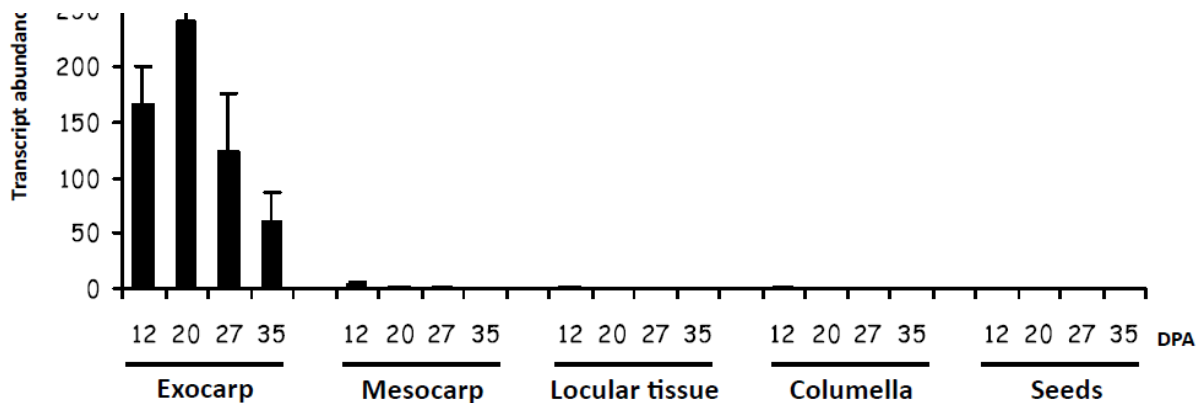


Figure 21 : Le gène codant pour la GDSL1 est exprimé spécifiquement dans la peau de tomate Girard *et al.* (2012). Analyse de l'expression de la GDSL1 par qPCR en temps réel dans les différents tissus du fruit de tomate au cours de son développement. DPA, jours après anthèse.

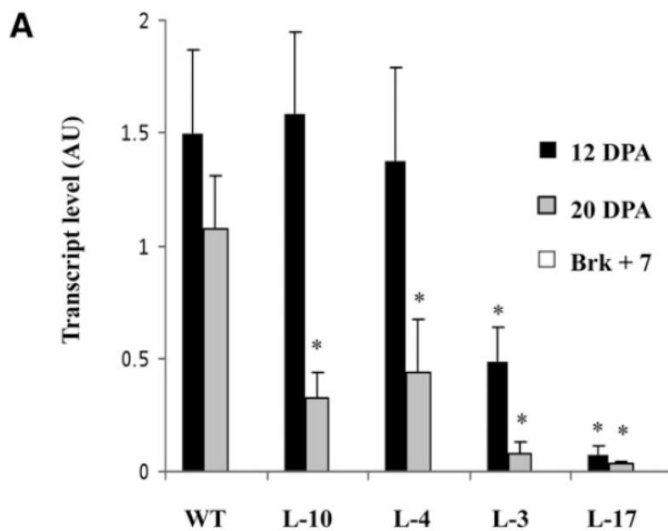


Figure 22 : Détection de la GDSL1 dans l'épiderme des fruits de tomate WT et P_{35S}::GDSL1^{RNAi} à différents stades de développement Girard *et al.* (2012). Analyse de l'expression du gène codant pour la GDSL1 (A) et détection de la GDSL1 par westernblot (B) dans les lignées transgéniques (L-3,4,10,17) et les plantes sauvages (WT). DPA, jours après anthèse. Brk, stade breaker caractérisé par un changement de couleur du fruit (de vert à orange)



Une analyse préliminaire réalisée par l'équipe Edifices Lipoprotéiques et ProtéoSaccharidiques (ELIPS, INRAe de Nantes), visant à identifier les protéines les plus abondantes dans la peau de la tomate (**Figure 20**), a permis de mettre en évidence une GDSL lipase acylhydrolases-transférase (GDSL1). Cette enzyme fait partie d'une famille multigénique d'enzymes lipolytiques qui contient le motif conservé Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL). Leur fonction a été caractérisée chez certaines bactéries. Cependant, chez les plantes, leur activité catalytique et leur rôle physiologique étaient inconnus lorsque cette étude a débuté. Initialement identifiées à partir de plantes soumises à l'attaque de différents pathogènes, ces enzymes semblaient être impliquées dans les mécanismes de défense (Clauß *et al.*, 2008). Leur rôle potentiel dans l'hydrolyse et la synthèse d'ester lipidiques en faisaient cependant de bonnes candidates pour la mise en place de la cutine et de sa modification au cours de la croissance de la plante. L'analyse du profil d'expression des gènes de cette famille a pu montrer que : (i) 4 gènes codant pour des GDSL étaient exprimés dans le fruit de tomate, (ii) celui codant pour la GDSL1 était le plus fortement exprimé, et (iii) il est spécifiquement exprimé dans l'exocarpe (**Figure 21**). Ces résultats illustrent également que le gène de la GDSL1 est plus fortement exprimé au cours de la phase d'expansion du fruit, au moment où l'accroissement de la surface de l'organe nécessite la plus forte synthèse de cutine afin d'en recouvrir l'épiderme. L'analyse de la protéine GDSL1 par westernblot (**Figure 21**) et immuno-localisation dans la cuticule de la tomate (Girard *et al.*, 2012) ont permis de montrer que : (i) la GDSL1 est produite par les petites cellules de l'épiderme mais sécrétée vers l'extérieur où on la retrouve enchâssée dans le polymère de cutine et (ii) elle s'accumule fortement au début de la phase d'expansion du fruit (12 DPA, jours après anthèse) puis diminue au cours du mûrissement du fruit, en accord avec le profil d'expression du gène GDSL1.

Durant ma thèse, j'ai généré et caractérisé des lignées transgéniques de tomates sous exprimant des gènes candidats potentiellement impliqués dans le développement du fruit. Ces gènes ont été choisis sur la base d'une expression différentielle entre les petites cellules de l'exocarpe et les grandes cellules du péricarpe (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). L'un d'entre eux codait pour la GDSL lipase 1, ce qui a cristallisé le début de la collaboration entre l'équipe de Génomique Fonctionnelle et Développement du Fruit et l'équipe ELIPS. Quatre lignées P_{35S}::GDSL1^{RNAi} ont été étudiées et comparées à la plante sauvage afin de démontrer le rôle de cette enzymes dans la polymérisation de la cutine. La **Figure 22**, qui représente l'expression de GDSL1 dans la peau de tomate à différents stades de développement du fruit montre que ces lignées transgéniques présentent une réduction variable de l'expression du gène et de la quantité d'enzyme, en accord avec les phénotypes contrastés observés par la suite dans ces plantes.

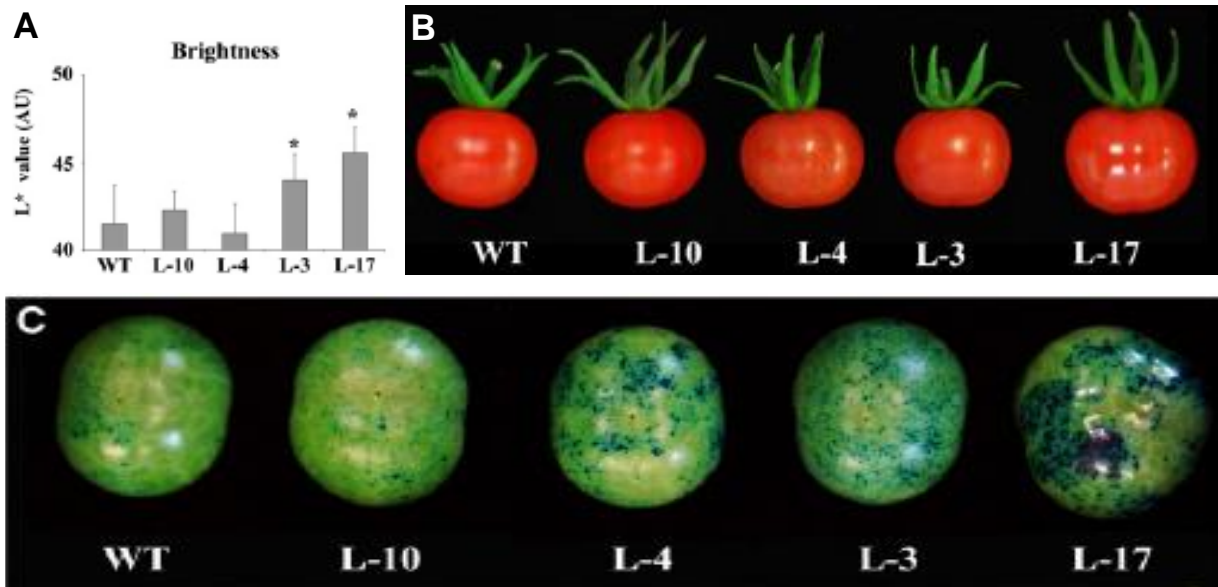


Figure 23 : Analyse de la brillance et de la perméabilité des fruits dans les lignées $P_{35S}::GDSL1^{RNAi}$ et WT Girard *et al.* (2012). La brillance des fruits de tomate à maturité, mesurée au chromamètre (A) ou visible sur les images (B), est plus importante dans les lignées transgéniques par comparaison avec les lignées WT. La perméabilité de la peau des tomates, mesurée par incorporation du bleu de toluidine (C), est plus importante dans les lignées transgéniques.

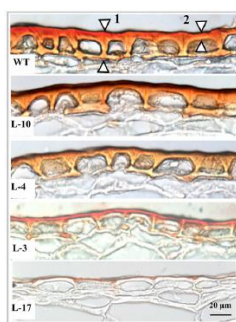


Figure 24 : Mesure de l'épaisseur de la cuticule des fruits de tomate $P_{35S}::GDSL1^{RNAi}$ et WT Girard *et al.* (2012). Les assises cutinisées de l'exocarpe sont révélées par le rouge soudan et observées par microscopie en champ clair. Des mesures ont été réalisées au niveau des flèches (non représenté). La diminution de l'épaisseur de la cuticule est très importante dans les lignées transgéniques.

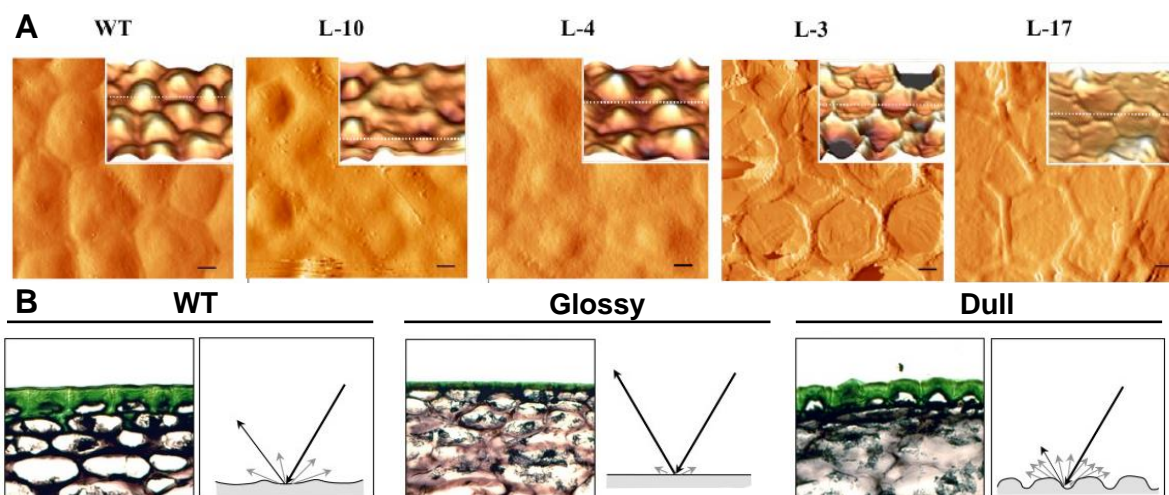


Figure 25 : L'analyse de la surface des fruits des lignées $P_{35S}::GDSL1^{RNAi}$ explique leur brillance plus importante. A, Analyse par microscopie de force atomique (AFM). La surface des fruits des lignées transgéniques est plus lisse B, Modèle expliquant l'aspect extérieur des fruits de tomate basé sur l'étude de différents mutants de cuticule (adapté de Petit *et al.* 2014). La lumière est renvoyée par une cuticule plus lisse, diffractée par une cuticule avec des reliefs plus importants.

Dans les lignées transgéniques $P_{35S}::GDSL1^{RNAi}$, les fruits se développent comme ceux de la plante sauvage (Girard *et al.*, 2012), mais présentent des phénotypes caractéristiques d'une altération de la cuticule. Tout d'abord les fruits des lignées transgéniques sont plus brillants (**Figure 23 A et B**), ce qui suggère que leur surface peut réfléchir la lumière différemment d'un fruit de plante sauvage. De plus, la perméabilité des fruits produits par les lignées transgéniques est fortement réduite. En effet, la chair présente un marquage plus intense après immersion dans un colorant bleu (**Figure 23 C**). Ces fruits se dessèchent également beaucoup plus vite que les fruits des plantes sauvages (Girard *et al.*, 2012). La cuticule des plantes permet d'assurer la perméabilité des organes et de limiter les pertes d'eau. Les mutants qui présentent un dépôt de cutine altéré montrent aussi un dessèchement plus important des tissus, une perte de chlorophylle en condition d'immersion ou une perméabilité plus forte aux colorants (Petit *et al.*, 2014). La sous expression du gène *GDSL1* engendre une très forte diminution de l'épaisseur de la cutine au niveau de l'épiderme des fruits de tomate. Dans les lignées les plus affectées (L3 et L17), la cutine est 4 à 7 fois moins épaisse que pour les fruits WT. L'analyse de la composition de cette cutine par chromatographie en phase gazeuse a montré que la proportion des différents monomères de cutine ne varie pas de façon significative mais la quantité totale de ces monomères est jusqu'à 20 fois moins importante dans les lignées transgéniques, par rapport aux plantes contrôles. Dans les fruits de la lignée transgénique L-10, qui ne présente qu'une très faible réduction de la quantité de *GDSL1* (Girard *et al.*, 2012), la cutine est aussi épaisse que chez le contrôle, la brillance et la perméabilité des fruits ne sont pas altérées. En revanche dans les lignées L-3 et L-17, l'épaisseur de la cutine est fortement réduite, la *GDSL* lipase, détectée par immuno-marquage, est presque inexistante (Girard *et al.*, 2012), les fruits sont plus brillants et plus perméables. Cette brillance accrue des fruits est parfaitement bien expliquée par la caractérisation de mutants EMS de tomate dont la structure de la cuticule est altérée (Petit *et al.*, 2013). La **Figure 25** montre comment la cutine, qui recouvre la surface des fruits de tomate, épouse la structure des cellules épidermiques situées au-dessous, pour aboutir à une surface « bosselée » qui réfléchit une partie seulement de la lumière incidente. Un dépôt de cuticule qui exacerbe le relief à la surface du fruit atténue la réflexion de la lumière et se traduit par un fruit d'aspect mat. Au contraire, un dépôt uniforme de cuticule, qui peut d'ailleurs être le résultat d'une production trop forte ou trop faible de cutine, accentue la réflexion de la lumière et engendre un fruit plus brillant. L'utilisation de la microscopie de force atomique (AFM) a permis de montrer que la réduction de cutine dans les lignées $P_{35S}::GDSL1^{RNAi}$ entraîne une surface plane qui explique l'aspect brillant des fruits (**Figure 25**). L'ensemble de cette étude représente, avec les travaux de Yeats *et al.* (2012), la première démonstration que les *GDSL* lipases exprimées dans l'épiderme sont des enzymes essentielles qui assurent la polymérisation de la cutine chez les plantes.

Seconde expérience post-doctorale

Identification de nouveaux mécanismes de résistance aux stress abiotiques par criblage d'une population d'*A. thaliana* transgéniques

*Laboratoire Bioquímica y Biotecnología Vegetal
Universidad de Malaga*

A l'issue de mes travaux précédents, j'ai orienté mon parcours professionnel de façon à élargir à la fois mes connaissances, mes compétences techniques et ma vision scientifique, et j'ai initié un nouveau stage postdoctoral au sein du laboratoire de Biochimie et Biotechnologie Végétale de Malaga (LBBV) dirigé par Miguel Angel Botella.

L'étude que j'ai réalisée au sein de ce laboratoire s'inscrivait dans le cadre d'un projet plus vaste appelé TRANSPLANTA, qui impliquait 14 équipes espagnoles issues de 10 instituts différents. L'objectif global de cette étude était de contribuer à la caractérisation fonctionnelle de l'ensemble des facteurs de transcription (FTs) d'*Arabidopsis thaliana*, et d'évaluer le potentiel biotechnologique des FTs sélectionnés au sein d'espèces d'intérêt agronomique. Cette approche se fonde sur le criblage d'une collection de plantes transgéniques sur-exprimant ces gènes, générées dans le cadre du projet. Etant donné le potentiel effet pléiotropique d'une expression constitutive d'un FT, chaque lignée sur-exprime un seul gène cible sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'œstradiol.

La régulation de la transcription des gènes est un mécanisme primordial pour assurer la plasticité des réponses face aux stimuli extérieurs chez tous les organismes vivants. Au cours des 15 dernières années, l'avancée des connaissances dans le domaine de la transcription a mis en valeur des mécanismes complexes comme le remodelage de la chromatine, le *silencing* de gènes ou l'action de petits peptides (Lauregger *et al.*, 2015). Mais en 2010, et en particulier chez les plantes, les facteurs de transcription étaient considérés comme les acteurs principaux assurant la régulation de la transcription des gènes. Uniquement 5% de ces gènes avaient fait l'objet d'analyses fonctionnelles, mais ils étaient les cibles d'un nombre grandissant d'études, ce qui témoignait de l'intérêt d'une approche à haut débit pour caractériser leur fonction *in planta* et leur potentiel biotechnologique. Le séquençage complet du génome d'*Arabidopsis* a permis d'identifier plus de 1500 FTs, soit environ 6% du génome alloué à ce type de régulation (Riechmann and Ratcliffe, 2000). De par leur capacité à se fixer à des éléments *cis*-régulateurs au sein des promoteurs de multiples gènes, les FTs représentent des éléments clés pour la compréhension fondamentale des processus de développement de la plante, aussi bien que des candidats de choix pour la sélection de variétés d'intérêt agronomique.

L'objectif de mon travail, qui s'inscrit dans la thématique du laboratoire LBBV, était de cribler cette collection afin d'isoler et de caractériser les régulateurs impliqués dans la résistance contre les stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*. Je m'intéressais plus particulièrement à ceux qui sont impliqués dans (i) les mécanismes de réparation de la membrane plasmique, ainsi que (ii) ceux qui interviennent dans la tolérance au stress oxydatif. Les travaux de MA Botella avaient mis en évidence une famille de protéines impliquée dans la réparation de la membrane plasmique lors de stress froid, osmotique et

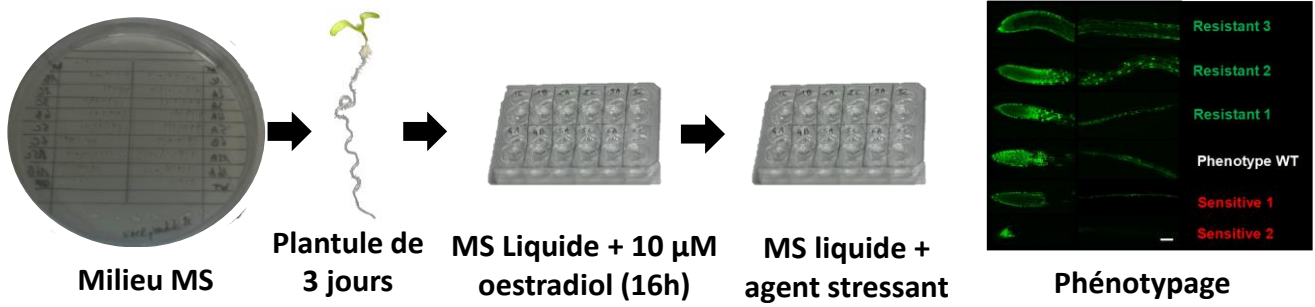


Figure 26: Protocole expérimental mis en place pour cribler la collection de plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*. Les graines sont semées après stratification sur un milieu MS. Les plantules de 3 jours sont transférées en milieu MS liquide + œstradiol pendant 16h pour induire l'expression du facteur de transcription. Après induction, les plantules sont transférées sur un milieu stressant. La viabilité cellulaire est estimée en utilisant le FDA (fluorescéine di-acétate).

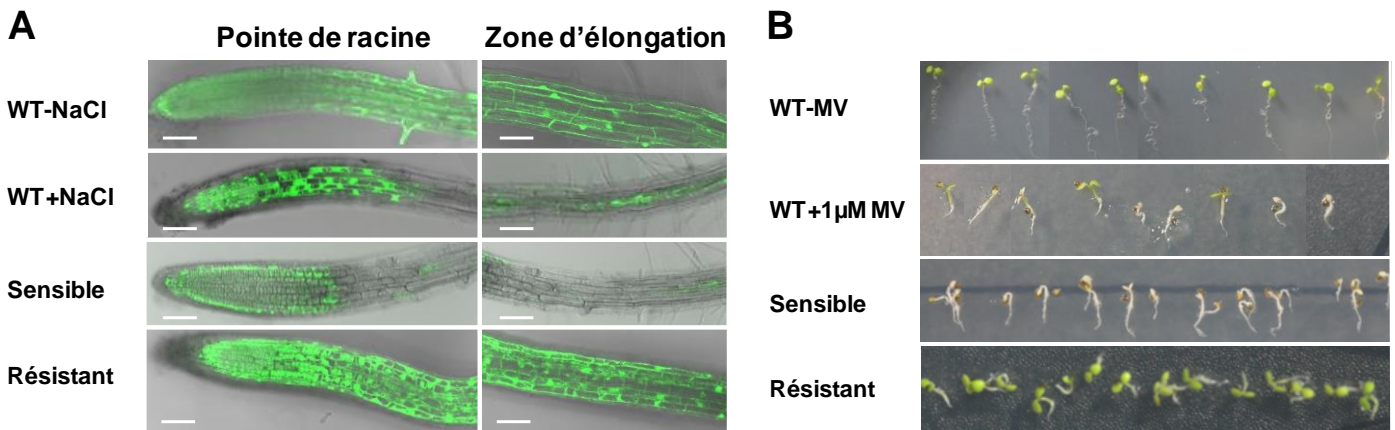


Figure 27: Exemples de criblages de la collection de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant des FTs. (A) Marquage des cellules situées dans la racine dont l'intégrité de la membrane plasmique n'a pas été affectée par un stress salin. Le FDA marque uniquement les cellules vivantes. (B) Test de tolérance au stress oxydatif induit par le méthyl viologène (MV). WT = plantes sauvages Col-0.

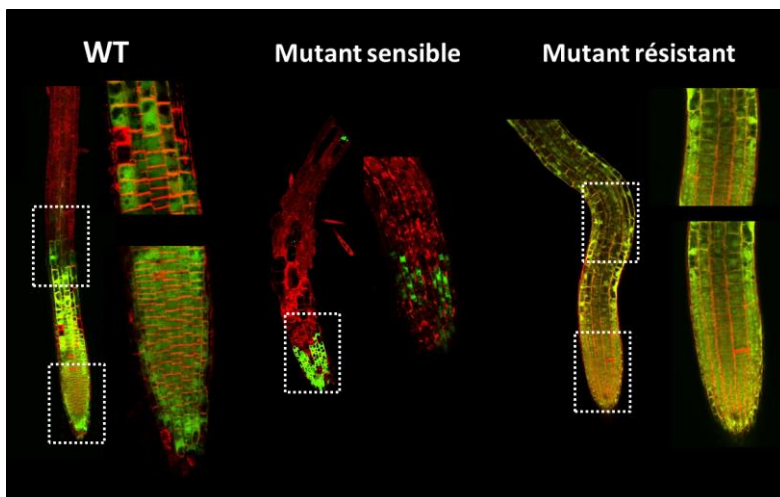


Figure 28: Exemples d'un mutant sensible et d'un mutant résistant au stress salin observé en microscopie confocale. La fluorescence verte, obtenue par excitation du FDA avec de la lumière bleue, marque les cellule vivantes de la pointe de racine soumise à 12h d'exposition à une solution de 125mM de NaCl.

salin. Bien connu chez les animaux, ces mécanismes sont très peu caractérisés chez les plantes, mais revêtent pourtant une importance capitale pour leur survie (Schapire *et al.*, 2008). De la même façon, il apparaît tout aussi important, d'un point de vue fondamental aussi bien qu'agronomique, d'identifier des régulateurs mis en jeu par la plante pour lutter contre des conditions oxydantes de l'environnement extérieur.

J'ai utilisé une large gamme de marqueurs (GFP, FDA, FM64-4, GUS, DAB, NBT, etc...), couplés à des techniques de microscopie (fluorescence et confocale), pour mettre en évidence les FTs qui, une fois surexprimés au sein des plantes transgéniques, affectent la résistance de la membrane plasmique face à un stress salin (**Figure 6A**) ou la croissance des plantes lors d'un stress oxydatif (**Figure 6B**).

Afin de transférer les connaissances acquises chez *Arabidopsis* dans des plantes d'intérêt agronomique, mon objectif était également de caractériser le potentiel biotechnologique des candidats sélectionnés en utilisant des lignées de tomates transgéniques (surexpression et/ou sous-expression). Cependant, suite à mon recrutement en tant que MCF à l'université de Toulouse, je n'ai pas pu poursuivre ces travaux.

Cette expérience postdoctorale m'a permis de mettre en application et de fortifier les compétences acquises au cours de mes recherches précédentes. Mes connaissances en physiologie des plantes en général, et en biologie moléculaire ou en biotechnologie en particulier, se sont révélées indispensables pour mener à bien ce projet. Sensibilisé très tôt à travailler à l'interface entre plusieurs équipes, je n'ai pas éprouvé de difficulté à m'intégrer dans une vaste collaboration comme celle du projet TRANSPLANTA. Au sein du laboratoire LBBV, j'ai pu développer de nouvelles connaissances concernant des techniques de microscopie ou la maîtrise d'un nouveau modèle d'étude.

Chapitre 3 :
Travaux de recherche en tant
que Maître de Conférences

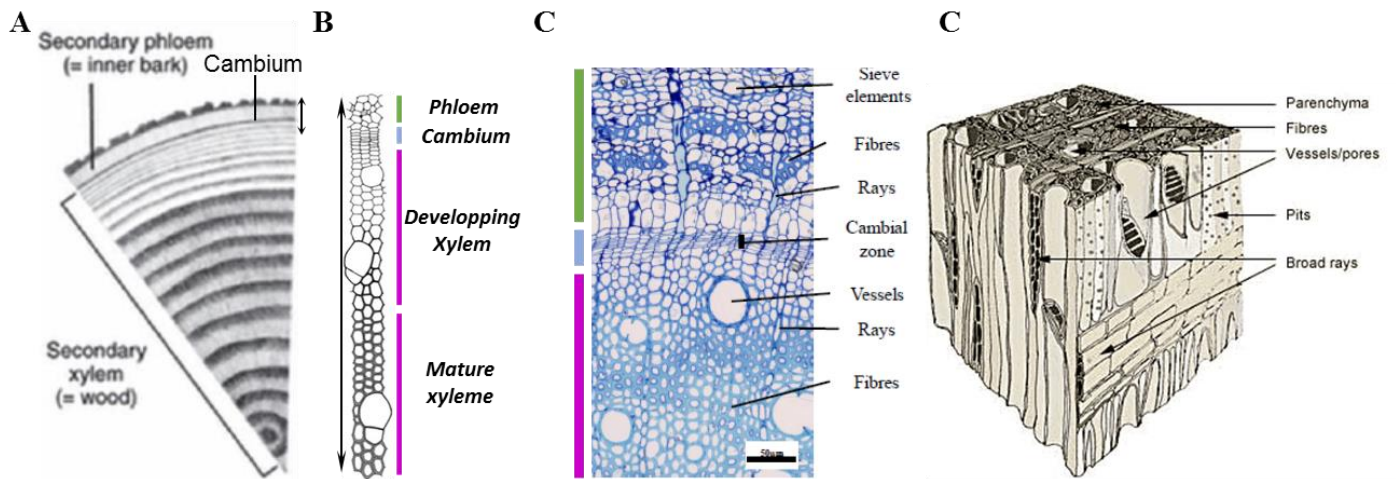


Figure 29: Structure et organisation des tissus qui composent le bois chez les arbres. **A**, Section transversale d'un tronc, de l'écorce (extérieur) vers le xylème (intérieur). La structure et la composition du bois se modifient en fonction des saisons pour former des anneaux concentriques. **B** et **C**, Coupes transversales des tissus du bois. Les cellules du cambium se divisent, s'allongent puis se différencient pour former différents types cellulaires au niveau du phloème et du xylème. **D**, Les différentes cellules du bois assurent des rôles distincts et présentent une organisation tridimensionnelle complexe qui détermine les propriétés du bois.

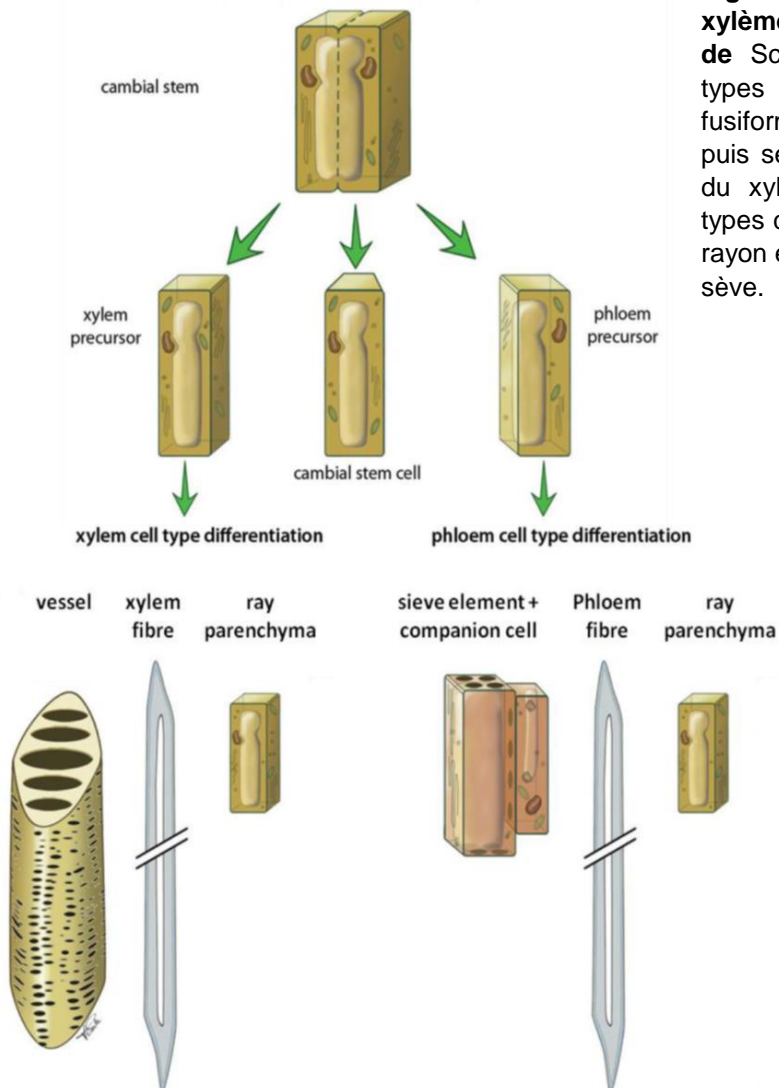


Figure 30: Différenciation des cellules du xylème et du phloème secondaires (Adapté de Schuetz, Smith and Ellis, 2013). Deux types de cellules cambiales, initiales fusiformes ou initiales de rayon, se divisent puis se différencient pour donner les cellules du xylème et du phloème. Les principaux types cellulaires sont les fibres, les cellules de rayon et les cellules assurant le transport de la sève.

3.1 Régulation et dynamique de la formation du bois

3.1.1 Introduction

Les plantes terrestres sont dotées d'un système vasculaire constitué de trois tissus principaux : le xylème, le phloème et le cambium. Ce dernier est un méristème interne qui génère les deux premiers (Lucas *et al.*, 2013). Dans ce système finement organisé (**Figure 29**), le xylème et le phloème agissent en tant que conduits spécialisés, et ont pour rôle de délivrer les ressources à chaque organe. Le xylème assure le transport de l'eau et des nutriments solubles puisés dans le sol, vers les parties aériennes. Le phloème, achemine les photoassimilats (sucres et acides aminés) des feuilles vers les autres parties de la plante. Dans certains organes comme la tige, la prolifération et la différenciation des cellules cambiales donne naissance au xylème (vers l'intérieur de la tige) et au phloème (vers l'extérieur de la tige), ce qui entraîne un développement radial de l'organe appelé croissance secondaire. Le bois produit par les arbres n'est autre que l'ensemble des cellules du xylème. Il représente le meilleur exemple de développement d'un système vasculaire secondaire chez les végétaux.

En tant que plantes pérennes, les arbres peuvent poursuivre le développement du système vasculaire au niveau du tronc, parfois pendant des centaines d'années. Cela donne lieu à l'accumulation d'une quantité considérable de molécules carbonées dans les parois des cellules du xylème. Le bois représente ainsi le réservoir le plus abondant de carbone à la surface de la planète, de même qu'une importante source d'énergie renouvelable. A l'heure actuelle, il est utilisé en tant que matière première pour une grande diversité d'applications agro-industrielles (combustion, construction ou production de pâte à papier) et contribue à diminuer notre dépendance vis-à-vis des hydrocarbures. L'optimisation de l'utilisation de cette biomasse dans ces différentes filières agro-industrielles fait encore l'objet de verrous technologiques importants, principalement à cause des propriétés physico-chimiques du bois. Ces propriétés sont déterminées par sa composition mais aussi par son anatomie complexe (**Figure 29**).

Les tissus du bois sont mis en place par le méristème cambial. Ce processus est contrôlé par des signaux internes (hormones et autres messagers circulants) et externes (environnement biotique et abiotique). Ces signaux, qui fluctuent tout au long de la vie de l'arbre, influencent l'activité du cambium vasculaire (Mauriat *et al.*, 2014). Ce dernier est composé de deux types de cellules souches, les initiales fusiformes et les initiales de rayon, qui se divisent pour générer plusieurs types cellulaires (**Figure 30**). Les initiales fusiformes vont donner naissance principalement aux cellules conductrices (vaisseaux et trachéides), aux fibres, ainsi qu'aux cellules du parenchyme axial du xylème, alors que les initiales de rayon vont produire les cellules du parenchyme radial (Spicer and Groover, 2010).

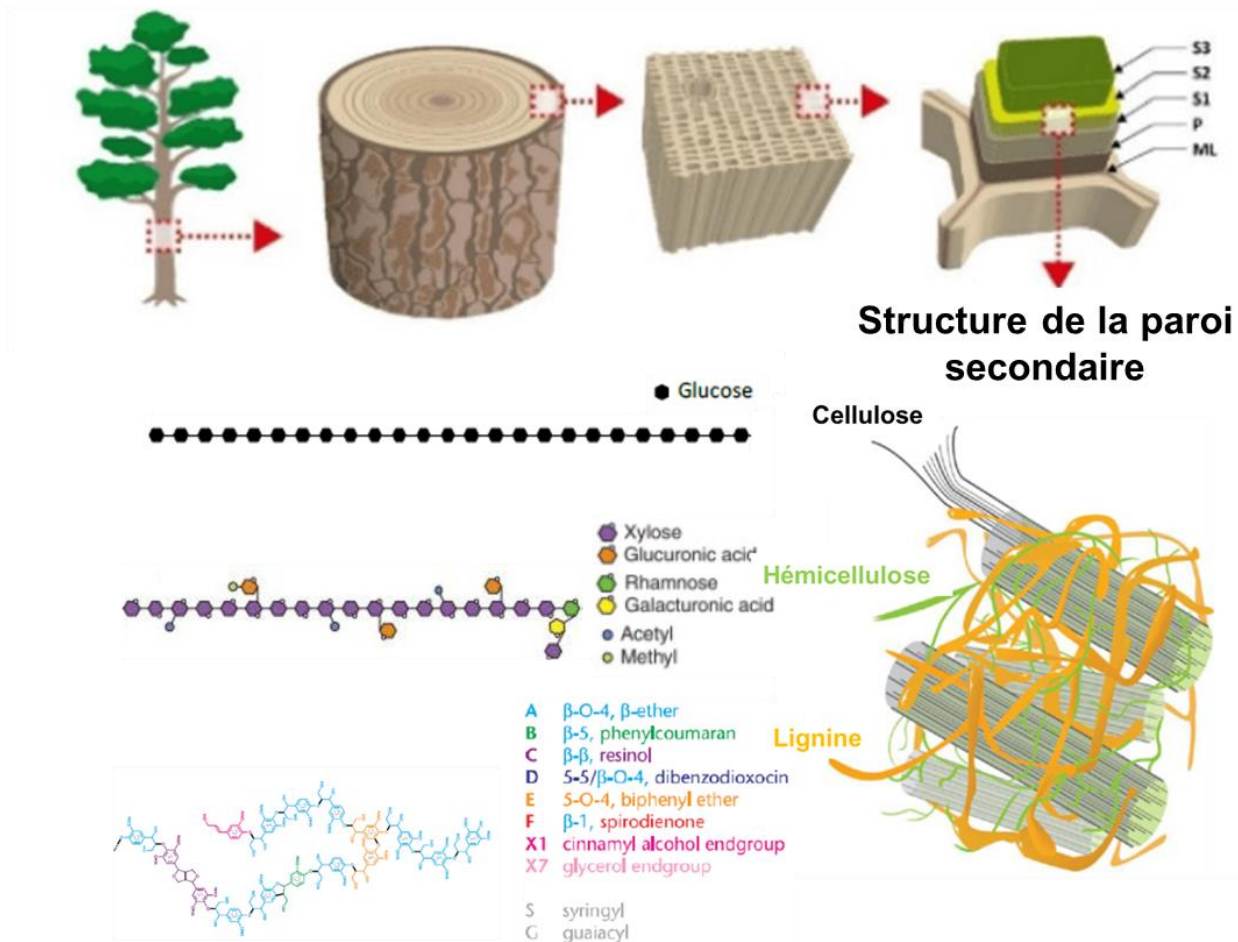


Figure 31: Structure et composition de la paroi secondaire des cellules du xylème (adapté de Plomion, Leprovost and Stokes, 2001). Les cellules matures du xylème sont pourvues d'une couche d'adhésion aux cellules adjacentes, la lamelle moyenne (ML), d'une paroi primaire (P) et d'une paroi secondaire très épaisse déposée en couches successives (S1, S2, S3). La couche S1 est la première à être mise en place et fait le lien avec la paroi primaire. Sa faible épaisseur, qui ne représente que 5% à 10% de l'épaisseur totale de la paroi secondaire, la rend difficilement observable. La couche S2 représente entre 75% et 85% de l'épaisseur totale de la paroi secondaire. Enfin, la couche S3 est la dernière à être produite lors du dépôt de paroi secondaire. Cette couche peut représenter jusqu'à 10% de la paroi secondaire. La paroi secondaire est composée pour moitié de cellulose, un polymère de glucose reliés entre eux par des liaisons β 1,4. Environ 20-25% de cette paroi représente des hémicelluloses. Les xylanes sont les hémicelluloses les plus abondantes dans le bois. Elles sont composées d'une chaîne principale de xylooses méthylés et/ou acétylés, interrompue par des résidus rhamnoses sur lesquels se branchent des chaînes latérales d'acides glucuroniques ou galaturoniques. La lignine est un polymère complexe d'acides phénoliques qui recouvre et s'imbrique dans la matrice de polysaccharides. Chez les arbres, la lignine est principalement composée de sous unités syringil et guaiacyl, reliées entre elles, et avec les résidus des hémicelluloses, par une très grande diversité de liaisons chimiques qui conditionnent ses propriétés physico-chimiques.

La xylogénèse comprend quatre étapes principales : (1) la mise en place d'assises cellulaires par division au niveau du cambium, (2) l'élongation des nouvelles cellules, (3) le dépôt d'une paroi secondaire lignifiée et (4) la mort cellulaire programmée. Le dépôt d'une épaisse paroi secondaire sous forme de couches successives est un processus de développement spécifique aux cellules qui ont pour fonction de résister à des contraintes mécaniques, telles que les fibres du phloème et du xylème. Cette paroi est composée de polymères de sucres (cellulose, d'hémicelluloses et pectines), et de lignine, qui est un polymère de composés phénoliques (**Figure 31**).

La biosynthèse de la cellulose est assurée par des polysaccharides synthases spécifiques, ou cellulose synthases (CesA), qui forment des multi-mères ancrés à la membrane plasmique. L'analyse du génome de différentes plantes a suggéré que plusieurs gènes CesA y sont présents, et les études fonctionnelles montrent qu'il existe deux groupes de CesA : un groupe associé à la biosynthèse de la paroi primaire, et un autre associé à la biosynthèse de la paroi secondaire ((Neil G Taylor *et al.*, 2003; Juraniec and Gajda, 2008).

Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses et les pectines sont synthétisées dans l'appareil de Golgi, transportées jusqu'à la surface de la cellule via des vésicules sécrétoires, puis libérées dans le compartiment pariétal. L'assemblage de ces polysaccharides se poursuit dans l'apoplaste lors de leur incorporation à la paroi (Rennie and Scheller, 2014). Dans le cas du bois, les hémicelluloses sont composées principalement de xylanes, sous forme de longs polymères de 4-O-méthyl-glucuronoxylane. De nombreuses classes d'enzymes sont impliquées dans la synthèse de la chaîne principale de xyloses, dans la décoration par des résidus d'acide glucuronique, ainsi que dans l'acétylation et la méthylation du polymère. Certaines enzymes sécrétées dans l'apoplaste sont également impliquées dans le remodelage des molécules de xyloglucanes après leur libération dans la paroi.

La lignine est un polymère de molécules phénoliques, dont la structure est complexe du fait de la grande variété de métabolites pouvant être incorporés et des différentes liaisons chimiques possibles entre ces sous-unités (Boerjan, Ralph and Baucher, 2003; Boudet *et al.*, 2003). Ce polymère a un rôle fondamental dans la paroi secondaire et lui confère une résistance mécanique et des propriétés hydrophobes. La biosynthèse de la lignine débute dans la voie du shikimate, à partir du chorismate, qui sert de précurseur, notamment pour la production des acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Knaggs, 2003). La biosynthèse des trois principaux alcools qui rentrent dans la composition finale du polymère de lignine, p-coumarylique (unité H), coniferylique (unité G) et sinapylique (unité S), se produit grâce à l'action de 11 étapes enzymatiques de la voie des phénylpropanoïdes.

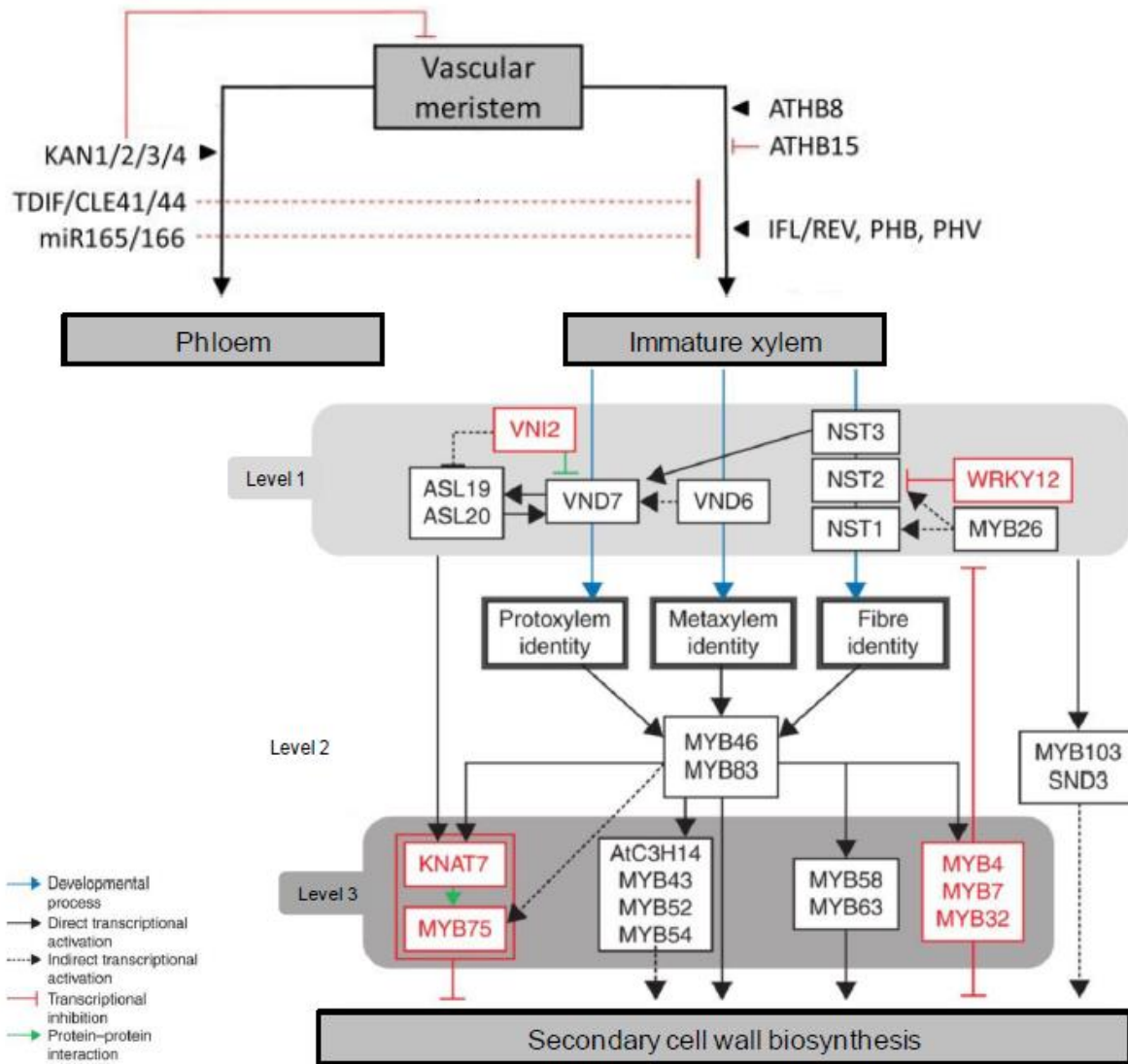


Figure 32: Représentation schématique du réseau de régulation contrôlant le dépôt de paroi secondaire dans les cellules du xylème en différenciation (adapté de Hussey *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2014). Sous l'influence de signaux internes (facteurs de transcription, hormones, peptides et miRNA), le cambium produit des cellules qui se différencient en cellules de phloème ou de xylème. La différenciation terminale des cellules du xylème en fibres ou en vaisseaux est régulée par un réseau de facteurs de transcription (FT) appartenant principalement aux familles NAC et MYB. Parmi ces FT, certains sont des régulateurs positifs (flèches noires) et d'autres des régulateurs négatifs (flèches rouges). Ils sont organisés de façon hiérarchisée selon plusieurs niveaux : les régulateurs les moins spécialisés en premier (master regulators), un niveau intermédiaire, puis les facteurs de transcription régulant les gènes associés au dépôt de la paroi secondaire et à la mort cellulaire programmée (PCD).

Si la majorité des acteurs de la biosynthèse des précurseurs de la lignine sont relativement bien connus, les mécanismes impliqués dans leur transport et leur polymérisation dans la paroi restent encore mal compris. Chez les dicotylédones, la lignine est principalement composée des sous-unités G et S, tandis que les H sont minoritaires (Vanholme *et al.*, 2019). La structure finale du polymère de lignine, qui détermine ses propriétés physico-chimiques, va dépendre de la proportion des sous-unités S/G/H et des liaisons qui les assemblent.

Lorsque le dépôt de la paroi secondaire est terminé, les vaisseaux et les fibres vont entamer un processus de mort programmée. La mort cellulaire des vaisseaux survient dans les jours qui suivent leur différenciation à partir de la zone cambiale, tandis que les fibres peuvent rester en vie pendant environ 1 mois (Bollhöner, Prestele and Tuominen, 2012). La xylogénèse, est un processus complexe et dynamique influencé par de nombreux signaux endogènes et exogènes qui interviennent à plusieurs échelles. Malgré les progrès réalisés au cours de ces dernières années dans l'étude de la formation de la paroi secondaire, les processus impliqués dans le contrôle de l'activité cambiale et la différenciation des cellules du xylème restent encore mal connus.

La formation du xylème nécessite la coordination transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes structuraux. Cette dernière est assurée, à plusieurs niveaux, par un jeu d'hormones et autres molécules signal, ainsi qu'un réseau de gènes régulateurs (**Figure 32**). Le maintien du caractère pluripotent des cellules cambiales, indispensable pour une activité méristématique continue, est contrôlé en amont par une voie de signalisation qui fait intervenir des couples « peptides / récepteurs », des facteurs de transcription, ainsi que certaines hormones telles que les cytokinines, l'auxine, les gibbérellines et l'éthylène. En aval de cette voie, un grand nombre de gènes codant pour des facteurs de transcription (FT) interagissent en un réseau hiérarchisé, impliquant des boucles de rétrocontrôle positives et négatives, afin de réguler le dépôt de la paroi secondaire dans les futures cellules du xylème (**Figure 32**). Dans ce réseau, les FT NAC les plus en amont sont nécessaires et suffisants pour activer le programme de dépôt de paroi, et sont, par conséquent, considérés comme des "masters régulateurs" de la formation de la paroi secondaire. Ces masters régulateurs du niveau 1 interviennent très en amont et régulent un ensemble de FT de niveau 2, qui appartiennent majoritairement à la famille des MYB. Ils sont exprimés dans les fibres et vaisseaux, et sont capables d'induire la formation d'une paroi secondaire. Des études fonctionnelles (Hussey *et al.*, 2013), ont pu montrer que parmi les régulateurs les plus en aval du réseau (niveau 3), on peut trouver deux groupes de FT : des régulateurs positifs et des régulateurs négatifs du dépôt de la paroi secondaire. Plusieurs études conduites chez des espèces pérennes suggèrent que ces voies de régulation décryptées chez la plante herbacée *Arabidopsis*, sont conservées chez les arbres (Zhang *et al.*, 2014). Les principaux

acteurs impliqués dans la régulation de la formation de la paroi secondaire dans le xylème, caractérisés chez *Arabidopsis*, semblent conservés chez les arbres. Cependant, certains exemples laissent penser qu'il pourrait exister des divergences entre les arbres et les plantes herbacées dans les voies de régulation de la formation de la paroi secondaire (Jin *et al.*, 2000; Legay *et al.*, 2010). Plusieurs sous-groupes de FT de type MYB, détectés dans le génome d'espèces pérennes, ne semblent pas avoir d'orthologue proche chez les herbacées (Soler *et al.*, 2015). De plus, la fonction de nombreux FT, identifiés par des analyses globales de transcriptomique et d'interaction ADN-protéines, suggèrent que les réseaux de régulation contrôlant le dépôt de paroi sont bien plus complexes que la vision simplifiée décrite dans la littérature (Shi *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Ces données laissent également supposer qu'il pourrait exister des mécanismes de régulation propres aux espèces ligneuses, qui interviendraient dans la formation de la paroi dans des tissus ou des conditions spécifiques, en particulier en réponse à des contraintes abiotiques.

Dans les nombreuses études menées sur la réponse des plantes aux stress abiotiques, les tissus vasculaires et la paroi secondaire, en particulier chez les arbres, ont fait l'objet de moins d'attention que les réponses moléculaires impliquées dans la préservation des processus biologiques cellulaires. Les études sur ce sujet s'accordent à dire que la paroi joue un rôle dans la mise en place de la résistance à des stress tels que la sécheresse ou le froid mais les mécanismes mis en jeu restent mal compris. De façon générale, les stress abiotiques semblent engendrer un épaississement de la paroi dans des organes tels que les feuilles et les racines, ainsi qu'une augmentation de la biosynthèse de lignine (Moura *et al.*, 2010; Cabane, Afif and Hawkins, 2012). Ceci est généralement interprété comme une stratégie consistant à rigidifier et imperméabiliser la paroi des cellules du système vasculaire pour résister au manque d'eau et au gel. Cependant, il y a 10 ans, la majorité de ces observations étaient parcellaires, parfois contradictoires, et reposaient sur l'analyse de quelques paramètres isolés comme l'expression de quelques gènes potentiellement reliés à la biosynthèse de la lignine, la quantification de l'activité de certaines enzymes de la voie des phénylpropanoïdes ou la mesure de paramètres histologiques au niveau des tissus vasculaires (Hausman *et al.*, 2000; Moura *et al.*, 2010; Cabane, Afif and Hawkins, 2012; Domon *et al.*, 2013; LeGall *et al.*, 2015). A part certains mécanismes remarquables de par leur intensité, comme par exemple la formation du bois de réaction en réponse à un stress mécanique ou gravitropique intense, l'ajustement plus subtil de la structure et de la composition des tissus du bois en réponse à des contraintes climatiques épisodiques n'avaient pas fait l'objet d'investigations approfondies. Cette interaction entre la formation des tissus du bois et la réponse aux contraintes climatiques a représenté le cœur de ma thématique de recherche depuis mon recrutement.

3.1.2 Thématiques de recherche de l'équipe d'accueil

J'ai été recruté en septembre 2011 dans l'équipe de recherche de "Génomique fonctionnelle de l'Eucalyptus", créée suite à la fusion de deux équipes : "Régulation transcriptionnelle de la formation du bois (dirigée par J. Grima-Pettenati) et "Réponse au stress froid chez l'Eucalyptus" (dirigée par Chantal Teulières). A l'issue de mes travaux de doctorat et de postdoctorat, réalisés sur des plantes modèles et des plantes annuelles d'intérêt agronomique, la découverte des approches de génomique sur les espèces forestières a constitué pour moi un défi. D'autant plus que mon recrutement devait cristalliser une nouvelle thématique: "La régulation de la formation du bois en condition de stress abiotiques chez l'Eucalyptus".

L'Eucalyptus est l'arbre feuillu le plus planté au monde dont le bois est utilisé principalement pour la pâte à papier et la construction. Sa croissance rapide et la qualité de son bois font de l'Eucalyptus une importante source de biomasse ligno-cellulosique susceptible d'alimenter également les filières de production d'énergie renouvelable. Les Eucalyptus sont natifs d'Australie et Nouvelle Guinée où la plupart des climats sont représentés. Avec environ 700 espèces, ce genre présente une adaptabilité remarquable à une variété de conditions. Hormis quelques espèces d'altitude, les Eucalyptus présentent cependant une plus forte tolérance à la sécheresse et à la chaleur qu'au froid intense. Leur croissance continue, du fait de l'absence d'endormance, et la persistance de leurs feuilles en hiver, les rendent très vulnérables aux gelées hivernales mais laissent supposer des mécanismes d'acclimatation aux contraintes abiotiques différents des espèces endémiques de l'hémisphère Nord. De par son importance agronomique, les filières de sélection en Europe et en Amérique du Nord tentent d'implanter ce modèle dans le paysage forestier (Sederoff, Myburg and Kirst, 2010). En France, les sélectionneurs du FCBA ont généré des génotypes d'Eucalyptus hybrides résistants au gel, homologués pour les plantations et la production de bois. Dans le sud de la France, en Espagne et au Portugal, différents génotypes d'Eucalyptus issus des programmes de sélection sont plantés sur des parcelles expérimentales. Ces parcelles représentent autant de ressources biologiques inestimables qui nous ont permis, au cours de ces dernières années, d'étudier la formation des tissus du bois en réponse aux contraintes de l'environnement. Le séquençage du génome d'*E. grandis*, réalisé par un consortium au sein duquel mon équipe d'accueil a joué un rôle significatif (Myburg *et al.*, 2014), a agi comme un catalyseur considérable sur les techniques de génomique et de biotechnologies, employées notamment dans l'équipe pour la caractérisation de gènes candidats impliqués dans la formation du bois et la réponse aux stress abiotiques.

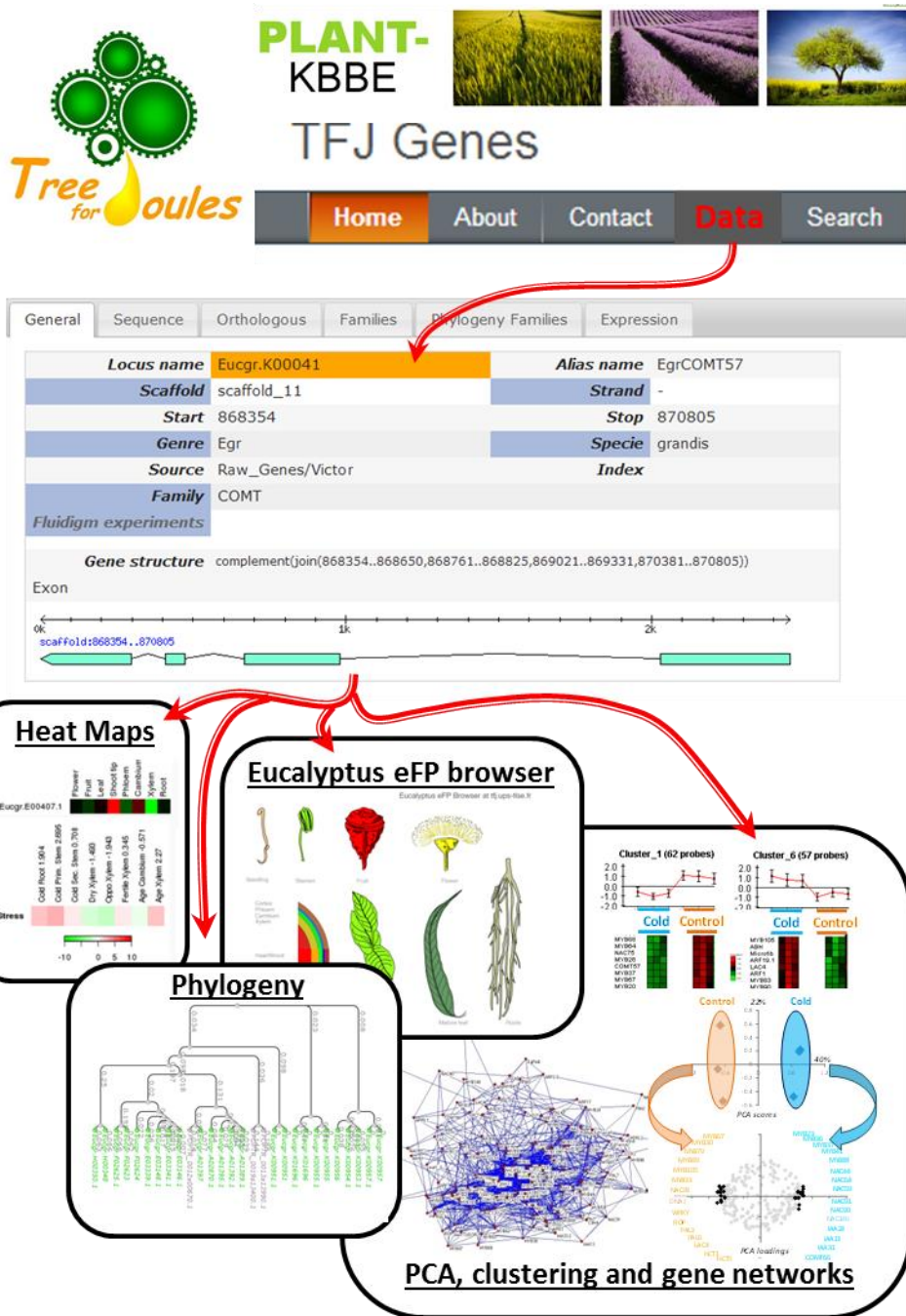


Figure 33: Mise en place d'une base de données et d'outils d'analyses statistiques multivariées à partir des résultats du projet Tree For Joules (T4J, Plant KBBE). (collaboration avec B. Savelli, service de bioinformatique du LRSV). Cette base de données renferme des informations sur plus de 210 gènes dans plus de 30 conditions et/ou fonds génétiques d'Eucalyptus différents.

Les thématiques de recherche menées au sein de l'équipe « Génomique Fonctionnelle de l'Eucalyptus » en 2011 étaient centrées sur 2 axes. Le premier, qui impliquait Jacqueline Grima-Pettenati (DR CNRS) et Hua Wang (MCF UPS), concernait l'identification et la caractérisation de nouveaux gènes régulateurs de la formation du bois ainsi que le rôle des régulations hormonales dans le développement de ce tissu. Les méthodologies mises en œuvre couvraient des champs disciplinaires variés : biologie moléculaire, imagerie cellulaire, biotechnologie et génomique, et utilisaient le modèle Eucalyptus mais aussi le Peuplier et Arabidopsis pour assurer la caractérisation fonctionnelle de gènes. Le second axe, mené par Chantal Teulières (Pr UPS) et Christiane Marque (MCF UPS), s'intéressait au rôle de facteurs de transcription DREB dans la réponse aux stress abiotiques, en particulier grâce à des approches de transgénèse, d'analyse d'expression de gènes et de phénotypage de la réponse aux stress. En me basant sur les compétences de l'équipe, ainsi que sur mon savoir-faire, j'ai proposé une thématique complémentaire basée sur une approche de biologie des systèmes pour identifier les régulateurs impliqués dans le remodelage des tissus du bois en réponse aux stress et comprendre le rôle de ces modifications dans le développement et la survie de la plante.

3.1.3 Mes premiers pas dans le « bois »

Mon arrivée dans l'équipe GFE a été marquée par une prompte intégration dans les projets en cours et facilitée par le type d'approches expérimentales qui y étaient développées car elles étaient proches des compétences que j'avais pu acquérir précédemment. Le dynamisme et la gentillesse de mes collègues ont également été déterminants pour m'impliquer efficacement dans les travaux de l'équipe.

Bien que le projet européen *Tree 4 Joules* (T4J, Plant KBBE, 2011-2015) ait été initié avant mon arrivée, j'ai été associé aux groupes de travail coordonnés par J. Grima-Pettenati, impliquant 13 équipes de recherche françaises, portugaises, espagnoles et allemandes, pour mener à bien les objectifs scientifiques qui visaient à identifier des facteurs régulant les propriétés physico-chimiques des parois secondaires des cellules du bois, chez l'Eucalyptus et le Peuplier. Ces approches ont été grandement facilitées par le séquençage du génome d'*Eucalyptus grandis* par un consortium au sein duquel notre équipe a contribué activement à l'annotation experte de familles de gènes reliés à la formation du bois. Dans le cadre de T4J, j'ai participé à la construction d'une base de données à partir des ressources génomiques générées par les partenaires de T4J (**Figure 33**). J'ai testé et implémenté des outils d'analyses statistiques multivariées visant à identifier des groupes de gènes d'intérêt et à visualiser les informations disponibles pour chacun de ces gènes. L'utilisation de ces

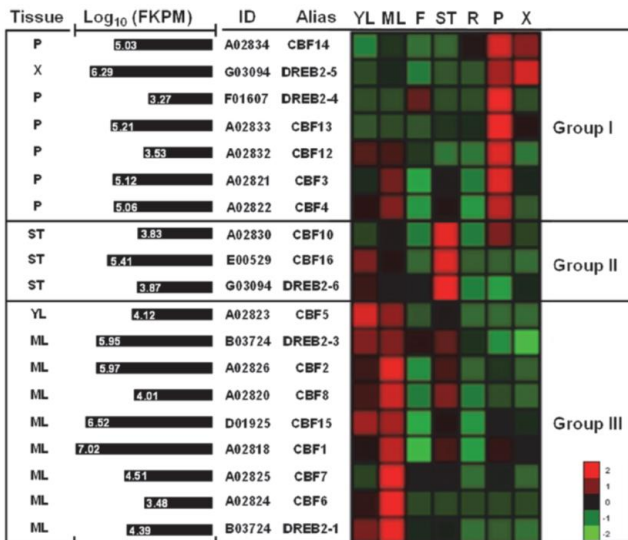


Figure 34: Expression basale des gènes *DREB* dans différents tissus chez *E. grandis*. (Cao et al., 2015) Représentation sous forme de « heat maps » des données de RNAseq obtenues sur les gènes des familles *DREB1/CBF* et *DREB2* dans différents organes : YF, jeunes feuilles ; ML, feuille mature ; F, fleur ; ST, apex ; R, racine ; P, phloème et X, xylème. La première colonne représente le tissu dans lequel les gènes présentent l'expression absolue la plus forte (FKPM). Les groupes I, II et III concernent les gènes préférentiellement exprimés dans les tissus du bois, dans les apex et dans les feuilles, respectivement. *CBF14* et *DREB2-5* sont les deux gènes les plus exprimés dans le xylème.

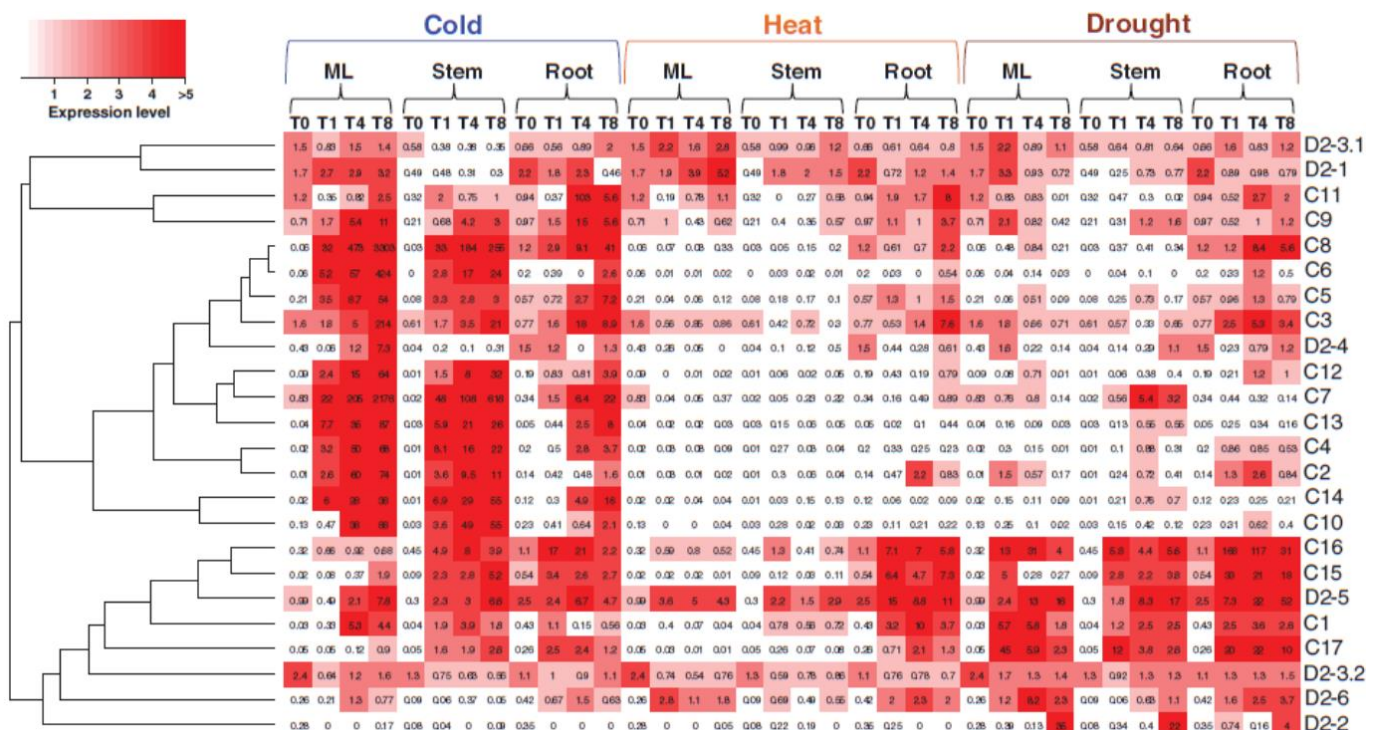


Figure 35: Expression des gènes *DREB* dans les feuilles, les tiges et les racines en réponse au froid, à la sécheresse et à la chaleur chez *E. grandis*. (N'Guyen et al., 2017). Représentation sous forme de « heat maps » des données de pPCR obtenues sur les gènes des familles *DREB1* et *DREB2/CBF* dans différents organes en réponse à différents stress : ML, feuilles ; Stem, tige ; Root, racines. Le calcul des distances (clustering) est basé sur les profils d'expression des gènes. Bien que certains soient induits par la chaleur et/ou la sécheresse, les gènes *CBF* sont préférentiellement induits par le froid. Les gènes *CBF14* et *DREB2-5* présentent la plus forte induction dans la tige en réponse au froid.

techniques a contribué à sélectionner des gènes candidats sur la base de 4 critères : (1) leur fonction régulatrice (facteurs de transcription), (2) leur expression dans les tissus du bois (cambium / xylème), (3) l'absence d'orthologues proches déjà caractérisés au sein d'espèces modèles et (4) une régulation de l'expression de ces gènes en réponse à des stress abiotiques. Ces gènes candidats, potentiellement impliqués dans la régulation de la formation du bois, appartiennent à différentes familles de facteurs de transcription, principalement MYB et NAC. J'ai contribué par la suite à la caractérisation fonctionnelle de certains d'entre eux, comme *EgMYB88* et *EgMYB137* (Soler *et al.*, 2016; Ployet *et al.*, 2019), ou encore *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64*, *EgMYB68* et *EgNAC64* (non publié, voir chapitre « Projet de Recherche »). Il ressort de l'ensemble de ces travaux préliminaires que de nombreux gènes impliqués dans la formation du bois, ainsi que des facteurs de transcription à la fonction encore inconnue, sont régulés en réponse à des stress abiotiques comme le froid ou la sécheresse mais leur rôle reste à déterminer.

En parallèle, j'ai contribué à la caractérisation des voies de signalisation intervenant dans la réponse aux stress chez l'Eucalyptus, en particulier celles qui impliquent les facteurs de transcription DREB (Cao *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017). Ces gènes appartiennent à la grande famille des *AP2/ERF* (APETALA2/Ethylene-Responsive element binding Factor). Ils codent pour des protéines qui peuvent se fixer sur la séquence A/GCCGAC, appelée CRT (C-Repeat) ou Dehydration Responsive Element (DRE). Cette séquence est située dans les promoteurs des gènes de réponse aux stress abiotiques afin d'induire leur expression et de mettre en place les mécanismes de protection des cellules végétales (Sakuma *et al.*, 2002). Les DREB sont divisés en deux groupes : les gènes *DREB1/CBF* sont principalement impliqués dans l'acquisition de la tolérance au froid alors que les gènes *DREB2* jouent un rôle dans la résistance de la plante à la chaleur, à la sécheresse ou au stress osmotique. L'étude du génome d'*E. grandis* a mis en évidence 17 gènes *DREB1/CBF* et 6 gènes *DREB2*. Les analyses dans lesquelles je suis intervenu montrent que ces gènes présentent des profils d'expression spécifiques dans les différents tissus et en réponse à différents stress (**Figure 34 et 35**). Dans les tiges, les feuilles ou les racines d'Eucalyptus, les *DREB1/CBF* sont rapidement et fortement induits en réponse au stress froid. De même, les *DREB2* présentent une expression plus importante en réponse à la sécheresse ou au stress osmotique (**Figure 35**). Néanmoins, certains *CBF* sont aussi induits en réponse à la sécheresse ou au stress osmotique, et certains *DREB2* en réponse au stress froid. L'analyse fine de leur profil d'expression, en absence ou en présence de stress, souligne également une spécificité tissulaire. Si cette spécificité a tendance à s'atténuer après l'exposition à un stress car cela multiplie considérablement leur expression, en absence de stress, en revanche, plusieurs *CBF* s'expriment préférentiellement dans les tissus vasculaires de la tige.

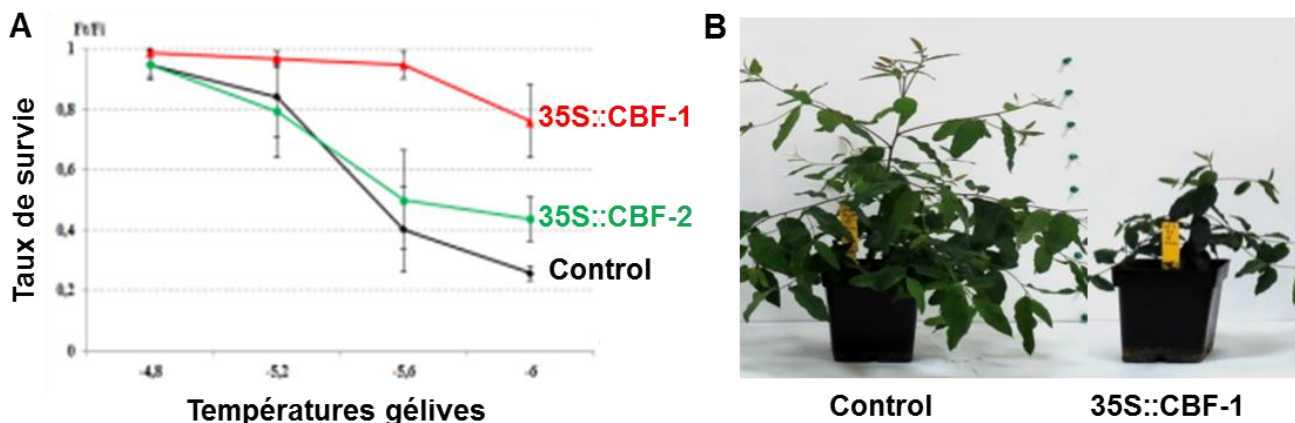


Figure 36: Phénotypage de plantes transgéniques 35S::CBF. A, En condition de température gélive, les plantes 35S::CBF présentent un meilleur taux de survie que les contrôles. B, La surexpression des gènes *CBF* entraîne une diminution de la croissance des plantes.

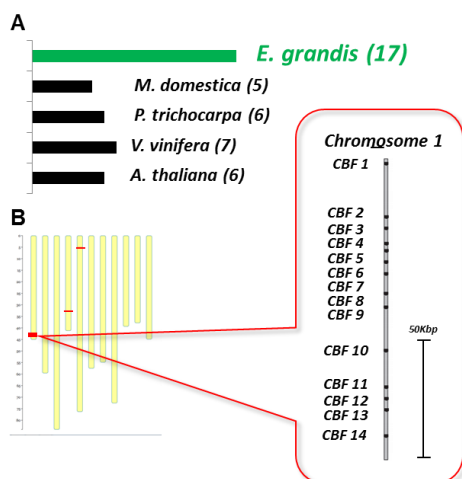


Figure 37: Duplication en tandem de la famille *CBF* dans le génome d'*E. grandis*. Le séquençage d'*E. grandis* (Myburg *et al.*, 2014) a révélé une très forte duplication des *CBF* par comparaison avec les génomes d'autres plantes ligneuses (Peuplier, Vigne, Pommier) ou herbacées (Arabette). Quatorze des dix-sept gènes *CBF* sont regroupés sur le chromosome 1

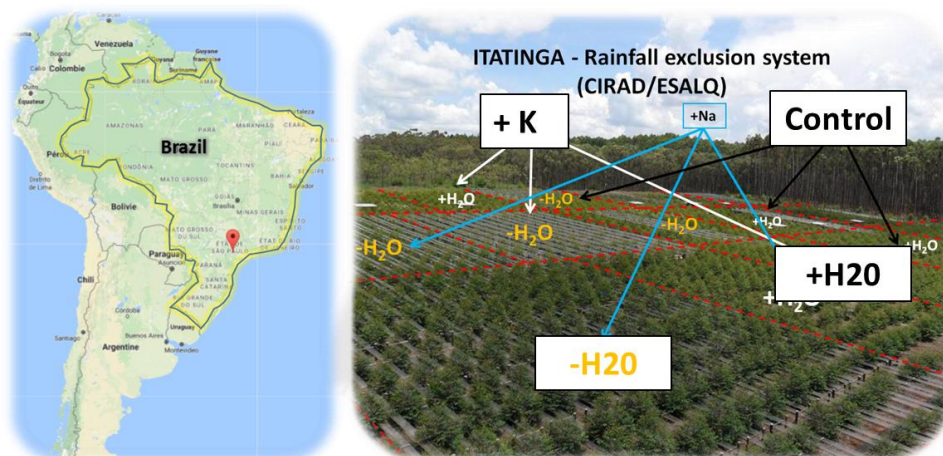


Figure 38: Description de la parcelle expérimentale située à Itatinga (San Paulo, Brésil) mise en place par le CIRAD et l'ESALQ. Sur cette parcelle étaient cultivées plus de 2500 copies clonales d'un génotype commercial d'*E. grandis*, réparties en blocs (rectangles rouges), soumises à différentes conditions : avec ou sans amendement en potassium, avec ou sans ajout de sodium, avec ou sans restriction d'eau. La restriction d'eau, obtenue par l'ajout de bâches en plastique au niveau du sol, permettait de diminuer de 66% l'apport en eau de pluie.

Les CBF présentent des séquences génomiques très conservées, dépourvues d'intron. La surexpression d'une séquence CBF chez l'Eucalyptus, comme pour la plupart des plantes, augmente la tolérance vis-à-vis du gel, au détriment de la croissance (**Figure 36**). Mais au-delà de la confirmation que leur séquence, de même que leur fonction, sont conservées chez l'Eucalyptus, nous avons pu constater que l'*E. grandis*, qui n'est pourtant pas très tolérant au froid, présente beaucoup plus d'isoformes de CBF que d'autres plantes pérennes ou herbacées. Ceci semble résulter d'une duplication récente de certaines familles de gènes au sein du génome d'*E. grandis* (**Figure 37** ; Cao *et al.*, 2015 ; Myburg *et al.*, 2014). L'ensemble de ces observations suggèrent une sub-fonctionnalisation au sein de cette famille de gènes, dont la fonction pourrait aller au-delà de la simple protection des cellules contre le gel. Nous avons émis l'hypothèse que les CBF pourraient jouer un rôle central dans le remodelage de la structure et de la composition des tissus du bois, et ainsi contribuer à une meilleure tolérance de l'arbre aux conditions de stress froid. Cet axe a représenté une part importante de mes recherches, décrites dans le **Paragraphe 2** du chapitre « Travaux de recherche en tant que Maître de Conférences » de ce manuscrit.

En parallèle, je me suis intéressé à la même problématique concernant l'influence de la sécheresse sur la formation du bois. Le manque d'eau est un autre stress abiotique majeur qui menace la survie des espèces pérennes, dont la fréquence risque d'être augmentée par l'évolution du climat à l'échelle de la planète. Des exemples d'adaptations fonctionnelles au niveau des tissus vasculaires sont bien décrites dans la littérature mais les voies de régulations mises en jeu sont très mal connues. Les travaux que j'ai menés pour étudier cette réponse physiologique, décrits dans le **Paragraphe 3**, ont débuté par dans le cadre d'une collaboration internationale impliquant le CIRAD et l'université de San Paulo (ESALQ). L'accès à un système expérimental hors du commun (**Figure 38**), mis en place en condition forestière et impliquant des chercheurs de multiples disciplines, a représenté une opportunité inestimable d'étudier l'effet d'une restriction hydrique, couplée à différents régimes nutritionnels, sur la formation du bois.

Dans les paragraphes suivants de ce chapitre, je développerai les travaux que j'ai menés pour comprendre les modifications qui surviennent dans le bois en réponse aux stress abiotiques. Mes objectifs étaient les suivants :

- (1) Analyser et comprendre les régulations qui sont impliquées dans le remodelage des tissus du bois en réponse à des stress abiotiques
- (2) Identifier les régulateurs clés impliqués dans cette réponse
- (3) Caractériser la fonction de ces régulateurs au niveau de la formation du bois.

Pour répondre à ces questions biologiques, j'ai également dû mettre en place des méthodes d'analyse qui n'étaient pas ou plus disponibles au sein de l'équipe ReDyWood (ex GFE) :

- L'analyse de composés pariétaux : dosages des lignines, saccharification, FT-IR
- Le phénotypage des tissus vasculaires en condition de stress: prélèvements en conditions contrôlées / forestières, mesures automatisées de paramètres cellulaires à partir de coupes histologiques
- La détection de marques de remodelage de la chromatine (MeDIP et bisulfite sequencing)
- L'identification des éléments *cis* reconnus par un facteur de transcription (DAPseq)
- La mise en application d'approches statistiques multivariées (PCA / PLS-DA / sparse PLS-DA) Le développement d'approches d'intégration de données issues de différents niveaux d'analyse. Cette approche dite de « biologie des systèmes », vise à comprendre un mécanisme biologique dans sa globalité en appliquant des outils statistiques pour regrouper et analyser des variables agissant de façon coordonnée (WGCNA / MixOmics).

3.2 Régulation de la formation du bois en réponse au stress froid

3.2.1 Remodelage des tissus du bois en réponse au froid chez l'Eucalyptus

Dans les pays tempérés de l'hémisphère Nord, la plupart des plantes pérennes ont développé des stratégies pour éviter l'exposition au froid en arrêtant leur développement lorsque la photopériode diminue (endodormance), en perdant leurs feuilles et en isolant les bourgeons. Ce n'est pas le cas des Eucalyptus, dont la croissance, bien que modulée par les contraintes de l'environnement, se poursuit malgré la diminution de la durée du jour. L'absence de ces mécanismes d'évitement engendre, chez les espèces les plus productives d'Eucalyptus, une sensibilité importante aux gelées hivernales. La création récente d'hybrides tolérants le froid tels que les hybrides *E gunnii* x *E. dalrympleana*, permet dorénavant le développement de plantations industrielles dans les pays du nord.

Notre objectif était d'utiliser ces ressources biologiques afin d'évaluer l'impact du froid sur la structure et la composition du bois de ces hybrides, ainsi que sur les processus de biosynthèse et de régulation contrôlant la formation de leur paroi secondaire. De nombreuses études s'accordent à dire que l'exposition des plantes au froid entraîne une modification de la composition des tissus, en particulier au niveau de la paroi des cellules. Les études de l'adaptation de la paroi secondaire des cellules du bois sont parcellaires, et suggèrent, en plus de la modification du dépôt de certains polysaccharides, une augmentation de la biosynthèse de lignine en réponse au stress froid. Le rôle précis de ces modifications pour la protection de la plante reste encore mal compris. Nous avons émis l'hypothèse que chez l'Eucalyptus, la modification des tissus du bois s'intègre dans une grande diversité de mécanismes régulés par la voie des CBF et pourrait contribuer à la tolérance de la plante. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une approche intégrative combinant de l'histologie, de la caractérisation biochimique et des analyses transcriptomiques, ainsi que des analyses de co-expression, pour étudier les tissus du xylème d'Eucalyptus hybrides exposés à des températures basses.

Les principaux résultats de ce travail montrent que l'exposition au froid provoque le dépôt de parois plus épaisses et plus lignifiées dans les cellules du xylème, ainsi qu'une régulation transcriptionnelle des gènes de biosynthèse de la paroi secondaire. La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine, à l'exception de ceux spécifiquement dédiés à la biosynthèse des sous-unités Syringyl, sont induits. La création d'un réseau de co-expression, a permis l'identification des facteurs de transcription connus, et de nouveaux régulateurs potentiels, de la formation de la paroi secondaire, induits par le stress froid. Ces

régulateurs, à l'intersection entre signalisation en réponse au froid et formation de la paroi secondaire, sont des candidats prometteurs pour des études fonctionnelles puisqu'ils pourraient contribuer à la tolérance au froid des hybrides *E. gunnii* x *E. dalrympleana*.

Ces travaux, publiés dans la revue *Tree Physiology* ont été soutenus par le financement d'appel à projet locaux (AO Université Paul Sabatier) et nationaux (IDEX Unity – projet EuCoWood). Ils ont été réalisés en collaboration avec Luc Harvengt, responsable scientifique du pôle biotechnologies au sein du FCBA (R&D Forêt, Construction, Bois et Ameublement).



Tree Physiology 38, 409–422
doi:10.1093/treephys/tpx062



Research paper

Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*

Raphael Ployet¹, Marçal Soler¹, Victor Carocha^{1,2}, Nathalie Ladouce¹, Ana Alves³, José-Carlos Rodrigues³, Luc Harvençt⁴, Christiane Marque¹, Chantal Teulières¹, Jacqueline Grima-Pettenati¹ and Fabien Mounet^{1,5}

¹Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31326 Castanet-Tolosan, France; ²Instituto de Tecnologia de Química Biológica (ITQB), Biotecnologia de Células Vegetais, Av. da Republica, 2781-157 Oeiras, Portugal; ³Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal; ⁴FCBA, Biotechnology and Advanced Silviculture Department, Genetics and Biotechnology Team, F-33610 Cestas, France; ⁵Corresponding author (mounet@lrsv.ups-tlse.fr)

Received December 30, 2016; accepted May 28, 2017; published online June 13, 2017; handling Editor Janice Cooke

Although eucalypts are the most planted hardwood trees worldwide, the majority of them are frost sensitive. The recent creation of frost-tolerant hybrids such as *Eucalyptus gundal* plants (*E. gunnii* × *E. dalrympleana* hybrids), now enables the development of industrial plantations in northern countries. Our objective was to evaluate the impact of cold on the wood structure and composition of these hybrids, and on the biosynthetic and regulatory processes controlling their secondary cell-wall (SCW) formation. We used an integrated approach combining histology, biochemical characterization and transcriptomic profiling as well as gene co-expression analyses to investigate xylem tissues from *Eucalyptus* hybrids exposed to cold conditions. Chilling temperatures triggered the deposition of thicker and more lignified xylem cell walls as well as regulation at the transcriptional level of SCW genes. Most genes involved in lignin biosynthesis, except those specifically dedicated to syringyl unit biosynthesis, were up-regulated. The construction of a co-expression network enabled the identification of both known and potential new SCW transcription factors, induced by cold stress. These regulators at the crossroads between cold signalling and SCW formation are promising candidates for functional studies since they may contribute to the tolerance of *E. gunnii* × *E. dalrympleana* hybrids to cold.

Keywords: abiotic stress, cold, correlation network, *Eucalyptus*, lignin, transcription factors.

Introduction

Eucalypts are the most planted hardwood trees worldwide because of their very rapid growth, exceptional wood quality and wide adaptability (Myburg et al. 2007). Two main species are used in industrial plantations: the subtropical *Eucalyptus grandis* and the temperate *Eucalyptus globulus*, which are among the leading sources of wood biomass for pulpwood and timber, and are considered promising feedstocks for the production of second-generation biofuels. Although eucalypts are planted in >100 countries over six continents, the extension of industrial plantations to Northern hemisphere countries has been hampered by the fact that most commercial species and derived

hybrids are very sensitive to frost (Booth 1990). This frost sensitivity is partially explained by the fact that eucalypts are evergreen trees that do not cope with frost by avoidance as many woody plant species from temperate countries do. The increasing demand for wood led the French 'Institut Technologique FCBA' to select fast-growing and frost-resistant hybrids between *Eucalyptus gunnii*, a species originating from the Central Plateau of Tasmania (Potts et al. 2001), and *Eucalyptus dalrympleana*, known under the generic name of *Eucalyptus gundal* (Navarro et al. 2009). The genes responsible for the high frost tolerance of *E. gunnii* have not yet been identified; however, a comparative study of the dehydration-responsive element binding (DREB)

family of transcription factors (TFs) in *E. grandis* and *E. gunnii* suggested that additional copies and/or higher basal expression of CBF/DREB1 account, at least in part, for the ability of *E. gunnii* to adapt to cold conditions (Nguyen et al. 2017).

Wood, or secondary xylem, is produced by the activity of an internal meristem, the vascular cambium, through a complex differentiation process leading to highly specialized xylem cells characterized by thick, lignified secondary cell walls (SCWs) (Plomion et al. 2001). Secondary cell walls are mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin, in proportions of ~2:1:1, crosslinked into a supramolecular network, thereby creating a highly resistant barrier. The phenolic polymer lignin is mainly responsible for the recalcitrance of SCWs to degradation, which is a major obstacle for industrial end-uses of wood such as for pulp and paper manufacture or bioethanol production (VanAcker et al. 2013). In angiosperms, lignin is a complex tridimensional polymer containing mainly guaiacyl (G) and syringyl (S) units (Vanholme et al. 2010) that are connected by an array of inter-monomeric linkages, most commonly labile β -O-4 bonds. A high S/G ratio, which is associated with a high proportion of β -O-4 bonds, is, for instance, beneficial for lignin depolymerization during the kraft pulping process (Ventorim et al. 2014). The lignin content and composition of wood varies greatly within and between species, between developmental stages, and in response to environmental cues (Plomion et al. 2001). In eucalypts, for instance, the structure and content of lignin is affected by the nitrogen status of the plant (Camargo et al. 2014).

The gene families encoding the 11 enzymes involved in biosynthesis of lignin monomeric units, or monolignols, have been studied at the genome level in *E. grandis* (Carocha et al. 2015). Lignin biosynthesis starts with the deamination of phenylalanine and leads to the production of hydroxycinnamoyl-CoA esters. This part of the pathway is called 'general phenylpropanoid metabolism' since hydroxycinnamoyl-CoA esters are also precursors of a wide range of end products including flavonoids, anthocyanins and condensed tannins, which vary according to species, cell types and in response to environmental signals (Dixon and Paiva 1995). Based on comparative phylogeny and patterns of expression, a total of 38 genes were identified as bona fide members of the 11 gene families, of which 25 are likely involved in developmental lignification belonging to the so-called 'core vascular lignification toolbox' (Carocha et al. 2015). In addition, Carocha et al. (2015) pointed out several members of the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) superfamilies called 'CAD-like', 'CCoAOMT-like' and 'COMT-like' as strongly expressed in xylem, suggesting possible roles in xylogenesis, although their functions are still unknown.

Our knowledge of how SCW biosynthesis is regulated at the transcriptional level comes mainly from studies of the herbaceous plant *Arabidopsis*. In this model plant, a complex hierarchical network of TFs of the NAC and R2R3-MYB families act

as first- and second-level master switches, respectively, to regulate a battery of downstream TFs (most of them also belonging to the MYB family) and SCW biosynthesis genes (Grima-Pettenati et al. 2012, Hussey et al. 2013, Nakano et al. 2015, Zhong and Ye 2015). Remarkably, a recent study demonstrated that abiotic stresses such as high salinity or iron deprivation can co-opt the xylem regulatory network in *Arabidopsis*, i.e., distinct stresses are able to modulate the expression of regulators of SCW biosynthesis to potentially promote functional adaptation of the plant to the stress conditions (Taylor-Teeple et al. 2015).

In eucalypts, two master regulators of SCW deposition, *EgMYB2* (Goicoechea et al. 2005) and *EgMYB1* (Legay et al. 2007, 2010), have been characterized functionally. Potential orthologues of *Arabidopsis* SCW regulators in the *E. grandis* genome (Myburg et al. 2014) have also been identified by comprehensive genome-wide surveys of the R2R3-MYB and NAC TF families (Hussey et al. 2015, Soler et al. 2015). Importantly, members of subgroups present neither in *Arabidopsis* nor in rice were also identified, some of which are preferentially expressed in vascular cambium suggesting that they may be novel genes that regulate xylem differentiation (Soler et al. 2015).

Exposure to chilling is known to increase plants' ability to later withstand freezing temperatures. This process of cold acclimatization induces complex physiological and biochemical changes. Among them, increased cell-wall rigidity might lead to higher cell resistance to dehydration due to freezing (reviewed in LeGall et al. 2015). In some cases, lignin synthesis is enhanced during cold acclimatization and this may contribute to cell strengthening, thereby preventing cell damage and collapse (Domon et al. 2013). Most of these studies were performed on crop plants. By contrast, very few studies have investigated the effect of cold acclimatization on the SCWs of forest trees, despite the fact that cold is one of the major abiotic constraints affecting perennial plant development in many countries (Teulières et al. 2007). To the best of our knowledge, there is only one study of trees (Hausman et al. 2000), which reported an increase in the lignin content of shoots of young poplar trees exposed to 10 °C for 2 weeks.

To evaluate the effects of low temperature on the SCW properties of *Eucalyptus* wood and to identify the metabolic and regulatory genes involved in SCW biosynthesis under cold stress, our study combined morphological analyses of xylem with biochemical characterization and transcriptomic profiling in young *E. gundal* hybrids submitted to chilling temperatures for up to 7 weeks and in adult trees grown in field conditions over three seasons in the southwest of France. Moreover, we performed gene co-expression network analyses on expression profiling data, which identified new potential regulators at the crossroad between SCW synthesis and response to cold stress. These regulators are promising candidates for future studies since they are potentially promoting functional adaptation to cold conditions.

Materials and methods

Plant material and cold treatment

Eucalyptus gundal plants (*E. gunnii* × *E. dalrympleana* hybrids) obtained by in vitro propagation of cuttings were provided to us by the Institut Technologique FCBA (Pierroton, France). Six months after rooting, 36 plants were cultivated in a growth chamber with long day photoperiod (16 h light/8 h dark) at 25 °C/22 °C (light/dark) and 80% relative humidity. They were first exposed to a short acclimatization period of 3 days at 12 °C/8 °C (light/dark) before 46 days of cold treatment at 8 °C/4 °C (light/dark). Samples were collected before the cold treatment (0 day, control). Further samples were collected at 2 and 15 days after the start of cold treatment. Final samples were collected at the end of the experiment (46 days). Each sampling was performed on 6–10 independent plants. The lower part of the main stem of each plant was collected; 1 cm was kept in ethanol 80% (v/v) for histochemical analyses, the rest was frozen in liquid nitrogen, milled using a Mixer Mill MM 400 (Retsch, Haan, Germany) and the resulting powders were kept at –80 °C for later use.

Samples from adult plants (>10 years old) were taken from the FCBA experimental plantation in southwest France (43°21'21.0' N 1°14'27.0' E). A set of 12 *E. gundal* (four independent pools of three individuals) were sampled over three seasons (see Figure S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* online): autumn 2014 (mean temperatures 17 ± 6 °C), winter 2015 (mean temperatures 5 ± 5 °C) and summer 2015 (mean temperatures 22 ± 6 °C). After removing the bark at a height of ~150 cm, samples of xylem were collected by scraping using a single-edge, sharp blade and the samples were processed as above for the young plants. For wood structure observations, micro-core samples were collected by using a 5-mm diameter punch and were immediately fixed in 80% ethanol until use.

RNA isolation

Total RNA was extracted from the milled powder samples produced from the stem fragments of young plants and scraped xylem for adult trees as described by Southerton et al. (1998). Contaminating DNA was removed by using the TURBO DNA-free Kit (Ambion, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were checked by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% agarose gels. DNA contamination was evaluated by PCR using the housekeeping gene *Tubulin* (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online).

Quantitative RT-PCR

First strand cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The primer pairs were designed by using QuantPrime online software (<http://www.quantprime.de/>, Arvidsson et al. 2008)

and are listed in Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* online. Transcript abundance was assessed by using high-throughput microfluidic qPCR (96.96 Dynamic Array Fluidigm®, BioMark, Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, USA) according to the manufacturer's protocol and by conventional RT-qPCR using 1 µl of 1/10 diluted cDNA and Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), as described previously (Cassan-Wang et al. 2012). Expression profiles were obtained by the $E^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Pfaffl 2001) using primers efficiency calculated through LinRegPCR (Ruijter et al. 2009). Expression was normalized against reference genes *PP2A1*, *PP2A3*, *IDH*, *SAND* and *EF1a* (Cassan-Wang et al. 2012).

Biochemical analyses of SCWs

Biochemical analyses of young trees were performed on bark-free stem samples, dried for 48 h at 60 °C and milled with a Mixer Mill MM 400 (Retsch). For adult trees, scraped xylem samples were ground in liquid nitrogen and freeze-dried for 48 h. Extractives content analyses and Analytical Pyrolysis (Py-GC/FID) applied to extractive-free xylem residues (EXRs) were performed as described in Lepikson-Neto et al. (2013). At least two runs were performed per sample. Pyrolysis products were identified as previously described (Alves et al. 2009). Lignin content was evaluated by the Klason method as described by Méchin et al. (2014). Lignin structure was analysed by thioacidolysis. For each sample, thioacidolysis was performed as described by Méchin et al. (2014), on 10 mg of EXR heated for 4 h and at 100 °C (oil bath) with 7 ml of a mix prepared with 10 ml of ethanethiol, 2.5 ml of BF₃ etherate (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and then adjusted the final volume of 100 ml with dioxane (Fisher Scientific). Lignin monomers were then extracted with 7 ml of dichloromethane (Fisher Scientific). Extracts were trimethylsilylated by incubating with 50 µl of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 5 µl of ACS-grade pyridine (Sigma) for 30 min at 60 °C. These samples were then analysed in a Triple Quadrupole GC-MS system (Thermo Scientific) fitted with an autosampler, a splitless injector (280 °C), and an iontrap mass spectrometer operating in the electronic impact mode with a source at 220 °C, an interface at 280 °C and a 50–650 *m/z* scanning range. The column was a ZB5-MSi column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) operated in the temperature program mode (from 45 to 180 °C at +30 °C min⁻¹, then from 180 to 260 °C at +3 °C min⁻¹), with helium carrier gas at a 1.5 ml min⁻¹ flow rate. S and G peaks were identified using *m/z* (respectively, 399 and 369) and integrated using Xcalibur® software.

Microscopy and histochemistry

Tissues fixed in 80% ethanol were cut into thin sections (20 µm) by using a Vibratome VTS1000 (Leica, Wetzlar, Germany) and a sapphire vibratome knife (Delaware Diamond Knives, Wilmington, DE, USA). Lignin and cellulose were stained, respectively, with a mix of Safranin (0.1%) and Astra Blue (1%)

according to the protocol of Vazquez-Cooz and Meyer (2009). Samples were also dehydrated in a EM CPD300 automated critical point dryer (Leica) using CO₂ as a transitional fluid. When dry, the samples were coated with nickel (5 nm) in a EM MED020 vacuum coating system (Leica) and analysed in a scanning electron microscope (ESEM Quanta 250 FEG; FEI, Merignac, France) at 5 kV. In parallel, small fragments were embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd, London, UK) by immersion in four consecutive baths (24 h) of increasing concentrations of resin (33, 50, 66 and 100%). Semi-thin sections (1 µm) were obtained by using a Histo Diamond Knife (DiATOME, Biel, Switzerland) on an ultramicrotome Reichert UltraCutE (Leica Microsystems, Rueil Malmaison, France). Sections were immediately mounted on glass slides and warmed to 60 °C for 5 min. For tissue morphology observation, sections were stained with 1% (w:v) aqueous Toluidine Blue O for 10 min at room temperature, rinsed in distilled water, dried at 60 °C and mounted under coverslips in mounting medium (Richard-Allan Scientific, San Diego, CA, USA). Semi-automatic image acquisition was performed using a Nanozoomer C9600-12 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) in bright field at ×40 magnification. Images were exported from raw data by using NDPview 2.3.1 and subsequently treated with ImageJ software (V1.5) to determine cell number, lumen and total cell-wall surface areas, thus allowing the calculation of mean cell density, average lumen diameter and average cell-wall thickness. Cells with diameters superior to 20 µm were considered as vessels. Average cell-wall thickness was determined on >15,000 cells in 7–20 stem sections for each tree.

Co-expression network analyses

Expression data from 146 genes related to the MYB family, NAC family and enzymes involved in SCW deposition were obtained from our previous studies (Carocha et al. 2015, Hussey et al. 2015, Soler et al. 2015). In these works, transcript levels were assessed for 22 parameters, including various eucalypts species, tissues, stages of development and growth conditions (see Table S2 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Pearson pairwise correlation matrix was generated using 'rcorr' function of 'Hmisc' package with R software. The *P*-values obtained were adjusted using 'p.adjust' function with Bonferroni correction method. We eliminated correlations with an adjusted *P*-value >0.05 and calculated distances = $(1 - \sqrt{(\text{correlation value})^2})$ between the remaining genes. Distances were used to graphically represent gene correlation network using Cytoscape[®] software (force-directed layout).

Results

Analyses of xylem structure in plants submitted to low temperatures

To evaluate the effects of prolonged cold treatment on xylem structure, we first compared thin sections of stems from young

Eucalyptus hybrids grown for 7 weeks (46 days) at 4 °C with similar control sections harvested before cold exposure (i.e., grown at 25 °C). In the controls, the newly formed xylem cells immediately below the cambium formed a differentiating zone characterized by a gradual increase in cell size and cell-wall thickness (Figure 1a). The same observations were done in a control experiment performed with young trees grown during 46 days at 25 °C (see Figure S2a and b available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). After 46 days of cold exposure, we observed an increase in SCW thickness in the xylem cells located within the first four to eight layers close to the cambium initials (Figure 1b). This was confirmed by using scanning electron microscopy (Figure 1c and d), which showed that in plants exposed to cold for 46 days, several layers of cells in the early differentiating xylem zone (close to the cambium) had thick SCWs comparable to those observed in the mature xylem zone. On the contrary, the early differentiating xylem cells of control plants had thin primary cell walls similar to those of cambium initials. It is worth noticing that, during cold exposure, young trees continue to undergo apical and radial growth. Therefore, the xylem cells next to cambium, which exhibit thicker and more lignified cell wall, are supposed to be newly generated (see Figure S2c–f available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Likewise, in adult *Eucalyptus* trees grown in forest plantations, the SCWs were thicker in autumn (average temperature 17 ± 6 °C) and in winter (average temperature 5 ± 5 °C) than in summer (average temperature 22 ± 6 °C) (Figure 1e–g and see Figure S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). We used ImageJ software to quantify the impact of low temperature on SCW thickness in xylem (Figure 1h and i) and found a significant increase in SCW thickness (average for fibres and vessels) in young trees exposed to cold for 46 days when compared with the controls (+0.5 µm), and between winter and summer in adult trees (+1.5 µm). We also measured fibre density (number of cells per mm²) and the diameter of the vessel lumens in the xylem tissues of young and adult trees (see Figure S3 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). For both, we observed a significant reduction of the fibre lumen diameter in cold conditions, in agreement with the increase of SCW thickness, but no significant difference in fibre cell density.

Effects of cold on lignin content in differentiating xylem

We used histochemical staining to characterize further the effects of cold on xylem cells (Figure 2). Safranin–Astra Blue stains blue those cell walls rich in cellulose, such as those of cambium initials, and stains red the lignified cell walls, such as those of mature xylem cells. In young control trees (grown at 25 °C), several layers of immature xylem cells in close proximity to cambium cells presented thin, weakly lignified SCWs stained both in red and blue (Figure 2a). After 46 days of cold exposure, xylem cells in the corresponding zone had thicker cell walls and

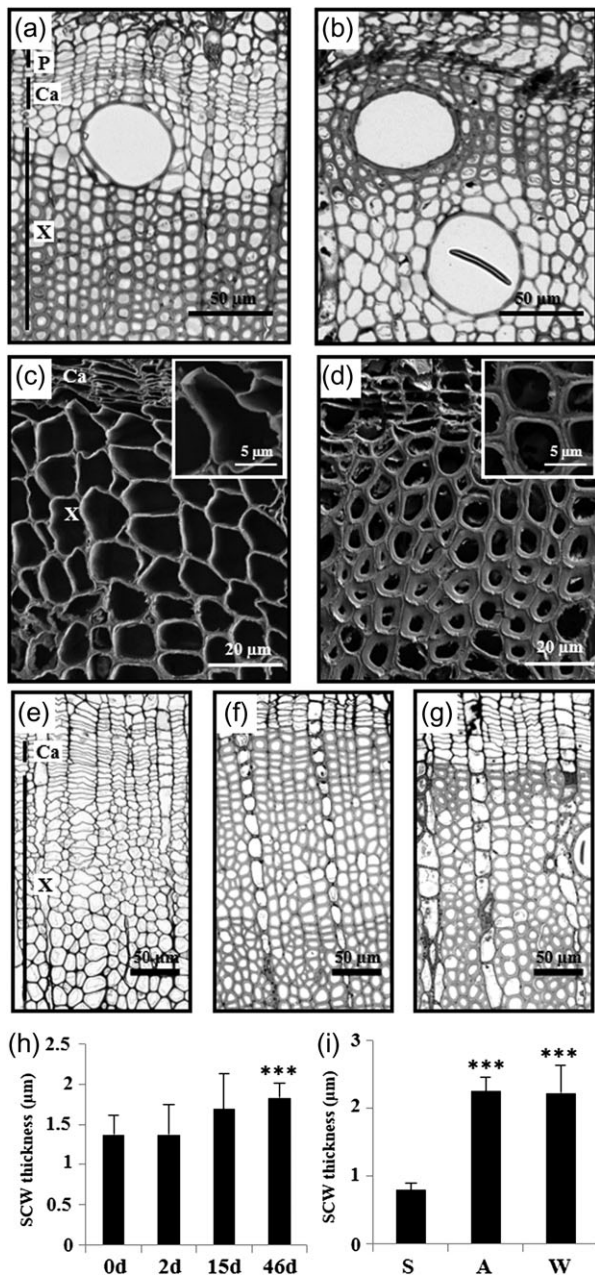


Figure 1. Cold increases the thickness of xylem SCWs. (a and b) Bright field microscopy of transverse sections of xylem from the stems of young control plants grown at 25 °C (a) and similar plants exposed to cold for 46 days (b). (c and d) Scanning electron microscopy ($\times 1000$ magnification) of sections as in (a and b). Insets show $\times 4000$ magnifications of xylem cells located immediately below the cambium. (e–g) Transverse sections of xylem from adult trees growing in field conditions. Xylem was collected from the main trunk in summer (e), autumn (f) and winter (g). (h and i) Histograms showing the SCW thickness (average of fibres and vessels) in xylem of young plants before and after 2, 15 and 46 days of cold (h) and in xylem of adult *Eucalyptus* trees in summer, autumn and winter (i). For each time point, $>15,000$ measurements were performed by using ImageJ software on 7–20 stem sections from independent trees. Significant differences compared to the control (0 day) for young trees and compared to samples collected in the summer for adult trees are indicated by asterisks, where $*P < 0.05$, $**P < 0.005$ and $***P < 0.001$ according to Student's *t*-test. X, xylem; P, phloem; Ca, cambial zone. 0 d, control; 2 d, 2 days; 15 d, 15 days; 46 d, 46 days of cold treatment. S, summer; A, autumn; W, winter.

more intense red staining, indicating higher lignin content (Figure 2b). Similar differences were observed between adult tree samples collected in summer (Figure 2c) and those collected in autumn (Figure 2d) and winter (Figure 2e), in which Safranin stained red the SCWs of xylem cells located immediately below the cambium.

An increase in the insoluble lignin (called Klason lignin) content of 1.5% (Figure 2f) and 1.9% (Figure 2g) was found by analysis of the samples from young and adult eucalypts submitted to cold. In addition to this moderate but statistically significant increase in lignin content, which we confirmed by analytical pyrolysis (Table 1), the amount of ethanol-extractable compounds increased fivefold in xylem samples from cold-treated young plants when compared with controls (Table 1).

We analysed the lignin structure by thioacidolysis, which specifically targets the G and S units involved in labile β -O-4 linkages (Méchin et al. 2014). Thioacidolysis yields expressed per gram of Klason lignin, which reflect the overall amounts of lignin monomers linked by β -O-4 bounds, were not affected by cold in both young plants and adult trees (Table 1). The S/G ratio was not significantly altered in young trees but was significantly reduced in adult trees: in autumn and winter, G units increased 46 and 37%, respectively, when compared with the summer level and S units were 27 and 19% higher, respectively, in autumn and winter than in summer.

Finally, the cP/cH ratio, which indicates the relative proportion of hemicelluloses (pentosanes) compared with cellulose (hexosanes) (Lepikson-Neto et al. 2013), significantly increased in young plants after 46 days of cold treatment (from 25.7 ± 2.7 in 0 day samples to 29.6 ± 3.6 in 46 days samples, *t*-test, $n = 10$, $P < 0.05$; see Figure S4 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online*). This suggests that the deposition of hemicelluloses could be cold-induced in *Eucalyptus* as reported in annual plants (LeGall et al. 2015).

Transcriptional regulation of genes related to SCW biosynthesis

We performed RT-qPCR analyses on young *Eucalyptus* trees sampled at 2, 15 and 46 days after exposure to cold and compared with controls (0 days) (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online* and Figure 3). A twofold change of the transcript level ratio (between cold conditions and control) was defined as a threshold above which a gene was considered differentially expressed in response to cold. We first analysed the transcript level of a member of the DREB/CBF TF gene family, *EgCBF14*, a marker of cold stress known to be highly expressed in *E. gunnii* stems (Cao et al. 2015); *EgCBF14* was induced 300-fold after 2 days of cold treatment and stayed highly expressed after 46 days when compared with controls (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online*).

We then analysed the effect of cold on the transcript levels of genes involved in the biosynthesis of SCW polymers, i.e., lignin, cellulose and hemicelluloses (see Table S1 available as Supplementary

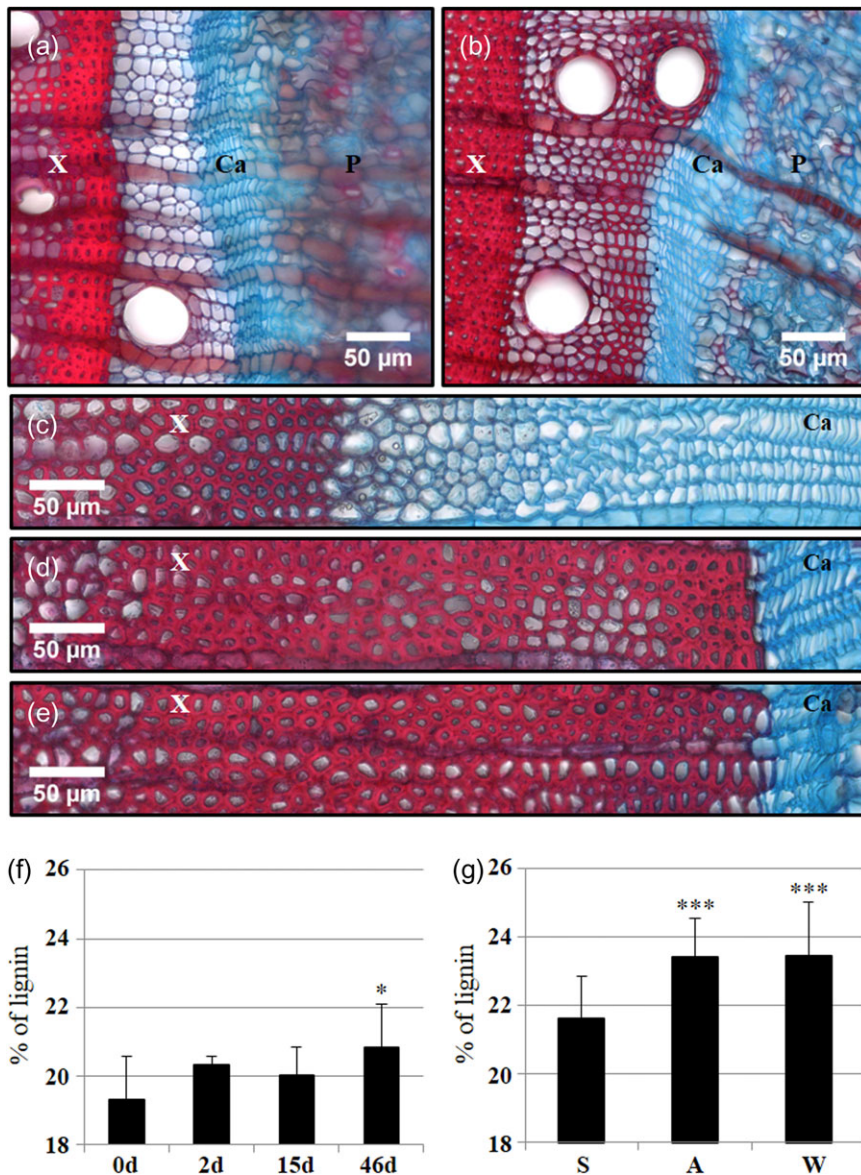


Figure 2. Cold enhances lignin deposition in xylem SCW. (a–e) Safranin–Astra Blue double staining of transverse sections from the stems of young plants (a, control; b, 46 days of cold exposure) and adult trees (c, summer; d, autumn; e, winter). Phenolic compounds are stained red and polysaccharides blue. X, xylem; Ca, cambium; P, phloem. (f and g) Klason lignin content in bark-stripped stems of young plants and in xylem scrapings of adult trees. Significant differences from the control (0 day) for young plants and from samples collected in summer for adult trees are indicated as in Figure 1 ($n = 6–8$). Abbreviations as in Figure 1.

Data at *Tree Physiology Online*). Among the 11 phenylpropanoid gene families involved in the monolignol biosynthesis pathway, the vast majority of the members identified as being recruited for lignin biosynthesis during development belonging to the so-called ‘core vascular lignification toolbox’ (Carocha et al. 2015) were significantly induced by cold, although moderately (marked in bold in see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online* and Figure 3a). Of these genes, the two most highly induced were the two members of the C4H family, *EgC4H1* (24.5-fold induction) and *EgC4H2* (7.5-fold induction); the latter was already known to be inducible by abiotic stress responses in eucalypts (Carocha et al. 2015). It

is worth noting that *EgF5H1* and *EgCOMT1*, which encode enzymes catalysing the two key steps in S unit biosynthesis, were not significantly induced in response to cold (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online* and Figure 3a).

The levels of induction of the other family members in response to cold were in general much higher than those of the ‘core vascular lignification toolbox’ genes. This was mainly due to their lowest expression in xylem in control conditions (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology Online* and Figure 3a). For instance, in the PAL family, *EgPAL1* thought to be involved in anthocyanin production was induced

Table 1. Analyses of SCW composition in xylem. Wood composition was assessed in young control plants (0 day), in similar plants after 2 days, 15 days or 46 days in the cold and in adult trees in summer, autumn and winter. Ethanol extractives, Klason acid-insoluble lignin and pyrolysis lignin content are expressed in % of cell-wall mass. S, G and S+G β -O-4 yields were obtained by thioacidolysis. They are expressed in μ moles per gram of cell wall (G and S yield) or μ moles per gram of Klason lignin (for S+G yield KL). Bold values represent significant differences (Student's *t*-test, $n = 6-8$; a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$) compared with controls (0 day, for young plants and Summer for adult plants); –, not analysed.

Sample type	EtOH extractives	Lignin content					S/G ratio	
		Klason	Pyrolysis	G yield _(β-O-4)	S yield _(β-O-4)	S+G yield KL	Pyrolysis	Thioacidolysis
0 day	1.43 \pm 0.74	19.3 \pm 1.3	24.6 \pm 1.1	167 \pm 26	814 \pm 152	5070 \pm 1237	1.34 \pm 0.1	4.9 \pm 0.5
2 days	3.91 \pm 0.65^c	20.3 \pm 0.3	24.6 \pm 0.2	183 \pm 31	850 \pm 83	5091 \pm 614	1.36 \pm 0.04	4.7 \pm 0.3
15 days	6.46 \pm 0.63^c	20 \pm 0.8	23.9 \pm 0.9	152 \pm 31	742 \pm 109	4471 \pm 513	1.45 \pm 0.02	5 \pm 1
46 days	7.66 \pm 1.73^c	20.8 \pm 1.3^a	25.8 \pm 1^a	179 \pm 39	859 \pm 156	4997 \pm 956	1.34 \pm 0.06	4.8 \pm 0.4
Summer	–	21.6 \pm 0.97	–	93 \pm 30	387 \pm 120	2386 \pm 610	–	4.11 \pm 0.8
Autumn	–	23.6 \pm 0.9^c	–	136 \pm 21^c	492 \pm 94^a	2260 \pm 641	–	3.38 \pm 0.57^b
Winter	–	23.5 \pm 1.1^c	–	127 \pm 22^c	461 \pm 118	2158 \pm 946	–	3.48 \pm 0.6^a

10-fold and *EgPAL8*, whose role is unknown, was induced up to 330-fold (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). In the COMT family, except *EgCOMT1*, all the genes were induced from 12-fold up to 618-fold (for *EgCOMT6*) (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). For each enzymatic step, we compared before and after cold treatment, the transcript abundance of each gene to the total transcript production of the family expressed as percentage (Figure 3b). This comparison showed that in most cases, main transcript contributions were still attributed to the 'core vascular lignification toolbox' genes. The enzymes encoded by the latter are likely keeping prominent roles in lignin biosynthesis in response to cold temperatures. However, genes encoding *EgPAL8*, *EgHCT2* and *EgCOMT6*, which are not part of this 'lignification toolbox', were dramatically induced in response to cold and reached expression levels similar to the prominent 'lignification toolbox' genes *EgPAL3*, *EgHCT4* and *EgCOMT1*, respectively. Two *Eucalyptus* laccases orthologues of *AtLac11* and *AtLac4* (involved the lignin polymerization step in *Arabidopsis* (Zhao et al. 2013) were induced by cold ninefold and threefold, respectively (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online)). Considering polysaccharides biosynthesis, two of the four cellulose synthases genes analysed (*EgCesA2* and *EgCesA6*) (Ranik and Myburg 2006) were induced fivefold and twofold, respectively, whereas only one of the eight genes involved in hemicelluloses biosynthesis—the closest *Eucalyptus* orthologue of *AtIRX10* (GUT2, a member of GT47 family, Wu et al. 2009)—was induced more than fourfold by cold (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online).

Xylem SCW transcriptional regulators induced by cold

A recent study in *Arabidopsis* demonstrated that abiotic stresses (high salinity and iron deprivation) can induce genes that regulate biosynthesis of the SCW (Taylor-Teeples et al. 2015). To investigate whether the response to cold in *Eucalyptus* might also induce genes that regulate SCW biosynthesis, we selected

25 close orthologues of the *Arabidopsis* TFs involved in the three-levels hierarchical SCW regulatory network (Figure 4), building on the works of Hussey et al. (2013) and Soler et al. (2015) and we analysed their transcript levels in young trees exposed to cold (Figure 4). Fourteen of the 25 genes were differentially expressed following cold exposure: seven were up-regulated and seven were down-regulated (Figure 4 and see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Four genes presented a non-significant twofold induction or repression. The differentially regulated genes were found mainly in the lower third level of the SCW regulatory network (Level 3). These TFs act directly on the structural genes involved in the biosynthesis of the SCW polymers. Six of the up-regulated genes are positive regulators of SCW deposition (i.e., orthologues of *AtMYB20*, *AtMYB54*, *AtMYB58*, *AtMYB63*, *AtMYB69* and *AtMYB79*), whereas three of the down-regulated genes are negative regulators of SCW deposition (i.e., orthologues of *AtMYB7*, *AtMYB75* and *AtKNAT7*). Only 4 of the 14 genes significantly affected by cold are involved in the upper part of the regulatory network (Levels 1 and 2). Of these, three were repressed (orthologues of *AtMYB83*, *AtMYB55* and *AtSND1*) and one was induced (one orthologue of *AtSND3*).

In addition to the orthologues of known regulators of SCW in *Arabidopsis*, potential new SCW regulators have been pointed out by the works of Hussey et al. (2015) and Soler et al. (2015). To identify the most promising candidate regulators among these eucalypt genes and to evaluate their responses to cold, we used co-expression analyses that have been shown to be useful to identify new genes involved in SCW-related synthesis (Ruprecht and Persson 2012). We first built a gene co-expression network based on transcript profiling of 146 candidate SCW-related genes in a large panel of eucalypt organs and tissues, stages of development and/or environmental conditions previously described in Cassan-Wang et al. (2012), Camargo et al. (2014), Hussey et al. (2015), Soler et al. (2015) and Carocha et al. (2015). This set of genes comprised lignin and cellulose biosynthesis genes, as well as known and as yet

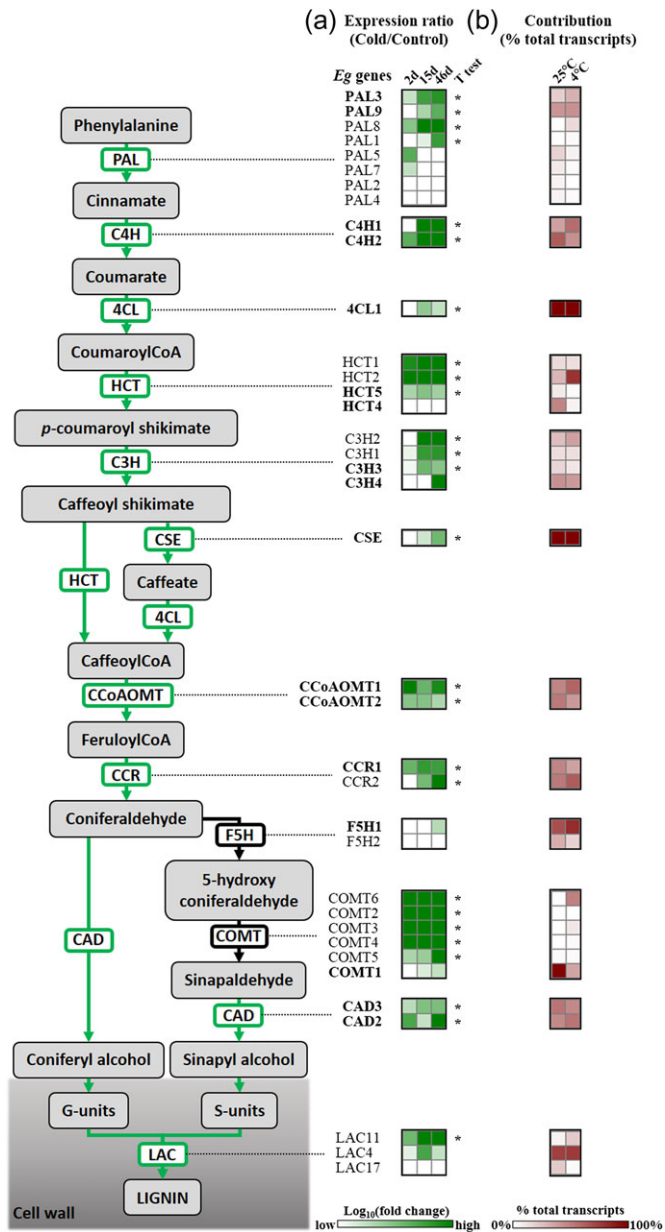


Figure 3. Cold induces genes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. (a) The transcript levels of the genes encoding the 11-enzymatic steps involved in the monolignol biosynthetic pathway were analysed by RT-qPCR in response to cold. They include the 17 genes (marked in bold) identified as being involved in developmental lignification, belonging to the 'core vascular lignin toolbox' (Carocha et al. 2015). In addition, three close orthologues of *Arabidopsis* laccases 11, 4 and 17, were analysed. Because they represent a minor pathway in woody angiosperms, the enzymatic steps leading to hydroxyphenyl (H units) were not represented. Green and black arrows represent enzymatic steps induced or not induced by cold, respectively. The heat map illustrates the gene expression ratios in young plants exposed to cold for 2, 15 and 46 days compared with controls. The white to green colour scale represents \log_{10} of expression ratio (2, 15 or 46 days versus control). (b) The heat map represents, for each enzymatic step, the transcript abundance of each gene versus the total transcript production of the gene family expressed as percentage before and after cold treatment. The white to red colour scale represents 0 to 100% of transcript contribution. Expression values are provided in Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online. Genes short names were given according

uncharacterized NAC and MYB TFs. Pearson's correlation coefficient is commonly used to estimate transcriptional coordination between two genes, suggesting their involvement in the same biological process (Aoki et al. 2007). We thus generated a Pearson correlation matrix to build a co-expression network in which 132 of the 146 genes (nodes) were connected by 592 edges representing significant co-expression relationships (see Table S2 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). These correlations were represented graphically in a network regrouping 93 of the 132 genes (Figure 5). The remaining 39 genes were grouped in smaller networks (see Figure S5 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Because we focused our interest in woody tissues, we set up node sizes to be proportional to the expression ratio between woody and non-woody tissues. Edge lengths are inversely proportional to the absolute value of correlation for each gene pair comparison, so that genes in close vicinity are considered as strongly correlated. This approach led to three clusters of genes, which were clearly separated and in which almost all the significant correlations detected were positive (Figure 5). We used a hierarchical clustering approach to investigate the tissue preferential expression of the genes contained in each of these clusters (see Figure S6 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Based on this, we called the upper cluster 'xylem cluster' because it contained 47 genes preferentially expressed in xylem and related to SCW deposition, i.e., lignin toolbox genes, cellulose synthases and orthologues of known TFs that regulate SCW biosynthesis (Figure 5). Interestingly, it also contained uncharacterized TFs. The intermediate or 'cambium cluster' contained 17 genes expressed preferentially in vascular cambium, mainly composed of TFs of unknown function (with no orthologues in *Arabidopsis*). The lower 'non-woody tissues' cluster contained 29 genes; of these, 11 encoded enzymes of unknown function (COMT_like, CAD_like, HCT_like) and 18 were unknown TFs. We chose a subset of 23 uncharacterized TFs, contained both in the 'xylem' and the 'cambium' clusters, to investigate their responses to cold temperatures by measuring their transcript levels in cold acclimated young plants (squares, Figure 5). Eleven of these genes were up-regulated by cold and three were down-regulated. Those of the 'xylem cluster' were being either up- or down-regulated by cold from twofold to eightfold. The 10 TFs of the 'cambium cluster' regulated by cold were all induced, some being dramatically up-regulated such as *EgMYB64* (>5000-fold) and *EgMYB59* (>100-fold).

to Carocha et al. (2015): PAL, phenylalanine ammonialyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; 4CL, 4-hydroxycinnamate CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl transferase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; COMT, caffeic acid O-methyltransferase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase.

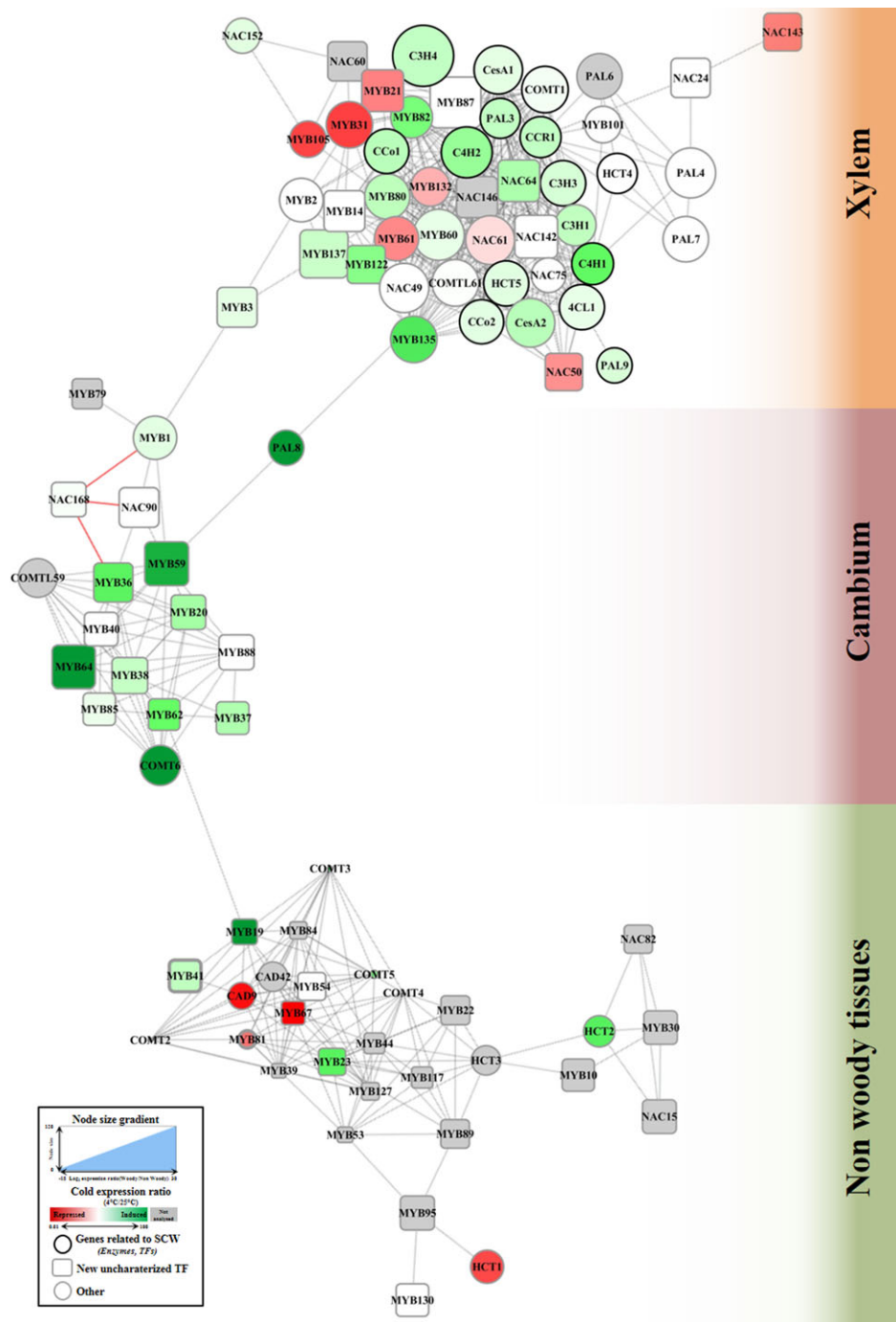


Figure 5. Correlation network analyses highlight xylem and cambium clusters enriched in cold responsive TFs. Transcript profiling of 146 genes encoding members of the MYB, NAC families of TFs as well as enzymes involved in SCW biosynthesis in a panel of 22 conditions were obtained from previous studies in eucalypts (see Table S2 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online) (Cassan-Wang et al. 2012, Carocha et al. 2015, Hussey et al. 2015, Soler et al. 2015). Significant pairwise Pearson correlation values (Bonferroni adjusted, $P < 0.05$) were used to draw a co-expression network. A short link between two genes represents a strong correlation, explained by similar expression profiles in the 22 conditions analysed. Grey and red edges represent respectively positive and negative correlations. Gene names and accession numbers are listed in Table S2 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online. Node sizes are proportional to the expression ratio between woody and non-woody tissues (see Table S2 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Circles represent genes related to SCW formation (enzymes or TFs), squares represent new, uncharacterized TFs. The main network shown here is composed of 93 genes (nodes) linked by 520 relationships (edges); small isolated sub-networks regrouping 39 genes are provided in Figure S5 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online. The three clusters of the main network were named according to the tissue preferential expression of their gene members ('xylem', 'cambium' or 'non-woody tissues'; see Figure S6 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online). Transcript levels were measured in young eucalypts plants submitted to cold (2, 15 and 46 days at 4 °C) and compared with control (25 °C, 0 days). Node colour gradient (red to green) represents gene expression ratios between cold and control conditions (see Table S1 available as Supplementary Data at *Tree Physiology* Online; ratio = $\text{Cold}_{\text{mean}(15 \text{ days}/46 \text{ days})} / \text{Control}_{(0 \text{ days})}$). Green and red colours represent gene induction or repression in response to cold, respectively. Grey nodes represent genes with no expression data.

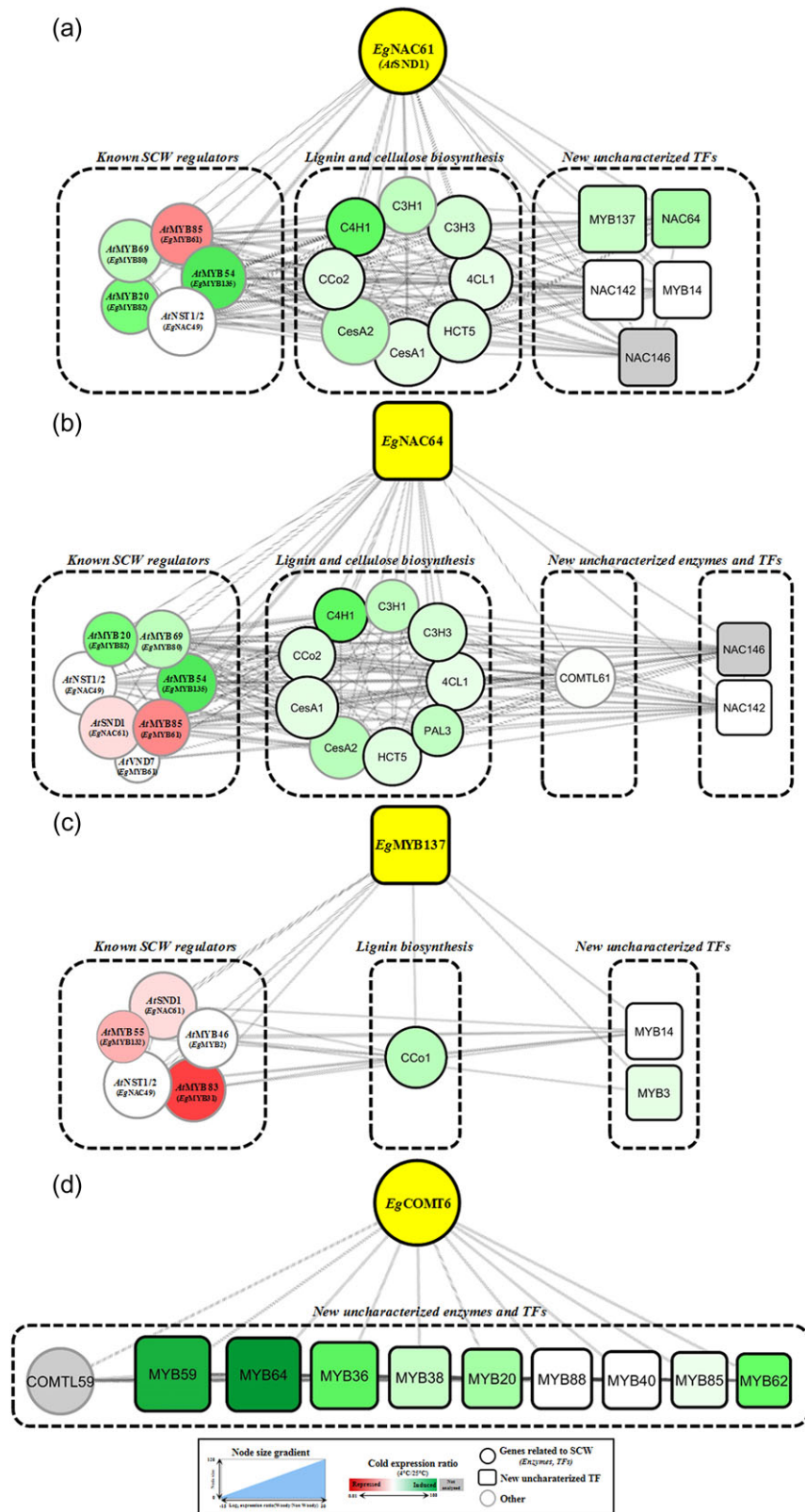


Figure 6. Xylem and cambium sub-networks reveal promising new candidate genes. Sub-networks were generated by extracting the genes directly correlated to (a) *EgNAC61* (*AtSND1*), (b) *EgNAC64*, (c) *EgMYB137* or (d) *EgCOMT6*. For legend, see Figure 5. Yellow nodes represent the 'hub gene' correlated to all the others.

never in non-dormant trees such as eucalypts. Here, we report that long exposure to cold increases SCW thickening in the developing xylem cells of the cold-resistant hybrid *E. gundal*. This was observed in young trees and to an even greater extent in adult trees. These thicker SCWs were enriched in Safranin-stained, mostly phenolic compounds. On one hand, both Klason lignin analysis and analytical pyrolysis suggest that at least part of these phenolic compounds were incorporated into lignin polymers, resulting in more lignin in the SCWs of plants submitted to cold conditions. On the other hand, the observed fivefold increase in ethanol-extractible compounds suggests that part of these phenolics stayed soluble or loosely linked to the cell walls. As suggested previously for *Miscanthus* and wheat (Olenichenko and Zagoskina 2005, Domon et al. 2013), these compounds might increase cell-wall rigidity by crosslinking with cell-wall polymers and/or might contribute to xylem cell protection from reactive oxygen species.

The greater lignin content in the xylem SCWs of cold-treated eucalypts is in good agreement with the up-regulation of most genes belonging to the 'core vascular lignification toolbox'. In young trees, all lignin genes whose products are involved in G unit biosynthesis were induced by cold, whereas genes dedicated to S unit biosynthesis (encoding *EgF5H1* and *EgCOMT1*, Anterola and Lewis 2002) were not differentially expressed. This differential expression of genes involved in G and S unit biosynthesis in response to cold, which might result in relatively more G units than S units, may explain the significant decrease in the S/G ratio observed in adult trees in autumn and winter compared with that in summer.

In general, the genes most highly induced by cold were those not involved in developmental lignification. These stress-inducible genes, which are often poorly expressed in xylem in control conditions, encode isoforms (*EgPAL8*, *EgHCT1* and *EgHCT2*, *EgCCR2*, *EgCOMT2–EgCOMT6*), whose activities might lead to the increased soluble phenolics content and/or to the increased lignin content.

Of the SCW polysaccharides, we observed a higher ratio of pentosanes (cP) to hexosanes (cH) in xylem samples from young plants exposed to cold than in control plants, suggesting that more hemicelluloses than cellulose might be incorporated into the SCWs in cold conditions. However, at the transcript gene level, we observed very significant inductions by cold of both a SCW-specific cellulose synthase gene *EgCesA2* (Eucgr. AO1324; Myburg et al. 2014), and of *EgIRX10*, which encodes a GT47 glycosyl transferase involved in chain elongation of the most abundant hemicelluloses, i.e., xylan. In *Arabidopsis*, a mutant deficient for *IRX10* and *IRX10*-like proteins showed a dramatic loss of SCW deposition associated with reduced xylan backbone polymerization and a complete loss of glucuronic acid side chains (Brown et al. 2009). Based on these results, we hypothesize that induction of *EgIRX10* in *Eucalyptus* xylem in response to cold increases SCW deposition and may account, at

least in part, for the observed increased SCW thickness in plants exposed to cold.

In summary, we observed increased SCW thickness likely resulting from enhanced deposition of lignin and possibly of xylan in *E. gundal* developing xylem cells submitted to cold conditions. An increased thickness of primary walls has been frequently reported in crop plants in response to various abiotic stresses and is considered as one of the main common mechanisms of stress responses in cell-wall architecture that could enable functional adaptation to abiotic stress. Increased lignin and/or hemicelluloses content is proposed to modulate cell-wall rigidity to prevent cell damage due to freezing (LeGall et al. 2015). Our findings are consistent with a model in which reinforcement of SCWs could be one mechanism by which perennial plants cope with unfavourable conditions such as cold and might help them adapt to frost. The content and composition of lignin polymers in SCWs seem to be modulated by transcriptional regulation of genes encoding enzymes involved in developmental lignification and of stress-responsive genes such as *EgCOMT6*. We cannot exclude, however, that such genes could be responsible for the synthesis of other phenylpropanoid compounds in response to cold. *EgCOMT6*, for instance is tightly co-expressed with cambium woody-specific MYB TFs whose role in SCW regulation based on co-expression networks is not obvious. Recently, one of these TFs, *EgMYB88*, has been functionally characterized in poplar and shown to control the biosynthesis of phenylpropanoid-derived secondary metabolites including lignin (Soler et al. 2016).

The *E. grandis* orthologues of *Arabidopsis* TFs belonging to the three-levels SCW hierarchical network established for the model plant were, for a large majority, positioned in the 'xylem co-expression cluster'. Cold temperatures triggered a clear regulation pattern for the most downstream TFs, downregulation of the negative regulators and induction of the positive regulators, in good agreement with the increase of SCW thickness and lignin content observed in response to cold. The 'xylem cluster' also included the 'core vascular lignin toolbox' genes and SCW-specific cellulose synthases. Co-expression between transcriptional regulators and effector genes ensuring SCW deposition has already been described and shown to be consistent across species (Ruprecht and Persson 2012). Indeed, the *EgNAC61* (*AtSND1*) sub-network included the closest *Arabidopsis* orthologues of TFs controlling SCW deposition, as well as cellulose and lignin related genes, known to be co-expressed and transcriptionally regulated by *AtSND1* (Zhong et al. 2006, Yao et al. 2012), and is, therefore, highly conserved between *Eucalyptus* and *Arabidopsis*. The analysis of the *EgNAC64* network highlighted a hub position of this TF and suggested that it could be a functional orthologue of *AtSND3* given its phylogenetic proximity even if it is not the closest *Eucalyptus* orthologue. *EgMYB137* is a new uncharacterized TF, co-expressed with *EgNAC61* (*AtSND1*) and other orthologues of *Arabidopsis* SCW-master

regulators, like *EgMYB2* (*AtMYB46*) or *EgNAC49* (*AtNST1/2*). *EgNAC64* and *EgMYB137* are induced by cold stress and might lead, at least in part, to the phenylpropanoid/lignin increase and the S/G ratio decrease triggered by chilling temperatures.

Notably, the use of a woody plant allowed a physical separation of differentiating xylem from vascular cambium (Cassan-Wang et al. 2012) and thus enabled to highlight in our co-expression analysis a 'cambium co-expression cluster' that obviously cannot be characterized in *Arabidopsis*. This cluster contains mostly yet uncharacterized MYB TFs, belonging to woody-preferential clades, not present in *Arabidopsis* and many of them are cold-induced. Twelve of them are also correlated to stress-inducible genes of the phenylpropanoid pathway, like *EgCOMT6* or *EgPAL8* and could be involved in lignin deposition or soluble phenolics biosynthesis.

In conclusion, this work provides a strong foundation to decipher the function of new TF candidates at the crosstalk between cold stress and wood tissue formation. This is particularly relevant in *Eucalyptus*, which, as a woody evergreen perennial tree, must ensure its fitness and adaptability to challenging environmental cues. This study also provides a global view of the consequences of cold temperatures on wood formation in *Eucalyptus*. The observed increase in the amount of lignin and the modified lignin composition (lower S/G ratio) may contribute to greater tolerance of cold in *E. gunnii* × *E. dalrympleana* hybrids, as in crop plants, but these SCW modifications may also greatly affect the properties of the wood and consequently its industrial uses. In this respect, the identification of regulators that act both in the developmental patterning of wood tissues and in the abiotic stress response will be extremely useful for both wood engineering and breeding strategies as stressed by Mashkina and Butorina (2003) and Harfouche et al. (2011).

Supplementary Data

Supplementary Data for this article are available at *Tree Physiology* Online.

Acknowledgments

The authors acknowledge F. Melun (FCBA) for his help with the identification of field-grown eucalypt clones in Longages (France), R. Simões (CEF) for the extraction of xylem samples, B. Savelli and H. San Clemente (LRSV) for their help with bioinformatics, A. Gauthier and A. Desplat for their technical help during their Master internships, the Genotoul Bioinformatics Platform Toulouse Midi-Pyrenees for computing and storage resources and the TRI-Genotoul platform for microscopic analyses. The authors are grateful to Prof. C. Lapierre (Institut JP Bourgin, France) and Dr Y. Barrière (INRA Lusignan, France) for helpful discussions and advice on lignin analyses. The authors acknowledge Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the University Paul Sabatier Toulouse III, the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Fundação para a

Ciência e a Tecnologia (FCT) and the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for the support of this work.

Funding

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the University Paul Sabatier Toulouse III (UPS, IDEX UNITI, project EuCoWood), the TREEFORIOULES project (ANR-2010-KBBE-007-01 and FCT, P-KBBE/AGR_GPL/0001/2010) the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). R.P. was supported by a PhD grant from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Alves A, Gierlinger N, Schwanninger M, Rodrigues J (2009) Analytical pyrolysis as a direct method to determine the lignin content in wood. Part 3. Evaluation of species-specific and tissue-specific differences in softwood lignin composition using principal component analysis. *J Anal Appl Pyrolysis* 85:30–37.
- Anterola AM, Lewis NG (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61:221–294.
- Aoki K, Ogata Y, Shibata D (2007) Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant Cell Physiol* 48:381–390.
- Arvidsson S, Kwasniewski M, Riaño-Pachón DM, Mueller-Roeber B (2008) QuantPrime—a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* 9:465.
- Booth TH (1990) Mapping regions climatically suitable for particular tree species at the global scale. *For Ecol Manage* 36:47–60.
- Brown DM, Zhang Z, Stephens E, Dupree P, Turner SR (2009) Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 57:732–746.
- Camargo ELO, Nascimento LC, Soler M et al. (2014) Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol* 14:256.
- Cao PB, Azar S, SanClemente H, Mounet F, Dunand C, Marque G, Marque C, Teulières C (2015) Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *Eucalyptus grandis*: an intriguing over-representation of stress-responsive. *PLoS One* 10:1–22.
- Carocha V, Soler M, Hefer C, Cassan-Wang H, Fevèreiro P, Myburg AA, Paiva JAP, Grima-Pettenati J (2015) Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol* 206:1297–1313.
- Cassan-Wang H, Soler M, Yu H et al. (2012) Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription-PCR analysis of gene expression in organs and tissues of *Eucalyptus* grown in various environmental conditions. *Plant Cell Physiol* 53:2101–2116.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1097.
- Domon JM, Baldwin L, Acket S et al. (2013) Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry* 85:51–61.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S et al. (2005) *EgMYB2*, a new transcriptional activator from *Eucalyptus xylem*, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J* 43:553–567.
- Grima-Pettenati J, Soler M, Camargo ELO, Wang H (2012) Transcriptional regulation of the lignin biosynthetic pathway revisited: new players and insights. In: Jouanin L, Lapierre C (eds) *Advances in*

- botanical research: lignins biosynthesis, biodegradation and bioengineering. Elsevier, San Diego, pp 173–218.
- Harfouche A, Meilan R, Altman A (2011) Tree genetic engineering and applications to sustainable forestry and biomass production. *Trends Biotechnol* 29:9–17.
- Hausman JF, Evers D, Thiellement H, Jouve L (2000) Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Rep* 19:954–960.
- Hussey SG, Mizrahi E, Creux NM, Myburg AA (2013) Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front Plant Sci* 4:1–21.
- Hussey SG, Saidi MN, Hefer CA, Myburg AA, Grima-Pettenati J (2015) Structural, evolutionary and functional analysis of the NAC domain protein family in *Eucalyptus*. *New Phytol* 206:1337–1350.
- LeGall H, Philippe F, Domon J, Gillet F, Pelloux J, Rayon C (2015) Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4:112–166.
- Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, Brière C, Séguin A, Mackay J, Grima-Pettenati J (2007) Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci* 173:542–549.
- Legay S, Sivadon P, Blervacq A-S et al. (2010) EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar. *New Phytol* 188:774–786.
- Lepikson-Neto J, Alves A, Simões R et al. (2013) Flavonoid supplementation reduces the extractive content and increases the syringyl/guaiacyl ratio in *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* hybrid trees. *BioResources* 8:1747–1757.
- Mashkina OS, Butorina AK (2003) Genetic engineering of forest woody plants. *Genetika* 39:309–317.
- Méchin V, Laluc A, Legée F, Cezard L, Denoue D, Barrie Y, Lapierre C (2014) Impact of the brown-midrib bm5 mutation on maize lignins. *J Agric Food Chem* 62:5102–5107.
- Myburg A, Potts B, Marques CM, Kirst M, Gion J, Grattapaglia D, Grima-Pettenati J (2007) *Eucalyptus*. In: Kole CE (ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants*. Springer, New York, NY, USA, pp 115–160.
- Myburg AA, Grattapaglia D, Tuskan GA et al. (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510:356–362.
- Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, Ohtani M (2015) NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front Plant Sci* 6:288.
- Navarro M, Marque G, Ayax C, Keller G, Borges JP, Marque C, Teulieres C (2009) Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *J Exp Bot* 60:2713–2724.
- Nguyen H, Cao PB, San Clemente H, Ployet R, Mounet F, Harvengt L, Ladouce N, Marque C, Teulieres C (2017) Special trends of CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance. *Physiol Plant* 159:445–467.
- Olenichenko NA, Zagorskina NV (2005) Response of winter wheat to cold: production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity. *Appl Biochem Microbiol* 41:600–603.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002–2007.
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiol* 127:1513–1523.
- Potts BM, Potts WC, Kantvilas G (2001) The miena cider gum, *Eucalyptus Gunnii* subsp. *Divaricata* (Myrtaceae): a taxon in rapid decline. *Pap Proc Roy Soc Tas* 135:57–61.
- Ranik M, Myburg AA (2006) Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiol* 5:545–556.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Van Den Hoff MJB, Moorman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45.
- Ruprecht C, Persson S (2012) Co-expression of cell wall-related genes: new tools and insights. *Front Plant Sci* 3:1–7.
- Ruprecht C, Mutwil M, Saxe F, Eder M, Nikoloski Z, Persson S (2011) Large-scale co-expression approach to dissect secondary cell wall formation across plant species. *Front Plant Sci* 1:2–23.
- Soler M, Camargo ELO, Carocha V et al. (2015) The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytol* 206:1364–1377.
- Soler M, Plasencia A, Lepikson-Neto J et al. (2016) The woody-preferential gene EgMYB88 regulates the biosynthesis of phenylpropanoid-derived compounds in wood. *Front Plant Sci* 7:1422.
- Southerton SG, Marshall H, Mouradov A, Teasdale RD (1998) Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol* 118:365–372.
- Taylor-Teeple M, Lin L, de Lucas M et al. (2015) An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517:571–575.
- Teulieres C, Marque C, Nagata T, Lörz, Wildhom JM (2007) *Eucalyptus*. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp 387–406.
- VanAcker R, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels* 6:46.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol* 153:895–905.
- Vazquez-Cooz I, Meyer RW (2009) A differential staining method to identify lignified and unlignified tissues. *Biotech Histochem* 77:277–282.
- Ventorim G, Alves AF, Penna LS, Francis RC (2014) Effect of S/G ratio on kraft pulping and ecf bleaching of some poplars and eucalyptus. *Cellul Chem Technol* 48:365–373.
- Wu AM, Rihouey C, Seveno M, Hörnblad E, Singh SK, Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A (2009) The *Arabidopsis* IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J* 57:718–731.
- Yao DX, Wei Q, Xu WY, Syrenne RD, Yuan JS, Su Z (2012) Comparative genomic analysis of NAC transcriptional factors to dissect the regulatory mechanisms for cell wall biosynthesis. *BMC Bioinformatics* 13:12.
- Zhao Q, Nakashima J, Chen F et al. (2013) Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:3976–3987.
- Zhong R, Ye ZH (2015) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol* 56:195–214.
- Zhong R, Demura T, Ye Z-H (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3158–3170.

3.2.2 Les CBF sont impliqués dans le remodelage du xylème

Les données de la littérature (Taylor-Teeple *et al.*, 2014), ainsi que les résultats que nous avons obtenus (Ployet *et al.*, 2017), montrent que les voies de développement des tissus du bois sont fortement interconnectées avec les mécanismes de perception et de réponse aux stress abiotiques. Nos analyses transcriptomiques, réalisées en condition de stress froid, révèlent que de nouveaux gènes à la fonction inconnue, jusqu'alors ignorés par les cribles de détection de gènes d'intérêts, apparaissent différenciellement exprimés dans le bois. De même, l'expression d'une partie au moins des gènes impliqués dans la formation du xylème est induite en réponse au froid. Nous avons montré que le manque d'eau et la disponibilité en nutriments peuvent également réguler le transcriptome des cellules du xylème (Ployet *et al.*, 2019, voir chapitre 3.1). La régulation de processus de développement préexistants par des conditions contraignantes est souvent décrite, dans la littérature, par le terme de « co-optation » (Taylor-Teeple *et al.*, 2015). Ce processus pourrait constituer un élément important de la tolérance, en conférant, par des adaptations fonctionnelles ciblées, des propriétés particulières à certains tissus de la plante. Deux exemples récents viennent étayer cette hypothèse : la surexpression de *BpMYB46* ou *PtoMY170*, qui augmente la résistance aux stress salin et osmotique en agissant sur le développement des tissus vasculaires chez le Bouleau et *Arabidopsis*. (Guo *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017). Nous pensons que la modification de la structure et de la composition du bois, observée dans l'étude précédente chez des *Eucalyptus* soumis au froid, est également une illustration de ce processus biologique.

Dans le travail ci-dessous, extrait des travaux de Phi Bang Cao (PhD) et Raphael Ployet (PhD), nous avons démontré que les gènes DREB1/CBF, qui sont des éléments importants de la voie de signalisation impliquée dans la réponse au stress froid chez l'*Eucalyptus* (Navarro *et al.*, 2011), jouent un rôle dans le remodelage des tissus du bois. Ma participation à cette étude a concerné l'analyse de l'expression de gènes liés à la xylogénèse dans des lignées transgénique 35S :CBF ainsi que le dosage de composés de la paroi secondaire. Les principaux résultats de ce travail nous amènent à conclure que la voie de signalisation impliquant les CBF régule le dépôt d'une paroi secondaire plus épaisse et plus lignifiée, et influence la différenciation des cellules cambiales pour former des tissus du xylème plus denses, présentant des vaisseaux plus nombreux et plus petits.



Article

Wood Architecture and Composition Are Deeply Remodeled in Frost Sensitive *Eucalyptus* Overexpressing CBF/DREB1 Transcription Factors

Phi Bang Cao ^{1,2,†} , Raphaël Ployet ^{1,3,†}, Chien Nguyen ^{1,4}, Annabelle Dupas ¹, Nathalie Ladouce ¹, Yves Martinez ⁵, Jacqueline Grima-Pettenati ¹, Christiane Marque ¹, Fabien Mounet ¹ and Chantal Teulière ^{1,*}

¹ Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse III, CNRS, UPS, UMR 5546, 31320 Castanet-Tolosan, France; phibang.cao@hvu.edu.vn (P.B.C.); raphael.ployet@fabi.up.ac.za (R.P.)

² Department of Natural Sciences, Hung Vuong University, Nong Trang Ward, Viet Tri City, Phu Tho Province 29000, Vietnam

³ Department of Biochemistry, Genetics and Microbiology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa

⁴ Biotechnology and crop protection Department; Northern Mountainous Agriculture and Forestry Science Institute, Phu Tho 29000, Vietnam

⁵ CMEAB, IFR40 Pôle de Biotechnologie Végétale, 31320 Castanet-Tolosan, France

* Correspondence: teulieres@lrsv.ups-tlse.fr

† These two authors contributed equally to this work.

Received: 28 March 2020; Accepted: 21 April 2020; Published: 24 April 2020



Abstract: Eucalypts are the most planted trees worldwide, but most of them are frost sensitive. Overexpressing transcription factors for CRT-repeat binding factors (CBFs) in transgenic *Eucalyptus* confer cold resistance both in leaves and stems. While wood plays crucial roles in trees and is affected by environmental cues, its potential role in adaptation to cold stress has been neglected. Here, we addressed this question by investigating the changes occurring in wood in response to the overexpression of two CBFs, taking advantage of available transgenic *Eucalyptus* lines. We performed histological, biochemical, and transcriptomic analyses on xylem samples. CBF ectopic expression led to a reduction of both primary and secondary growth, and triggered changes in xylem architecture with smaller and more frequent vessels and fibers exhibiting reduced lumens. In addition, lignin content and syringyl/guaiacyl (S/G) ratio increased. Consistently, many genes of the phenylpropanoid and lignin branch pathway were upregulated. Most of the features of xylem remodeling induced by CBF overexpression are reminiscent of those observed after long exposure of *Eucalyptus* trees to chilling temperatures. Altogether, these results suggest that CBF plays a central role in the cross-talk between response to cold and wood formation and that the remodeling of wood is part of the adaptive strategies to face cold stress.

Keywords: Wood; CBF/DREB1 transcription factors; transgenic *Eucalyptus*; cold stress; secondary cell walls; lignin; vessels; fibers; wood anatomy

1. Introduction

Global climate changes together with an intensification of extreme climatic events are very serious threats to forest trees. Unlike annual herbaceous plants, trees face complex stress conditions repeatedly due to their long life cycle. Among the plethora of negative ecosystemic consequences linked to these climatic changes, a strong decrease in wood production and reduced carbon sequestration are expected [1]. Eucalypts are the most widely planted hardwood forest trees in the world [2] because

of their fast growth, superior wood quality, and adaptability to diverse environments. In Europe, eucalypts are mainly planted in Portugal, Spain, Italy, and Southwestern France thanks to favorable climatic conditions for these overwintering evergreen trees. Eucalypts have not evolved avoidance mechanisms such as endodormancy to cope with cold stresses in contrast to deciduous tree species. When temperatures go down in winter, both the primary and secondary (radial) stem growth are temporarily stopped or slowed down but start again when the conditions become favorable [3–5]. In eucalypts, the balance between growth and stress resistance is clearly in favor of the former [6].

Secondary growth is the result of the vascular cambium activity that generates secondary xylem (called wood in trees) through a terminal differentiation process, which includes cell division, cell expansion, massive deposition of lignified secondary cell walls (SCWs), programmed cell death, and finally formation of heartwood [7]. Both cambial activity and xylem differentiation are responsive to environmental cues, and wood phenotypic plasticity likely contributes to the functional adaptation of trees to stress [8]. Indeed, vascular traits reflect adaptation to climatic variations in eucalypts grown in their Australian natural environment [9]. In overwintering evergreen trees, xylem vessel anatomy is particularly important since it mediates the trade-off between resistance to freeze–thaw-induced embolism and xylem transport capacity [6]. In addition, changes in the thickness, composition and/or structure of SCWs have been observed in trees such as *Eucalyptus* in response to several stresses such as nitrogen excess or depletion [10], mechanical stress [11], or low temperature [4]. Exposure of *Eucalyptus gunnii* × *dalrympleana* hybrids to long-term chilling temperatures leads to structural modifications of xylem cells, including the deposition of thicker and more lignified xylem cell walls [4]. These results were observed for both young plants grown in controlled conditions and in field-grown adult trees sampled in fall and/or winter.

While we have a relatively good understanding of the developmental regulation of wood formation [12,13], our knowledge of the sensing/signaling pathways and of the mechanisms underlying wood formation in response to stresses is very scarce. Recent studies have highlighted the importance of a dynamic cross-talk between the regulation of SCWs during development and in response to stresses as necessary to promote adaptation to environmental changes. Indeed, some transcription factors (TFs) involved in the regulation of SCW formation are induced by environmental constraints such as high salinity or iron deprivation in *Arabidopsis* [14] or cold stress in *Eucalyptus* [4]. Notably, some SCW-related TFs are able to confer resistance to salt and drought when ectopically expressed [15,16].

The CRT-repeat binding factor/dehydration responsive element binding1 (*CBF/DREB1*) genes that belong to the large *AP2/ERF* (*APETALA2/ethylene-responsive element binding factor*) transcription factor family play key roles in frost tolerance [17]. Indeed, *CBF* overexpression (*CBF-OE*) mimics cold acclimation in addition to developmental and growth modifications in numerous plants species [18–20], including *Eucalyptus* [21]. Notably, *CBF* genes are overrepresented in the *E. grandis* genome as compared to most other plant genomes with the exception of *Medicago* that also contains 17 *CBF* members [22]. This subfamily expansion is even more important in *E. gunnii*, which is one of the most frost-tolerant *Eucalyptus* [23]. Some of these *CBFs* are strongly induced in stems in response to cold treatment [23]. To the best of our knowledge, no study has ever investigated the effects of *CBF* overexpression on secondary growth and wood formation.

This prompted us to investigate the effects of *CBF* overexpression on wood formation by using *Eucalyptus CBF-OE* lines that were previously characterized for their tolerance to frost [21]. We analyzed the architecture and the composition of the wood formed in this artificial situation, mimicking permanent cold stress, through histochemical, biochemical, and transcriptomic analyses. The results emphasize the strong impact of *CBF* overexpression on xylem differentiation leading to an altered architecture and composition. The lignin content and composition were also modified as the expression of the main genes involved in lignin biosynthesis.

2. Results

Although eucalypts are known to be recalcitrant to transformation, we previously succeeded in transforming a cold-sensitive *Eucalyptus* hybrid (*E. urophylla* × *E. grandis*) with the two CBF genes *EguCBF_K* and *EguCBF_Q* (previously named, respectively, *EguCBF1a* and *EguCBF1b* by [24]), cloned from the cold tolerant species *E. gunnii*. The resulting transgenic micro-cuttings overexpressing either *EguCBF_K* or *EguCBF_Q* were shown to be more tolerant to frost and exhibited some phenotypes reminiscent of cold acclimation [21].

As described in the Material and Methods Section, we first implemented a protocol to root the rooting-recalcitrant transgenic micro-cuttings of these two lines *EguCBF_K*-OE and *EguCBF_Q*-OE, and control plants (empty vectors). We then evaluated their tolerance to frost and measured their growth parameters. We also examined in detail the impact of CBF overexpression on xylem formation, architecture, secondary cell wall composition, as well as on the expression of genes involved in the lignin branch pathway.

2.1. CBF Overexpression Confers Frost Tolerance to *Eucalyptus* Transgenic Lines While Negatively Impacting Plant Growth and Development

We assessed frost tolerance on both leaves and stem fragments using the ion leakage method, which allows for the evaluation of cell injury and, therefore, membrane integrity [25]. For all damaging temperatures (below -5.5 °C) (Figure 1), *EguCBF_Q*-OE plants exhibited a significantly lower injury index and thus a better frost tolerance than control lines both for leaves and stems. *EguCBF_K*-OE plants exhibited a significant increase in cold tolerance only for leaf tissues at the lowest temperature assessed, as compared to controls (Figure 1a).

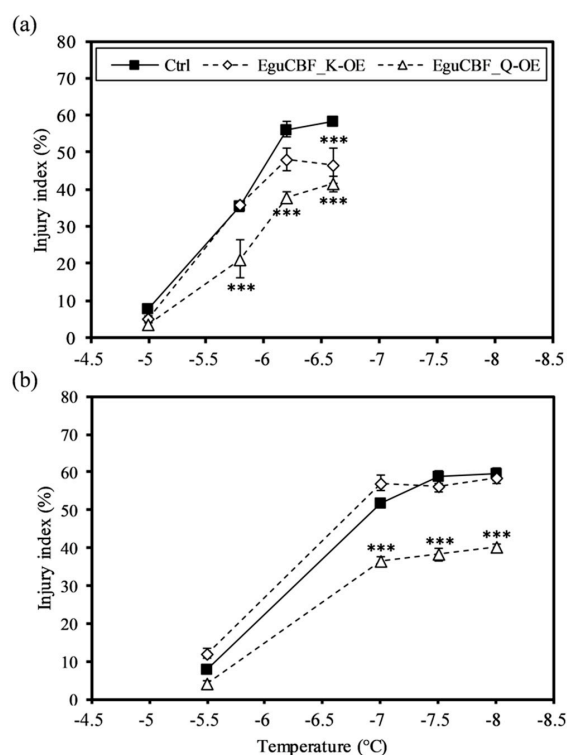


Figure 1. Frost tolerance of CRT-repeat binding factor overexpressing (CBF-OE) transgenic lines. Frost tolerance was assessed using the ion leakage method on leaf discs (a) and stem segments (b) of 6-month-old transgenic plants overexpressing the gene *EguCBF_K* (*EguCBF_K*-OE) or *EguCBF_Q* (*EguCBF_Q*-OE) and control plants transformed with an empty vector. Results are means \pm SD of three biological replicates. ANOVA and Tukey HSD test $p < 0.05$ (***) were used to highlight statistical differences between transgenic lines and controls.

The higher frost tolerance exhibited by *EguCBF_Q*-OE rooted plants is in good agreement with the results obtained previously on the corresponding micro-cuttings [21] and, notably, was associated with a drastic reduction of primary growth (Figure 2a). In contrast, stem heights of the *EguCBF_K*-OE plants were similar to controls (Figure 2a).

All the morphological parameters measured were strongly decreased (on average by 54%) in *EguCBF_Q*-OE as compared to controls (Figure 2b). Among them, stem diameter and branch number were the most affected, being only 50% and 38% of those of the controls, respectively. In *EguCBF_K*-OE plants, leaf width was significantly reduced while leaf length, number of branches, and stem diameter were slightly but not significantly reduced.

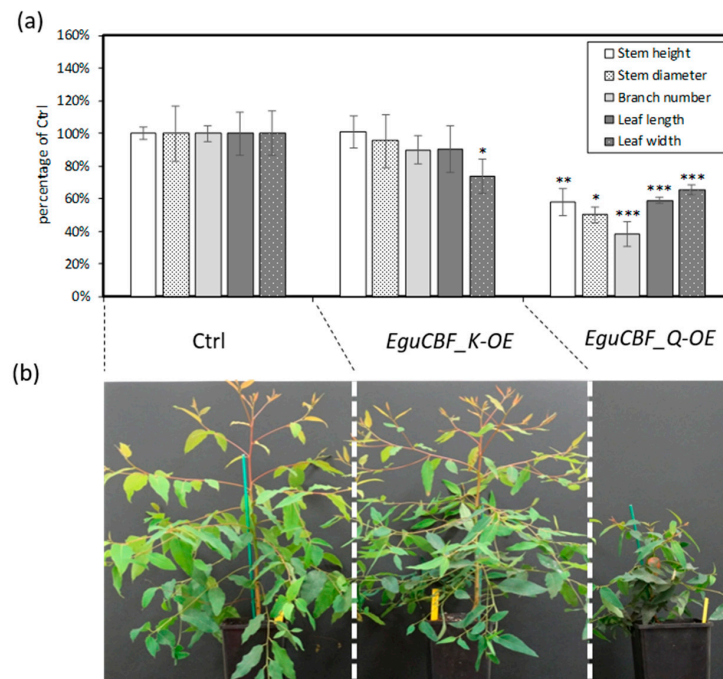


Figure 2. Comparison of morphological parameters between *CBF*-OE and control lines. (a) Morphological traits (stem height, stem diameter, branch number, leaf length, and width) were measured on 6-month-old *CBF*-OE (*EguCBF_K*-OE, *EguCBF_Q*-OE) and control plants (Ctrl). The results are means \pm SD of six biological replicates. Statistical difference with control was assessed using Tukey HSD test: *** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$), and * ($p < 0.05$). (b) General shape and size of 6-month-old plants.

2.2. *CBF* Overexpression Impacts Xylem Differentiation and Architecture in *Eucalyptus* Transgenic Lines

The impact of ectopic overexpression of *CBF* on secondary growth was further investigated on stem transversal sections by counting the number of differentiating xylem cells (i.e., xylem cells situated between flat and dividing cambial initials, and xylem cells that initiated secondary cell wall deposition) as a proxy for evaluating cambial activity. The number of differentiating xylem cell layers that exhibited thin primary cell walls (red cells in Figure 3a) was significantly reduced in both *EguCBF_K*-OE and *EguCBF_Q*-OE plants, by 21% and 48%, respectively, as compared to control plants (Figure 3b). We also used cell wall thickness as a proxy for evaluating the xylem cells' maturation state. For this purpose, we artificially designed three groups of xylem cell layers: 1 to 3 (Figure 3a green), 4 to 6 (Figure 3a pink), and 7 to 9 (Figure 3a blue) adjacent to the cambial initials and measured the average cell wall thickness (Figure 3c). The first three layers 1 to 3 did not exhibit any significant difference between lines as these cells were thin, wall differentiating cells in all lines. In *EguCBF_Q*-OE plants, xylem cells within group 4 to 6 and group 7 to 9 exhibited significantly thicker cell walls than control plants by factors of 1.7 and 1.4, respectively. Although nonsignificant, *EguCBF_K*-OE plants also

showed thicker cell walls than controls in these two most inner groups of cells, thus exhibiting an intermediate pattern between controls and *EguCBF_Q*-OE plants. These observations suggest that for both *EguCBF_K*-OE and *EguCBF_Q*-OE, secondary cell wall deposition was initiated earlier than in control plants. This focus on developing xylem from the cambial zone highlighted the significant impact of *CBF* overexpression on cell differentiation and on the dynamics of cell wall deposition.

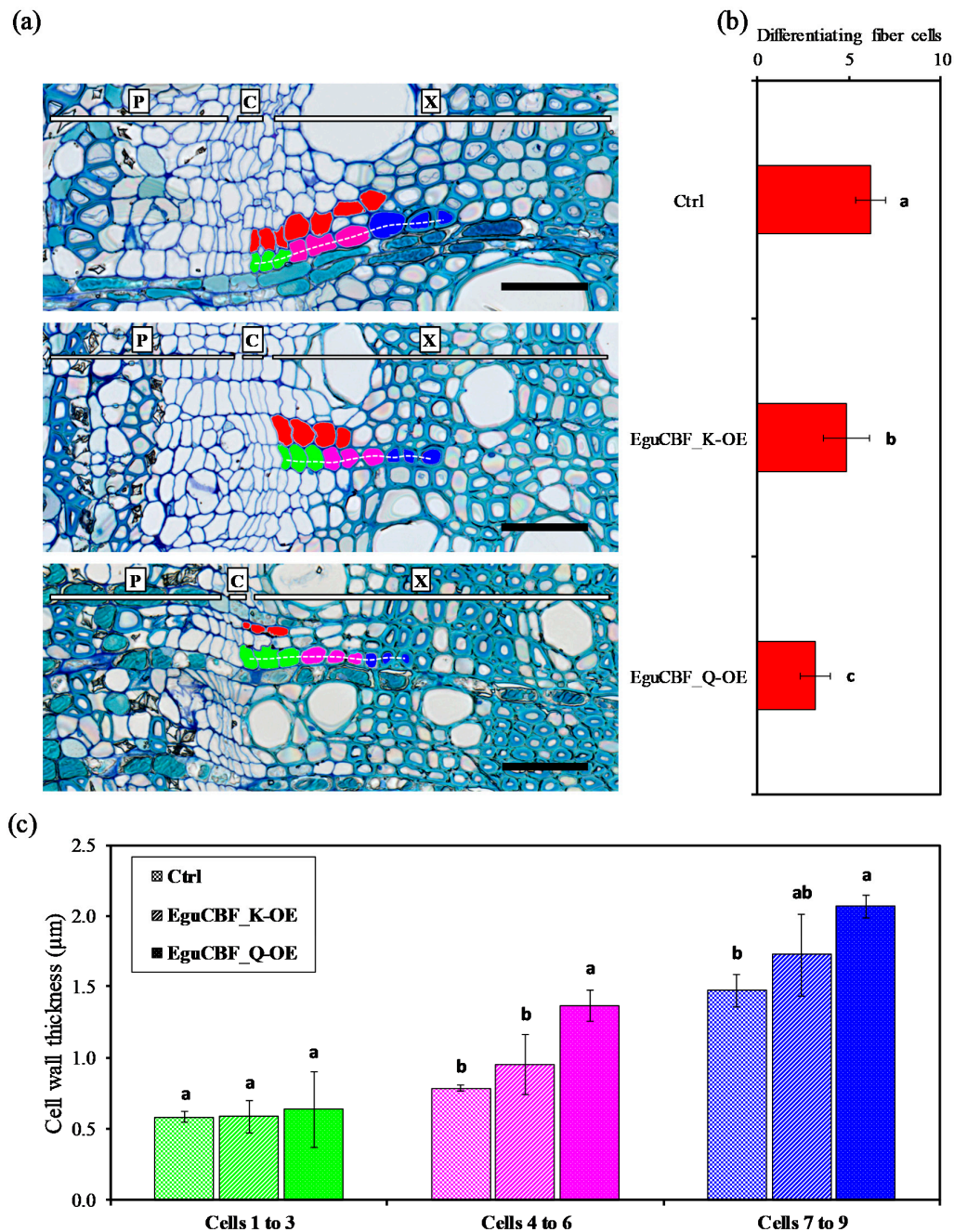


Figure 3. Dynamics of xylem differentiation in the *CBF*-overexpressing lines and controls. (a) Stem cross sections of 6-month-old controls, *EguCBF_K*-OE, and *EguCBF_Q*-OE *Eucalyptus* plants stained with Toluidine blue O. Differentiating xylem cells with thin primary cell walls are colored in red. A cell line originating from the same cambial initial was artificially separated into three groups (green, cells 1 to 3; pink, cells 4 to 6; blue, cells 7 to 9) (b) Average number of differentiating fiber cells (colored in red) from cambial initials, counted on 49 to 61 fiber cell lines (i.e., fiber cells originating from the same cambial

initial) as exemplified by the white dotted line, across 3 biological replicates per line. (c) Average cell wall thickness for each of the three groups (cells 1 to 3; 4 to 6; 7 to 9) of differentiating fiber cells starting from the cambial initials. The average cell wall thickness was measured on 31 to 58 fiber cell lines per line, across 3 biological replicates per line. The results are means \pm SD of measurements (different fiber cell lines) and statistical difference was assessed using one-way ANOVA and Tukey HSD post hoc test ($p < 0.05$; groups identified with letters a, b and c). P: phloem, C: cambial zone, X: xylem. Scale bar = 50 μm .

We then analyzed the xylem vessels' properties such as diameter, density, porosity, hydraulic mean diameter, hydraulic conductivity, and vulnerability index. As shown in Figure 4, the distribution of the vessel diameter greatly differed between *EguCBF_Q*-OE plants and controls whereas *EguCBF_K*-OE showed an intermediate pattern. Most of the vessels in *EguCBF_Q*-OE were smaller (71.5% of them showed a maximum diameter of 40 μm), as compared to controls for which 75% of the vessels had a diameter greater than 40 μm . Notably, the smallest vessel diameter class (< 20 μm) was represented only in *EguCBF_Q*-OE, whereas the largest classes (60–80 μm) were virtually absent from *EguCBF_Q*-OE. Concomitant to the reduction of the mean vessel diameter in both *EguCBF_Q*-OE (–34%) and to a lesser extent *EguCBF_K*-OE (–15%; Table 1), the vessel density increased dramatically (+152%) in *EguCBF_Q*-OE and moderately in *EguCBF_K*-OE (+54%). Despite the reduction of their average vessel diameter, secondary xylem of both *EguCBF_K*-OE and *EguCBF_Q*-OE showed an increased porosity, statistically different from controls only for *EguCBF_K*-OE. We then calculated the average vessel hydraulic mean diameter that reflects the class of diameter having the highest contribution to water transport [26]. A similar trend as for the average vessel diameter was observed, where the vessels having the highest contribution to water transport in *EguCBF_K*-OE and *EguCBF_Q*-OE were 14% and 34% smaller, respectively, than in control plants. From these anatomical measurements, we extrapolated the theoretical area-specific hydraulic conductivity known to reflect the efficiency of sap flow through the vascular system [27,28]. It was severely reduced for *EguCBF_Q*-OE (–51%) and less so (–17%) for *EguCBF_K*-OE in comparison to controls. Consequently, the xylem potential vulnerability index was dramatically reduced for both CBF-OE lines (–73% and –44% for *EguCBF_Q*-OE and *EguCBF_K*-OE, respectively) as compared to controls, suggesting a lower vulnerability to hydraulic failure for these CBF-OE lines [29].

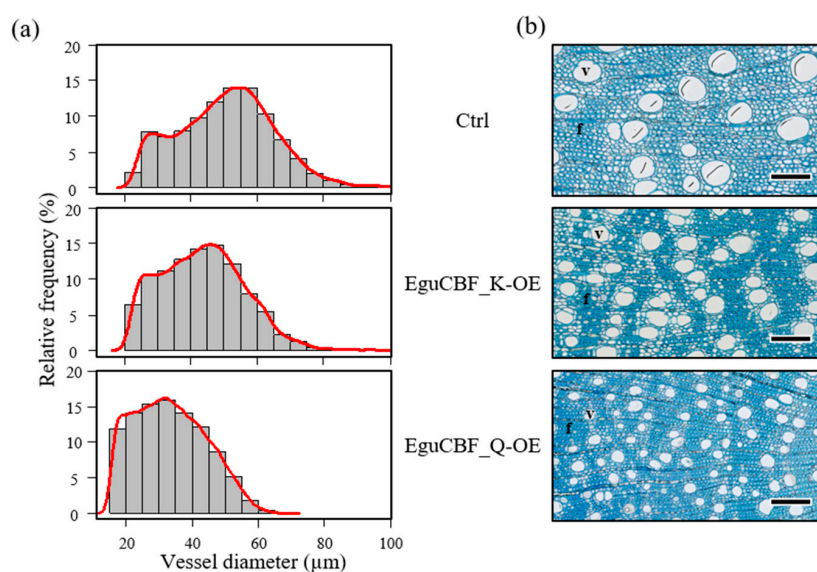


Figure 4. Vessel distribution. (a) Vessel diameter distribution in the secondary xylem of 6-month-old control, *EguCBF_K*-OE, and *EguCBF_Q*-OE *Eucalyptus* plants. (b) Toluidine blue O stained cross sections of secondary xylem of 6-month-old plants. The results are mean diameters \pm SD of a total of 2700 to 6600 vessels measured across 3 biological replicates per line. Scale bar = 50 μm . V: vessels; f: fibers.

Table 1. Vessel properties in *Eucalyptus* CBF-overexpressors.

	Control	<i>EguCBF_K-OE</i>	<i>EguCBF_Q-OE</i>
Vessel diameter (μm)	52.7 ± 3.4^a	44.9 ± 4.3^b	34.6 ± 5.4^c
Vessel density (N/mm^{-2})	67.4 ± 10.8^c	103.6 ± 18.2^b	169.9 ± 39.5^a
Porosity (%)	14.5 ± 1.4^b	16.1 ± 1.5^a	15.4 ± 2.6^{ab}
Average vessel hydraulic mean diameter (μm)	62.8 ± 4.7^a	54.2 ± 6.6^b	41.4 ± 6.4^c
Theoretical area-specific hydraulic conductivity ($\text{kg}/\text{m}^{-1}/\text{MPa}^{-1}/\text{s}^{-1}$)	15.8 ± 2.9^a	13.1 ± 3.6^b	7.7 ± 3.2^c
Potential vulnerability index	0.81 ± 0.16^a	0.45 ± 0.11^b	0.22 ± 0.08^c

These parameters were evaluated on 2700–6600 vessels from 3 replicates for each line. Statistical significance was assessed through two ways ANOVA and groups (identified with letters a, b and c) were defined using Tukey post hoc test ($p < 0.05$).

We also quantified the percentage of vessels containing tyloses in their lumen (Figure 5a). Within stem sectors (i.e., areas between two rays, from pith to developing xylem) of controls and *EguCBF_K-OE* plants, on average, 30% of vessels contained tyloses, mainly located in the most mature xylem close to the pith. This percentage was much lower in *EguCBF_Q-OE* (1.1%; Figure 5b).

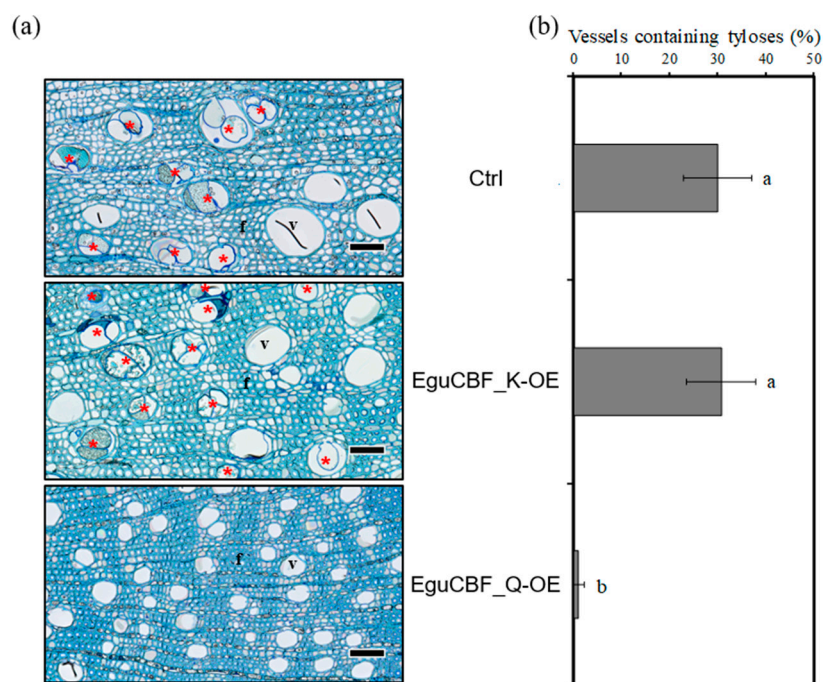


Figure 5. Presence of tyloses in the inner part of the xylem. (a) Toluidine blue O stained cross sections of the inner part of the secondary xylem of 6-month-old plants, vessels containing tyloses are highlighted by red stars. (b) Percentage of vessels containing tyloses quantified in stem sectors delimited by ray cells from pith to cambium. A total of 44 to 1915 vessels with tyloses were counted per line, across 3 biological replicates. Statistical significance was assessed with one-way ANOVA and Tukey HSD post hoc test ($p < 0.05$; groups identified with letters a, b and c). Scale bar = $50 \mu\text{m}$.

The characteristics of the fibers of the CBF-OE lines were also modified (Table 2). For instance, the fiber lumen diameter was significantly reduced in *EguCBF_Q-OE* plants (-24.3%) and to a lesser extent in *EguCBF_K-OE* plants (8.3%) as compared to controls. The average fiber density showed an opposite trend, with an increase of 7.5% and 26.8% in *EguCBF_K-OE* and *EguCBF_Q-OE*, respectively, as compared to controls. Consistent with these observations, image analyses revealed an overall increase of 8.6% of the cell wall surface proportion in *EguCBF_Q-OE* plants while the average SCW

thickness measured over a large number of fibers was not statistically different between the CBF-OE lines and the controls.

Table 2. Properties of xylem fibers in *Eucalyptus* CBF-overexpressors.

	Control	<i>EguCBF_K-OE</i>	<i>EguCBF_Q-OE</i>
Fiber lumen diameter (μm)	5.51 \pm 0.62 ^a	5.05 \pm 0.74 ^b	4.17 \pm 0.41 ^c
Fiber density (N/mm^{-2})	9793.1 \pm 1639.2 ^c	10594.6 \pm 1684.9 ^b	13378.7 \pm 2214.1 ^a
Fiber cell wall thickness (μm)	3.00 \pm 0.49 ^a	3.01 \pm 0.70 ^a	2.85 \pm 0.47 ^a
Cell wall area fraction (%)	58.19 \pm 2.99 ^b	56.66 \pm 5.37 ^b	63.19 \pm 5.21 ^a

The fiber lumen diameter and density are the average of 4500–19,000 measurements across 3 biological replicates per line. The cell wall thickness is the average of measurements performed on 38,000–65,000 fibers across 3 biological replicates per line. Statistical significance was assessed through two ways ANOVA and groups defined using Tukey HSD post hoc test ($p < 0.05$; groups identified with letters a, b and c).

2.3. Both Lignin Content and Composition Are Modified in CBF-Overexpressors

In addition to these changes in wood structure, we observed an accumulation of phenolic compounds using Safranin–Astra blue counterstaining on stem transverse sections (Figure 6a). *EguCBF_Q-OE* plants showed a more intense Safranin red staining than controls in most tissues of the stem (Figure 6a, top panel). This intense staining was considerably attenuated by bleach treatment and washing (Figure 6a, bottom panel), suggesting a strong accumulation of hydrophobic compounds non-covalently bound to the cell wall structures in *EguCBF_Q-OE* plants. The staining profile of *EguCBF_K-OE* stem sections was similar to that of control plants.

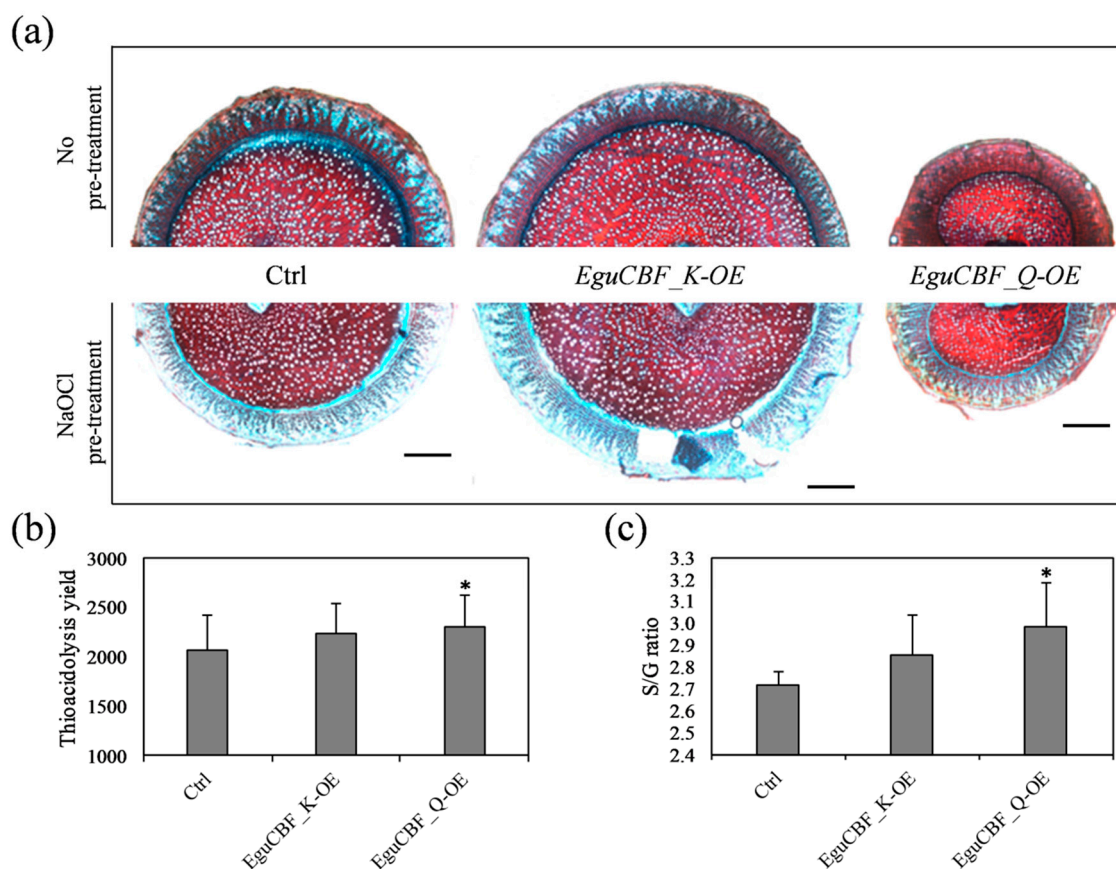


Figure 6. Impact of CBF overexpression on xylem biochemical composition. (a) Transversal stem sections stained with Safranin–Astra blue counterstaining before (top panel) and after (bottom panel) treatment with sodium hypochlorite (bleaching). (b) Total β -O-4 linked lignin and (c) lignin monomers ratio (S (syringyl)/G (Guaiacyl)) measured through thioacidolysis. Scale bar = 1 mm.

To further characterize the modifications occurring in secondary xylem, we analyzed lignin content and structure using thioacidolysis [30], a method that allows quantification of the amount and the composition of the non-condensed β -O-4 linked lignin polymer. As shown in Figure 6, the β -O-4 lignin content in stems of *EguCBF_Q*-OE plants was significantly increased by 11.8% as compared to controls, whereas *EguCBF_K*-OE showed a nonsignificant increase by 8.6% (Figure 6b). Besides these increases, significant changes were observed in the relative proportion of the S (Syringyl) versus G (Guaiacyl) monomers (Figure 6c). Indeed, the S/G ratio increased from 2.71 (controls) to 2.98 in line-*EguCBF_Q*-OE plants, reflecting either depletion in G monomers and/or enrichment in S monomers within the β -O-4 fraction of the lignin polymer. *EguCBF_K*-OE plants showed a nonsignificant increase of the S/G ratio.

2.4. Most Lignin Biosynthetic Genes Are Up-Regulated in CBF-Overexpressors

We then evaluated the impact of CBF overexpression on the relative expression of genes encoding enzymes of the different steps of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. We first analyzed the transcript levels of 15 of the 17 bona fide genes involved in lignin biosynthesis [31] in the secondary xylem of CBF-OE plants. In *EguCBF_Q*-OE plants, 10 of these 15 genes were more expressed than in controls with ratios ranging from 1.2 to 3.4 ($p < 0.05$ for 1 gene out of 3 genes tested using Student's t-test; Figure 7; Table S1). This included genes coding for at least one isoform contributing to each of the early steps of the general phenylpropanoid pathways (*EgrPAL9*, *EgrC4H1*, *EgrC4H2*, *EgrHCT4*, *EgrC3H3*, *EgrC3H4*, *EgrCCoAOMT1*, *EgrCCoAOMT2*). Consistent with the significant increase of the S/G ratio observed, the gene *EgrF5H1* involved in the biosynthesis of S monolignols was found upregulated by 2.8-fold in *EguCBF_Q*-OE plants, in comparison to control plants. Only 5 out of 15 bona fide genes were more expressed in *EguCBF_K*-OE plants than in controls with ratios ranging from 1.2 to 2.5 ($p < 0.05$ for 1 gene out of 3 genes tested using Student's t-test; Table S1), mainly involved in the early steps of lignin biosynthesis (*EgrPAL3*, *EgrPAL9*, *EgrHCT4*, *EgrC3H3*) and one gene involved in the final steps of lignin biosynthesis (*EgrCAD2*).

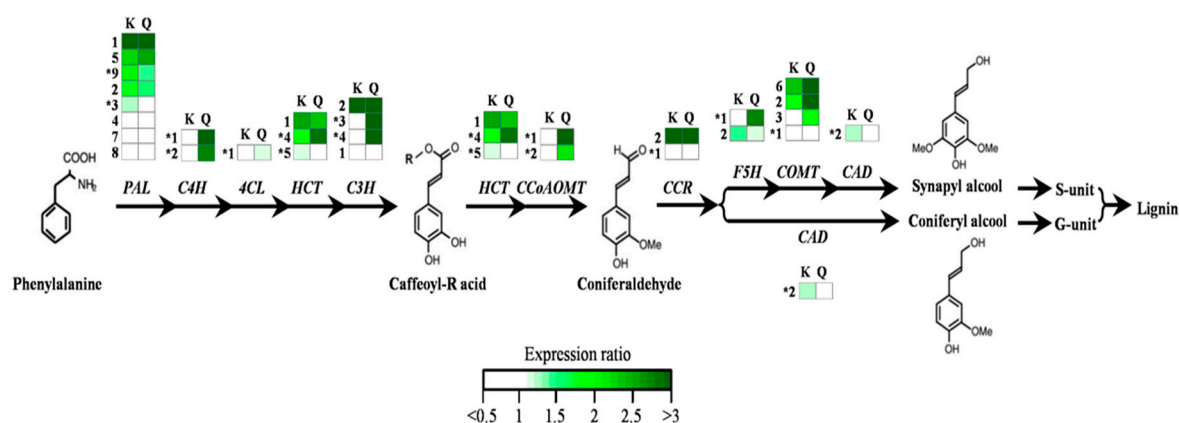


Figure 7. Impact of CBF overexpression on the relative expression of genes involved in the monolignol biosynthetic pathway. Transcript levels are relative to control plants, and were analyzed by RTqPCR. This pathway represents the main biosynthetic route toward the monolignols coniferyl and sinapyl alcohol, giving rise to G and S units, respectively, adapted from [32] (R = shikimic or quinic acid). The analyses included 17 bona fide genes (*) from the core vascular lignin toolbox involved in developmental lignification [31], and 14 additional isoforms showing induction in response to abiotic stresses in previous studies [4]. The green color in the heat maps illustrates induction of gene expression (ratio > 1) in transgenic CBF-OE plants, relative to control plants. Ratio values are provided in Table S1. Gene abbreviations are given according to [31]: PAL: phenylalanine ammonia lyase; C4H: cinnamate-4-hydroxylase; 4CL: 4-hydroxycinnamate CoA ligase; HCT: hydroxycinnamoyl transferase; C3H: *p*-coumarate 3-hydroxylase; CCR: cinnamoyl CoA reductase; CCoAOMT: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase; F5H: ferulate 5-hydroxylase; COMT: caffeic acid O-methyltransferase; CAD: cinnamyl alcohol dehydrogenase.

In addition to the core toolbox required for lignin biosynthesis in xylem, we analyzed the expression of 14 genes coding for additional isoforms either contributing to lignin biosynthesis or phenolic compound metabolism in *Eucalyptus* (Figure 7; Table S1; [31]). The majority of these genes had their expression increased in both CBF-OE lines, with 9 out of 14 genes upregulated in *EguCBF_Q*-OE by a factor up to 7.1 (significant for 3 genes out of 5 genes tested with Student's t-test; Table S1), and 9 out of 14 upregulated in *EguCBF_K*-OE plants by a factor up to 3.5 (significant for 4 genes out of 6 genes tested with Student's t-test; Table S1). Notably, the expression of 7 of these genes (*EgrPAL1*, *EgrHCT1*, *EgrC3H2*, *EgrCCR2*, *EgrCOMT2*, *EgrCOMT3*, and *EgrCOMT6*) was already found to be significantly upregulated upon cold exposure in *Eucalyptus* xylem, pointing to a putative role in the stress response [4].

Overall, the induction of at least one isoform for each of the 11 steps of the phenylpropanoid pathways is consistent with the significant increase in lignin content (Figure 6a) and the accumulation of phenolics observed in stem tissues (Figure 6c) of *EguCBF_Q*-OE plants. The phenotype of *EguCBF_K*-OE plants showing neither a significant increase of lignin content nor an apparent accumulation of phenolics is in accordance with the induction of only a few bona fide genes and, overall, only some steps of the phenylpropanoid pathway.

3. Discussion

Early work on the CBF gene family in *Eucalyptus* allowed for the identification of two CBF genes (*EguCBF1a* and *EguCBF1b*) from the cold-tolerant species *E. gunnii* [24,33]. Since then, we characterized the CBF gene family in *E. gunnii* from our in-house genome draft [23], and *EguCBF1a* and *EguCBF1b* were renamed *EguCBF_K* and *EguCBF_Q*, respectively. Through characterization of the CBF gene family in *E. grandis* [22], we also established putative orthologies between CBF members of these two species showing contrasted tolerance to cold [23]. Indeed, *EgrCBF6* (*Eucgr.A02824*) and *EgrCBF14* (*Eucgr.A02834*) from *E. grandis* were identified as putative orthologs of *EguCBF_K* and *EguCBF_Q*, respectively.

EguCBF_Q was shown to be strongly induced in *E. gunnii* stems in response to cold, and *EguCBF_K* was found to be induced in the stem in response to cold to a lesser extent, but with preferential expression in leaves [22,23].

Motivated by the findings that, on the one hand, wood formation is deeply modified by long exposure to chilling temperatures in *Eucalyptus* [4] and, on the other hand, that some CBF genes are strongly cold-induced in stems [23], this study aimed at evaluating the role of two of these TFs in controlling wood formation in response to cold.

As previously observed at the micro-cutting stage [21], the phenotyping of rooted six-month-old CBF-OE plants revealed an improvement in frost tolerance together with primary and secondary growth reduction, especially dramatic for plants overexpressing *EguCBF_Q*. Here, we showed that CBF ectopic expression triggered substantial remodeling of xylem architecture and composition, a phenotype that has never been reported before in any plant species studied.

The vascular phenotype of CBF-OE lines included a reduction of xylem vessel diameter together with an increase of vessel density. Reduction of vessel diameter is the most common anatomical wood trait associated with adverse growing conditions such as altitude, frost, or aridity [9,34,35]. Typically observed in angiosperms including *Eucalyptus*, this reduction in vessel surface is compensated for by an increase in vessel density [9].

With regard to fibers, the increase in cell density (i.e., the significant decrease of cell diameter) observed in CBF-OE mimics the cold-induced changes observed after long exposure of *Eucalyptus* trees to chilling temperatures [4]. When cambial and differentiating xylem zones were more precisely observed, the number of immature cell layers of the CBF-OE was reduced as compared to controls. Such a reduction is commonly reported for deciduous trees during autumnal cold-hardening [36]. This modified dynamic of cell maturation suggests a strong reduction of the cambial activity/expanding zone resembling the dormancy of deciduous trees. Of note, a growing number of reports describe the

upregulation of *CBF* in the cambial zone upon dormancy [37], suggesting involvement of *CBF* in the control of cambial activity in trees [34,38–42].

Overall, these *CBF*-OE phenotypes highlighted a deep remodeling of xylem architecture that mostly mimics adaptive features related to plants withstanding stressful environments. The functional significance of the *CBF*-induced changes in *Eucalyptus* wood with regard to stress resistance was supported by both a higher cold tolerance of the stems and a predicted lower vulnerability of the vessels to embolism [35,43]. Beyond the vascular traits, the fiber characteristics of the *CBF*-OE lines may positively influence survival under adverse environmental conditions. The overall increase in cell wall surface as well as the increased lignin content supported by induction of expression of lignin biosynthesis genes as observed in the xylem of *CBF*-overexpressors, may also positively impact cavitation resistance as shown in different species including *Eucalyptus* [44,45]. More generally, these traits likely participate in strengthening the cell walls to prevent freezing damage or cell collapse as reported for cold-hardened plants [46]. Altogether, this data provides evidence that *CBF* overexpression globally promotes the protection of woody organs from frost damage.

The cost of this “safer” phenotype is obviously a clear reduction of growth as observed for *EguCBF_Q*-OE plants. Xylem characteristics may participate in this reduction, since narrow vessels negatively impact hydraulic conductivity [43]. Among overwintering evergreens, *Eucalyptus* is well known for its high hydraulic conductivity associated to a relatively high sensitivity to embolism after freeze–thaw events [6]. In response to constitutive *CBF* overexpression, which extensively mimics changes associated to adaptation to adverse environmental factors, the response is moved towards safety and reduced hydraulic conductivity. Overall, this *CBF*-OE phenotype highlights the importance of xylem traits in the trade-off between safety (stress resistance) and growth. The presented data also raise the question of the potential involvement of *CBF* as a potential master player in controlling this compromise.

The present study clearly shows that at least one *Eucalyptus CBF* member (*EguCBF_Q*), which is induced by cold in stems and leads to the most severe modifications of xylem when overexpressed, can control secondary growth in addition to the well-known roles in promoting cold protection and reducing primary growth. By inducing remodeling of anatomy and physiology of both leaves and stems, *CBF* would allow eucalypts to face adverse environments, thereby compensating for the lack of avoidance strategies such as leaf fall and endodormancy.

This novel role for *CBF* in the cross-talk between cold response and wood formation supports that remodeling xylem structure and composition through the *CBF*-signaling pathway is an adaptive strategy to face stress since it is safer to maintain conductivity under stressful conditions. Given that additional *CBF* copies and/or higher expression have been suggested as the main drivers in *E. gunnii* to adapt to a temperate climate [23], the role of potential orthologs of *EguCBF_Q* in *Eucalyptus* genotypes sensitive to frost needs to be addressed.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

We previously transformed *E. urophylla* x *E. grandis* (clone 201) using *A. tumefaciens*, a cold sensitive hybrid, with the coding sequences of two genes *EguCBF1a* and *EguCBF1b* (originated from the cold tolerant *E. gunnii*) under the control of the 35S*CaMV* promoter [21]. These sequences were renamed *EguCBF_K* and *EguCBF_Q*, respectively, after annotation of *CBFs* in the genome of *E. gunnii* [23].

We then developed a protocol to root these lines, which were maintained as micro-cuttings by first promoting shoot elongation under low-intensity light ($62 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$) in MS medium [47] supplemented by benzylaminopurine (BAP, 0.5 μM ; Sigma, St. Louis, MO, USA; Table S2). Three centimeter long shoots were transferred on 1/4 MS medium supplemented by indol-butyric acid (IBA, 10 μM ; Sigma, St. Louis, MO, USA) for three days in the dark at 22 °C to induce root formation. The root elongation phase was conducted in standard conditions for light (16 h/light)

and temperature (25 °C-day/22 °C-night) on hormone-free medium (1/4 MS-based) supplemented by charcoal (0.5 g/L; Sigma, St. Louis, MO, USA). After acclimatization on compost supplemented by a fungicide (Propamocarbe fosetyl, 0.3%; Bayer, Leverkusen, Germany) in mini-greenhouses, the rooted plants were grown in a controlled-environment chamber at 25 °C-day/22 °C-night with a long-day photoperiod (16 h/light, 115 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ supplied by Lumilux Daylight 58 W Osram, Munich, Germany). Out of 15 independent overexpressing transgenic lines previously characterized for their increased frost tolerance [21], the present study used lines A25 (*EguCBF_K-OE*), B9 (*EguCBF_Q-OE*) and controls transformed with empty vectors (pK7). After 6 months of ex vitro culture, we measured the main axis height, the stem diameter at the bottom of the main axis, and the branching. We also measured the size (length and width) of 20 mature leaves from 3 plants for each line.

4.2. Freezing Tolerance Assessment Using the Ion Leakage Method

From 3 individual plants per line, we collected 8 fresh leaf discs (7 mm diameter) from fully developed leaves (5th rank) and 8 stem fragments (1 cm-long) sampled from the basal part of the plants' main axes. Samples were transferred into tubes containing 20 mL of de-ionized water and kept at 4 °C overnight. The tubes were transferred into a cryostat (CC2 Huber, Offenburg, Germany) for monitoring the freezing speed ($-2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}^{-1}$). At $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$, frost was induced by adding an ice cube made from 3 mL of de-ionized water. After freezing at $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-5.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-6.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, and $-6.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ for leaf discs and $-5.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-7.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, and $-8.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for stem segments, the samples were transferred at 4 °C for thawing slowly overnight. The electrolyte conductivity (E_c) of the solution was measured with a conductance meter (Consort C532, Consort, Turnhout, Belgium) initially (E_{ci}), after thawing (E_{cf}), and finally after the total cell destruction by autoclaving at 121 °C for 15 min (E_{ct}). The cell membrane injuries were calculated as $(E_{cf} - E_{ci}) / (E_{ct} - E_{ci}) \times 100$ [48] and expressed as injury indexes (%) representing the susceptibility to frost. Mean values of injury indexes were statistically analyzed by using one-way ANOVA and Tukey HSD post hoc tests implemented in R.

4.3. Microscopy and Histochemistry

From the basal parts of plants main axes, stem segments (1 cm-long) were fixed in 3.7% formaldehyde, then dehydrated in 80% ethanol, and a fragment was embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd., London, UK). Semi-thin sections (1 μm) were stained with TBO (Toluidine Blue O, Sigma, St. Louis, MO, USA) as previously described [4]. Semi-automatic image acquisition was performed on 3–9 sections (from 3 individual plants per line) in a bright field at 40 \times magnification using a Nanozoomer C9600-12 (Hamamatsu, Shizuoka, Japan). The resulting images of whole sections were exported from raw data using NDPview 2.3.1 (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) and xylem anatomical characteristics were measured with ImageJ software (V1.5).

Using the particle analysis tool of ImageJ, the lumen cross-sectional area of only functional vessels present in xylem (i.e., vessels without tyloses, diameter $\geq 14\mu\text{m}$) was measured automatically. For each transformed line (3 biological replicates), we calculated the average vessel lumen diameter (D , in μm) and the vessel density (N , in mm^{-2}) from a total of 2700–6600 vessels. The xylem porosity, defined as the percentage of xylem area occupied by vessels, was inferred from the cumulated area of vessel lumens. The potential xylem vulnerability index ($VI = D/N$) representing the vulnerability to hydraulic failure was calculated as the ratio between the average vessel diameter (D) and the vessel density (N) as defined by [49]. The theoretical area-specific conductivity (K_s , in $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-1}/\text{MPa}^{-1}/\text{s}^{-1}$) of sapwood was extrapolated from these anatomical measurements according to the modified Hagen–Poiseuille equation for capillaries: $K_s = (\pi \cdot \rho / 128 \cdot \eta \cdot A) \cdot \sum D_i^4$, where ρ is the density of water at 20 °C (Kg/m^{-3}) and η the dynamic viscosity of water at 20 °C (MPa/s^{-1}) [50,51]. The proportion of vessels containing tyloses was calculated as the ratio of vessels showing blue stained material within the lumen, over the total number of vessels, counted manually in a stem sector (from pith to bark) randomly chosen within each section.

Similarly, as for vessels, fibers were automatically detected and their individual lumen cross-sectional areas measured using ImageJ on many representative zones located within the mature xylem and exclusively containing fibers. The average fiber lumen diameter (μm) and the average fiber density (number per mm^2) were calculated from a total of 4500–19,000 fiber cells measured in 3 biological replicates for each line. The average cell wall thickness of fibers was extrapolated from the total cell wall area, the total fiber lumen area, and the fiber density. Cell wall thickness of differentiating fiber cells was measured on a total of 31–58 fiber cell files across 3 biological replicates per line. Statistical significance of the results was assessed using one-way ANOVA and Tukey HSD post hoc tests implemented in R.

To observe accumulation of hydrophobic compounds, 60- μm -thick stem transverse sections were stained with Astra blue and counterstained with Safranin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Sections stored in 80% ethanol were first rehydrated for 10 min in distilled water, pretreated or not with 1% (*v/v*) sodium hypochlorite solution, and then immersed successively for 10 min in 1% (*m/v*) of aqueous Astra blue, and in 0.1% (*m/v*) aqueous Safranin, with an intermediate washing step in distilled water.

4.4. Lignin Content and Monomer Composition

Bark-free samples from the basal parts of the plant main stem axes were oven-dried for 48 h at 60 °C and then ground to powder. Lignin content and structure were evaluated using the simplified thioacidolysis method described by Méchin et al. [30] using 10 mg of pre-extracted tissues as described in Ployet et al. [4].

4.5. RNA Isolation and RT-qPCR Analysis

The transcript quantification of the *CBF* transgene and of genes encoding phenylpropanoid pathway genes previously identified in *Eucalyptus* [22,31] was completed as follows. Total RNA was extracted from 50 mg of frozen samples (leaves or stems) from 3 biological replicates per line using the CTAB-based protocol and following DNase treatment using Ambion[®] DNase I (Thermo Fisher, Waltham, MA, United States). cDNA was produced from 3 μg of RNA, as previously described [23]. The RT-qPCR reactions were performed using 1 μL of 1/10 diluted cDNA template and Applied Biosystems[®] Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, United States), as described previously [52]. Primers used in this study were previously designed [31] and are listed in Table S3. The changes in gene expression relative to control plants were quantified using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [53] using five reference genes [52] (Table S1), and statistically assessed using Student's *t*-test when the number of biological replicates per line was higher or equal to three.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/3019/s1>. Table S1: Expression ratios and results of statistical tests performed on genes related to monolignol biosynthesis pathway in CBF-OE transgenic lines and controls; Table S2: Composition of MS medium (W4) used for promoting shoot elongation in propagation of transgenic and control lines; Table S3: List of primers used for analysis of transcript level of lignin-related genes by RT-qPCR.

Author Contributions: Conceptualization, C.T. and C.M.; data curation, C.T., C.M., F.M. and R.P.; validation: C.T., C.M. and R.P.; writing—original draft preparation: C.T. and C.M.; writing—review and editing: C.T., C.M., J.G.-P., and R.P.; visualization: C.T., C.M., J.G.-P. and R.P.; supervision: C.T.; project administration: J.G.-P.; funding acquisition, C.T. and J.G.-P. Methodology: R.P. (Image analyses); Y.M. (Microscopy); N.L. (RT-qPCR); Resources: P.B.C. (transgenic line rooting, plant material production, stem sections); C.N. and A.D. (plant production, stem sections). Formal analysis: P.B.C. (Histochemistry, freezing tolerance assessment, gene expression analysis); C.N. (freezing tolerance assessment, gene expression analysis); R.P. (Image analyses) and F.M. (thioacidolysis). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the University Paul Sabatier Toulouse III (UPS), the French MERI (Ministry of Education, Research and Innovation), and the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). This research was also financially supported by the Vietnamese government for PhD grants (P.B. Cao and C. Nguyen).

Acknowledgments: We acknowledge Ines Hadj-Bachir for her help with sequence analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

4CL	4-hydroxycinnamate CoA ligase
ANOVA	Analysis of variance
AP2/ERF	APETALA2/ethylene-responsive element binding factor
BAP	Benzylaminopurine
C3H	<i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase
C4H	Cinnamate-4-hydroxylase
CAD	Cinnamyl alcohol dehydrogenase
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CBF	CRT-repeat binding factors
DREB	Dehydration responsive element binding protein
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA 3- <i>O</i> -methyltransferase
CCR	Cinnamoyl-CoA reductase
cDNA	Complementary DNA
COMT	Caffeic acid <i>O</i> -methyltransferase
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
Ec	Electrolyte conductivity
F5H	Ferulate 5-hydroxylase
G	Guaiacyl
HCT	Hydroxycinnamoyl transferase
HSD	Honestly significant difference
IBA	Indol-butyric acid
OE	Overexpression
PAL	Phenylalanine ammonialyase
PCR	Polymerase chain reaction
RTqPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
S	Syringyl
SCW	Secondary cell wall
TBO	Toluidine blue O
TF	Transcription factor
VI	Vulnerability index

References

- Hanewinkel, M.; Cullmann, D.A.; Schelhaas, M.J.; Nabuurs, G.J.; Zimmermann, N.E. Climate change may cause severe loss in the economic value of European forest land. *Nat. Clim. Chang.* **2013**, *3*, 203–207. [[CrossRef](#)]
- Myburg, A.A.; Grattapaglia, D.; Tuskan, G.A.; Hellsten, U.; Hayes, R.D.; Grimwood, J.; Jenkins, J.; Lindquist, E.; Tice, H.; Bauer, D.; et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **2014**, *510*, 356–362. [[CrossRef](#)]
- Teulieres, C.; Bossinger, G.; Moran, G.; Marque, C. Stress studies in *Eucalyptus*. *Plant Stress*. **2007**, *1*, 197–215.
- Ployet, R.; Soler, M.; Carocha, V.; Ladouce, N.; Alves, A.; Rodrigues, J.-C.; Harvengt, L.; Marque, C.; Teulieres, C.; Grima-Pettenati, J.; et al. Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*. *Tree Physiol.* **2018**, *38*, 409–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Butnor, J.R.; Johnsen, K.H.; Anderson, P.H.; Hall, K.B.; Halman, J.M.; Hawley, G.J.; Maier, C.A.; Schaberg, P.G. Growth, photosynthesis, and cold tolerance of *eucalyptus benthamii* planted in the piedmont of North Carolina. *For. Sci.* **2019**, *65*, 59–67.
- Choat, B.; Medek, D.E.; Stuart, S.A.; Pasquet-Kok, J.; Egerton, J.J.G.; Salari, H.; Sack, L.; Ball, M.C. Xylem traits mediate a trade-off between resistance to freeze-thaw-induced embolism and photosynthetic capacity in overwintering evergreens. *New Phytol.* **2011**, *191*, 996–1005. [[CrossRef](#)]
- Mauriat, M.; Le Provost, G.; Rozenberg, P.; Delzon, S.; Breda, N.; Clair, B.; Coutand, C.; Domec, J.-C.; Fourcaud, T.; Grima-Pettenati, J.; et al. Wood formation in trees. In *Tree Biotechnology*; Ramawat, K.G., Merillon, J.M., Ahuja, M.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2014; p. 656. ISBN 9781466597143.

8. Zinkgraf, M.; Liu, L.; Groover, A.; Filkov, V. Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytol.* **2017**, *214*, 1464–1478. [[CrossRef](#)]
9. Pfautsch, S.; Harbusch, M.; Wesolowski, A.; Smith, R.; Macfarlane, C.; Tjoelker, M.G.; Reich, P.B.; Adams, M.A. Climate determines vascular traits in the ecologically diverse genus *Eucalyptus*. *Ecol. Lett.* **2016**, *19*, 240–248. [[CrossRef](#)]
10. Camargo, E.L.O.; Nascimento, L.C.; Soler, M.; Salazar, M.M.; Lepikson-Neto, J.; Marques, W.L.; Alves, A.; Teixeira, P.J.P.L.; Mieczkowski, P.; Carazzolle, M.F.; et al. Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 256. [[CrossRef](#)]
11. Paux, E.; Carocha, V.; Marques, C.; De Sousa, A.M.; Borralho, N.; Sivadon, P.; Grima-Pettenati, J. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. *New Phytol.* **2005**, *167*, 89–100. [[CrossRef](#)]
12. Ye, Z.-H.; Zhong, R. Molecular control of wood formation in trees. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 4119–4131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Camargo, E.L.O.; Ployet, R.; Cassan-Wang, H.; Mounet, F.; Grima-Pettenati, J. Digging in wood: New insights in the regulation of wood formation in tree species. *Adv. Bot. Res.* **2018**, *89*, 201–233.
14. Taylor-Teeples, M.; Lin, L.; de Lucas, M.; Turco, G.; Toal, T.W.; Gaudinier, A.; Young, N.F.; Trabucco, G.M.; Veling, M.T.; Lamothe, R.; et al. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **2015**, *517*, 571–575. [[CrossRef](#)]
15. Guo, H.; Wang, Y.; Wang, L.; Hu, P.; Wang, Y.; Jia, Y.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Wang, C.; et al. Expression of the MYB transcription factor gene BplMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*. *Plant Biotechnol. J.* **2017**, *15*, 107–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Xu, C.; Fu, X.; Liu, R.; Guo, L.; Ran, L.; Li, C.; Tian, Q.; Jiao, B.; Wang, B.; Luo, K.; et al. PtoMYB170 positively regulates lignin deposition during wood formation in poplar and confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Tree Physiol.* **2017**, *37*, 1713–1726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Park, S.; Lee, C.-M.; Doherty, C.J.; Gilmour, S.J.; Kim, Y.; Thomashow, M.F. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant J.* **2015**, *82*, 193–207. [[CrossRef](#)]
18. Lata, C.; Prasad, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 4731–4748. [[CrossRef](#)]
19. Akhtar, M.; Jaiswal, A.; Taj, G.; Jaiswal, J.P.; Qureshi, M.I.; Singh, N.K. DREB1/CBF transcription factors: Their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J. Genet.* **2012**, *91*, 385–395. [[CrossRef](#)]
20. Mizoi, J.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* **2012**, *1819*, 86–96. [[CrossRef](#)]
21. Navarro, M.; Ajax, C.; Martinez, Y.; Laur, J.; El Kayal, W.; Marque, C.; Teulieres, C. Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. *Plant Biotechnol. J.* **2011**, *9*, 50–63. [[CrossRef](#)]
22. Cao, P.B.; Azar, S.; SanClemente, H.; Mounet, F.; Dunand, C.; Marque, G.; Marque, C.; Teulieres, C. Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *eucalyptus grandis*: An intriguing over-representation of stress-responsive DREB1/CBF genes. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nguyen, H.C.; Cao, P.B.; San Clemente, H.; Ployet, R.; Mounet, F.; Ladouce, N.; Harvengt, L.; Marque, C.; Teulieres, C. Special trends in CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs. *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance. *Physiol. Plant.* **2017**, *159*, 445–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Navarro, M.; Marque, G.; Ajax, C.; Keller, G.; Borges, J.P.; Marque, C.; Teulieres, C. Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 2713–2724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Steffen, K.L.; Arora, R.; Palta, J.P. Relative sensitivity of photosynthesis and respiration to freeze-thaw stress in herbaceous species. *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 1372–1379. [[CrossRef](#)]
26. Kolb, K.J.; Sperry, J.S. Differences in drought adaptation between subspecies of sagebrush (*Artemisia tridentata*). *Ecology* **1999**, *80*, 2373–2384. [[CrossRef](#)]
27. Hacke, U.G.; Sperry, J.S.; Wheeler, J.K.; Castro, L. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency. *Tree Physiol.* **2006**, *26*, 689–701. [[CrossRef](#)]

28. Tixier, A.; Cochard, H.; Badel, E.; Dusotoit-Coucaud, A.; Jansen, S.; Herbette, S. Arabidopsis thaliana as a model species for xylem hydraulics: Does size matter? *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2295–2305. [[CrossRef](#)]
29. Arbellay, E.; Fonti, P.; Stoffel, M. Duration and extension of anatomical changes in wood structure after cambial injury. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3271–3277. [[CrossRef](#)]
30. Méchin, V.; Laluc, A.; Legée, F.; Cézard, L.; Denoue, D.; Barrière, Y.; Lapiere, C. Impact of the brown-midrib *bm 5* mutation on maize lignins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5102–5107. [[CrossRef](#)]
31. Carocha, V.; Soler, M.; Hefer, C.; Cassan-Wang, H.; Fevereiro, P.; Myburg, A.A.; Paiva, J.A.P.; Grima-Pettenati, J. Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* **2015**, *206*, 1297–1313. [[CrossRef](#)]
32. Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **2010**, *153*, 895–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. El Kayal, W.; Navarro, M.; Marque, G.; Keller, G.; Marque, C.; Teulieres, C. Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from *Eucalyptus* in response to cold. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2455–2469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bhalerao, R.P.; Fischer, U. Environmental and hormonal control of cambial stem cell dynamics. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 79–87. [[CrossRef](#)]
35. Bourne, A.E.; Creek, D.; Peters, J.M.R.; Ellsworth, D.S.; Choat, B. Species climate range influences hydraulic and stomatal traits in *Eucalyptus* species. *Ann. Bot.* **2017**, *120*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wu, H.; Xu, H.; Li, H.; Wei, D.; Lin, J.; Li, X. Seasonal development of cambial activity in relation to xylem formation in Chinese fir. *J. Plant Physiol.* **2016**, *195*, 23–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schrader, J.; Nilsson, J.; Mellerowicz, E.; Berglund, A.; Nilsson, P.; Hertzberg, M.; Sandberg, G. A high-resolution transcript profile across the wood-forming meristem of poplar identifies potential regulators of cambial stem cell identity. *Plant Cell* **2004**, *16*, 2278–2292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kendall, S.L.; Hellwege, A.; Marriot, P.; Whalley, C.; Graham, I.A.; Penfield, S. Induction of dormancy in Arabidopsis summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *Plant Cell* **2011**, *23*, 2568–2580. [[CrossRef](#)]
39. Wisniewski, M.; Norelli, J.; Bassett, C.; Artlip, T.; Macarasin, D. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta* **2011**, *233*, 971–983. [[CrossRef](#)]
40. Wisniewski, M.; Norelli, J.; Artlip, T. Overexpression of a peach CBF gene in apple: A model for understanding the integration of growth, dormancy, and cold hardiness in woody plants. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 85. [[CrossRef](#)]
41. Artlip, T.S.; Wisniewski, M.E.; Bassett, C.L.; Norelli, J.L. CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. *Tree Physiol.* **2013**, *33*, 866–877. [[CrossRef](#)]
42. Zhao, C.; Zhang, Z.; Xie, S.; Si, T.; Li, Y.; Zhu, J.K. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, 2744–2759. [[PubMed](#)]
43. Vander Willigen, C.; Pammenter, N.W. Relationship between growth and xylem hydraulic characteristics of clones of *Eucalyptus* spp. at contrasting sites. *Tree Physiol.* **1997**, *18*, 595–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jacobsen, A.L.; Ewers, F.W.; Pratt, R.B.; Paddock, W.A.; Davis, S.D. Do xylem fibers affect vessel cavitation resistance? *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 546–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Barotto, A.J.; Monteoliva, S.; Gyenge, J.; Martinez-Meier, A.; Fernandez, M.E. Functional relationships between wood structure and vulnerability to xylem cavitation in races of *Eucalyptus globulus* differing in wood density. *Tree Physiol.* **2018**, *38*, 243–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Gall, H.; Philippe, F.; Domon, J.; Gillet, F.; Pelloux, J.; Rayon, C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* **2015**, *4*, 112–166. [[CrossRef](#)]
47. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497.
48. Bajji, M.; Kinet, J.M.; Lutts, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* **2002**, *36*, 61–70. [[CrossRef](#)]
49. Carlquist, S. Ecological factors in wood evolution: A floristic approach. *Am. J. Bot.* **1977**, *64*, 887–896. [[CrossRef](#)]

50. James, S.A.; Meinzer, F.C.; Goldstein, G.; Woodruff, D.; Jones, T.; Restom, T.; Mejia, M.; Clearwater, M.; Campanello, P. Axial and radial water transport and internal water storage in tropical forest canopy trees. *Oecologia* **2003**, *134*, 37–45. [[CrossRef](#)]
51. Hajek, P.; Kurjak, D.; von Wühlisch, G.; Delzon, S.; Schuldt, B. Intraspecific variation in wood anatomical, hydraulic, and foliar traits in ten european beech provenances differing in growth yield. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 791. [[CrossRef](#)]
52. Cassan-Wang, H.; Soler, M.; Yu, H.; Camargo, E.L.O.; Carocha, V.; Ladouce, N.; Savelli, B.; Paiva, J.A.P.; Leplé, J.-C.; Grima-Pettenati, J. Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription-PCR analysis of gene expression in organs and tissues of Eucalyptus grown in various environmental conditions. *Plant Cell Physiol.* **2012**, *53*, 2101–2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D.; Kong, Y.; Kong, D.; Gao, Q.; Zhou, G.; Sandberg, G.; Tuominen, H.; Moritz, T.; Bhalerao, R.; et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

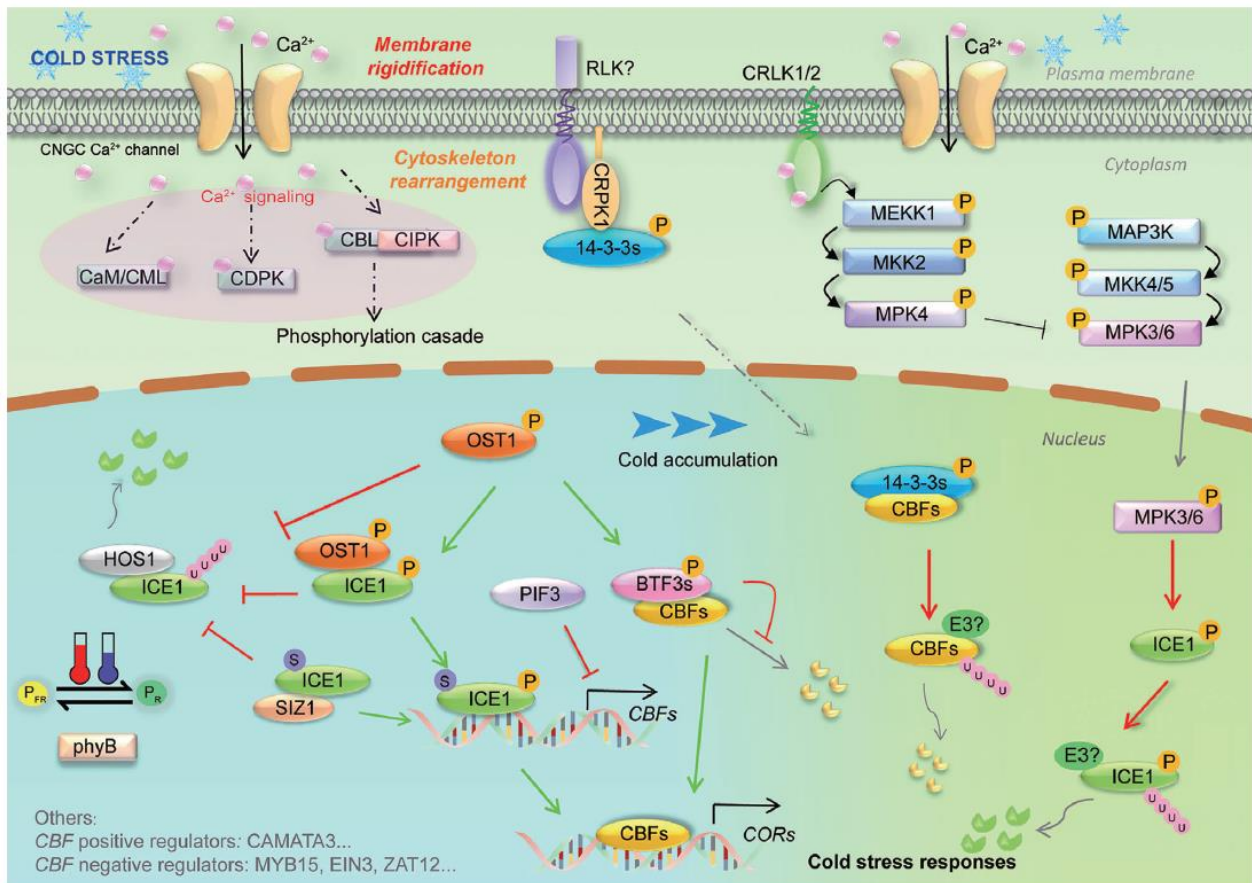


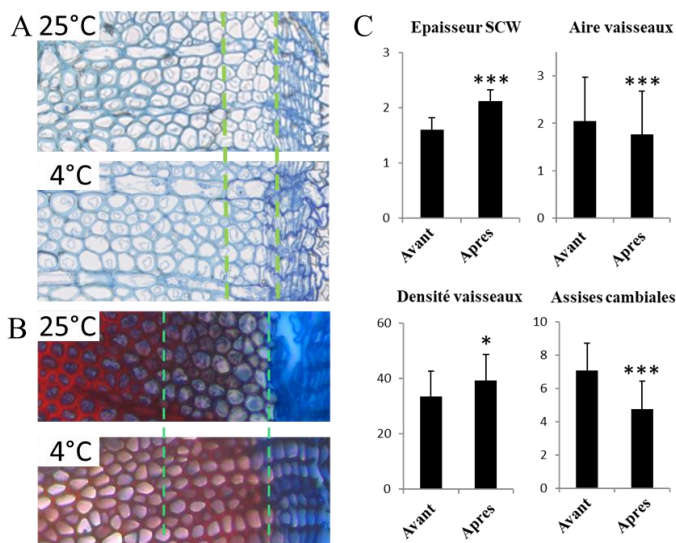
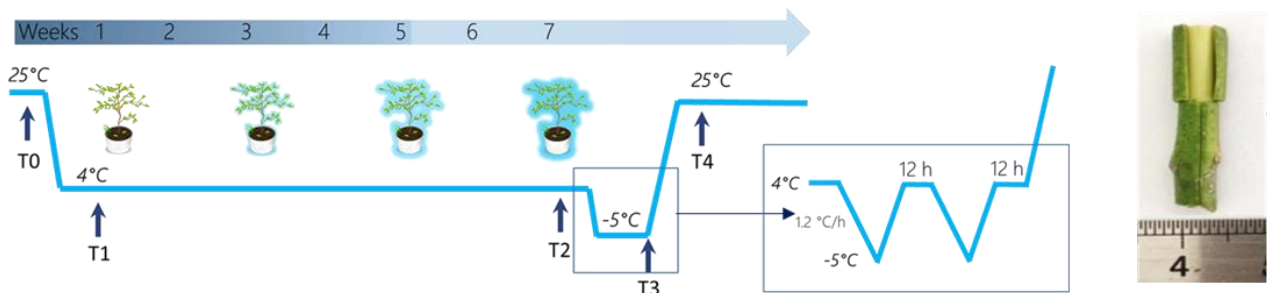
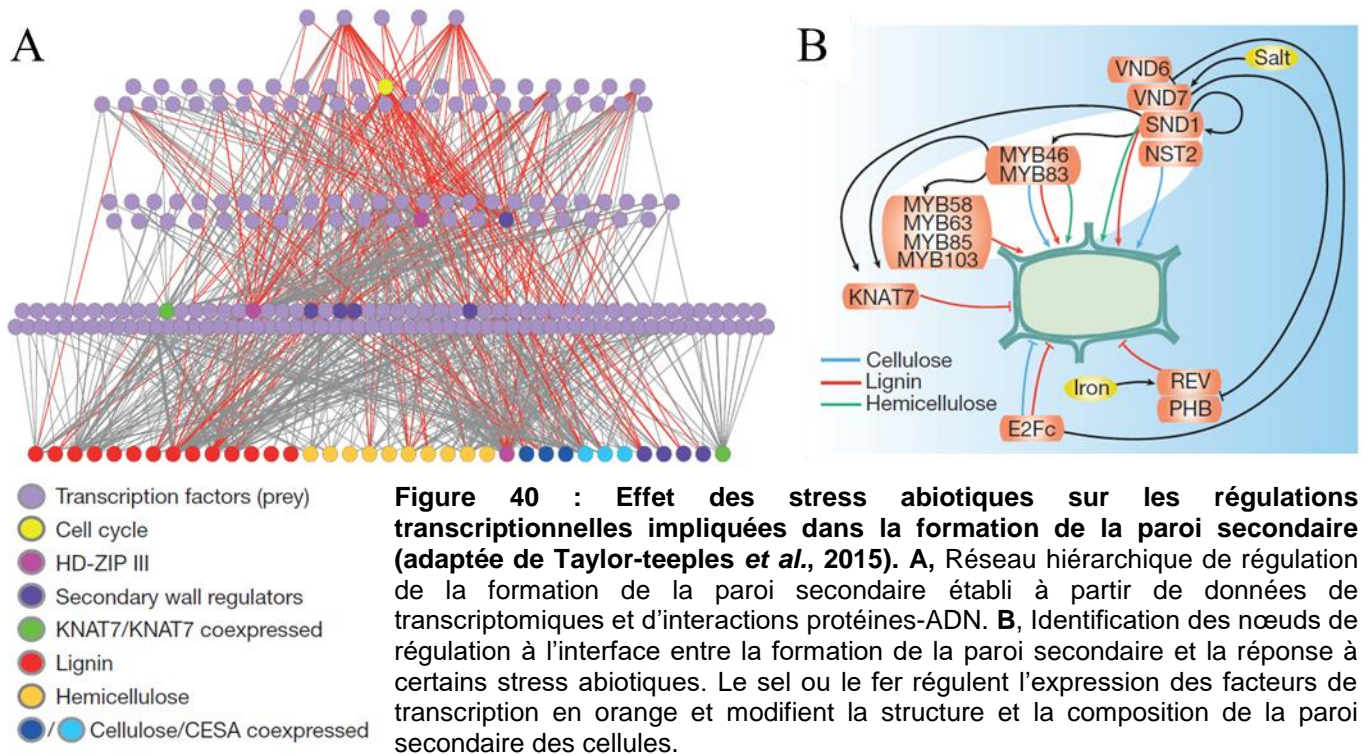
Figure 39: Schéma des cascades de signalisations induites en réponse au froid chez *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2018).

3.2.3 Identification des cibles transcriptionnelles des CBF dans le xylème

Les résultats de nos travaux montrent que la différenciation des cellules du bois (xylème), qui se fait à partir des cellules souches du cambium, est modifiée en réponse au froid (Ployet *et al.*, 2017). Lorsque les températures diminuent graduellement, l'Eucalyptus subit une période durant laquelle une reprogrammation de l'expression des gènes assure la mise en place de mécanismes de résistance au gel dans toutes les cellules de la plante.

Chez les plantes, la diminution de la température est perçue par un mécanisme complexe encore mal compris (**Figure 39**). En altérant la fluidité de la membrane plasmique, le froid pourrait induire (1) un influx de calcium, (2) des cascades de phosphorylation (MAPK), une induction de la voie de réponse à l'acide abscissique et (3) une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces signaux semblent agir de concert pour activer plusieurs voies de signalisation qui aboutissent à la production de molécules de défense (sucres / antioxydants / protéines protectrices). Parmi les facteurs de transcription impliqués dans ces voies de signalisation, les DREB1/CBF sont probablement les régulateurs les mieux caractérisés de la voie de réponse indépendante de l'ABA. Ils présentent une induction très rapide par le froid, de l'ordre de quelques dizaines de minutes, et stimulent l'expression de gènes cibles en se fixant sur des boîtes de régulation CRT/DRE présentes dans leur promoteur. Les études visant à identifier le régulon des gènes CBF sont contradictoires. Basées sur des approches de transcriptomique à partir de surexprimeur ou de mutant, certains travaux identifient une centaine de gènes cibles, d'autres les estiment à plus de 3000. Toutes s'accordent à dire que les CBF sont au cœur d'une régulation qui détermine un compromis (trade-off) entre croissance et défense (Shi *et al.*, 2016 ; N'Guyen *et al.*, 2017). Mais au-delà d'un ralentissement général de la croissance de la plante, très peu d'études ont cherché à déterminer si les voies de réponse au stress froid, et en particulier celle qui implique les CBF, pouvaient être connectées à certains processus de développement (à l'exception du rôle de la vernalisation dans le contrôle de la floraison, bien décrit dans la littérature).

Au cours de la phase d'acclimatation au froid, nous avons observé que la paroi secondaire des cellules du xylème s'épaissit et se lignifie, le nombre d'assises cambiales diminue, les vaisseaux sont plus nombreux et plus petits. Des phénotypes similaires sont observés lorsque l'on surexprime les CBF (Cao *et al.*, 2015, 2020 ; N'Guyen *et al.*, 2017). Les cibles des CBF qui pourraient expliquer ces phénotypes restent à découvrir pour mieux comprendre comment la réponse au froid et la xylogénèse sont interconnectées. Cependant, ces réponses sont complexes et impliquent probablement des centaines de gènes en interaction et dont la fonction, en particulier chez les arbres, reste inconnue.



Ces cinq dernières années ont vu l'essor de nouvelles générations d'analyses à l'échelle du génome qui ont considérablement affiné notre compréhension des voies de régulations impliquées dans la formation des tissus du bois. Des analyses à haut débit du transcriptome de ces tissus, couplées à la détection *in vitro* ou *in planta* des cibles directes des principaux facteurs de transcription régulant la xylogénèse, ont abouti à une vision plus détaillée de ce réseau de régulation transcriptionnelle hiérarchisé et des perturbations qu'il subit en condition de stress (**Figure 40**). C'est en développant des approches similaires que nous essayons de comprendre l'effet du froid sur la formation du bois chez l'Eucalyptus, qui est de toute évidence influencée par l'activation de la voie de signalisation impliquant les CBF lorsque la température diminue.

Dans le cadre de la thèse d'Ines Hadj Bachir, nous cherchons à déterminer (1) comment la voie de réponse au stress froid impliquant les facteurs de transcription CBF peut influencer la différenciation du xylème et (2) en quoi ces modifications peuvent contribuer à la tolérance générale de la plante. Pour répondre à ces questions, des hybrides d'*Eucalyptus gunnii*, sélectionnés par nos collaborateurs du FCBA (Foret, Construction, Bois, Ameublement) pour leur productivité et leur résistance exceptionnelle au gel, ont été soumis à une longue acclimatation au froid suivie de deux épisodes de gel nocturne (**Figure 41**). Des échantillons de xylème ont été prélevés à température optimale (TO, 25°C), 24h après la diminution de la température à 4°C (T1), après sept semaines d'acclimatation à 4°C (T2), après deux épisodes de gel nocturne (T3) et enfin 24h après un retour à une température optimale de croissance (T4). Cet échantillonnage a été calibré pour espérer observer : (i) les changements rapides de régulation en réponse à une variation de température (25°C-> 4°C, 4°C -> -5°C, 4°C > 25°C) et (ii) les effets du froid sur la structure et la composition du xylème, qui nécessitent plusieurs semaines à se mettre en place. Le xylème de la tige principale a été récolté à partir de 6 plantes indépendantes (copies clonale de l'hybride nommé 208) dans le but d'étudier le transcriptome du xylème, ainsi que l'analyse de la structure et de la composition de ce tissu par différentes approches. Les principales conclusions de ces travaux, en cours de valorisation sont décrites ci-dessous.

A/ Remodelage des tissus du bois sous l'effet de l'acclimatation au froid

L'analyse histologique, plus complète et robuste que dans les précédentes études, a confirmé que, dans la zone du xylème située sous le cambium qui est produite pendant l'acclimatation, la paroi secondaire des cellules est plus épaisse, plus lignifiée, les vaisseaux sont plus nombreux et plus petits. Le nombre d'assises cambiales est réduit à 4°C par rapport à une température de croissance optimale de 25°C. Comme nous l'avons déjà observé, la croissance à 4°C est ralentie mais se poursuit en générant de nouvelles cellules du xylème qui présentent une paroi secondaire aux propriétés modifiées.

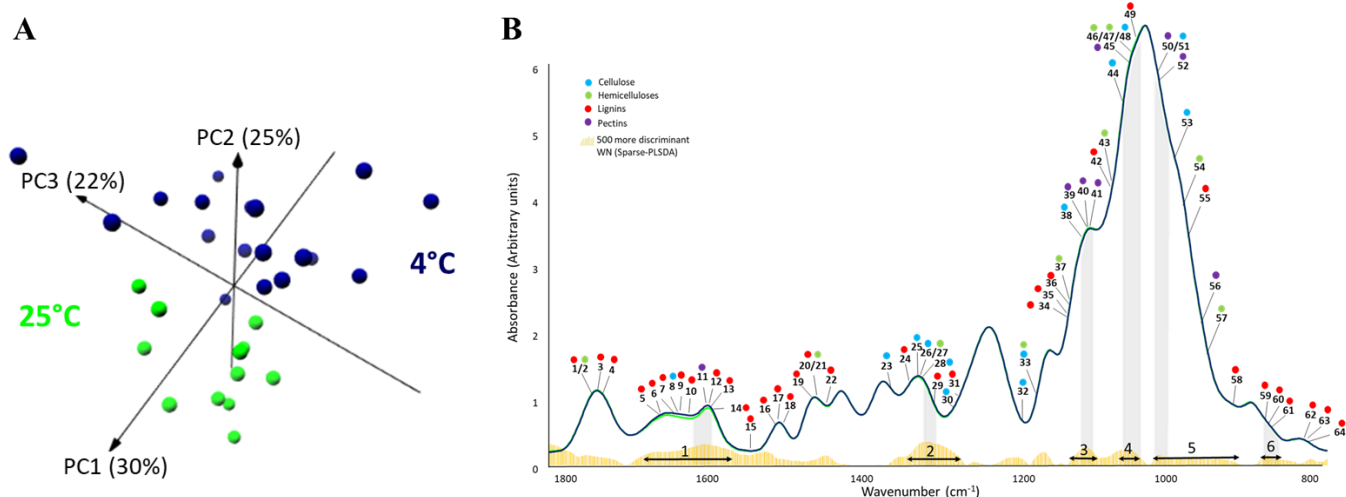


Figure 43: La comparaison des spectres FT-IR entre des plantes soumises au froid (4°C) et des plantes contrôles (25°C) révèle un changement global de composition de la paroi secondaire. **A**, L'analyse PLS-DA des valeurs normalisées de FT-IR (1800-800cm⁻¹) montre une différence marquée de composition de la SCW entre les conditions 4°C (bleu) et 25°C (vert). Les trois premières composantes expliquent 77% de la variabilité totale. **B**, Spectres médians des échantillons de xylème obtenus à 25°C et à 4°C. Les histogrammes jaunes représentent les valeurs absolues de la contribution des 500 meilleurs nombres d'onde à l'établissement de l'axe PC1, qui sépare le mieux les conditions 4°C et 25°C. Les pastilles de couleur représentent 64 nombres d'onde associés à différents composés de la paroi dans la littérature. Les flèches noires schématisent 6 zones du spectre FT-IR présentant des différences entre les conditions 4°C et 25°C. Les zones 1 et 6 sont majoritairement reliées à des composés de la lignine alors que les autres concernent des nombres d'onde associés à des polysaccharides.

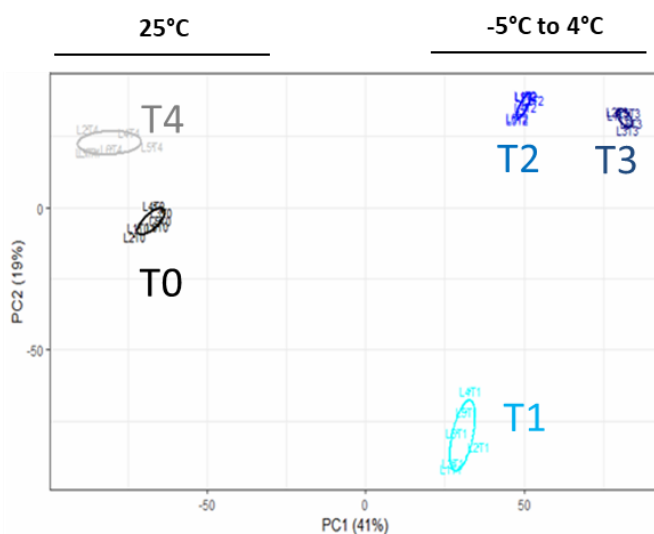


Figure 44: Analyse en composante principale obtenue à partir des données de transcriptome du xylème d'*Eucalyptus gunnii* soumis à une acclimation au froid. Les temps T0, T1, T2, T3 et T4 correspondent aux temps de récolte décrits dans la **Figure 41**. Les composantes 1 et 2 expliquent 41% et 19% de la variabilité totale, respectivement. Une reprogrammation de l'expression des gènes est détectée moins de 48h après exposition à une température de 4°C. Les transcriptomes des temps T0 et T4, récoltés à 25°C au début et à la fin d'expérience, sont très semblables. Au temps T4, certains gènes restent cependant différenciellement exprimés par rapport au temps T0, signe

que les effets du froid sur le transcriptome peuvent perdurer plus d'une semaine après retour à une température optimale. Les temps T2 et T3, récoltés après 7 semaines d'exposition au froid, sont séparés car les échantillons T3 ont été soumis à 2 nuits consécutives de températures gélives (-5°C). Pour chaque temps de récolte, le transcriptome a été analysé à partir de 6 répliques biologiques.

Afin de mieux caractériser la composition du bois formé en réponse au stress froid, nous avons procédé à des analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). J'ai adapté cette méthode à notre thématique afin de pouvoir analyser rapidement et de façon non destructive des différences de composition dans des échantillons de bois. Pour cela, j'ai bénéficié du savoir-faire de Guillermina Hernandez (DR INRA, LISBP - Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés), avec qui je collaborais dans le cadre d'une étude sur la digestion de la biomasse par des microbes présents dans l'estomac des termines (Dai *et al.*, 2020; Dumond *et al.*, 2021). La FTIR est une technique analytique efficace pour identifier rapidement les « familles chimiques » présentes au sein d'une poudre de xylème. Elle permet de mesurer l'absorbance de la lumière infrarouge par un échantillon et génère un spectre basé sur les groupes fonctionnels du matériau. Dans notre cas, les polymères pariétaux absorbent les longueurs d'ondes IR et le spectre produit est une véritable « empreinte digitale » caractéristique de la composition de l'échantillon de bois. J'ai adapté les approches statistiques développées précédemment pour faire ressortir les longueurs d'ondes expliquant les différences entre du xylème de plantes acclimatées et non acclimatées au froid (**Figure 43**). Sans une calibration rigoureuse et l'analyse de standards purifiés, il est difficile d'attribuer avec certitude l'absorbance à une LO donnée à la quantification d'un composé spécifique. Cependant, les données de la littérature permettent de suggérer quelles catégories de polymères pariétaux pourraient expliquer les différences observées. Dans notre cas, les profils FT-IR réalisés sur poudres brutes montrent une différence de composition de la paroi secondaire des cellules du xylème entre les conditions 25°C et 4°C. Lorsque l'on s'intéresse aux spectres acquis sur des parois purifiées, on observe que la structure et la composition de la lignine mais surtout des polysaccharides pariétaux (cellulose et hémicelluloses) pourraient être modifiées lors d'un stress froid (**Figure 43**). Les données de transcriptomiques acquises sur les mêmes échantillons renforcent cette hypothèse et permettent d'identifier les voies de régulation qui pourraient être impliquées.

B/ Les CBF sont au cœur d'un réseau de gènes co-exprimés en réponse au froid

L'analyse du transcriptome des tissus du xylème, prélevés aux différents points de la cinétique, a permis de détecter 10 488 DEG ($\log_2 \text{ratio d'expression} > |1|$ and $p\text{-value} < 0.05$, $n=6$). L'analyse en composantes principales des données d'expression permet de mettre en évidence une séparation marquée entre les échantillons récoltés à température optimale de 25°C et ceux qui ont subi une acclimatation au froid (**Figure 44**). La première composante sépare les échantillons récoltés après exposition au froid de ceux récoltés à 25°C. La seconde illustre des différences plus fines, concernant la réponse à court terme des cellules du xylème (après 48h à 4°C). La séparation des temps T0 et T4 montre qu'une semaine après un retour à 25°C, certains gènes restent encore différenciellement exprimés.

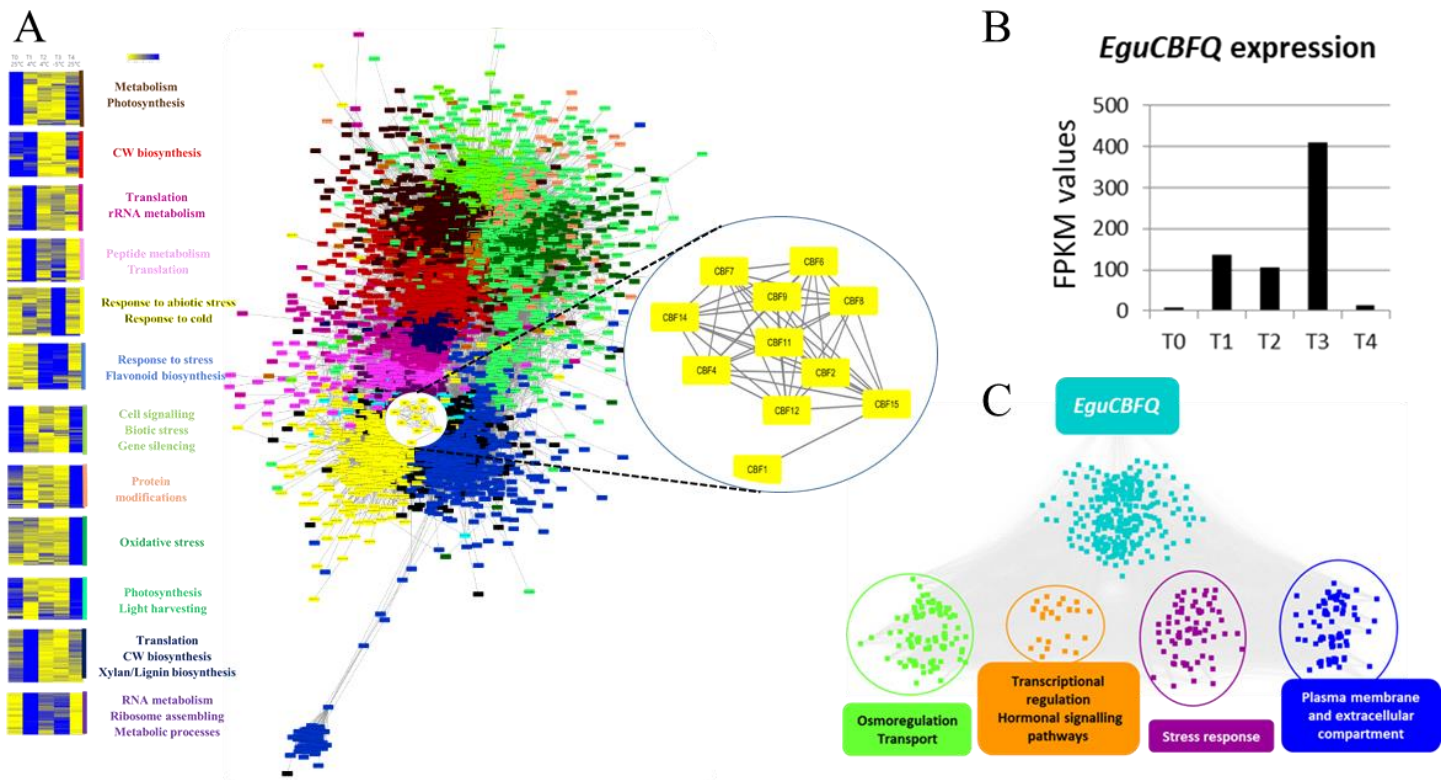


Figure 45: Analyse du transcriptome des cellules du xylème en réponse au froid. A, La construction d'un réseau de co-expression révèle 12 modules enrichis en gènes impliqués dans les mécanismes de protection vis-à-vis des stress abiotiques, la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules du xylème. Le profil d'expression des gènes de chaque module est représenté sur la gauche. Les facteurs de transcription CBF sont fortement corrélés entre eux au sein d'un sous réseau. B, *EguCBF_Q* est le CBF présentant la plus forte induction dans la tige de l'Eucalyptus. C, *EguCBF_Q* est directement connecté à >800 gènes dont certains sont impliqués dans la xylogénèse et le dépôt de la paroi secondaire.

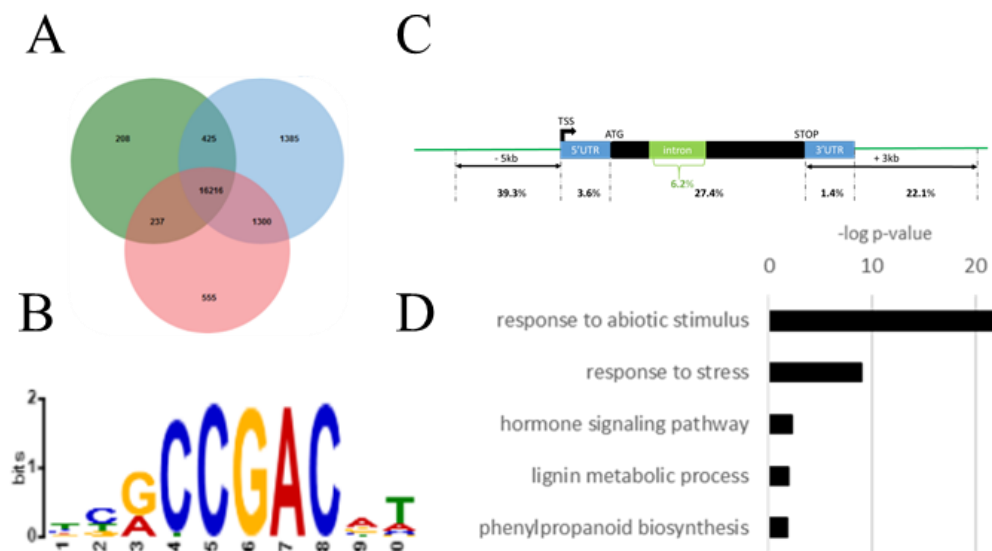


Figure 46: Analyse des cibles de *EguCBF_Q* par DAPseq. A, Nombres de régions *cis* fixées par *EguCBF_Q* dans 3 répliques techniques. Environ 16 000 sites de fixation potentiels ont été identifiés. B, Motif enrichi au sein de l'ensemble des cibles de *EguCBF_Q*. Ce motif correspond à l'élément *cis* canonique CRT/DRE reconnu par les CBF. C, Répartition des cibles de *EguCBF_Q* détectée par DAPseq. Plus de 60% des sites de fixation potentiels se retrouvent en amont ou au sein des gènes cibles. D, L'analyse d'enrichissement GO révèle que les cibles potentielles de *EguCBF_Q* sont impliquées majoritairement dans la réponse au stress, mais aussi dans les régulations hormonales et la synthèse de constituants pariétaux.

Ces données de séquençage d'ARN nous apportent des informations sur différents mécanismes, impliqués aussi bien dans des processus d'acclimatation à long terme que dans des réponses rapides vis-à-vis d'un froid modéré, d'un gel et d'une reprise de croissance. L'analyse de ces données par des approches de WGCNA nous a permis de générer un réseau de co-expression dont les DEG sont rassemblés au sein de 12 modules, selon leur profil d'expression (**Figure 45A**). Pour chaque module, les fonctions biologiques dans lesquelles ces DEG sont impliqués ont été étudiées par des analyses de Gene Ontology (GO). Dans le xylème d'une plante acclimatée au froid, de nombreux DEG sont reliés à la réponse au stress, la protection de la cellule, la synthèse de composés antioxydants et l'ajustement du métabolisme. Ces réponses sont encore renforcées en condition de gel. Mais au moins 3 modules présentent un enrichissement en DEG impliqués dans la formation du bois et la biosynthèse de composés pariétaux, en particulier lors de la phase précoce d'acclimatation et lors du retour à une température optimale. Au cœur de ces interactions, on retrouve un sous réseau de facteurs CBF, au sein duquel *EguCBF_Q* de l'*E. gunnii*, le plus proche orthologue du gène *EgCBF14* de l'*E. grandis*, est directement co-exprimé avec plus de 800 gènes (**Figure 45B**). Si la plupart d'entre eux sont reliés à des mécanismes de réponses au stress froid déjà bien décrits dans la littérature, on remarque avec intérêt la présence de gènes impliqués dans la synthèse de polysaccharides, des facteurs de transcription impliqués dans la formation de la paroi secondaire et la régulation de voies de signalisation hormonales (**Figure 45C**). Nous avons cherché à déterminer quelles sont les cibles directes de *EguCBF_Q* qui pourraient être impliquées dans le remodelage des tissus du bois.

C/ Identification des cibles de *EguCBF_Q* dans le xylème d'Eucalyptus

Afin d'identifier les cibles de *EguCBF_Q* nous avons utilisé une technique de DNA Affinity Purification suivie d'un séquençage illumina de l'ADN obtenu (DAPseq) qu'il nous semblait plus facile à adapter pour le modèle Eucalyptus, récalcitrant à la transgénèse. En bref, il s'agit de produire le facteur de transcription *in vitro*, fusionné avec un TAG HALO. Grâce à ce tag, le FT est lié à des billes magnétiques, qui servent à précipiter l'ADN fixé par le facteur de transcription lorsqu'il est mis en contact avec une banque de fragments d'acides nucléiques (ADN génomique fragmenté par sonication). Le séquençage des fragments précipités par cette technique renseigne sur les gènes qui peuvent être ciblées par le TF. Le DAPseq, qui n'avait jamais été utilisée chez l'Eucalyptus, a nécessité un travail conséquent de mise au point et d'optimisation. Pour cela, nous avons utilisé *EgMYB1* et *EgMYB2*, deux facteurs de transcription impliqués dans la formation de la paroi secondaire dont on connaît les cibles principales, comme cas d'étude (Takawira *et al.*, 2022). Ce travail

a été réalisé avec l'aide de collaborateurs de l'université de Prétoria, et intégré dans la thèse d'Ines Hadj Bachir. Le facteur de transcription *EguCBF_Q* s'est révélé capable de fixer des séquences régulatrices dans le promoteur (5Kb en amont du TSS) de plus de 6000 gènes (**Figure 46**). Des analyses d'enrichissement font clairement ressortir le motif canonique CRT/DRE ciblé par les CBF. Les gènes identifiés appartiennent majoritairement à des processus biologiques reliés à la réponse aux stress abiotiques, mais certains d'entre eux concernent la formation des tissus vasculaires et la voie de signalisation impliquant l'auxine. Beaucoup de ces cibles sont aussi co-exprimées avec *EguCBF_Q* dans les réseaux de gènes précédents.

D/ Perspectives

Afin de confirmer que *EguCBF_Q* est capable de réguler ces cibles, l'expression de ces gènes sera analysée dans des plantes transgéniques surexprimant ce facteur de transcription. Ces plantes pourront aussi être utilisées pour caractériser plus finement les modifications au niveau du xylème. L'ensemble de ce travail, qui vise à identifier les voies de régulations ciblées par *EguCBF_Q* pour remodeler la structure et la composition des tissus du bois en réponse au froid, est en cours de valorisation (Hadj Bachir *et al.*, 2023 *in prep*).

Ines Hadj Bachir, Raphael Ployet, Hélène San Clemente, Marielle Aguilar, Annabelle Dupas, Nathalie Ladouce, Yves Martinez, Jacqueline Grima-Pettenati, Chantal Teulières and Fabien Mounet (**2023**). CBF dependent regulatory pathway remodel wood formation in response to cold temperature.

Ce travail renforce l'hypothèse selon laquelle la régulation du processus de différenciation du xylème pourrait jouer un rôle non négligeable pour permettre à la plante de résister au froid. La nature exacte des propriétés du xylème impliquées dans cette résistance reste cependant à élucider. Certains de nos résultats suggèrent que le remodelage des tissus du bois pourrait dépendre du génotype d'Eucalyptus étudié. De plus, en fonction des espèces d'Eucalyptus, nous avons pu observer des différences dans le nombre et les profils d'expression des gènes CBF (N'Guyen *et al.*, 2019). Il est donc possible que la variabilité naturelle de la résistance au froid chez l'Eucalyptus dépende en partie de la capacité de remodelage des tissus du bois. Cette thématique reste encore peu travaillée, et représente un axe futur que je souhaiterais développer au sein de l'équipe ReDyWood (voir Chapitre 4.2).

3.3 Régulation de la formation du bois en réponse au stress hydrique

Si la méthodologie et les protocoles pour analyser les effets du froid chez l'Eucalyptus étaient bien maîtrisés dans l'équipe lors de mon recrutement, ce n'était pas le cas du stress hydrique. Quelques essais préliminaires, pourtant prometteurs, nous ont permis d'évaluer que nous manquions d'outils et de savoir-faire pour mettre en place un protocole de restriction d'eau qui soit à la fois contrôlé, mesurable et reproductible. Pour étudier l'effet de la sécheresse sur la formation du bois, nous avons développé deux stratégies : **(i)** une collaboration avec des spécialistes en écophysiologie et en chimie du bois (Favreau *et al.*, 2019; Ployet *et al.*, 2019), sur une parcelle expérimentale équipée d'un appareillage de haute qualité (**Chapitres 3.1 et 3.2**), et **(ii)** l'utilisation du robot Phenoserre de la plateforme TPMP (**Chapitres 3.3**)

3.3.1 Le manque d'eau et la disponibilité en K⁺ influencent la xylogénèse

Mon activité de recherche au sein de l'équipe ReDyWood a rapidement été marquée par le développement d'une collaboration avec l'UMR AGAP (CIRAD Montpellier). En effet, les approches menées par Gilles Chaix et Bénédicte Favreau au sein de cette équipe, centrées à la fois sur des analyses métabolomiques globales mais aussi des analyses fines de la chimie du bois, étaient complémentaires à nos méthodes. En parallèle, nos partenaires de l'UMR Eco & Sols de Montpellier, en collaboration avec l'Université de São Paulo (ESALQ), avaient coordonné la mise en place d'un dispositif expérimental unique au monde pour leurs études écophysiologiques (voir **Figure 38**). Sur le site brésilien d'Itatinga, plusieurs centaines d'arbres d'un génotype commercial d'*E. grandis* ont été exposés à 6 traitements différents : 2 régimes hydriques combinés à 3 régimes de fertilisation. Les arbres ont été soumis à un apport en eau de pluie normal, ou à l'exclusion d'environ 30% de celle-ci, conduisant à un manque d'eau modéré. En combinaison avec ces deux traitements, le tiers des arbres a reçu une fertilisation de base minimale, alors que les autres bénéficient d'un apport en potassium ou en sodium (Battie-Laclau *et al.*, 2014a; 2014b; Battie-Laclau *et al.*, 2016). Le potassium est un nutriment inégalement réparti dans le sol. Il est crucial pour le développement de la plante et c'est un osmolite très important pour la formation du bois (Fromm, 2010). Le sodium est souvent associé à un élément toxique. Cependant, des études ont montré qu'à faible concentration, il pouvait partiellement compenser une carence d'éléments nutritifs dans le sol, comme une faible concentration en K⁺.

J'ai participé à l'élaboration du projet Agropolis – Capes, porté par Gilles Chaix, pour financer la mise en place de nos recherches sur ce dispositif. En intervenant au côté de nos collègues du CIRAD, notre objectif était de corrélérer des données, obtenues à l'échelle des

cellules du xylème, et des données physiologiques, mesurées au niveau des arbres exposés aux stress. Ces recherches s'inscrivent dans le cadre de la thèse de Raphael Ployet, qui a passé 3 mois au Brésil, co-encadré par Gilles Chaix. Dans ce contexte, je me suis également rendu au Brésil à deux reprises pour participer à la coordination du projet et travailler sur l'analyse conjointe des données de transcriptomique, de métabolomique, de chimie et d'histologie, obtenues à partir des prélèvements de xylème sur des arbres soumis aux 6 traitements. Les données obtenues par nos collègues de l'UMR Eco & Sols relatives à la croissance des arbres (Battie-laclau *et al.*, 2014a; 2014b) ont été analysées conjointement. Pour faciliter l'interprétation des données, nous avons choisi, dans un premier temps, de nous concentrer sur l'analyse de l'effet du potassium sans prendre en compte le traitement au sodium. Parmi les personnes les plus impliquées dans ces travaux, M. T. Veneziano Labate et T. R. Cataldi ont effectué les analyses métabolomiques (GC/LC-MS) et H. San Clemente a contribué au pré-traitement des données transcriptomiques RNAseq. G. Chaix a contribué à analyser la structure du bois, notamment par l'acquisition des données de microdensitométrie, tandis que M. Morel a été impliquée dans la caractérisation biochimique des échantillons. Jean Paul Laclau a contribué à analyser les résultats et a permis l'accès à des données d'écophysiologie obtenues via les nombreuses études conduites par son équipe sur ce dispositif. B. Favreau a été impliquée dans l'analyse de l'ensemble des résultats, et en particulier des données métabolomiques.

Dans cette étude, publiée dans la revue *New Phytologist* (Ployet *et al.*, 2019), nous avons identifié les processus biologiques impactés par l'apport en potassium et/ou la restriction d'eau. Nos observations permettent d'approfondir, au niveau moléculaire, notre compréhension d'un mécanisme physiologique crucial pour les espèces cultivées : en stimulant la croissance des plantes, l'ajout de fertilisants provoque une demande plus forte en eau, ce qui peut les rendre plus vulnérables au stress hydrique. Au travers d'approches d'intégration de données, nous avons identifié des modules de gènes et de métabolites co-régulés ensembles et corrélés avec des paramètres de structure et de composition du bois. Ils sont impliqués dans une balance entre la production de biomasse et la réponse au stress. Ces modules renferment aussi des facteurs de transcription dont la fonction est inconnue. Ces gènes sont potentiellement impliqués dans des adaptations fonctionnelles au niveau du xylème, qui peuvent contribuer à la résistance de l'arbre face aux stress. La caractérisation de l'un d'entre eux, *EgMYB137*, dans des plantes transgéniques, confirme son rôle dans la différenciation des tissus du bois, la formation des vaisseaux et la biosynthèse de la paroi secondaire.

A systems biology view of wood formation in *Eucalyptus grandis* trees submitted to different potassium and water regimes

Raphael Ployet¹, Mônica T. Veneziano Labate², Thais Regiani Cataldi², Mathias Christina^{3,4} , Marie Morel¹, Hélène San Clemente¹, Marie Denis^{5,6}, Bénédicte Favreau^{5,6} , Mario Tomazello Filho⁴, Jean-Paul Laclau^{3,4} , Carlos Alberto Labate², Gilles Chaix^{4,5,6}, Jacqueline Grima-Pettenati¹  and Fabien Mounet¹ 

¹Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse III, CNRS, UPS, 31326 Castanet-Tolosan, France; ²Max Feffer Laboratory for Plant Genetics, Department of Genetics, College of Agriculture 'Luiz de Queiroz', University of São Paulo, Av. Pádua Dias 11, PO Box 09, Piracicaba-SP 13418-900, Brazil; ³CIRAD, UMR ECO&SOLS, F-34398 Montpellier, France; ⁴Department of Forest Resource, Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, Av. Pádua Dias N° 11, Piracicaba, São Paulo 13418-900, Brazil; ⁵CIRAD, UMR AGAP, 34395 Montpellier, Cedex 9, France; ⁶UMR AGAP, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

Summary

Author for correspondence:
Fabien Mounet
Tel: +33 534323825
Email: mounet@lrsv.ups-tlse.fr

Received: 10 November 2018
Accepted: 28 February 2019

New Phytologist (2019)
doi: 10.1111/nph.15802

Key words: co-regulation networks, drought, *Eucalyptus*, omics integration, potassium, systems biology, transcription factors, xylem.

- Wood production in fast-growing *Eucalyptus grandis* trees is highly dependent on both potassium (K) fertilization and water availability but the molecular processes underlying wood formation in response to the combined effects of these two limiting factors remain unknown.
- *E. grandis* trees were submitted to four combinations of K-fertilization and water supply. Weighted gene co-expression network analysis and MixOmics-based co-regulation networks were used to integrate xylem transcriptome, metabolome and complex wood traits. Functional characterization of a candidate gene was performed in transgenic *E. grandis* hairy roots.
- This integrated network-based approach enabled us to identify meaningful biological processes and regulators impacted by K-fertilization and/or water limitation. It revealed that modules of co-regulated genes and metabolites strongly correlated to wood complex traits are in the heart of a complex trade-off between biomass production and stress responses. Nested in these modules, potential new cell-wall regulators were identified, as further confirmed by the functional characterization of *EgMYB137*.
- These findings provide new insights into the regulatory mechanisms of wood formation under stressful conditions, pointing out both known and new regulators co-opted by K-fertilization and/or water limitation that may potentially promote adaptive wood traits.

Introduction

Wood, or secondary xylem, is formed by the activity of an internal meristem called the vascular cambium, through a complex differentiation process leading to highly specialized xylem cells characterized by thick, lignified secondary cell walls (SCWs; Plomion *et al.*, 2001). Besides being a renewable source of material for humans, providing raw material for timber, paper, energy, second-generation biofuels as well as for added-value biomaterials (Mizrachi *et al.*, 2012), wood represents a major carbon sink important for climate regulation (Bonan, 2008). The physico-chemical properties of wood, which depend mainly on the chemical composition and the structure of SCWs, determine wood industrial end-uses (Mansfield, 2009). In xylem, SCWs are made of *c.* 75% of polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) and 25% of lignin, a complex hydrophobic phenolic polymer.

The fast-growing eucalypts, characterized by their outstanding growth performance, short rotation time and wide adaptability, are the most planted trees worldwide (Hinchee *et al.*, 2009). Eucalypt plantations are mostly established in tropical and

subtropical regions where the main environmental constraints are soil nutrient starvation and drought episodes (Gonçalves *et al.*, 1997). In highly weathered tropical soils, potassium (K) is a major limiting factor for tree growth (Laclau *et al.*, 2009; Wright, 2011; Epron *et al.*, 2012). Besides its essential role in a variety of cellular processes (reviewed by Sardans & Peñuelas, 2015), K is considered as a key osmolyte for wood formation (Fromm, 2010). K fertilization in K-deficient soils can lead to a dramatic increase in wood biomass production in tree species such as pine (Smethurst *et al.*, 2007), poplar (Arend *et al.*, 2004; Wind *et al.*, 2004) and eucalypts (Laclau *et al.*, 2009). In these conditions, a higher cambial activity is correlated with a peak of K in the cambial zone (Kuhn *et al.*, 1997; Arend *et al.*, 2002; Langer *et al.*, 2004; Wind *et al.*, 2004; Fromm, 2010). K also influences xylem structure, probably through its role in turgor-driven elongation of new xylem cells. It has an impact on the deposition dynamics of SCWs as K-starved trees show earlier initiation of SCW deposition than controls (Dunisch *et al.*, 1998; Langer *et al.*, 2002).

In a context of climate change, the intensity and frequency of future drought episodes are likely to increase in tropical and

subtropical regions, affecting the productivity of *Eucalyptus* plantations (Hawkins & Sutton, 2012; IPCC, 2013). Potassium contributes to plant resistance to abiotic stresses, including drought, by improving processes such as osmotic adjustment, stomatal aperture control, photosynthesis activation, reactive oxygen species (ROS) detoxification and phloem loading of photoassimilates (reviewed by Wang *et al.*, 2013). Some studies have suggested that K modulates xylem hydraulic conductance, possibly by interacting with pectins in intervessel pits, enhancing tree resistance to drought (Nardini *et al.*, 2010; Jansen *et al.*, 2011). Recently, using a large-scale through-fall exclusion experiment, Battie-Laclau *et al.* (2016) showed that K fertilization improved water use efficiency and biomass production in *Eucalyptus*. However, during drought episodes, they noticed that the beneficial effect of K may not be sufficient to counterbalance the detrimental effect of increased water demand caused by higher growth rates of K-fertilized trees (Battie-Laclau *et al.*, 2014a,b). Tree responses to drought in interaction with K-fertilization start to be well documented in organs such as leaves and roots (Cakmak, 2005; Anschütz *et al.*, 2014), but xylem has received much less attention. Most studies performed in this tissue have focused on drought-induced structural modifications and their impact on water transport properties (Arend & Fromm, 2007; Zwieniecki & Secchi, 2015). The changes occurring at the transcriptomic and metabolomic levels in xylem in response to drought and K-fertilization remain unstudied.

Wood formation is a highly regulated process mainly controlled at the transcriptional level, and the expression of SCW-associated genes is tightly spatiotemporally regulated (Hertzberg *et al.*, 2001; Demura & Fukuda, 2007) through a complex hierarchical regulatory network (reviewed by Hussey *et al.*, 2013; Yang & Wang, 2016). Recent studies have highlighted the importance of a dynamic cross-talk between the regulation of SCWs during development and in response to stresses, which is probably necessary to promote adaptation to environmental changes (Zinkgraf *et al.*, 2017). For instance, changes in the thickness, composition and/or structure of SCWs have been observed in response to several stresses such as nitrogen excess or depletion (Camargo *et al.*, 2014; Euring *et al.*, 2014), mechanical stress (Mellerowicz & Gorshkova, 2012) or low temperature (Ployet *et al.*, 2018). Transcription factors (TFs) involved in the regulation of SCW formation as well as SCW biosynthesis genes were reported to be induced by environmental constraints such as high salinity or iron deprivation in *Arabidopsis* (Taylor-Teeple *et al.*, 2015) or cold stress in *Eucalyptus* (Ployet *et al.*, 2018). Some of these TFs were shown to be involved in stress tolerance (Ramírez *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2017).

To gain a comprehensive view of a complex process such as the regulation of wood formation in response to environmental cues, systems biology approaches seem the most well adapted (Cramer *et al.*, 2011). Indeed, the integration of transcriptomic and metabolomic approaches has provided very valuable insights into tension wood formation (Andersson-Gunnerås *et al.*, 2006) and the lignin biosynthetic pathway (Vanholme *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) as well as the primary wall transition to SCWs (Li *et al.*, 2016a,b). Taylor-Teeple *et al.* (2015) constructed

co-regulation networks inferred from protein–DNA interactions to refine the SCW regulatory network under abiotic stresses in *Arabidopsis* and highlighted new key regulators. In poplar, co-expression networks were used to identify cell-type-specific TFs involved in the regulation of SCW biosynthesis in xylem (Shi *et al.*, 2017), and modules of genes involved in xylem formation under abiotic stresses (Cai *et al.*, 2014; Zinkgraf *et al.*, 2017; Wildhagen *et al.*, 2018). Mizrachi *et al.* (2017) applied a network-based data integration method to reveal the pathways underlying biomass and bioenergy-related traits using a segregating *Eucalyptus* hybrid population. Very recently, Wang *et al.* (2018) developed a multi-omics integrative analysis of lignin biosynthesis in poplar to quantify the effects of the expression of monolignol biosynthetic pathway genes on wood properties.

To gain an integrated view of the regulation of wood formation in response to a combination of K and water regimes, we collected differentiating xylem from 4-yr-old *Eucalyptus grandis* trees grown in four contrasting treatments. We performed both transcriptomic and metabolomic profiling to detect differentially expressed genes (DEGs) and differentially accumulated mass signatures (DAMs), respectively. We also evaluated trunk growth, xylem structure and saccharification yield as a proxy for changes in SCW composition. We then constructed WGCNA (weighted gene co-expression network analysis) and MixOmics-based co-regulation networks to correlate changes in transcriptome, metabolome and wood traits. This systems biology approach enabled us to identify biological processes and meaningful subset of genes impacted by K-fertilization and/or water limitation. Among the latter, TFs highly connected to SCW biosynthetic genes and wood traits were highlighted as potentially involved in SCW regulation. We functionally characterized the most promising candidate and confirmed its ability to regulate SCW deposition in *E. grandis*.

Materials and Methods

Plant material and sampling

We used the experimental field trial set up in 2010 using an *E. grandis* commercial clone (Suzano Company, São Paulo, Brazil) at the Itatinga Experimental Station of the University of São Paulo (23°020S, 48°380W, for a detailed description see Battie-laclau *et al.* (2014a)). Our study focused on four conditions combining K-fertilization and water availability: [+W–K] (no K-fertilization and no throughfall exclusion); [–W–K] (no K-fertilization and 37% of throughfall excluded); [+W+K] (0.45 mol K m^{–2} applied as KCl and no throughfall exclusion); and [–W+K] (0.45 mol K m^{–2} applied as KCl and 37% throughfall exclusion). For each condition, phenotyping and xylem sampling were performed on four independent trees (Supporting Information Fig. S1).

Tree circumference (CBH) was measured at breast height (BH; 1.3 m above ground) every 15 d. Trunk biomass was quantified after cutting down the trees as described by Battie-Laclau *et al.* (2016). An allometric equation allowing calculation of trunk biomass from CBH (González-García *et al.*, 2016) was applied to

predict biomass production per day (kg of dry matter d^{-1} per tree) for each tree, over the 3 months preceding sampling. Daily average gross primary productivity (GPP, $\text{gC m}^{-2} \text{d}^{-1}$) was estimated using the model established by Christina *et al.* (2015). The proportion of carbon allocated to trunk secondary growth (%GPP_{stem}) was obtained for each tree by dividing the trunk biomass increment (kgDM d^{-1} per tree) by the simulated tree gross primary productivity (gC d^{-1} per tree).

Wood samplings were performed on four independent trees per condition (at BH) in May 2014, during a severe dry season (Fig. S2). Wood disks were collected for wood micro-density measurements, and micro-core samples (length: 15 mm; diameter: 2 mm) were fixed and stored in 80% ethanol for histology analyses. Developing xylem (including cambium) was collected by scraping after removing the bark and immediately frozen in liquid nitrogen for transcriptomic and metabolomic analyses. Metabolome and wood properties were analyzed on the four biological replicates for each condition and three replicates were used to perform transcriptomic analyses (Fig. S3).

RNA extraction and analyses of the transcriptome

RNA extraction and integrity controls were performed as previously described (Ployet *et al.*, 2018). Three sequencing libraries per treatment were generated and sequenced (Illumina, San Diego, CA, USA; 150 bp paired-end reads) by the Genotoul GeT platform (<https://get.genotoul.fr/en/>; France) using the HiSeq3000 (Illumina). An average of 46 million reads per library was generated, and >90% were mapped to the *E. grandis* reference genome (v.1.1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/>) using TOPHAT2 (Kim *et al.*, 2013). Sequencing data were registered at the NCBI SRA database (PRJNA514408). For a subset of selected genes, RNAseq expression levels were confirmed by real-time quantitative PCR (Fig. S4; Table S1) as described by Ployet *et al.* (2018).

Metabolite extraction and biochemical analyses

Soluble metabolites were extracted from four independent biological replicates and analyzed according to the methods described by De Vos *et al.* (2007) and Hoffmann *et al.* (2017) for GC-MS and LC-MS, respectively, including minor changes as detailed in Method S2. Biochemical analyses of SCWs were done in triplicate from extractive-free xylem residue (EXR) obtained as described by Ployet *et al.* (2018) and detailed in Method S1. Saccharification was estimated with or without alkali pretreatment, mainly as described by Van Acker *et al.* (2016). Reducing sugar concentration was assessed with dinitrosalicylic acid (DNS) reagent using a 10 μl aliquot of the supernatant after 6, 24 and 48 h of reaction. Enzyme activity was assessed at 0.25 filter paper units (FPU) ml^{-1} in our conditions.

Vector construction and plant transformation

The coding region (1050 bp) of *EgMYB137* (*Eucgr.K02806*), and a fragment of 2 kb upstream of the start codon (promoter)

were amplified from *E. grandis* xylem cDNA and genomic DNA, respectively, using specific primers (Table S1). The DNA fragments were then cloned into Gateway-adapted binary vectors pGWAY-0 and pGWAY-1, for overexpression and promoter activity analyses respectively and transformed into *Eucalyptus* hairy roots as described by Plasencia *et al.* (2016). *Eucalyptus* composite plants harboring transgenic hairy roots were grown in OIL DRI substrate US-Special Substrate (Type III/R; Damolin, Fur, Denmark) in 200 ml pots for a period of 5 months (16 h photoperiod, 25/22°C). Fluorescent roots expressing DsRed were collected on seven to nine independent lines for further analyses. Histochemical GUS assays were performed as described by Plasencia *et al.* (2016).

Microscopy and histochemistry

Wood density was measured as described by Dobner *et al.* (2018). Average density (g cm^{-3}) was measured by X-ray radiography every 40 μm along the first 4 mm of differentiating xylem zone using a QTRS-01 \times Tree Ring Analyzer according to the manufacturer's procedure (Quintek Measurement Systems, Knoxville, TN, USA). For xylem structure analysis, transverse sections were made from micro-core samples (three biological replicates per condition) and transgenic roots (six *p35S:EgMYB137* lines and four controls), and embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd, Reading, UK). Semi-automatic image analyses of semi-thin sections (1 μm) were performed as previously described (Ployet *et al.*, 2018) to estimate SCW thickness (Method S1). Average vessel diameter was measured by image analyses on >400 vessels (diameter cut-off >35 μm) using IMAGEJ software (v.1.5).

Statistical analyses and data integration

For transcriptomic analyses, we combined CUFFDIFF v.2.2.1 (Trapnell *et al.*, 2012) and DESEQ2 R package v.1.10 (Love *et al.*, 2014) to detect a total of 5573 DEGs (fold change ≥ 2 , adjusted *P*-value (false discovery rate, FDR) <0.01, Table S1). For metabolomic analyses, 2250 mass signatures were obtained by LC-MS (850) and GC-MS (1400). Mass signatures detected in fewer than two technical repetitions and two conditions were discarded. We identified 516 DAMs, 231 and 285 for LC-MS and GC-MS respectively (fold change ≥ 2 , FDR <0.01, Table S2). Missing values were substituted by random forest imputation (Gromski *et al.*, 2014), using the MISSFOREST R package (Stekhoven & Buhlmann, 2012). In total, 6089 DEGs and DAMs were used to perform data mining. Discrimination of the different treatments and biological replicates was done using partial least squares – discriminant analysis (PLS-DA), from the R package MIXOMICS (Lê Cao *et al.*, 2016).

We used the BiNGO package (CYTOSCAPE software, Maere *et al.*, 2005) and G:PROFILER (Reimand *et al.*, 2016) to perform gene ontology enrichment based on *Arabidopsis thaliana* Gene Ontology (GO) classification on the first blast hit of *Eucalyptus* DEGs in the *Arabidopsis* genome (PHYTOZOME v.12). Two networks of GO enrichment were obtained for genes regulated by

either water availability (+W treatments vs –W treatments) or K supply (+K treatments vs –K treatments). They were merged and manually curated to remove redundant GO terms (Fig. 2).

Network analyses based on Pearson pairwise correlations, calculated from three values per condition, were performed as described previously (Ployet *et al.*, 2018). We used WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008) to detect modules (softPower = 10, deepSplit = 3 and minModuleSize = 100) and to compute correlations between average module profiles and phenotypic variables. Correlations between standardized profiles of DAMs and DEGs of modules M1–6 were further investigated using MIXDIABLO (Data Integration Analysis for Biomarker discovery using a Latent component method for Omics studies, Singh *et al.*, 2016). In the sparse PLS-DA (sPLS-DA), a full design was chosen in which all datasets are connected, all variables were kept and the number of components set to three. Correlation values (Table S3) were used to graphically represent networks using CYTOSCAPE software. For WGCNA, significant Pearson correlations were used ($FDR < 5.10 \times 10^{-5}$) to select 4305 nodes. For MIXDIABLO, a correlation threshold of 0.8 within the MIXDIABLO similarity matrix was chosen to optimize modularity and allow comparison with the WGCNA network (Fig. S5).

Results

Remodeling of the xylem transcriptome and metabolome in response to K-supply and water availability

Analyses of the transcriptome and the metabolome of differentiating xylem tissues collected from field-grown *E. grandis* trees submitted to four different treatments combining rainfall water availability and K fertilization (Fig. 1a,b) revealed a total of 5573 DEGs and 516 DAMs (Fig. 1c,d, Tables S1, S2), respectively. The four treatments were clearly separated by the first three principal components (PC) of the PLS-DA, explaining 82% and 76% of the total variance of the DEG expression profiles and of the abundance profiles of DAMs, respectively (Figs 1c,d, S3). The first component (PC1) explained the highest percentage of variance (61% for DEGs and 39% for DAMs) clearly separating K-fertilized [+K] from nonfertilized [–K] samples. Indeed, most of the DEGs (>60%, Fig. 1c) and a large proportion of the DAMs (42%, Fig. 1d) were exclusively regulated by K-fertilization. In sharp contrast, 4% of the DEGs and 12% of the DAMs were regulated by water availability only. Interestingly, a substantial percentage of the DAMs (45%) and of the DEGs (34.7%) was regulated by both water and K. The vast majority of the DEGs (90%) and DAMs (79%) regulated by water were also regulated by K whereas only 36% of the DEGs and 52% of the DAMs regulated by K were also regulated by water.

Using a GO enrichment approach, we found that 159 biological processes (Fig. 2; Table S1) were significantly enriched among the DEGs. We made a hierarchical classification of these GO categories from the most general to the most specialized level (level 9, 45 GOs) and represented by green, blue and gray dots, the categories enriched in K-regulated, W-regulated and [K and/or W]-regulated DEGs, respectively. Considering level 9-GO categories,

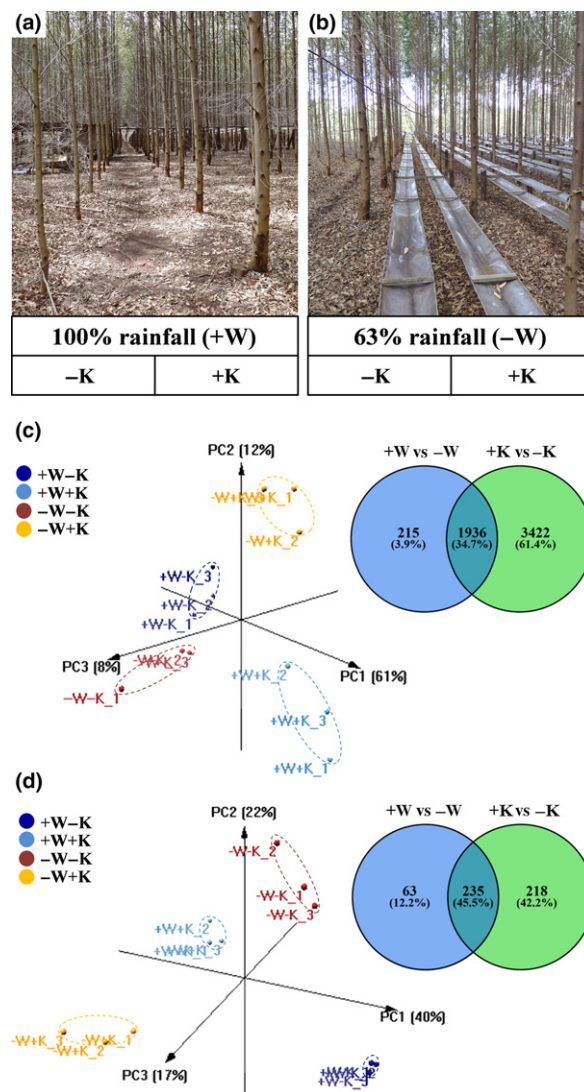


Fig. 1 Water exclusion and K-fertilization induce changes in xylem transcriptome and metabolome. (a, b) Field pictures of the 4-yr-old *Eucalyptus grandis* trees submitted to four treatments: [+W–K], [–W–K], [+W+K] and [–W+K]. In conditions [+W] and [–W], trees received respectively 100% and 63% of rainfall water (Battie-Laclau *et al.*, 2014b). In conditions [+K] and [–K], trees were supplemented or not with K. (c) PLS-DA analyses of 5573 genes (DEGs) differentially expressed (fold change ≥ 2 or ≤ 0.5 and $P_{FDR} < 0.01$, $n = 3$) in response to water exclusion and K fertilization (Supporting Information Table S1). The first three principal components (PC) separate the four treatments and explain 82% of the total variability. PC1 (61% of the total variability) explains the separation between [+K] and [–K] treatments. PC2 and PC3 (respectively 12% and 8% of the total variability) explain the separation between [+W] and [–W] treatments. The Venn diagram describes the proportion of DEGs regulated by water exclusion (+W vs –W), potassium supply (+K vs –K) or both. (d) PLS-DA analyses of 516 mass signatures (DAMs) differentially accumulated ($P_{FDR} < 0.05$, $n = 4$, peak intensity fold change ≥ 2 or ≤ 0.5) in response to water exclusion and K fertilization (Table S2). The first three principal components (PC) explain 76% of the total variability and separate the four treatments. PC1 (39% of the total variability) explains the separation between [+K] and [–K] treatments. PC2 and PC3 (21% and 16% of the total variability respectively) explain the separation between [+W] and [–W] treatments. The Venn diagram describes the proportion of DAMs regulated by water exclusion, potassium supply or both.

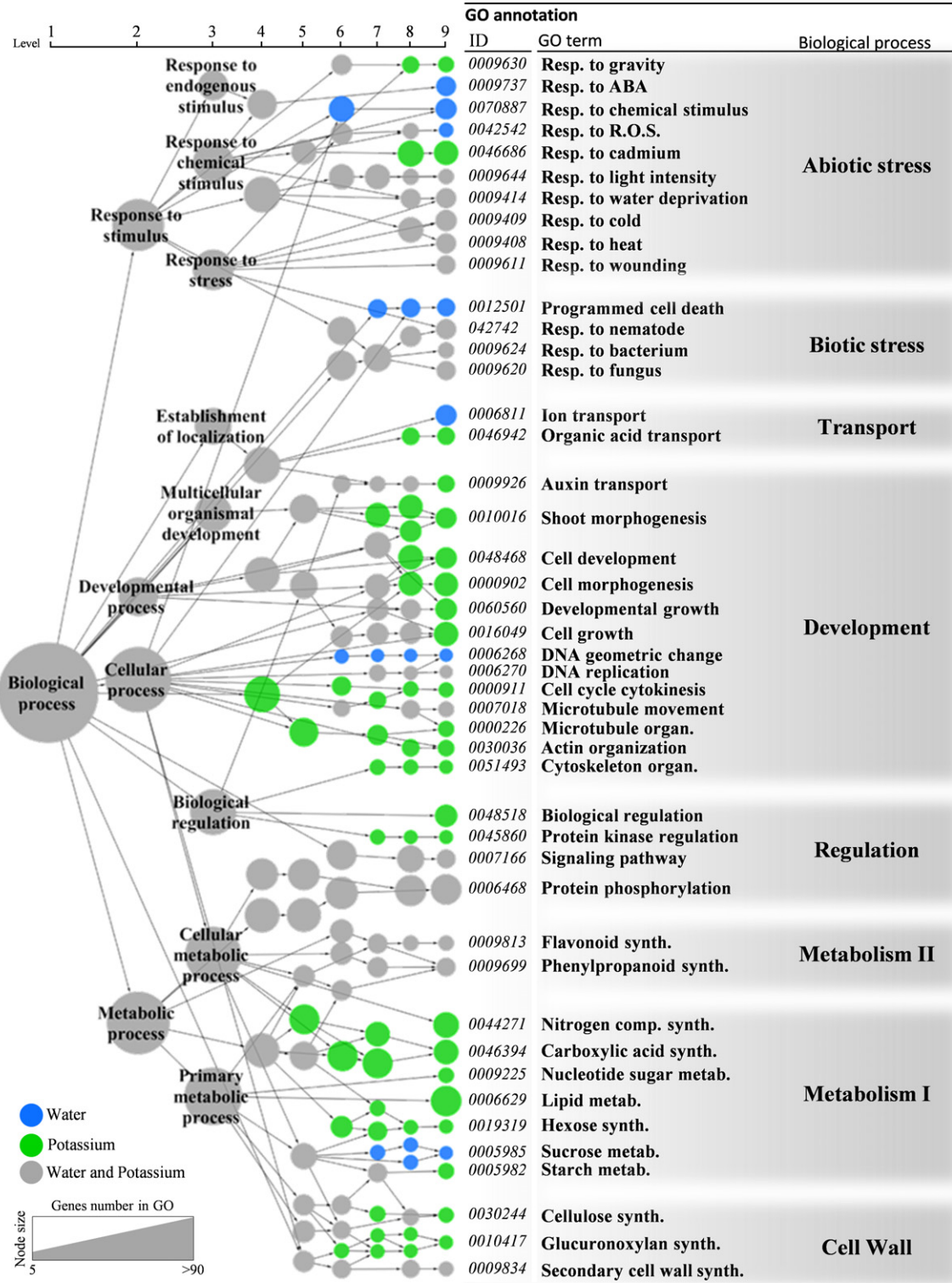


Fig. 2 The changes in transcriptome occur in a broad range of biological processes. Gene Ontology (GO) enrichment analysis on differentially expressed genes (DEGs), in response to K fertilization (5358 DEGs, 96%) or water exclusion (2151 DEGs, 38.5%), in *Eucalyptus grandis* trees. The network was created from BiNGO (Maere *et al.*, 2005) results, manually reorganized and curated to remove noninformative GO terms. A total of 159 significantly enriched GO terms ($P_{FDR} < 0.01$) were kept. Node size is proportional to the number of genes found within GO categories. We made a hierarchical classification of these categories from the most general (level 1) to the most specialized level (level 9). A complete list of GO terms of levels 1–9 is provided in Supporting Information Table S1. The 45 level 9 GOs are linked to development (13 GOs), biotic and abiotic stress responses (4 and 10 GOs respectively), primary metabolism (7 GOs), biological regulation (4 GOs), cell wall biosynthesis (3 GOs), secondary metabolism (2 GOs) and transport (2 GOs). Green dots represent the GOs enriched in DEGs regulated only by K (23 GOs), blue the GOs enriched in DEGs regulated only by W (7 GOs) and gray the GOs enriched in DEGs regulated by W and K (15 GOs).

23 were enriched in K-regulated DEGs, mainly related to development, primary metabolism, cell wall formation, regulatory processes, transport and abiotic stresses. The 15 GOs enriched in K- and/or W-regulated DEGs were related to secondary metabolism, biotic and abiotic stress responses and biological regulation. Only seven GOs were enriched in W-regulated DEGs and included abiotic stress responses and transport.

Integration of transcriptomic and metabolomic data through correlation network analyses

To gain insights into the regulation of xylem transcriptome and metabolome, we analyzed the correlations between 6089 variables representing 5573 DEGs and 516 DAMs (Table S3). We performed a correlations network analysis based on Pearson pairwise correlations to detect gene–gene or gene–metabolite profiles similarities. We selected the most robust correlations (FDR-adjusted

$P < 5.10e-5$) to build a network in which 4305 nodes (representing either DEGs or DAMs) were connected by 170 629 edges whose lengths were proportional to the absolute values of the corresponding correlations (Fig. 3). We obtained a dense, strongly correlated core network linked to six small subnetworks (Fig. 3). Sixty per cent of the 155 DAMs were spread across the network and correlated to DEGs but the remaining 40% were clustered in a specific subnetwork poorly connected with DEGs (i.e. only six DAMs were connected to DEGs).

Using the WGCNA method, we detected 12 modules containing highly correlated variables and therefore potentially involved in the same biological process (Fig. 3). For each module, we performed a GO enrichment analysis (Table S1) and represented by heatmap DEG profiles in the four treatments (Fig. 3). The expression profiles of the genes in all modules, except module 12, were more dependent on K-fertilization than on water status (Fig. S6).

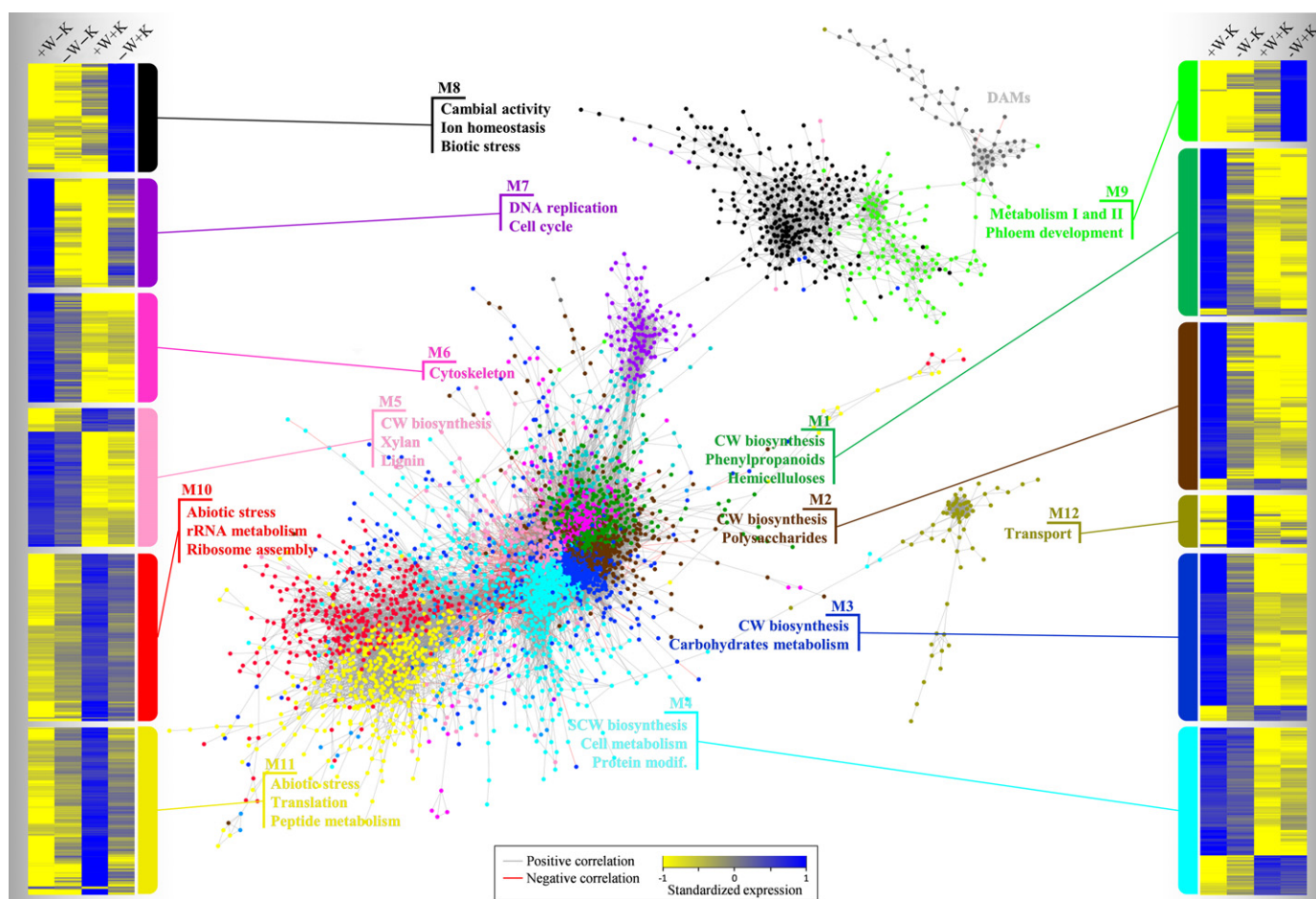


Fig. 3 Co-regulation network highlighting modules of highly correlated genes involved in biological processes associated with cell wall formation. Weighted co-expression network obtained by computing Pearson correlations between standardized profiles of 5573 DEGs and 516 DAMs. Edge lengths are proportional to correlations. The network was visualized using CYTOSCAPE software (force directed layout), and is composed of 170 629 significant correlations ($P_{\text{FDR}} < 5e-5$) between 4305 nodes. Gray and red edges represent positive and negative correlations respectively. Only 2135 correlations were negative (Supporting Information Table S3). Two small isolated subnetworks (< 10 variables) were not considered in the analyses. Twelve modules, detected by WGCNA analyses (Langfelder & Horvath, 2008), were represented by different node colors. For each module, gene expression profiles in the four treatments (Table S1) were represented by heatmaps. [+K], [–K], with and without potassium; [–W], [+W], with and without water exclusion. We performed a Gene Ontology (GO) enrichment approach using functional annotation of the first BLAST hit of *Eucalyptus grandis* genes in the *A. thaliana* genome (Table S4) to detect biological processes associated with DEGs enclosed in each module.

Modules M1–M5 located in the core of the network were enriched in cell-wall-related genes, especially in genes involved in the synthesis and in the regulation of the three main SCW polymers (cellulose, xylan, lignin) (Fig. 3, Table S4). Most of these genes (80%) were downregulated in response to K-fertilization while the remaining 20%, mostly involved in cell primary metabolism, were upregulated and thus negatively correlated with the first ones (Table S2). This included *EgrNAC12*, a putative ortholog of the drought inducible *ANAC002* in *Arabidopsis* (Table S4). Among the K-downregulated genes, 109 TFs were identified including regulators acting in the early phase of xylem differentiation such as *AtWRKY12*, *AtWRKY13*, *AtIFL1/REV*, *ATHB8* and *ATHB15* (Table S4). Twenty-three TFs were orthologs of the regulators belonging to the SCW hierarchical transcriptional network in *Arabidopsis* (Table S4) such as *EgrNAC61* and *EgrNAC26*, orthologs of first-level master switches *AtSND1* and *AtVND6*, respectively. The second-level positive (*EgMYB2*) and negative (*EgMYB1*) master switches functionally characterized in *Eucalyptus* were also present (Goicoechea *et al.*, 2005; Legay *et al.*, 2007). Fifty-two DAMs (33%) were correlated with the M1–M5 modules with M2 presenting the highest number of connected DAMs.

Nested in the core of the network, module M6 was highly connected with M1–M5 and significantly enriched with genes involved in cytoskeleton remodeling. No DAMs were linked to M6. Noteworthy, the Rac-like small GTPase *EgROPI* (Table S4), previously shown to be involved in the control of cell morphology and SCW formation in *Eucalyptus* xylem (Foucart *et al.*, 2009), was among the most connected genes. M6 also contained orthologs of genes involved in vesicle trafficking of CW polymers and CW-modifying enzymes, through interaction with microtubules such as *AtAAA1*, *AtRABA5a*, *AtRABA4a* and *AtROPGAP3* (Table S4).

Modules M10 and M11 were enriched in genes related to cell activity (RNA and protein metabolism) and to abiotic stress responses such as genes encoding heat shock proteins, ROS detoxification enzymes, secondary metabolism enzymes, stachyose and polyamine biosynthesis enzymes (Table S4). These modules contained orthologs of most of the key components of the ABA signaling pathway (Table S4), including receptors (*AtRCAR1/AtPYL9*, *AtRCAR3/AtPYL8*), receptor-associated kinase (*AtSnRK2.6/AtOST1*) and kinase's direct substrate (*AtAREB3*). ABA-inducible TFs, such as *ATHB7*, *ANAC081* and *ANAC102* (Table S4), were also present, as well as *AtRAE1* (ABA signaling) and *AtXERICO* (ABA metabolism). All these genes were strongly upregulated in response to K-fertilization and especially when water was available [+W+K]. M10 and M11 DEGs were connected with 19 DAMs.

M7 and M12 were enriched in genes strongly regulated by water in addition to regulated by K (Fig. S6). Most of the genes of M7, related to 'DNA replication and cell cycle', were downregulated by water exclusion in K-deficient trees, but upregulated by water exclusion in K-fertilized trees. Among these DEGs, 29 out of 126 belong to cell division machinery, chromosome segregation and cytokinesis (Table S4) including cyclin-dependent kinases, such as *Eucgr.A00867*, a putative ortholog of *AtCDKB2;2* required for meristem integrity in *Arabidopsis*.

EgrAP2-11, the only detected TF in M7, is a putative ortholog of *AtANT*, associated with cell division regulation in *Arabidopsis* shoot meristem (Table S4). M12 was enriched in genes related to transport of molecules that were upregulated in [–W–K] treatment. Nine encode proteins similar to transporters essential for xylem development or sap transport in *Arabidopsis* such as possible orthologs of *AtABCG11* and *AtABCB15* required for vascular development, and a close ortholog of *AtWAT1*, a tonoplast-localized transporter involved in SCW biosynthesis of xylem fibers in *Arabidopsis* (Table S4). Only one DAM was connected with M12 DEGs.

Modules M8 and M9 both contained genes upregulated by water exclusion in K-fertilized trees (Fig. S6). M8 enclosed genes related to cambial activity, such as several components of the *CLAVATA* peptide signaling pathways, as well as genes close to *AtMOL1* receptor and its ligand *AtCLE44/TDIF* (Table S4). Among the putative TFs detected in M8, we found orthologs of *AtDof5.6* and *AtARF4* which are involved in the formation of interfascicular cambium and vascular patterning in *Arabidopsis* roots, and in promoting cambium activity respectively (Table S4). Orthologs of genes related to K-homeostasis (*AtSKOR* and *AtZIFL2*) and to calcium sensing and transport (*AtSOS3*, *AtCAX1*, *AtCAX3* and *AtCAX7*) were also found in M8. The M9 module was enriched in genes related to phloem development (Table S4), such as putative orthologs of *AtSEOR1* required for phloem filament formation and orthologs of *AtAPL* required for phloem identity in *Arabidopsis*. Sixteen DAMs were associated with M8 and M9.

Correlations between identified DAMs and network modules

In an attempt to optimize the integration of the metabolomic and transcriptomic datasets, we decided to use the MIXDIABLO method of the MIXOMICS R package, a method designed for testing correlations between heterogeneous 'omics' datasets. As shown in Fig. 4(a), where the correlations between DAMs and modules are represented, the number of highly connected DAMs (282) was substantially increased as compared to the first method where only 93 were correlated with DEGs (Fig. 3). None of the DAMs was connected to the M7 and M12 modules, in agreement with the first correlation analysis. The vast majority of the highly connected DAMs (213, 76% of the DAMs) were associated with modules M1–M6 related to cell wall formation and cytoskeleton. Most of these DAMs accumulated in [+K] conditions and were negatively correlated with expression profiles of SCW-related genes. Among the most connected DAMs (red diamonds, Fig. 4a), 37 were selected for LC-MS-MS analyses and 14 provided robust identification. They belong mostly to the flavonoid, coumarin and terpen categories, but also to lipid and amino acid derivatives (Fig. 4b). Twelve were clearly accumulated in [+K] conditions and two in [–W] conditions.

Correlations between wood properties and network modules

The quantification of phenotypic traits related to wood formation in the four treatments (Fig. 5) revealed that saccharification

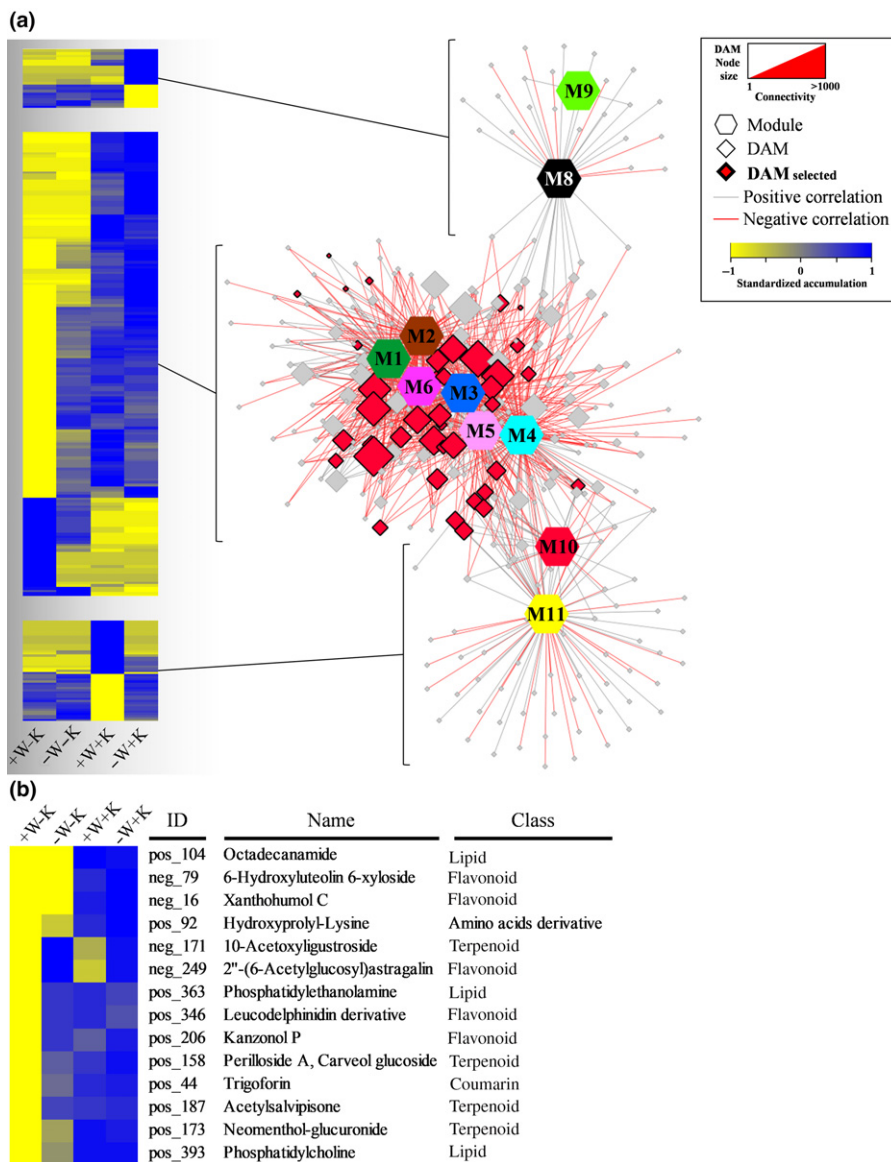


Fig. 4 DAMs–module correlation network using MIXOMICS integrative approach. (a) Network representing correlations (edges, >0.8) detected between DAMs, DEGs and the average profiles of the 12 modules. Module profiles were calculated from the average expression profiles of DEGs within each module and we used the same color code as in Fig. 3. Diamond nodes represent mass signatures with size proportional to their connectivity. Poorly connected nodes were removed for graphical representation (connectivity <3). Red diamonds represent DAMs selected for identification by LC-MS-MS (all connected to modules M1–M6). Edges are proportional to the absolute value of the correlation (Supporting Information Table S3). DAM–DAM correlations were removed to improve graphical representation. DAM accumulation profiles in the four treatments are represented by a heat map. [+K], [–K], *Eucalyptus grandis* trees with and without potassium; [–W], [+W], *Eucalyptus grandis* trees with and without water exclusion. (b) Heat map representing accumulation profiles of the 14 identified DAMs. Most of them are negatively correlated with modules M1–M6.

yield, vessel density and vessel diameter were almost exclusively regulated by K-fertilization whereas stem biomass increments and wood density were affected by both water exclusion and K-fertilization. Saccharification yield and vessel density decreased significantly (–14% and –16% respectively) in K-deficient trees relative to K-fertilized trees. By contrast, vessel diameter increased significantly in K-fertilized trees and slightly more when water was excluded (+15%, Fig. 5). Stem biomass increments were the highest in K-fertilized trees but were significantly reduced by water exclusion. Wood density tended to increase in response to water exclusion, but only significantly for K-fertilized trees (Fig. 5). The lowest carbon allocation for trunk growth (GPP_{stem}) was found in [–W–K] treatment whereas unexpectedly the highest value was found in the [–W+K] treatment.

We then used the WGCNA method to compute the correlations between the module profiles (mean profiles of all the variables contained in a module) of M1–M12 and the phenotypic traits. In the network represented in Fig. 5, the

phenotypic traits were correlated with the 12 module profiles as well as with 2184 variables contained in these modules (2148 DEGs and 36 DAMs). The core-network modules M1–M6 were positively correlated with vessel density and saccharification yield (Fig. 5). By contrast, these modules, except M2, were negatively correlated with vessel diameter (Fig. 5). The correlations obtained between traits and module profiles reflected well those between traits and variables (Fig. S7; Table S3). Indeed, most of the 1554 variables in modules M1–M6 were positively correlated (1187 variables) with saccharification and vessel density, whereas 720 variables were negatively correlated with vessel diameter. Stem biomass increments were positively correlated with modules M10 and M11 but negatively with modules M4 and M5. Wood density was positively correlated with modules M8 and M9 that were negatively correlated with saccharification yield. Module M8 was also positively correlated with vessel diameter. GPP_{stem} was positively correlated with module M7 and negatively with M12.

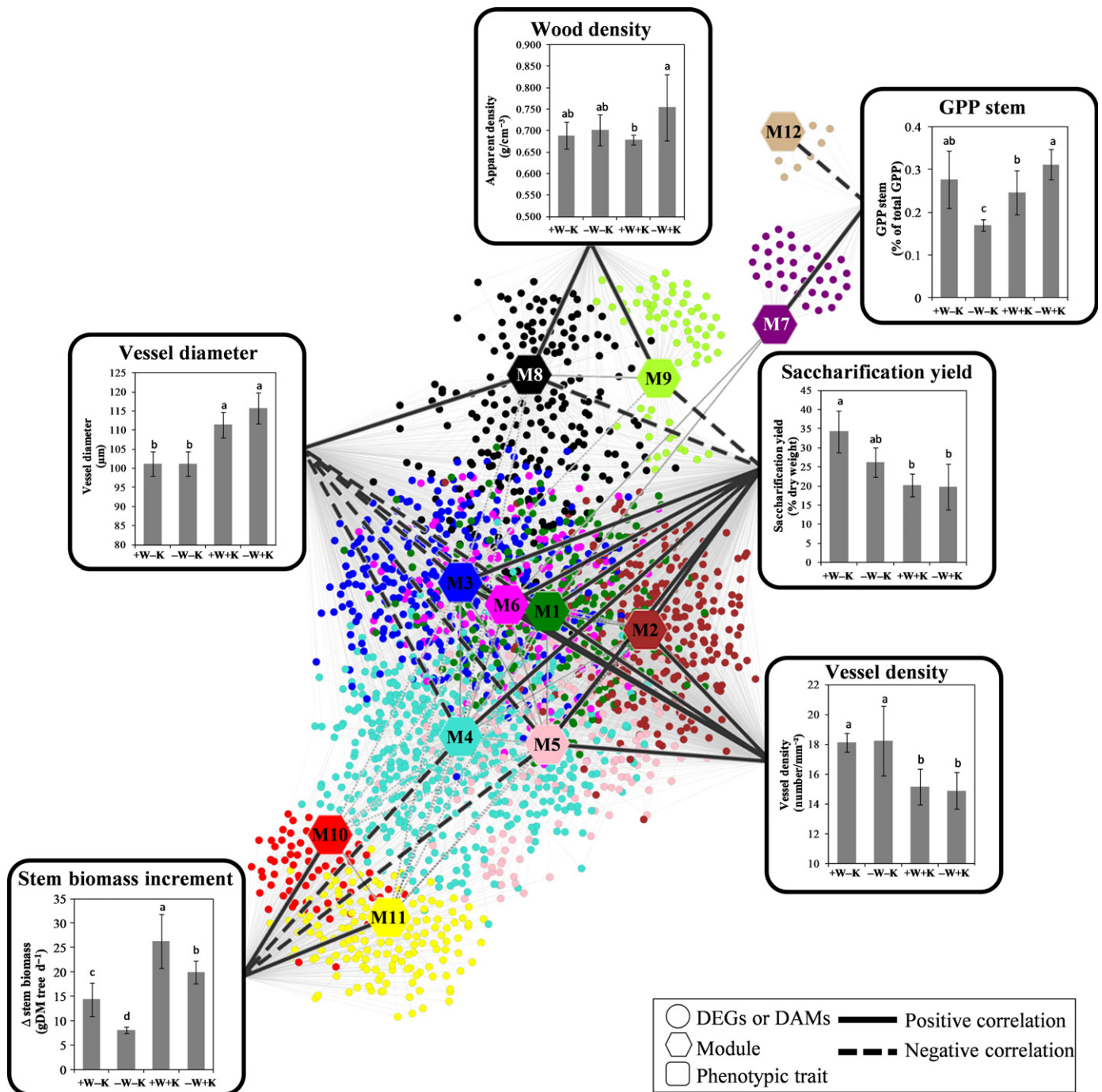


Fig. 5 Cell-wall-related modules are correlated with wood phenotypic traits. Average stem biomass increment (Δ stem biomass), average gross primary productivity allocated to stem growth (GPP_{stem}), saccharification yield, wood density, vessel size and vessel density were measured on developing xylems of *Eucalyptus grandis* trees submitted to potassium supply (+K and -K) and water exclusion (+W and -W). The phenotypic trait profiles are correlated to the average profile of the 12 modules (Fig. 3) and 2184 variables (36 DAMs and 2148 DEGs) presenting the highest correlation values (< 0.9) with at least one phenotypic trait ($P < 0.05$, Supporting Information Table S3). Edges (5726) are proportional to the absolute value of correlations. Positive and negative correlations are represented respectively by solid and dashed lines. DEGs, differentially expressed genes; DAMs, differentially accumulated metabolites. Dot colors correspond to module colors in Fig. 3. Letters represent significant differences between treatments (ANOVA Tukey's honest significant difference test, $n = 4$) and error bars represent \pm SD.

Identification of TFs related to wood formation in response to water exclusion and K-fertilization

With the aim of identifying new TFs involved in wood formation and regulated by K-fertilization and/or W status, we extracted

from modules M1–M6 (Figs 3, 4) a subnetwork containing 113 genes known to be involved in SCW biosynthesis (Fig. 6). All the genes present in this subnetwork were tightly co-expressed and strongly downregulated by K-fertilization. Their expression profiles were positively correlated to saccharification yield and vessel

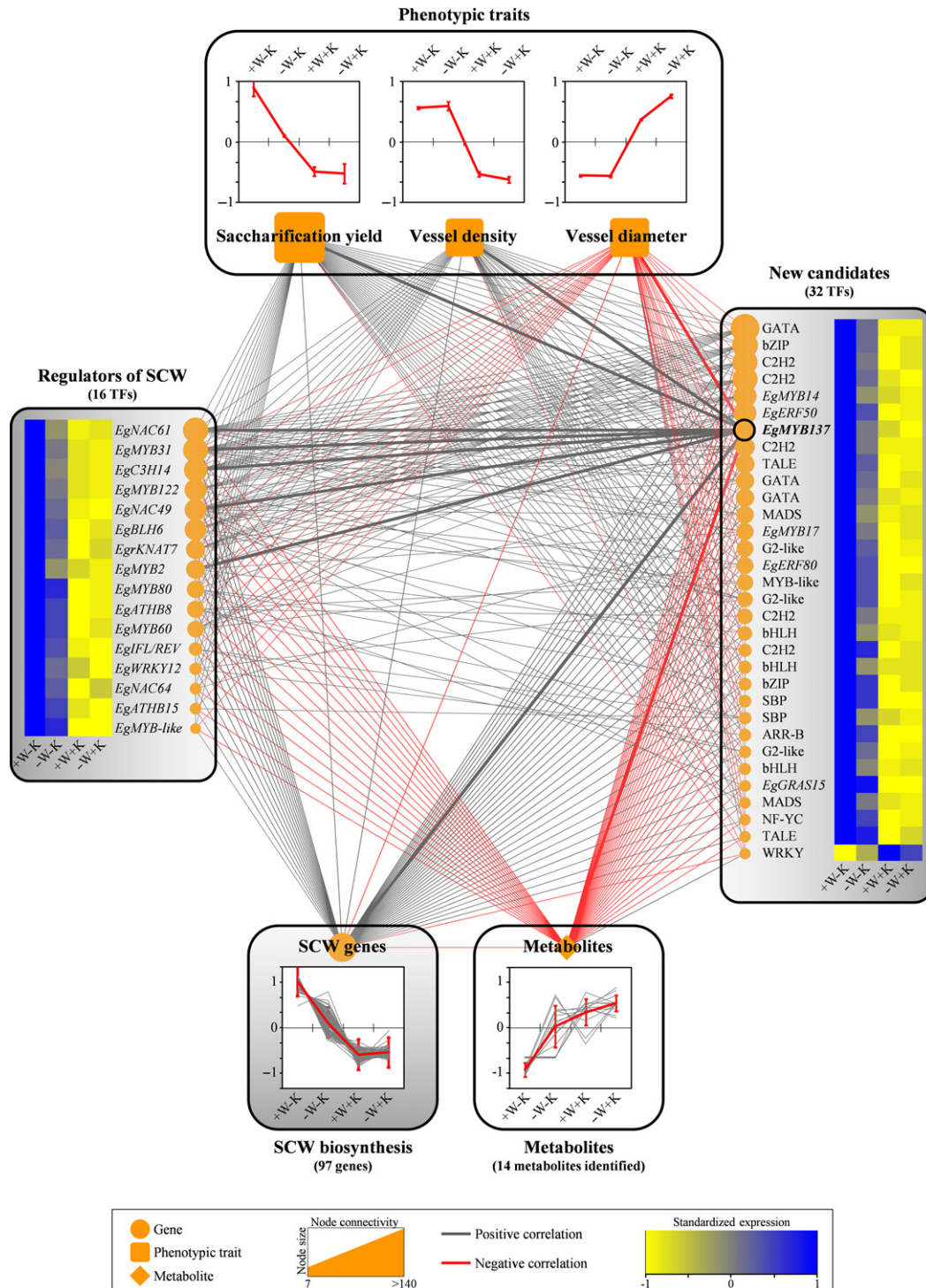


Fig. 6 Transcription factors highly co-regulated with secondary cell wall biosynthesis in stress conditions. This subnetwork of 162 nodes was extracted from modules M1–M6 (Fig. 3) and included significant correlations (edges, $P_{\text{FDR}} < 5.10 \times 10^{-5}$) between 145 DEGs. In addition to DEG–DEG correlations we added the correlations with the 14 identified DAMs (DEG–DAM correlations from MixOmics analyses, Fig. 4), and the correlations with saccharification yield, vessel density and vessel size (DEG–phenotypic traits correlations from WGCNA analyses, Fig. 5). Among the DEGs, 113 were related to SCW formation: 97 were related to CW or SCW biosynthesis (22 related to cellulose, 56 to hemicelluloses, 19 to lignin, bottom panel) and 16 were putative orthologs of TFs involved in SCW formation (left panel). In the right panel, 32 uncharacterized TFs represent new candidates potentially involved in SCW remodeling. Only the most connected TFs (connectivity > 4) correlated with at least one phenotypic trait were kept (nine were not represented). They were all correlated positively with saccharification yield and vessel density, and negatively with vessel diameter and identified DAM accumulation profiles. The edges connected to the best candidate *EgMYB137* (Supporting Information Table S5) are represented in bold. Node size is proportional to the degree of connectivity (Fig. 3; Table S3). Letters represent significant differences between treatments (ANOVA Tukey's honest significant difference test, $n = 4$) and error bars represent SD. Normalized DEG and DAM profiles are represented by heatmaps and graphs in the four treatments: [+K], [–K], *Eucalyptus grandis* trees with and without potassium; [–W], [+W], *Eucalyptus grandis* trees with and without water exclusion.

density but negatively correlated with vessel diameter. Among the SCW-associated DEGs, 65 were correlated with wood phenotypic traits and with identified DAMs (Fig. 6; Table S3). Sixteen of them were orthologs of TFs known to regulate SCW biosynthesis (Table S4) while 32 TFs were not yet functionally characterized in *Arabidopsis* nor *Populus*. We examined their connectivity in networks, their expression profiles in EucGenIE (<https://eucgenie.org/>) and their presence in previous data integration studies in *Arabidopsis*, *Populus* and *Eucalyptus* (Fig. 6; Table S5). *EgMYB137* obtained the best score in the ranking of the 32 TFs. It was correlated with 22 SCW biosynthesis genes and five SCW-TFs which were the closest orthologs of *AtSND1*, *AtNST1*, *AtMYB46*, *AtMYB83* and *AtC3H14* (Table S4). Of note, we found that this *EgMYB137*'s subnetwork was conserved in both *Populus trichocarpa* and *A. thaliana* (Fig. S8).

EgMYB137 is a regulator of xylem formation in *Eucalyptus*

To functionally characterize this promising new candidate, we investigated its spatial expression using *E. grandis* transgenic hairy roots transformed with a promoter-GUS fusion and overexpressed its coding sequence under control of the CamV35S promoter. Histochemical analyses revealed that the *EgMYB137* promoter drives GUS activity in the vascular cylinder of young roots (Fig. 7a) and in parenchyma cells surrounding developing vessels close to the cambial zone in older roots (Fig. 7b–d). Cross-sections of transgenic roots ongoing secondary growth revealed an enhanced deposition of SCW in xylem (Fig. 7e,f). The SCW of fibers of the *p35S:EgMYB137* lines were significantly thicker (+12%) as compared to control lines. By contrast,

SCWs of vessels were significantly thinner in *p35S:EgMYB137* (−4%) as compared to control lines (Fig. 7g). Vessel density was significantly reduced (−35%) in *p35S:EgMYB137* as compared to control lines (Fig. 7h) but no significant change in vessel or

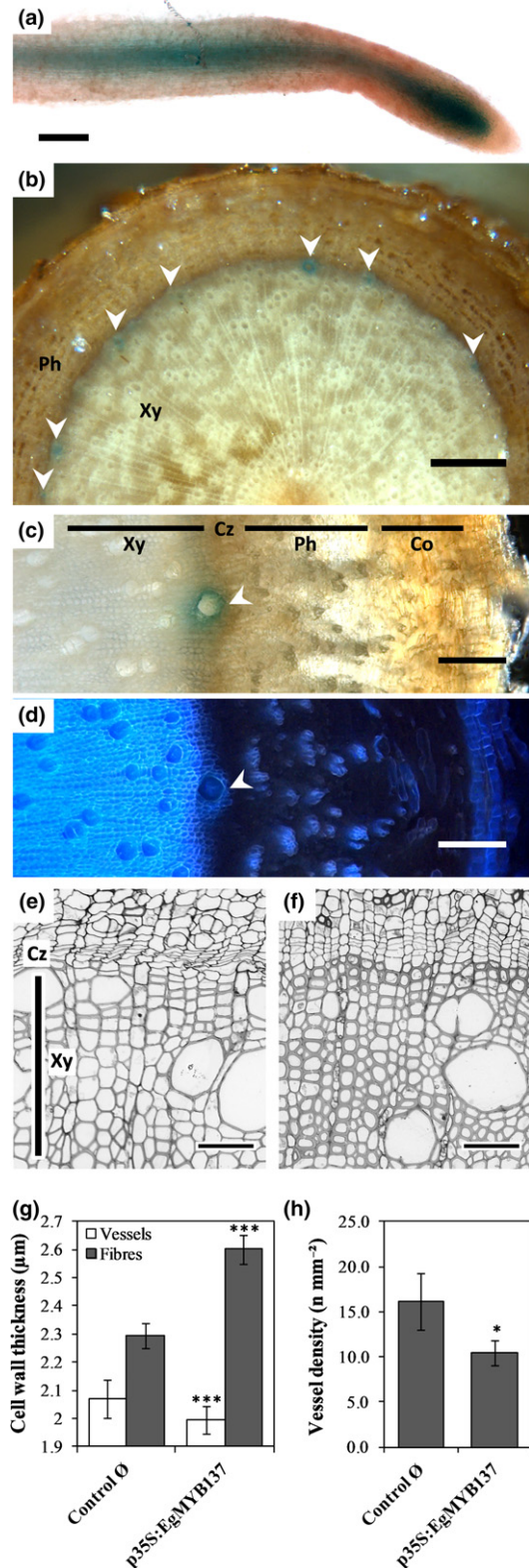


Fig. 7 *EgMYB137* is involved in xylem formation in *Eucalyptus* roots. GUS expression driven by the *EgMYB137* promoter was observed in the main root of *Eucalyptus grandis* transgenic lines, in (a) vascular tissues (*in vitro*, young root tip), (b) xylem vessels (differentiation zone) and (c) axial parenchyma cells surrounding the youngest vessels immediately below the cambium (5-month-old roots). Observations were made in brightfield mode on free-hand cut sections. White arrowheads represent vessels. Co, cortex; Cz, cambial zone; Ph, phloem; Xy, xylem. (d) Five-month-old *Eucalyptus* roots observed under epifluorescence microscopy. Highest autofluorescence intensity is observed in the cell wall (CW) of vessels and axial parenchyma cells immediately below the cambium (white arrowhead). (e) Brightfield observations of semithin section of 5-month-old control root (empty vector) stained with toluidine blue. Cz, cambial zone; Xy, xylem. (f) Brightfield observations of semithin section of 5-month-old *p35S:EgMYB137* roots, showing an increase in fiber CW thickness. (g) Changes in CW thickness of vessels and fibers in *p35S:EgMYB137* root xylem. Vessel SCWs were significantly thinner in *p35S:EgMYB137* lines ($1.99 \pm 0.04 \mu\text{m}$) as compared to control lines ($2.07 \pm 0.06 \mu\text{m}$). Fiber SCWs were significantly thicker in *p35S:EgMYB137* lines ($2.60 \pm 0.05 \mu\text{m}$) as compared to control lines ($2.29 \pm 0.04 \mu\text{m}$). ***, $P < 0.0001$ (Student's *t*-test). (h) Decrease in vessel density in *p35S:EgMYB137* root xylem ($10.4 \pm 1.4 \text{ mm}^{-2}$) as compared to control ($16.1 \pm 3.1 \text{ mm}^{-2}$). *, $P < 0.05$ (Student's *t*-test). Error bars represent SD ($n = 6$ for transgenic lines, $n = 4$ for controls). Vessel CW thickness was measured on > 70 vessels and > 1200 fibers. Vessel density and lumen diameter were measured on > 440 vessels and > 1200 fibers. Scale bars, (a) 200 µm; (b) 500 µm; (c–d) 150 µm; (e–f) 50 µm.

fiber lumen diameter was observed (data not shown). We further investigated the consequences of *EgMYB137* overexpression on saccharification yield (Table 1). With or without pretreatment, saccharification yield was reduced by *c.* 16% in *35S::EgMYB137* lines as compared to control lines.

Discussion

K-fertilization and water availability trigger interconnected regulations in xylem

We developed a systems biology approach that enabled us to get a comprehensive view of the regulations involved in wood formation of field-grown *E. grandis* trees submitted to four treatments combining K-fertilization and rainfall water availability. In our conditions, K-fertilization was responsible for the highest proportion of DEGs and DAMs, the highest proportion of variance explained by PLS-DA and the highest proportion of enriched GO categories. Most of these GO categories were related to development, primary metabolism and cell wall biosynthesis. Most of the genes of the coexpression network (modules M1–M12) were strongly regulated by K-fertilization with no or minor impact of water exclusion. These findings, demonstrating the prevailing impact of K on the remodeling of the transcriptome and the metabolome, are in line with our previous physiological studies on 3-yr-old trees showing that regardless water supply, K-fertilization increased dramatically gross primary productivity and above-ground biomass production (Battie-Laclau *et al.*, 2014a,b; Christina *et al.*, 2015). Similarly, we observed an increase in stem biomass increments in K-fertilized trees.

In response to water exclusion, enriched GO categories were mainly related to stress response and molecule transport but a high proportion of the stress-related genes were also differentially regulated by K-supply. The separation between [–W] and [+W] treatments by PLS-DA was highly dependent on K-fertilization, suggesting that tree responses to water shortage is highly dependent on K-availability. By contrast, genes in modules M10 and M11, involved in abiotic stress response and containing numerous genes of the ABA signaling pathway, were highly upregulated in either [–W+K] or [+W+K] treatments, suggesting that K-fertilized trees were stressed independently of water availability. This finding is consistent with previous physiological studies showing that at the end of the dry season, K-fertilized trees reached a higher level of water stress than K-deficient trees (Battie-Laclau *et al.*, 2014a,b, 2016). This drought-induced effect of K-fertilization was linked to the enhancement of tree growth rate causing a faster decrease in soil water stocks during dry periods (Christina *et al.*, 2018). This was particularly true in our study because of the exceptionally low amount of rainfall during the months preceding sampling (Fig. S2). Trees grown in [–W+K] underwent continuous drought episodes and developed adaptive traits to survive (Battie-Laclau *et al.*, 2014a,b, 2016). In comparison, trees grown in [+W+K] were less acclimated to severe drought events. In agreement with this hypothesis, [–W+K] trees exhibited a higher GPP_{stem} than [+W+K] and the highest expression level of stress responsive genes (modules M10 and M11),

Table 1 Over-expression of *EgMYB137* in *Eucalyptus grandis* roots changed saccharification yield.

	<i>p35S::EgMYB137</i>	Control Ø
Saccharification yield without pretreatment (%DW)	16.0 ± 1.8*	19.1 ± 2.2
Saccharification yield with pretreatment (%DW)	53.6 ± 5.8**	63.6 ± 6.8

Analyses of saccharification yield were performed in triplicate for nine lines of *p35S::EgMYB137* and six lines of controls (Ø, empty vectors). Values were significantly lower in *p35S::EgMYB137* lines compared to controls, in both pretreated and nonpretreated samples (± represents SD; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; Student's *t* test). Values are given as the percentage of dry weight (DW) of extracted xylem residue (EXR).

such as the drought-responsive TF *EgDREB2.5* (Fig. S4), was observed in [+W+K] treatment relative to [–W+K]. DEGs involved in secondary metabolism (module M9) and most of the (LC-MS) DAMs were also strongly induced in K-fertilized trees. Among the latter, the 14 DAMs identified could be related to drought stress response as signaling lipids (Hou *et al.*, 2016) or antioxidant compounds such as flavonoids, terpenoids and coumarins (Karabourniotis *et al.*, 2014).

SCW formation in the heart of the xylem response to K-fertilization and water supply

The SCW modules (M1–M6) constitute the core of the network and the vast majority of the SCW-associated genes were drastically downregulated in response to K-fertilization, suggesting a reduction or a delayed SCW deposition in developing xylem cells. These six modules were strongly correlated with saccharification yield, which reflects the accessibility of cell wall polysaccharides to enzymatic degradation, and is a crucial parameter for second-generation biofuel production (Van Acker *et al.*, 2014). A subset of genes in M1–M6, associated with primary metabolism, were negatively correlated with the SCW-associated genes and upregulated in K-fertilized trees. Among them, we found *EgrNAC12*, a putative ortholog of *ANAC002*, an ABA-inducible key TF that is strongly upregulated in response to cellular carbon depletion in *Arabidopsis* and responsive to stress including drought (Garapati *et al.*, 2015). Given that K-fertilization triggers drought stress signaling in our conditions, one possible hypothesis could be that K-fertilized trees develop strategies to mitigate drought stress such as stomatal closure to reduce transpiration, resulting in a reduction of carbon fixation by photosynthesis. Prolonged episodes of drought are known to lead to lower carbon uptake and consequently to carbon starvation for all tree organs (Mitchell *et al.*, 2014). K-fertilized trees could therefore modify carbon allocation at the detriment of SCW biosynthesis, as suggested by the repression of genes related to nucleotide-sugars (e.g. UDP-galactose transporters), often included within SCW modules (Li *et al.*, 2016b). Similarly, the accumulation of 80% of DAMs, negatively correlated with SCW-DEGs, could be at least partially a consequence of the repression of a phenylpropanoid pathway branch (Vanholme *et al.*, 2012).

Another hypothesis not exclusive of the first is that as in poplar, SCW deposition could be delayed in K-fertilized trees as a result of a stimulation of cambial activity (Langer *et al.*, 2002). In support of this hypothesis, we detected two groups of modules (M8–9 and M10–11) associated with cambial activity, cell activity and metabolism that were induced in response to K-fertilization. The expression profiles of these genes, which were also positively correlated with trunk biomass increments and wood density, pointed to a positive effect of K-fertilization on cambial activity and cell metabolism. This agrees with the essential role of K in maintaining cambial activity (Fromm, 2010). According to Langer *et al.* (2002), the osmotic role of K is also essential for vessel expansion. Modules M1–M6 were correlated negatively with vessel diameters and positively with vessel density, which increased and decreased respectively in response to K-fertilization. Besides enhancing transport efficiency, wider vessels can increase the vulnerability of xylem to cavitation, making trees more sensitive to drought episodes although other parameters such as vessel SCW composition and structure also influence xylem cavitation (Hacke *et al.*, 2001).

Most systems biology studies performed on woody tissues have focused on SCW, and only a few uncovered genes involved in cambial activity (Zinkgraf *et al.*, 2017; Ployet *et al.*, 2018). In the present study, the fine sampling of immature cells between bark and differentiating xylem allowed the identification of 18 TFs as promising candidates for the control of cambial activity in response to K-fertilization and water exclusion.

Integrative approach linked meaningful genes to complex traits

Within the core SCW modules (M1–M6), 56 TFs correlated to SCW genes and wood traits. These known and potential SCW-related TFs, downregulated in response to K fertilization and to a lesser extent by water shortage, probably play a role in the adaptation of trees to these environmental cues through modification of SCW properties and/or xylem anatomy. For instance, the strong downregulation of the SCW positive master switches such as *EgMYB2* suggests that SCW deposition in fiber cells is dramatically reduced in K-fertilized trees. Similar profiles were observed for a suite of TFs (*EgMYB31*, *EgMYB60*, *EgMYB80*, *EgMYB122*, *Eucgr.F02796*, *Eucgr.D01219* and *Eucgr.D01935*) which are the orthologs of TFs regulating SCW deposition in *Arabidopsis* *AtMYB83*, *AtMYB103*, *AtMYB69*, *AtMYB43*, *AtC3H14*, *AtWRKY12* and *AtKNAT7* respectively. TFs described in the literature as positive and negative regulators of SCW deposition (Hussey *et al.*, 2013) were both poorly expressed in K-treatments, suggesting that xylem differentiation is slowed down, to the benefit of cambial cell proliferation. In fully elongated immature xylem cells of *Arabidopsis*, SCW deposition is activated by either *AtSND1* and *AtNST1/2* in fibers or *AtVND6* and *AtVND7* in vessels (Zhong *et al.*, 2006; Mitsuda *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2010). SCW modules contain *EgNAC61* and *EgNAC49*, the closest orthologs of *AtSND1* and *AtNST1/2*, but no putative orthologs of the VND (vascular NAC domain) TFs. The absence of significant downregulation of VND master

switches suggests that the deposition of SCW in vessels is moderately impacted by fertilization, possibly to preserve the integrity of vessel SCWs, essential for water transport. Similarly, we observed an opposite pattern of SCW deposition in fibers and vessels of *35S::MYB137* transgenic roots (Fig. 7). *EgMYB137* appeared as the best candidate from a list of 32 TFs of unknown function, tightly correlated with a large number of known SCW biosynthesis genes as well as with wood properties (saccharification yield and vessel properties). To our knowledge, these TFs highly expressed in xylem, or their close orthologs, have never been characterized although they have been detected in other systems biology studies (Table S5). Some of them were coexpressed with SCW-related genes or direct targets of SCW regulators in *Arabidopsis* and *Eucalyptus* (Table S5). In poplar, putative orthologs for 22 of them were clustered in wood-related modules together with SCW genes (Table S5). *EgMYB137*, a member of the large R2R3MYB family (Soler *et al.*, 2015), showed the highest ranking among all candidates (Table S5).

The highly connected xylem-specific TF *EgMYB137* can regulate SCW deposition

Functional characterization of *EgMYB137* strongly supports that this TF regulates SCW formation as inferred from the network where it was correlated with saccharification yield, vessel density and vessel diameter: the *EgMYB137* promoter is specifically active in developing vessels and surrounding axial parenchyma; and in *EgMYB137*-overexpressing lines, cell wall thickness increases whereas vessel density and saccharification markedly decrease. Based on the positive correlations between *EgMYB137* expression profiles and both saccharification and vessel density, it was unexpected to observe a decrease of both in the transgenic overexpressing hairy roots. This apparent discrepancy might reflect the complex mode of regulation of some TFs, which can have a dual function depending on their expression level (dose-dependent effect) and the abundance of additional regulator proteins. This was clearly illustrated for *SND2* a well-known SCW TF, whose overexpression could increase SW deposition within a limited range of overexpression levels (Hussey *et al.*, 2011). Above a certain level, *AtSND2* overexpression had a negative effect on interfascicular fiber SCW deposition in *Arabidopsis* (Hussey *et al.*, 2011). More investigations are required to define the mode of action of *EgMYB137*, although our data clearly demonstrated that it has an important role in the regulation of wood formation. These result also strongly support SCW-regulatory roles for the 31 other TFs that deserve to be functionally characterized and further highlight the powerfulness of the network approach developed here.

In conclusion, our network-based approach revealed that co-regulated genes and metabolite modules related to wood formation are at the heart of a complex trade-off between secondary growth and stress response. Nested in these modules, new uncharacterized TFs were highlighted, potentially involved in SCW remodeling in stress conditions, leading to adaptive wood traits. We demonstrated that the most promising of them, the TF *EgMYB137*, was involved in the regulation of xylem structure

and composition. Together, this study represents an original attempt to correlate molecular regulations and complex wood traits in xylem.

Acknowledgements

The experimental site belongs to the SOERE F-ORE-T, which is supported annually by Ecofor, Allenvi and the French National Research Infrastructure ANAEE-F (<http://www.anaee-france.fr/fr/>). This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02), Agropolis Fondation (project ID 1203-003, Investissements d'avenir program, Labex Agro/ANR-10-LABX-372 0001-01) associated with CAPES (project: 017/13), CNPq (projects: 444793/2014-3 and 014/2012) and FAPESP (project 2013/25642-5). The authors acknowledge the University of Toulouse, the Genotoul GeT Platform and the TRI-Genotoul platform for microscopic analyses, and M. Bermudez and A. C. Siqueira for their contributions to field trials. The authors acknowledge S. Déjean and K-A. Lê Cao for help with the use of MIXOMICS. RP was supported by a PhD grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Author contribution

RP, MTVL, MC, BF, MTF, J-PL, CAL, GC, JG-P and FM contributed to manuscript redaction. RP, HSC, BF, MD and FM contributed to statistics, bioinformatics and data analyses. RP and GC performed xylem sampling. RP, MM, GC and FM contributed to RNA extraction and wood phenotypic traits analyses. RP, MTVL, TRC and BF contributed to extraction and metabolomics analyses. RP, FM and MM contributed to characterization of transgenic plants.

ORCID

Mathias Christina  <https://orcid.org/0000-0003-3618-756X>

Bénédicte Favreau  <https://orcid.org/0000-0003-2786-9374>

Jacqueline Grima-Pettenati  <https://orcid.org/0000-0003-4272-9767>

Jean-Paul Laclau  <https://orcid.org/0000-0002-2506-214X>

Fabien Mounet  <https://orcid.org/0000-0001-6632-3070>

References

- Andersson-Gunnerås S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B. 2006. Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 45: 144–165.
- Anschütz U, Becker D, Shabala S. 2014. Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *Journal of Plant Physiology* 171: 670–687.
- Arend M, Fromm J. 2007. Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiology* 27: 985–992.
- Arend M, Monshausen G, Wind C, Weisenseel MH, Fromm J. 2004. Effect of potassium deficiency on the plasma membrane H⁺-ATPase of the wood ray parenchyma in poplar. *Plant, Cell & Environment* 27: 1288–1296.
- Arend M, Weisenseel MH, Brummer M, Osswald W, Fromm JH. 2002. Seasonal changes of plasma membrane H⁺-ATPase and endogenous ion current during cambial growth in poplar plants. *Plant Physiology* 129: 1651–1663.
- Battie-Laclau P, Delgado-Rojas JS, Christina M, Nouvellon Y, Bouillet J-P, Piccolo M de C, Moreira MZ, Gonçalves JL de M, Rouspard O, Laclau J-P. 2016. Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *Forest Ecology and Management* 364: 77–89.
- Battie-Laclau P, Laclau J-P, Beri C, Mietton L, Muniz MRA, Arenque BC, De Cassia Piccolo M, Jordan-Meille L, Bouillet J-P, Nouvellon Y. 2014a. Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. *Plant, Cell & Environment* 37: 70–81.
- Battie-Laclau P, Laclau J-P, Domec J-C, Christina M, Bouillet J-P, de Cassia Piccolo M, de Moraes Gonçalves JL, e Moreira RM, Krusche AV, Bouvet J-M *et al.* 2014b. Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytologist* 203: 401–413.
- Bonan GB. 2008. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* 320: 1444–1449.
- Cai B, Li C-H, Huang J, Reuber L, Jiang C. 2014. Systematic identification of cell-wall related genes in *Populus* based on analysis of functional modules in co-expression network. *PLoS ONE* 9: e95176.
- Cakmak I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 521–530.
- Camargo ELO, Nascimento LC, Soler M, Salazar MM, Lepikson-Neto J, Marques WL, Alves A, Teixeira PJPL, Mieczkowski P, Carazzolle MF *et al.* 2014. Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* 14: 256.
- Chen H-C, Song J, Wang JP, Lin Y-C, Ducoste J, Shuford CM, Liu J, Li Q, Shi R, Nepomuceno A *et al.* 2014. Systems biology of lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: heteromeric 4-coumaric acid: Coenzyme A ligase protein complex formation, regulation, and numerical modeling. *Plant Cell* 26: 876–893.
- Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, Nouvellon Y, Bouillet J-P, Jourdan C, de Moraes Gonçalves JL, Laclau J-P. 2015. Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *Global Change Biology* 21: 2022–2039.
- Christina M, le Maire G, Nouvellon Y, Vezy R, Bordon B, Battie-Laclau P, Gonçalves JLM, Delgado-Rojas JS, Bouillet J-P, Laclau J-P. 2018. Simulating the effects of different potassium and water supply regimes on soil water content and water table depth over a rotation of a tropical *Eucalyptus grandis* plantation. *Forest Ecology and Management* 418: 4–14.
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K. 2011. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11: 163.
- De Vos RCH, Moco S, Lommen A, Keurentjes JJB, Bino RJ, Hall RD. 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* 2: 778–791.
- Demura T, Fukuda H. 2007. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Science* 12: 64–70.
- Dobner M, Huss J, Tomazello Filho M. 2018. Wood density of loblolly pine trees as affected by crown thinnings and harvest age in southern Brazil. *Wood Science and Technology* 52: 465–485.
- Dunisch O, Bauch J, Muller M, Greis O. 1998. Subcellular quantitative determination of K and Ca in phloem, cambium, and xylem cells of spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) during earlywood and latewood formation. *Holzforschung* 52: 582–588.
- Epron D, Laclau J-P, Almeida JCR, Gonçalves JLM, Ponton S, Sette CR, Delgado-Rojas JS, Bouillet J-P, Nouvellon Y. 2012. Do changes in carbon allocation account for the growth response to potassium and sodium applications in tropical *Eucalyptus* plantations? *Tree Physiology* 32: 667–679.

- Euring D, Bai H, Janz D, Polle A. 2014. Nitrogen-driven stem elongation in poplar is linked with wood modification and gene clusters for stress, photosynthesis and cell wall formation. *BMC Plant Biology* 14: 391.
- Foucart C, Jauneau A, Gion J-M, Amelot N, Martinez Y, Panegos P, Grima-Pettenati J, Sivadon P. 2009. Overexpression of EgROP1, a *Eucalyptus* vascular-expressed Rac-like small GTPase, affects secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 183: 1014–1029.
- Fromm J. 2010. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiology* 30: 1140–1147.
- Garapati P, Feil R, Lunn JE, Van Dijk P, Balazadeh S, Mueller-Roeber B. 2015. Transcription factor *Arabidopsis* activating factor1 integrates carbon starvation responses with trehalose metabolism. *Plant Physiology* 169: 379–390.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N *et al.* 2005. EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *The Plant Journal* 43: 553–567.
- Gonçalves JLM, Barros NF, Nambiar EKS, Novais RF. 1997. Soil and stand management for short-rotation plantations. In: Nambiar EKS, Brown AG, eds. *Management of soil, nutrients and water in tropical plantation forests*. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 379–417.
- González-García M, Almeida AC, Hevia A, Majada J, Beadle C. 2016. Application of a process-based model for predicting the productivity of *Eucalyptus nitens* bioenergy plantations in Spain. *GCB Bioenergy* 8: 194–210.
- Gromski PS, Xu Y, Kotze HL, Correa E, Ellis DI, Armitage EG, Turner ML, Goodacre R. 2014. Influence of missing values substitutes on multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolites* 4: 433–452.
- Guo H, Wang Y, Wang L, Hu P, Wang Y, Jia Y, Zhang C, Zhang Y, Zhang Y, Wang C *et al.* 2017. Expression of the MYB transcription factor gene BpMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*. *Plant Biotechnology Journal* 15: 107–121.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA. 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126: 457–461.
- Hawkins E, Sutton R. 2012. Time of emergence of climate signals. *Geophysical Research Letters* 39: 1–6.
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J *et al.* 2001. A transcriptional roadmap to wood formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 14732–14737.
- Hinchee M, Rottmann W, Mullinax L, Zhang C, Chang S, Cunningham M, Pearson L, Nehra N. 2009. Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 45: 619–629.
- Hoffmann B, Münch S, Schwägele F, Neusuß C, Jira W. 2017. A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control* 71: 200–209.
- Hou Q, Ufer G, Bartels D. 2016. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 39: 1029–1048.
- Hussey SG, Mizrachi E, Creux NM, Myburg AA. 2013. Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–21.
- Hussey SG, Mizrachi E, Spokevicius AV, Bossinger G, Berger DK, Myburg AA. 2011. SND2, a NAC transcription factor gene, regulates genes involved in secondary cell wall development in *Arabidopsis* fibres and increases fibre cell area in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology* 11: 173.
- IPCC. 2013. Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Jansen S, Gortan E, Lens F, Lo Gullo MA, Salleo S, Scholz A, Stein A, Trifilo P, Nardini A. 2011. Do quantitative vessel and pit characters account for ion-mediated changes in the hydraulic conductance of angiosperm xylem? *New Phytologist* 189: 218–228.
- Karabourniotis G, Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Bresta P, Stavroulaki V, Sumbele S. 2014. “Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence”: two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Science* 227: 21–27.
- Kim D, Perteau G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14: R36.
- Kuhn AJ, Schröder WH, Bauch J. 1997. On the distribution and transport of mineral elements in xylem, cambium and phloem of spruce (*Picea abies* [L.] karst.). *Holzforschung* 51: 487–496.
- Laclau J-P, Almeida JCR, Gonçalves JLM, Saint-Andre L, Ventura M, Ranger J, Moreira RM, Nouvellon Y. 2009. Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in *Eucalyptus* plantations. *Tree Physiology* 29: 111–124.
- Langer K, Ache P, Geiger D, Stinzinger A, Arend M, Wind C, Regan S, Fromm J, Hedrich R. 2002. Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 32: 997–1009.
- Langer K, Levchenko V, Fromm J, Geiger D, Steinmeyer R, Lautner S, Ache P, Hedrich R. 2004. The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 37: 828–838.
- Langfelder P, Horvath S. 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9: 559.
- Lê Cao K-A, Costello M-E, Lakis VA, Bartolo F, Chua X-Y, Brazeilles R, Rondeau P. 2016. MixMC: a multivariate statistical framework to gain insight into microbial communities. *PLoS ONE* 11: e0160169.
- Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, Brière C, Séguin A, Mackay J, Grima-Pettenati J. 2007. Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Science* 173: 542–549.
- Li Z, Fernie AR, Persson S. 2016a. Transition of primary to secondary cell wall synthesis. *Science Bulletin* 61: 838–846.
- Li Z, Omranian N, Neumetzler L, Wang T, Herter T, Usadel B, Demura T, Gialalisco P, Nikoloski Z, Persson S. 2016b. A transcriptional and metabolic framework for secondary wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 172: 1334–1351.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M. 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21: 3448–3449.
- Mansfield SD. 2009. Solutions for dissolution–engineering cell walls for deconstruction. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 286–294.
- Mellerowicz EJ, Gorshkova TA. 2012. Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition. *Journal of Experimental Botany* 63: 551–565.
- Mitchell PJ, O’Grady AP, Hayes KR, Pinkard EA. 2014. Exposure of trees to drought-induced die-off is defined by a common climatic threshold across different vegetation types. *Ecology and Evolution* 4: 1088–1101.
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. 2007. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 270–280.
- Mizrachi E, Mansfield SD, Myburg AA. 2012. Cellulose factories: advancing bioenergy production from forest trees. *New Phytologist* 194: 54–62.
- Mizrachi E, Verbeke L, Christie N, Fierro AC, Mansfield SD, Davis MF, Gjersing E, Tuskan GA, Van Montagu M, Van de Peer Y *et al.* 2017. Network-based integration of systems genetics data reveals pathways associated with lignocellulosic biomass accumulation and processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 114: 1195–1200.
- Nardini A, Grego F, Trifilo P, Salleo S. 2010. Changes of xylem sap ionic content and stem hydraulics in response to irradiance in *Laurus nobilis*. *Tree Physiology* 30: 628–635.
- Plasencia A, Soler M, Dupas A, Ladouce N, Silva-Martins G, Martinez Y, Lapierre C, Franche C, Truchet I, Grima-Pettenati J. 2016. *Eucalyptus* hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1381–1393.
- Plomion C, Leprovost G, Stokes A. 2001. Wood formation in trees wood formation in trees. *Plant Physiology* 127: 1513–1523.

- Ployet R, Soler M, Carocha V, Ladouce N, Alves A, Rodrigues J-C, Harvengt L, Marque C, Teulières C, Grima-Pettenati J *et al.* 2018. Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*. *Tree Physiology* 38: 409–422.
- Ramirez V, Agorio A, Coego A, García-Andrade J, Hernández MJ, Balaguer B, Ouwerkerk PBF, Zarra I, Vera P. 2011. MYB46 modulates disease susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 155: 1920–1935.
- Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, Vilo J. 2016. g: profiler—a web server for functional interpretation of gene lists. *Nucleic Acids Research* 44: W83–W89.
- Sardans J, Peñuelas J. 2015. Potassium: a neglected nutrient in global change. *Global Ecology and Biogeography* 24: 261–275.
- Shi R, Wang JP, Lin Y-C, Li Q, Sun Y-H, Chen H, Sederoff RR, Chiang VL. 2017. Tissue and cell-type co-expression networks of transcription factors and wood component genes in *Populus trichocarpa*. *Planta* 245: 927–938.
- Singh A, Gautier B, Shannon CP, Vacher M, Rohart F, Tebunt SJ, Le Cao K-A. 2016. DIABLO – an integrative, multi-omics, multivariate method for multi-group classification. *bioRxiv*. doi: 10.1101/067611.
- Smethurst P, Knowles A, Churchill K, Wilkinson A, Lyons A. 2007. Soil and foliar chemistry associated with potassium deficiency in *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research* 37: 1093–1105.
- Soler M, Camargo ELO, Carocha V, Cassan-Wang H, San Clemente H, Savelli B, Hefer CA, Paiva JAP, Myburg AA, Grima-Pettenati J. 2015. The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytologist* 206: 1364–1377.
- Stekhoven DJ, Buhlmann P. 2012. MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* 28: 112–118.
- Taylor-Teeple M, Lin L, De Lucas M, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Lin L, de Lucas M *et al.* 2015. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517: 571–575.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* 7: 562–578.
- Van Acker R, Lepélé J-C, Aerts D, Storme V, Goeminne G, Ivens B, Légée F, Lapierre C, Piens K, Van Montagu MCE *et al.* 2014. Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 111: 845–850.
- Van Acker R, Vanholme R, Piens K, Boerjan W. 2016. Saccharification protocol for small-scale lignocellulosic biomass samples to test processing of cellulose into glucose. *Bio-Protocol* 6: e1701.
- Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K, Boerjan W. 2012. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 3506–3529.
- Wang Y, Chantreau M, Sibout R, Hawkins S, Loqué D, Berkeley L, Wilkerson CG, State M. 2013. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–14.
- Wang JP, Matthews ML, Williams CM, Shi R, Yang C, Tunlaya-Anukit S, Chen H-C, Li Q, Liu J, Lin C-Y *et al.* 2018. Improving wood properties for wood utilization through multi-omics integration in lignin biosynthesis. *Nature Communications* 9: 1579.
- Wildhagen H, Paul S, Allwright M, Smith HK, Malinowska M, Schnabel SK, Paulo MJ, Cattonaro F, Vendramin V, Scalabrin S *et al.* 2018. Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree Physiology* 38: 320–339.
- Wind C, Arend M, Fromm J. 2004. Potassium-dependent cambial growth in poplar. *Plant Biology* 6: 30–37.
- Wright SJ. 2011. The carbon sink in intact tropical forests. *Global Change Biology* 19: 337–339.
- Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, Kubo M, Ohme-Takagi M, Fukuda H, Demura T. 2010. VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 1249–1263.
- Yang JH, Wang H. 2016. Molecular mechanisms for vascular development and secondary cell wall formation. *Frontiers in Plant Science* 7: 356.
- Zhong R, Demura T, Ye Z-H. 2006. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3158–3170.
- Zinkgraf M, Liu L, Groover A, Filkov V. 2017. Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytologist* 214: 1464–1478.
- Zwieniecki MA, Secchi F. 2015. Threats to xylem hydraulic function of trees under ‘new climate normal’ conditions. *Plant, Cell & Environment* 38: 1713–1724.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1 Description of biological replicates and experimental methodology.

Fig. S2 Monthly measurements of rainfall amount on the experimental system from 2010 to 2018.

Fig. S3 Principal component analyses of metabolomic data illustrating the reproducibility of the four independent replicates.

Fig. S4 Comparison of expression profiles obtained by real-time quantitative PCR and RNA sequencing for a subset of selected genes.

Fig. S5 MIXOMICS network threshold selection.

Fig. S6 Venn diagrams describing the effect of water availability and potassium supply on DEGs and DAMs repartition within each of the 12 modules detected by WGCNA analyses.

Fig. S7 Heatmaps representing correlation values between average gene module profiles and wood phenotypic traits.

Fig. S8 Conservation of the EgMYB137 subnetwork in *Eucalyptus grandis*, *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*.

Methods S1 Biomass estimation, biochemical analyses, microscopy and histochemistry.

Methods S2 GC and LC-MS analyses.

Table S1 Transcriptomic data and Gene Ontology enrichment analyses.

Table S2 Metabolomic data analyses and identification of DAMs.

Table S3 WGCNA network construction and analyses.

Table S4 Expert annotation of DEGs related to SCW formation based on a comprehensive survey of the literature and detailed matching of the closest orthologs in the *Arabidopsis* genome.

Table S5 Identification of transcription factors (TFs) potentially involved in SCW remodeling in response to water exclusion and K-supply.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews and Tansley insights.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <26 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit **www.newphytologist.com** to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit **www.newphytologist.com**

3.3.2 La perception du sodium induit une balance entre croissance et réponse au stress dans le xylème

Article en cours de préparation : R. Ployet, M. Veneziano Labate, H. Nguyen, A. Nassuth, T. Regiani Cataldi, H. San Clemente, B. Favreau, M. Tomazello Filho, J.P. Laclau, C. A. Labate, G. Chaix, C. Teulieres, J. Grima-Pettenati, F. Mounet (2022). **Substitution of potassium fertilization by sodium induces a trade-off between wood biomass accumulation and stress response in Eucalyptus.** *Frontiers in Plant science.*

Le réchauffement climatique menace directement les forêts de notre planète, réduisant ainsi la fixation du carbone atmosphérique et la production de bois. La plupart des espèces forestières à forte productivité, comme l'Eucalyptus, sont cultivées dans des régions tropicales et subtropicales, où le lessivage intense des sols requiert l'ajout de nutriments, comme le potassium, pour stimuler le rendement. Ces fertilisants, disponibles en quantité limitée, ont un coût économique et écologique important. De plus, en favorisant la forte croissance des arbres, les engrais encouragent l'épuisement des réserves hydriques du sol et accroissent le niveau de stress auquel les plantes sont exposées. Des études menées par nos collaborateurs du CIRAD sur des arbres fertilisés avec du potassium présentaient un niveau de stress plus important, durant la saison sèche, que ceux n'ayant reçu aucun engrais (Battie-Laclau *et al.*, 2014a ; 2014b ; 2016). Dans notre étude précédente (**Chapitre 3.1**), réalisée sur les mêmes arbres, nous avons identifié des modules de gènes impliqués dans ces mécanismes. Ils sont reliés à des voies de réponse au stress hydrique impliquant l'acide abscissique, ainsi que des facteurs de transcription spécifiques de la réponse à la sécheresse comme les DREB2. Ces gènes sont aussi corrélés à l'accumulation de nombreuses signatures métaboliques de composés antioxydants ou osmoprotectants.

Etant donné l'évolution du climat et le compromis important entre la croissance et la réponse aux stress abiotiques, il semble crucial de mieux comprendre ces mécanismes physiologiques, de façon à les intégrer dans les schémas de pratiques culturales et de sélection des génotypes destinés à la production forestière. Afin de réduire la dépendance des moyens de production agricole vis-à-vis des engrais, il est envisagé de substituer l'ajout de potassium par du sodium. Susceptible de remplacer, au moins en partie, les effets physiologiques du potassium, le sodium permet de maintenir une forte croissance des arbres dès lors qu'il est rajouté en petite quantité (Battie Laclaud *et al.*, 2014a). Il a de plus été observé que l'apport de sodium permettait de réduire la vulnérabilité des plantes au stress hydrique en stimulant les défenses. Cependant, les processus mis en jeu dans ces réponses restent mal compris. Dans les travaux suivants, dont la valorisation est en cours (Ployet et

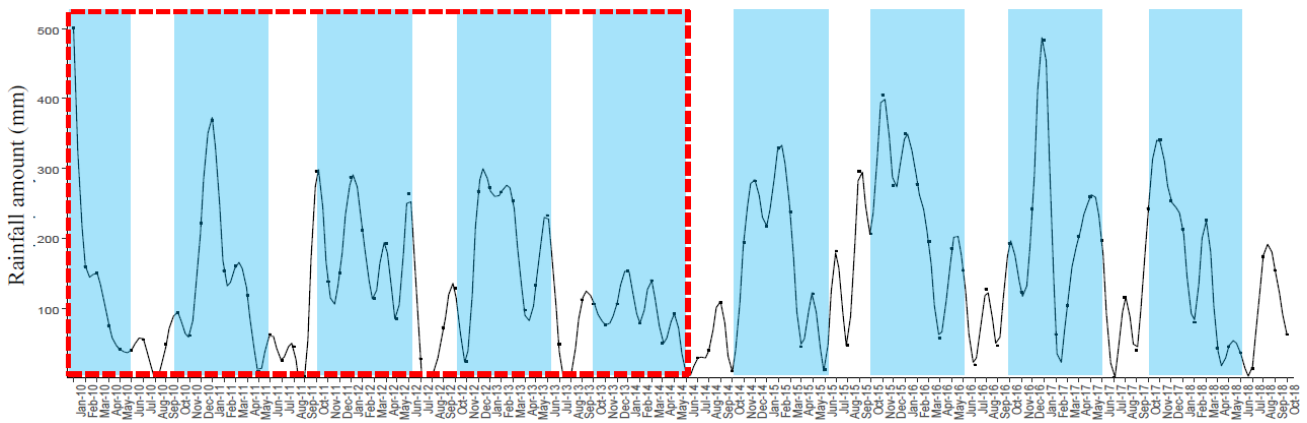


Figure 47 : Analyse de la pluviométrie sur la parcelle d'Itatinga. Le cadre rouge représente la période d'étude. Les zones bleues représentent les saisons des pluies

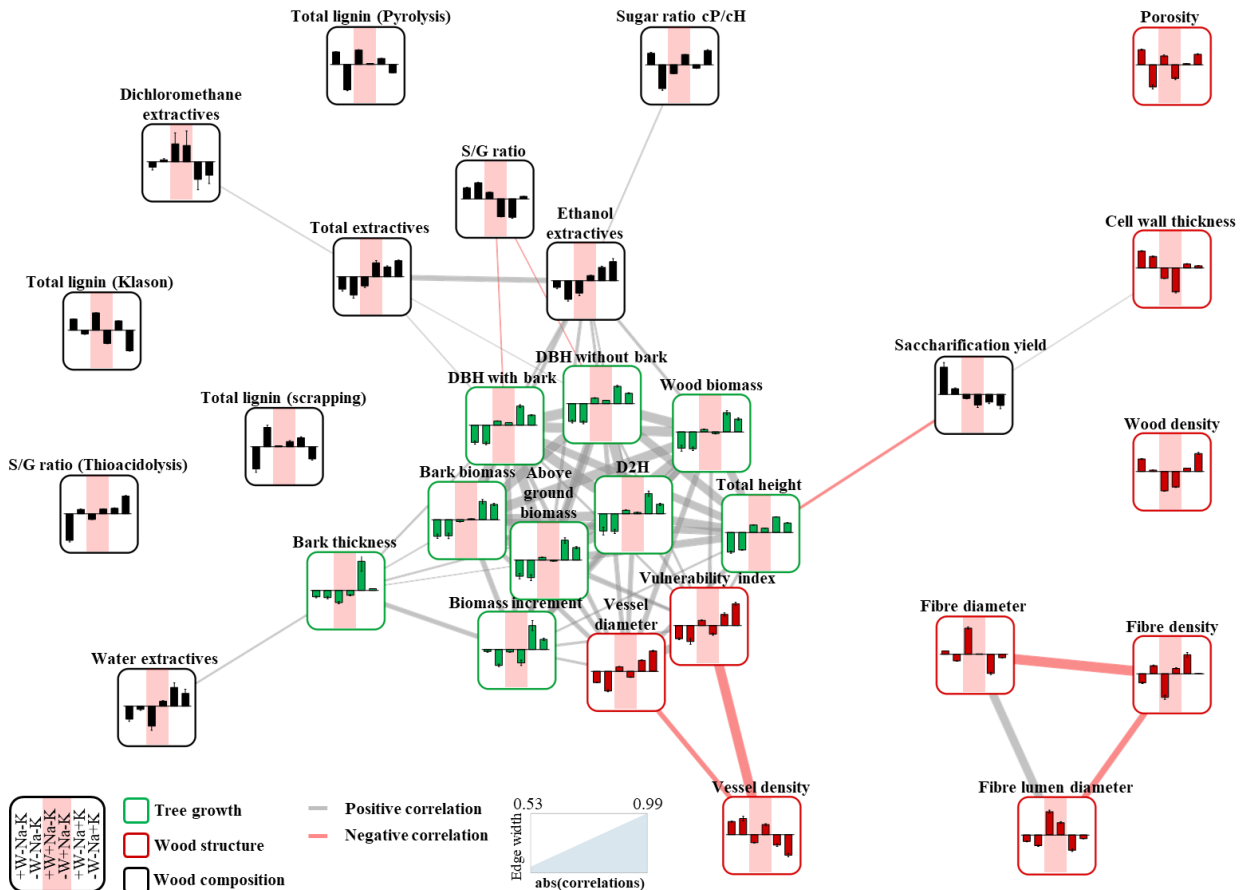


Figure 48 : Réseau de corrélation généré à partir des paramètres phénotypiques mesurés sur des *Eucalyptus grandis* soumis à des apports contrastés en eau, en potassium et en sodium. Les cadres en vert, en rouge et en noir correspondent aux paramètres de croissance, de structure et de composition du bois, respectivement. Les liens en gris et en rouge correspondent à des corrélations positives et négatives, respectivement. L'épaisseur du trait est proportionnelle à la valeur absolue de la corrélation. Pour chaque paramètre, les zones roses correspondent aux conditions avec apport en sodium.

al., 2022 in prep), nous avons souhaité étudier les processus biologiques qui sous-tendent l'effet bénéfique du Na sur la xylogénèse, et d'identifier les gènes régulateurs impliqués. Les ressources biologiques utilisées dans ce travail, obtenues grâce au même dispositif expérimental décrit plus haut (**Chapitre 3.1**), sont constituées d'échantillons de xylème prélevés sur le site brésilien d'Itatinga, à partir de d'*E. grandis* exposés à 6 traitements différents : 2 régimes hydriques (respectivement 100% et 66% d'eau) combinés à 3 régimes de fertilisation (apports minimal, supplémenté en K⁺ ou Na⁺). Nous avons intégré, dans ce travail, la mesure de la croissance des arbres, la caractérisation de la structure et de la composition du bois, l'analyse du transcriptome et du métabolome du xylème. Il est important de préciser que cette étude a été réalisée au cours d'un évènement de sécheresse extrême (Mai 2014). En effet, au cours de la saison humide précédant la période de mesure, les précipitations ont été inférieures de plus de 50% à la moyenne des 5 années précédentes (**Figure 47 A**). Les travaux de nos collaborateurs (Battie-Laclau *et al.*, 2014a,b, 2016) ont montré que la forte croissance des arbres ayant reçu un apport en K⁺ ou en Na⁺ avait considérablement réduit la quantité d'eau disponible dans le sol, en particulier au niveau des parcelles équipées d'un système d'exclusion d'eau de pluie. Paradoxalement, l'ajout de nutriments a donc placé ces arbres dans des contraintes hydriques plus fortes que ceux n'ayant reçu aucun amendement. Ces conditions expérimentales représentent un outil inestimable pour étudier la régulation de la balance entre les mécanismes de croissance et de réponse au stress hydrique au niveau des tissus du bois.

Dans les conditions de notre expérience, nous avons pu montrer que l'ajout de Na⁺ stimule la croissance et la production de bois (**Figure 47B et Figure 48**, données en vert), si l'on compare avec les arbres dépourvus d'apport exogène en nutriments, sans toutefois d'atteindre la forte croissance engendrée par un ajout de potassium. L'ajout de sodium semble également modifier les propriétés physico-chimiques de ces tissus. En particulier, la densité du bois est bien moins importante pour les arbres supplémentés en Na⁺. Ceci s'explique par une augmentation du diamètre du lumen des fibres. Car l'apport de Na⁺, lorsqu'il se combine avec une restriction d'eau, diminue fortement l'épaisseur de la paroi secondaire. On observe aussi une augmentation du nombre de vaisseaux qui s'accompagne d'une diminution de leur diamètre par rapport à la condition avec K⁺ (**Figure 47**, données en rouge). Ces paramètres expliquent la diminution d'un index de vulnérabilité, calculé sur la base des travaux de Arbella *et al.* (2012). En augmentant le nombre de vaisseaux et en diminuant leur diamètre par rapport à la condition avec K⁺, le sodium pourrait favoriser une forte croissance tout en diminuant le risque d'embolie (cavitation), qui survient lors d'un stress hydrique. Cependant, les études sur ce sujet restent controversées, et la résistance à la cavitation dépend d'autres paramètres comme la morphologie des

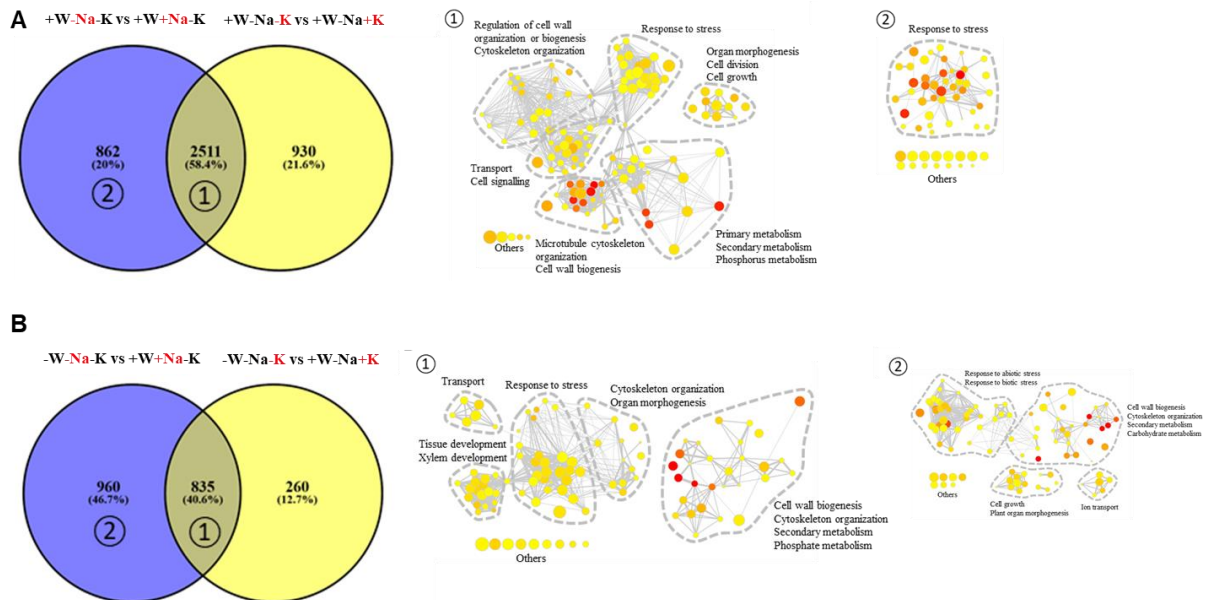


Figure 49 : Processus biologiques régulés au niveau transcriptionnel par le Na⁺, K⁺ et l'eau dans le xylème d'*Eucalyptus grandis*. A, Comparaison des gènes régulés par le Na⁺ et le K⁺ sans restriction d'eau. B, Comparaison des gènes régulés par le Na⁺ et le K⁺ en condition de restriction d'eau. Des réseaux de corrélation de terme GO enrichis par les gènes différentiellement exprimés dans les 6 conditions ont été générés. Avec ou sans restriction d'eau, les réseaux en 1 concernent les catégories GO de gènes présentant des profils similaires sous l'influence du K⁺ et du Na⁺, les réseaux 2 représentent au contraire ceux qui sont uniquement régulés par le Na⁺.

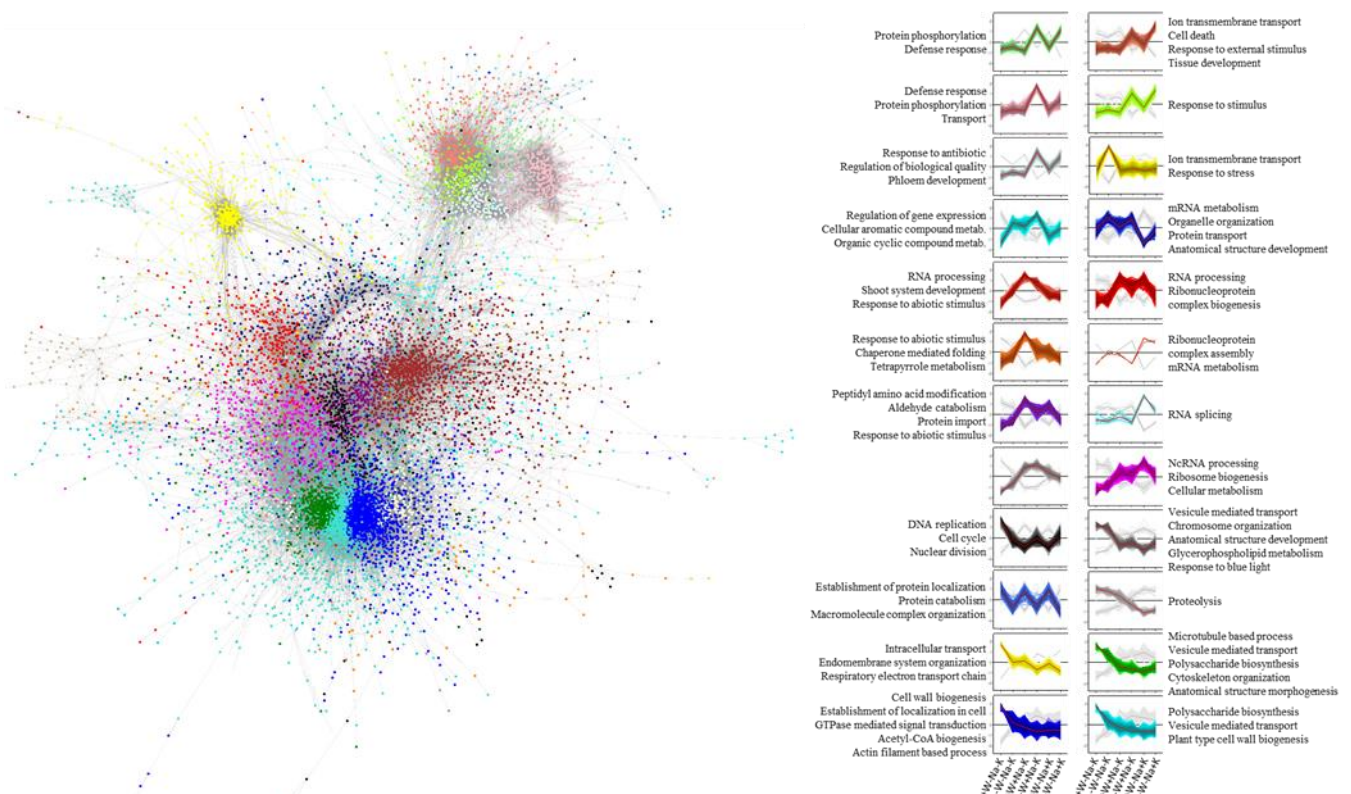


Figure 50: Réseau de co-expression généré à partir des profils d'expression des gènes régulés par le Na⁺, le K⁺ et la disponibilité en eau dans le xylème d'*Eucalyptus grandis*. Douze modules ont été détectés par l'analyse WGCNA. Les profils d'expression des gènes inclus dans les différents modules sont représentés sur la droite.

punctuations présentes sur les vaisseaux et la composition de la paroi secondaire (Choat and Pittermann, 2009; Choat *et al.*, 2011). Cette dernière est également modifiée (**Figure 47**, données en noir) selon le traitement : au niveau du dépôt de lignine, de la répartition des sucres et de la teneur en composés polaires. De plus, le sodium à lui seul engendre une forte accumulation de composés apolaires. Ces métabolites, solubles ou faiblement liés aux polymères pariétaux, pourraient augmenter la rigidité de la paroi ou protéger les cellules contre les espèces réactives de l'oxygène (Olenichenko and Zagoskina, 2005; Domon *et al.*, 2013).

Au niveau transcriptomique, l'analyse des gènes différentiellement exprimés (DEGs) permet d'appréhender les régulations qui sous-tendent l'effet du sodium sur le compromis entre croissance et résistance au stress hydrique. Si l'on exclut l'effet de l'apport en eau (conditions +/- W), le Na⁺ et le K⁺ entraînent des réponses transcriptionnelles très similaires. Plus de 50% des gènes, dont l'expression est régulée par le potassium, sont aussi régulés par le sodium (**Figure 49 A1**). Ces gènes sont majoritairement reliés aux mécanismes cellulaires qui assurent la formation et la différenciation des tissus qui composent le bois et expliquent potentiellement l'effet positif du Na⁺ et du K⁺ sur la croissance au niveau du tronc. Le sodium pourrait ainsi entraîner des effets comparables à ceux du potassium en agissant sur la division et la différenciation des cellules du xylème, la biosynthèse de la paroi secondaire, l'organisation du cytosquelette et le métabolisme cellulaire. L'effet du sodium ne se distingue de celui du potassium qu'au niveau de l'expression d'environ 20% des DEGs, qui sont spécifiquement régulés par l'ajout de sodium, et en grande partie reliés à des réponses aux stress abiotiques (**Figure 49 A2**). L'ajout de Na⁺ semble induire ces réponses même lorsque les arbres reçoivent 100% de l'eau de pluie.

Les différences observées entre l'ajout de Na⁺ et de K⁺ sont en revanche beaucoup plus importantes dans un contexte d'exclusion des précipitations (**Figure 49 B**). Dans ce cas, seuls 40% des gènes sont régulés à la fois par le Na⁺ et le K⁺ alors que presque 50% des DEGs ne sont influencés que par l'ajout de Na⁺ (**Figure 49 B1**). Cette part du transcriptome, qui marque une certaine spécificité de réponse vis-à-vis du Na⁺, ne concerne pas que les mécanismes de réponse aux stress, mais également des processus de formation des tissus du bois, qui se distingue de ceux qui sont régulés par le K⁺ (**Figure 49 B2**). L'analyse WGCNA réalisée sur ces données de transcriptomique a permis de dégager 30 modules, dont 23 présentent des enrichissements en Gene Ontology (GO) significatifs (**Figure 50**). Dans la grande majorité des modules (21/23) l'expression des gènes est influencée par l'effet de la restriction d'eau de pluie et la moitié des modules détectés comprennent des DEGs qui présentent une forte expression lorsque les arbres poussent en présence de sodium, contre seulement 8 en réponse au potassium. Il est intéressant de noter que, à l'instar des mesures réalisées au niveau de la croissance des arbres, le

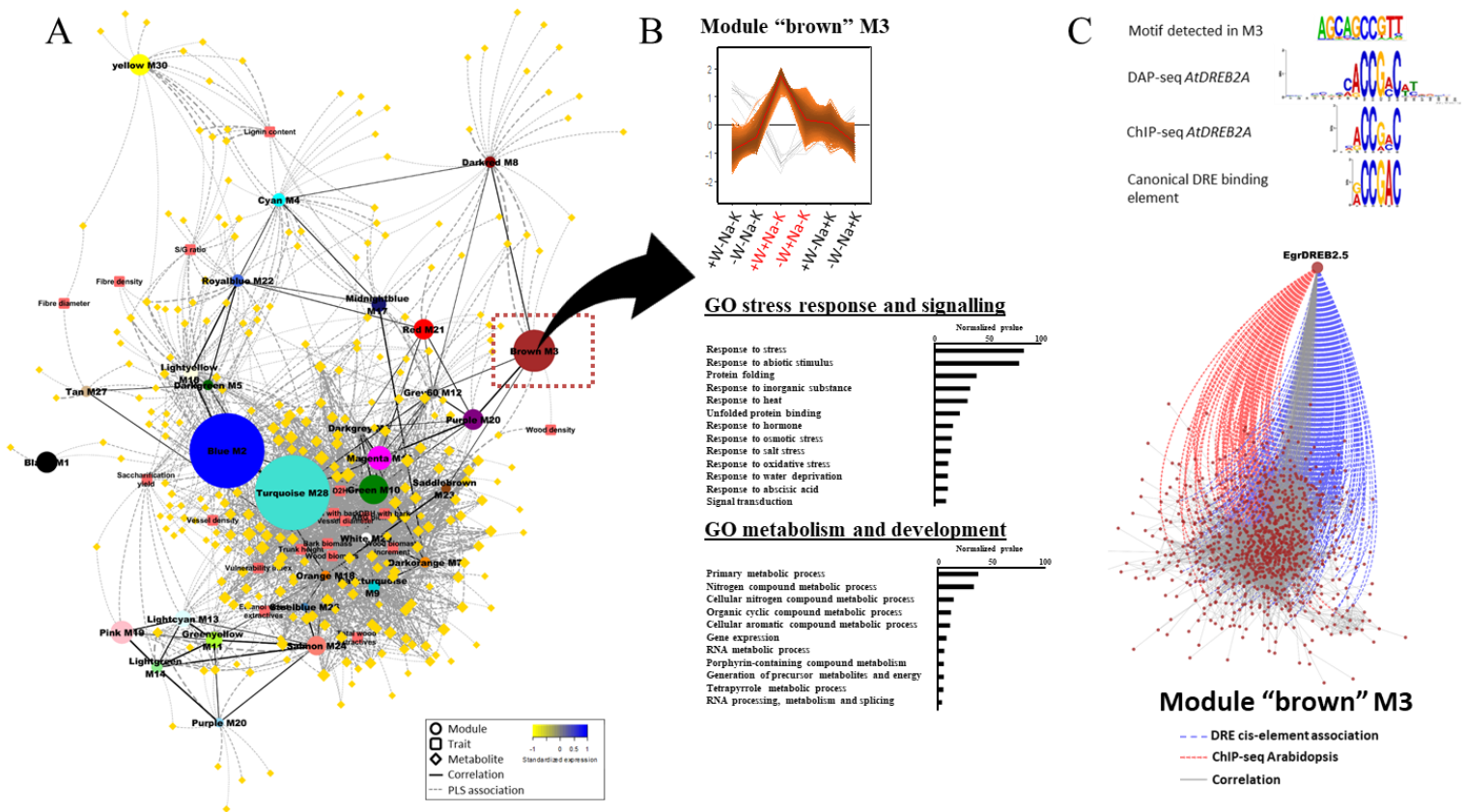


Figure 51 : Mise en évidence du rôle central du gène DREB2.5 dans les régulations croisées entre la réponse aux stress abiotiques et le développement du xylème. **A**, Réseau de co-régulation représentant les corrélations entre les profils de gènes, les métabolites et les traits phénotypiques régulés par le Na⁺, le K⁺ et la disponibilité en eau. **B**, Analyse GO des gènes du module « brown » M3, impliqués à la fois dans la réponse au stress abiotiques mais aussi dans la régulation du métabolisme cellulaire et du développement du xylème. **C**, Représentation des cibles potentielles du facteur de transcription DREB2.5 à partir des données de co-expression, d'identification des cibles par DAPseq et ChIPseq, et de la détection du motif DRE dans le promoteur des gènes du module « brown » M3.

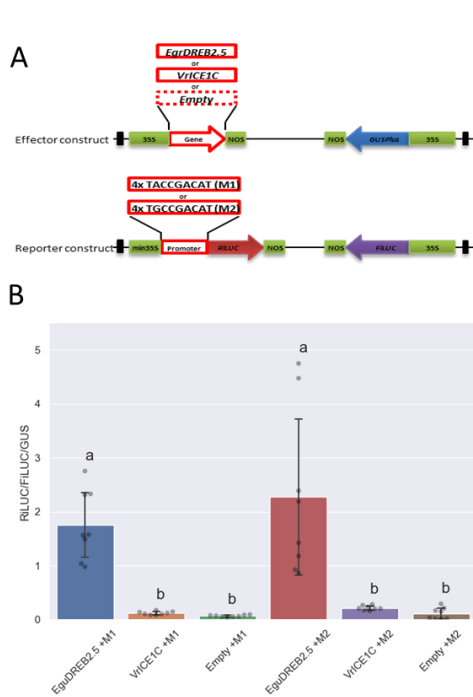


Figure 52 : Le facteur de transcription DREB2.5 cible les boîtes DRE pour induire la transcription des gènes cibles *in vivo*. **A**, Constructions utilisées pour les expériences de trans-activation dans des protoplastes de tabac. Deux types d'éléments DRE canoniques (M1 et M2), identifiés à partir de la littérature, ont été utilisés. Le facteur de transcription ICE1 a été utilisé comme contrôle négatif. **B**, L'induction d'une luminescence de la luciférase en tant que rapporteur témoigne de la capacité inductrice de DREB2.5 en présence des boîtes DRE M1 et M2.

transcriptome en réponse au Na⁺ présente un profil intermédiaire entre celui obtenu avec du K⁺ et l'absence de fertilisation. D'un côté, le Na⁺ induit l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de composés de la paroi secondaire, dans des fonctions cellulaires essentielles à la croissance ou dans la dynamique du cytosquelette. D'un autre côté la présence de Na⁺ régule l'expression de gènes qui interviennent dans les voies de signalisation en réponse aux stress abiotiques et dans les mécanismes de protection des cellules. En particulier, les gènes des modules « brown M3 », « darkred M8 » et « grey M12 » sont spécifiquement induits par l'ajout de sodium. Avec 972 gènes, le module « brown M3 » est le troisième plus important module du réseau (**Figure 51 A**). Il renferme des gènes impliqués dans les réponses aux stress mais présente également des enrichissements significatifs dans des catégories liées au métabolisme cellulaire et au développement des cellules du bois (**Figure 51 B**). On y retrouve des DEGs codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse ou le remodelage de sucres pariétaux, des transporteurs (d'ions ou de molécules variées), ou encore des régulateurs importants de la division cellulaire (cyclines et CDC). Dans ce module M3, l'induction de gènes impliqués dans la perception et la transduction du signal engendré par le sodium peut expliquer les réponses spécifiques observées alors que les arbres sont soumis à un stress hydrique important. On note en particulier l'induction de récepteurs de la famille des SOS, d'éléments impliqués dans la perception du stress salin comme XERICO (Qi *et al.*, 2016) et dans la signalisation à l'hormone ABA. Des gènes liés à d'autres voies hormonales sont induits : l'éthylène (11 DEGs), l'auxine (7 DEGs) ou les gibbérélines (5 DEGs). Ces hormones jouent un rôle important dans la formation des tissus du bois (Björklund *et al.*, 2007). Le module M3 renferme aussi 51 facteurs de transcription, plus fortement exprimés qui pourraient réguler les réponses observées dans les conditions avec ajout de Na⁺. La famille des ERF (ethylene response factor), est la plus représentée. L'analyse des promoteurs des gènes du module M3 (**Figure 51 C**) montre un enrichissement en motifs spécifiques de certains ERF : les DREB (Drought Responsive Element Binding), une sous famille qui comprend les facteurs DREB1/CBF et les DREB2. Le gène DREB2.5 est inclus dans le module M3, il présente une expression jusqu'à 10 fois plus forte dans les conditions +Na⁺ par rapport aux conditions avec K⁺ et sans fertilisation. Dans des travaux précédents (Cao *et al.*, 2015; N'Guyen *et al.*, 2017), nous avons observé que DREB2.5 est plus fortement induit dans les tissus du bois en réponse au stress hydrique et à la chaleur. Il est co-exprimé avec 175 DEGs du module M3. Les données de DAPseq et ChIPseq obtenues chez *Arabidopsis* (O'Malley *et al.*, 2016; Song, Koga and Ecker, 2016) montrent que ce TF serait susceptible de se fixer sur 78 de ces gènes (**Figure 51 C**). Des analyses de trans-activation nous ont démontré que DREB2.5 peut se fixer sur le motif canonique DRE « CCGACAT », présent sur 30% des DEGs du module M3 (**Figure 52**), et potentiellement induire leur expression.

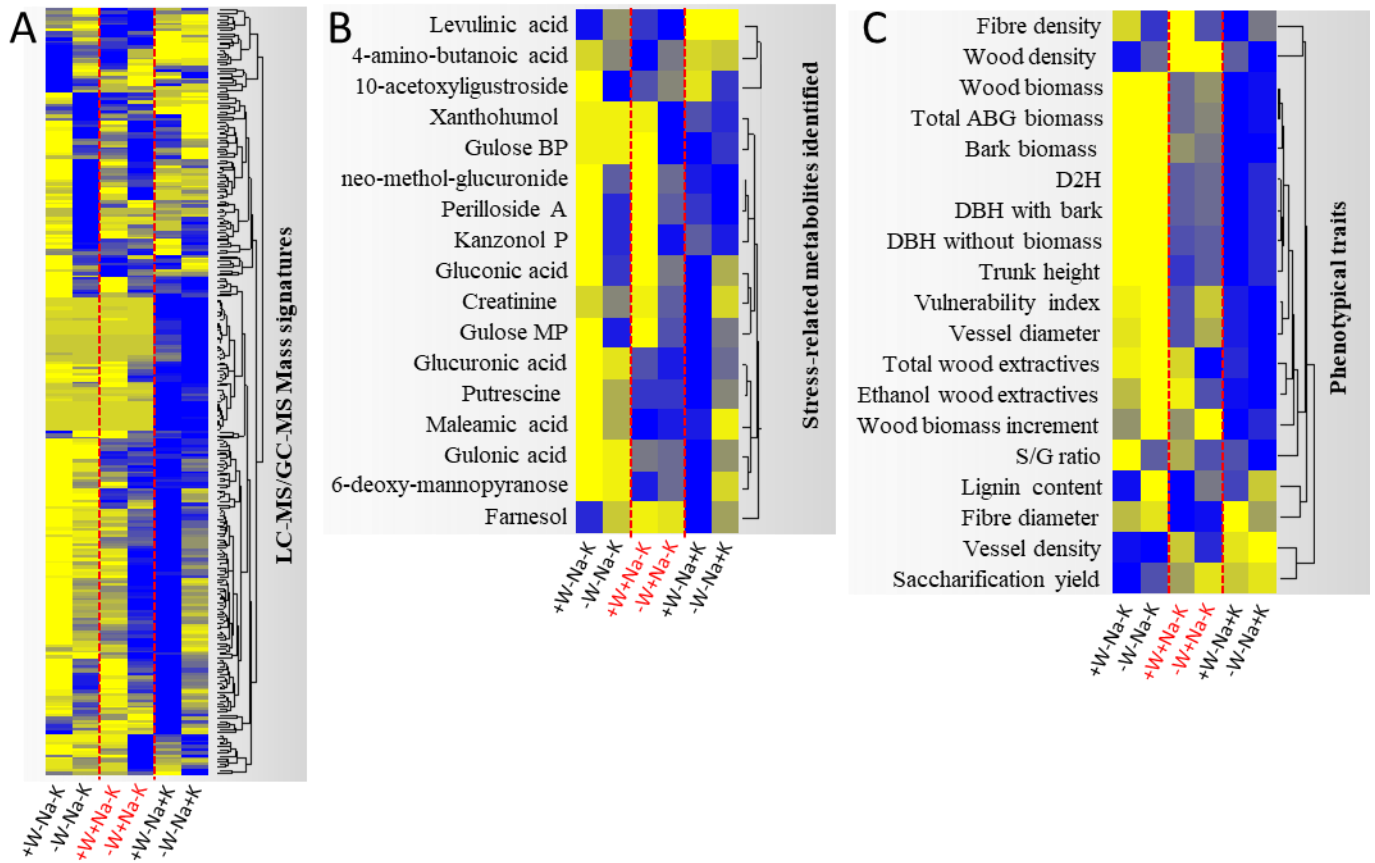


Figure 53 : L'amendement en sodium et en potassium augmente la productivité des arbres mais induit l'accumulation de métabolites liés au stress. A, Profils d'accumulation de 265 signatures métaboliques identifiées par LC-MS et GC-MS dans les 6 conditions. **B,** Profils d'accumulation de 17 métabolites identifiés par GC-MS-MS. Ces métabolites sont principalement liés aux voies métaboliques de réponse aux stress. **C,** Profils heat map des traits phénotypiques mesurés dans les 6 conditions.

Dans la littérature, les TFs de type DREB2 sont également induits suite à la perception du sel (Schmidt *et al.*, 2013). Dans les conditions avec ajout de sodium, la surexpression de DREB2.5 pourrait suggérer une plus forte induction des voies de réponse à la sécheresse. Les données de croissance et de physiologie des arbres montrent cependant que l'ajout de potassium place les arbres dans une situation de stress hydrique encore plus important que l'ajout de sodium (Battie-Laclaud *et al.*, 2014a,b). Il est aussi possible que le sodium contribue à stimuler plus fortement, et de façon constitutive, les mécanismes de tolérance au stress dans les conditions +Na.

A l'image de ce que nous avons pu montrer pour les CBF en réponse au froid (**Chapitre 2**), les gènes DREB2 pourraient ainsi agir à l'interface entre la réponse au stress hydrique et la formation des tissus du bois. En régulant l'activité cambiale et les voies de signalisations hormonales (gibbérellines, éthylène et auxine), DREB2.5 pourrait aussi contribuer à l'effet spécifique du Na⁺ et participer à la formation d'un bois moins dense que dans les autres conditions, avec des fibres aux parois beaucoup moins épaisses que dans les conditions +K⁺ (**Figure 48**). L'analyse du sous réseau de DREB2.5 suggère que ce gène pourrait contribuer à la modification de la composition de la SCW en induisant différentes catégories de gènes. Certains semblent impliqués dans le métabolisme primaire, comme la phosphofructokinase, qui contrôle le flux de carbone dirigé vers la synthèse de la paroi (Roach *et al.*, 2012). D'autres sont reliés à la synthèse de sucres et de sucres-nucléotides associés aux polysaccharides pariétaux comme le xylose, le galactose ou le mannose (Verbančič *et al.*, 2018). Enfin certains gènes codent pour des enzymes impliquées dans la voie des phénylpropanoïdes, comme la CAD9 (alcool cinnamylique déshydrogénase).

Les stratégies d'analyse multivariées développées précédemment (**Chapitre 3.1**) ont permis de corrélérer l'expression des 30 modules aux profils d'accumulation de 265 signatures métaboliques (**Figure 53 A et B**), ainsi qu'aux variations de 29 paramètres phénotypiques (**Figure 53 C**). Les 2/3 des DAMs présentent une plus forte concentration en réponse à l'ajout de K⁺ et, dans une moindre proportion à l'ajout de Na⁺. La plupart des DAMs identifiés peuvent être reliés à des marqueurs de stress. Comme précisé précédemment, l'ajout K⁺ stimule fortement la croissance des Eucalyptus, épuisant ainsi les réserves hydriques du substrat et place ces arbres en condition de stress important. Ce stress semble moins fort avec l'ajout de sodium. En intégrant des données transcriptomiques, métabolomiques et phénotypiques, cette étude ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent le compromis entre croissance et tolérance au stress hydrique. Elle permet aussi de mieux comprendre quels régulateurs pourraient agir dans le cadre d'un apport de fertilisant sous forme de sodium, pour assurer un meilleur développement des Eucalyptus, tout en atténuant la vulnérabilité des arbres pendant la saison sèche.

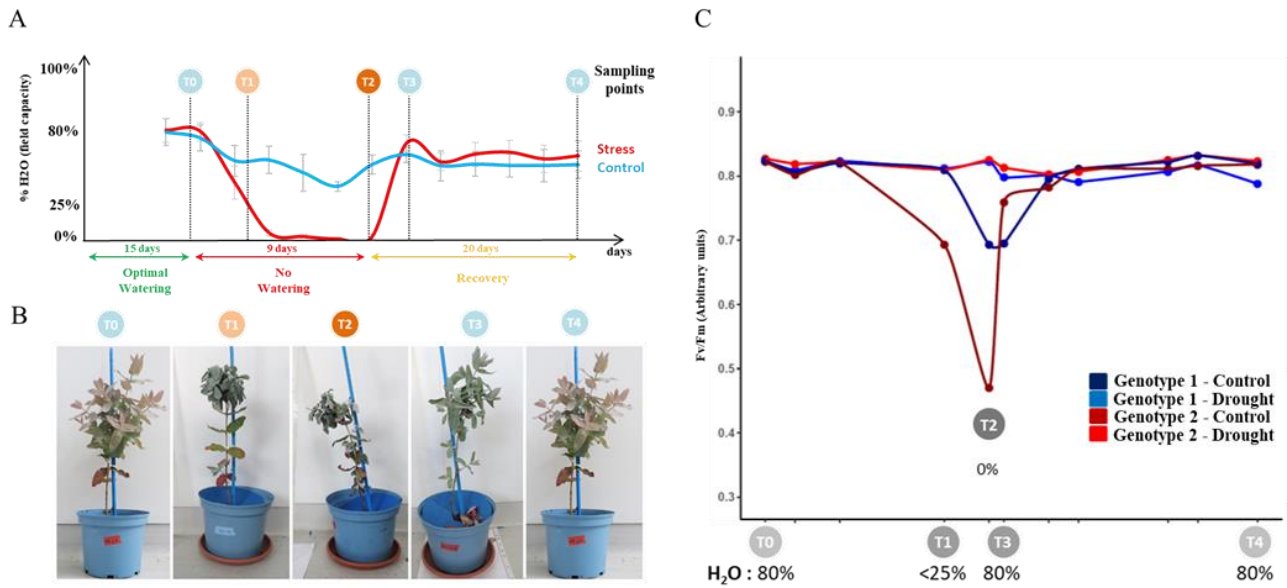


Figure 54 : Configuration d'un stress hydrique appliqué en conditions contrôlées sur deux géotypes d'*E. globulus*. Trente copies clonales par géotype d'Eucalyptus, âgées de 3 mois après enracinement des boutures, ont été acclimatées à des conditions standards de croissance en serre (photopériode : 16h de jour / 8h de nuit, température : 15°C jour / 22°C nuit). Nous avons utilisé la plateforme TPMP équipé d'un robot Lemnatec/Optimalog (<https://www6.toulouse.inrae.fr/tpmp/>) afin de contrôler l'arrosage et d'analyser les paramètres de croissance (mesures journalières). Des mesures manuelles de l'état du système photosynthétique (Fv/Fm et mesures SPAD) ont été réalisées à intervalles réguliers. Les feuilles, les tiges et les racines ont été mesurées, photographiés, pesées, congelés dans l'azote liquide après prélèvement et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

3.3 Analyse de la dynamique de développement de deux génotypes contrastés d'*Eucalyptus globulus* en condition de stress hydrique

Les effets négatifs du réchauffement de la planète ont déjà commencé à bouleverser fortement les écosystèmes forestiers (Allen *et al.*, 2010). En augmentant la fréquence d'évènements extrêmes, la modification du climat va continuer à augmenter la vulnérabilité des forêts, qu'elles soient naturelles ou plantées, et réduire leur potentiel économique. Il apparaît crucial d'anticiper ces changements et leurs effets sur les arbres afin de proposer des espèces ou des génotypes plus appropriés au climat de demain. Le projet européen B4EST vise à acquérir les connaissances technologiques, biologiques et climatiques nécessaires afin d'améliorer la survie des arbres, leur santé, leur résilience et leur productivité, tout en maintenant la diversité génétique des surfaces forestières européennes et leurs rôles écosystémiques. Afin de couvrir les besoins géographiques, économiques et sociétaux des 9 pays européens impliqués, B4EST inclut les travaux de 13 partenaires publics et privés sur 8 espèces pérennes. Le groupe de travail Eucalyptus regroupe l'équipe ReDyWood du LRSV, l'équipe XylomeS de l'UMR Biogeco, et l'entreprise privée portugaise ALTRI. Au sein de ce projet, coordonné par C. Bastien (INRA d'Orleans), j'étais impliqué dans 3 *workpackages*: (1) l'acquisition et l'analyse de phénotypes engendrés par les contraintes abiotiques, (2) l'identification de marqueurs génomiques qui peuvent influencer ces phénotypes et (3) la dissémination des connaissances obtenues au travers d'écoles thématiques. Dans ce chapitre, j'aborderai les travaux de l'équipe qui concernent la réponse de clones commerciaux d'*Eucalyptus globulus* (ALTRI) face à la sécheresse, et laisserai de côté les données obtenues en réponse au gel.

La réponse des Eucalyptus à une restriction d'eau sévère a été étudiée sur des copies clonales de 2 génotypes d'*E. globulus* (ou clones) notées « Génotype 1 » et « Génotype 2 », choisis pour leur capacité de croissance contrastée. « Génotype 2 » est un clone commercialisé à fort rendement. « Génotype 1 » est beaucoup moins vigoureux et d'intérêt agronomique plus faible. Cette expérience de stress hydrique a été réalisée sur la plateforme de phénotypage TPMP (avec l'aide de Nemo Peeters et Fabrice Devoiles de l'INRAe). Dans cette expérience, des Eucalyptus de 6 mois ont été cultivés avec un arrosage maîtrisé (80% de la capacité hydrique du substrat), 16h d'éclairage par jour, une hygrométrie de 80% et une température de 25°C le jour et 22°C la nuit. Après une période d'acclimatation, un lot de 40 plantes a subi un arrêt d'arrosage alors qu'un lot témoin d'effectif égal a été maintenu en condition hydrique optimale durant toute l'expérience (**Figure 54 A et B**). Après 9 jours, la capacité de récupération des plantes stressées a été évaluée en reprenant un arrosage optimal. L'appareillage de la plateforme a permis de calibrer l'apport hydrique et de mesurer la perte hydrique pour chaque plante (**Figure 54 C**).

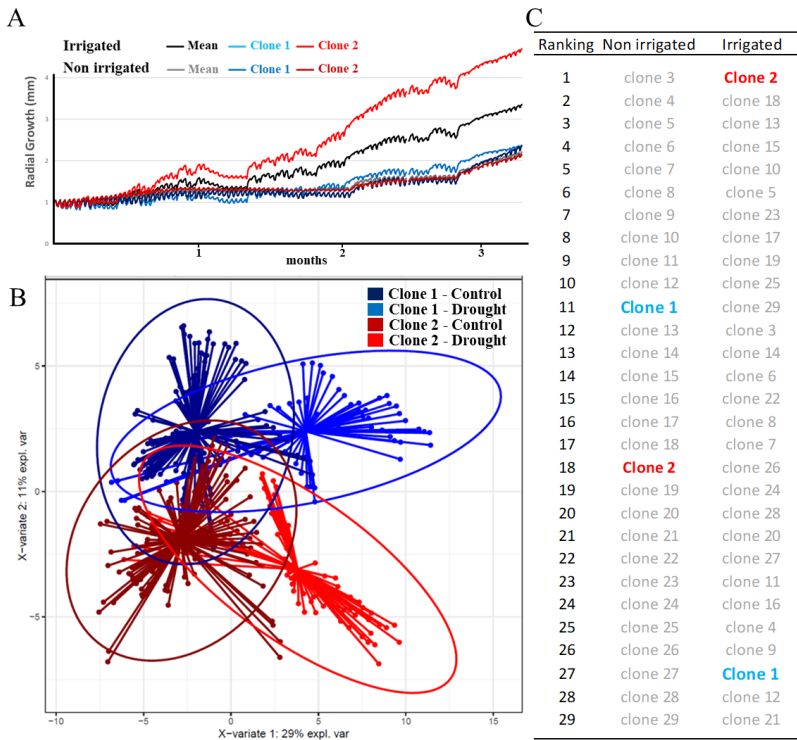


Figure 55 : Evaluation des paramètres de croissance de jeunes *Eucalyptus globulus* soumis à un stress hydrique en conditions contrôlées et forestières. **A**, Croissance radiale mesurée sur 2 géotypes d'*E. globulus* au cours de la saison sèche, sur des parcelles irriguées et non irriguées (données fournies par JM. Gion, parcelle expérimentale mise en place au Portugal par le CIRAD, géotypes issus de l'entreprise ALTRI). **B**, Analyse PLS-DA des données de croissance obtenues à partir des géotypes 1 et 2 en conditions contrôlées, avec ou sans arrêt d'arrosage (voir **Figure 54**). **C**, Classement des 30 géotypes basé sur leur dynamique de croissance radiale au cours de la saison sèche, sur des parcelles irriguées et non irriguées. Dans toutes les analyses effectuées, le géotype 2 présente une plasticité plus importante lorsque la disponibilité en eau diminue et lors d'une reprise de l'arrosage.

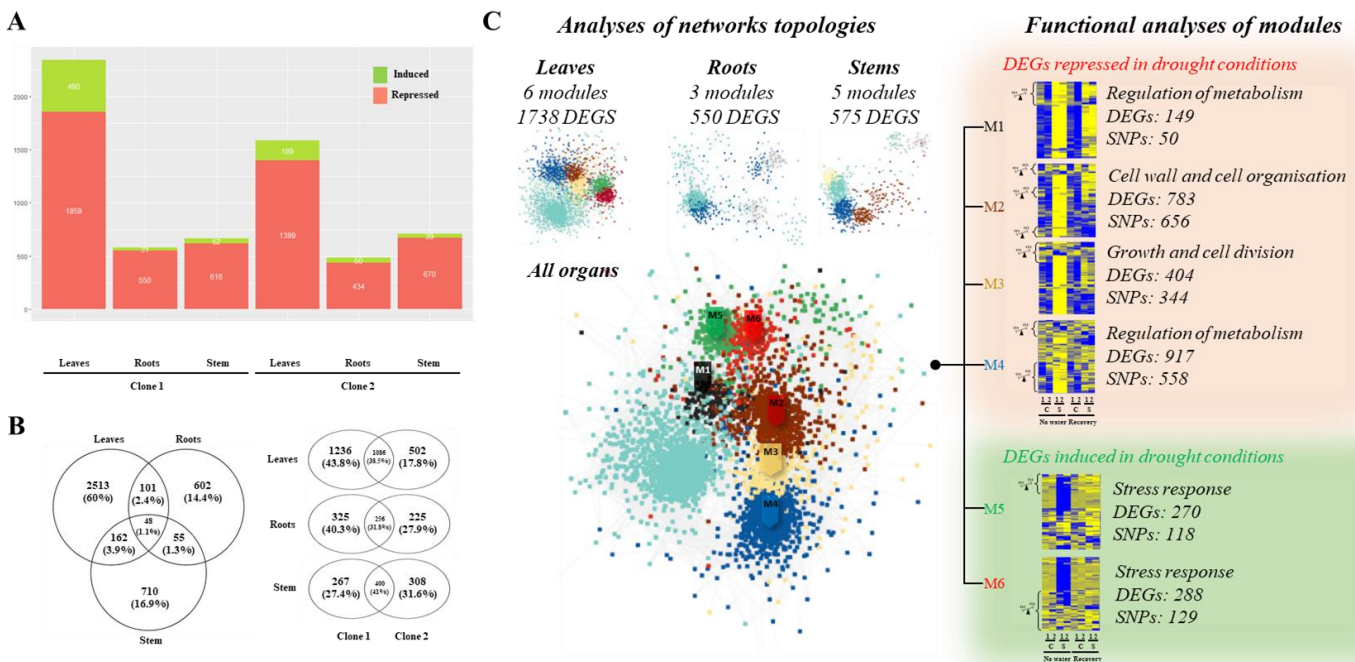


Figure 56 : Analyse du transcriptome des feuilles, des tiges et des racines de deux géotypes d'*E. globulus* soumis ou pas à une restriction d'eau. **A**, DEGs entre les conditions avec et sans stress, dans les différents organes des plantes des géotypes 1 et 2. **B**, DEGs entre les différents organes en fonction des géotypes. **C**, Analyse des réseaux de co-expression par WGCNA. Les catégories GO des modules (M1 à M6) qui renferment des DEGs, ainsi que le nombre de DEGs présentant des SNPs identifiés par le géotypage d'une population de >800 géotypes d'*E. globulus*, sont précisés sur le panneau de droite (données non publiées transmises par JM Gion). Les modules renfermant des gènes différentiellement exprimés entre les deux géotypes en condition de stress hydrique sont représenté par le symbole d'une balance. C, contrôle, S, sécheresse, 1 et 2, géotypes

La prise d'images journalières, couplée à des mesures réalisées manuellement, nous ont permis d'évaluer l'état physiologique des plantes, ainsi que leur dynamique de croissance, après l'arrêt puis la reprise de l'arrosage (**Figure 54 B et C**). Nous avons pu comparer ces données de croissance avec celles enregistrées sur une parcelle expérimentale en conditions forestières. Sur cette parcelle, 30 génotypes d'*Eucalyptus globulus*, dont les deux génotypes analysés par notre équipe, ont été cultivés pendant 2 ans avec et sans irrigation. Ces arbres ont été phénotypés à plusieurs niveaux durant leur croissance, y compris par des mesures journalières du diamètre du tronc grâce à des capteurs dendrométriques (**Figure 55**). En conditions contrôlées comme en conditions forestières, le génotype 2 présente une plus forte croissance lorsque l'apport en eau est optimal (**Figure 55 A**). Les arbres du génotype 2 se montrent également plus rapides que ceux du génotype 1 pour (i) ralentir leur croissance après l'arrêt d'arrosage, ou au contraire reprendre leur croissance suite à un rétablissement de l'apport hydrique. L'évaluation de paramètres liés à l'état de stress, comme par exemple les mesures de fluorescence de la chlorophylle, montrent que le manque d'eau affecte plus rapidement les arbres du génotype 2. En période de saison sèche, s'ils ne sont pas irrigués, les arbres du génotype 2 présentent une croissance radiale encore plus faible que ceux du génotype 1 (**Figure 55 A**). Nous avons déjà pu constater qu'il existe un compromis fort entre les mécanismes qui favorisent une forte croissance et ceux qui sont impliqués dans la réponse à un stress hydrique (voir **Chapitre 3.1**, Ployet *et al.*, 2019). A l'opposé, les arbres du génotype 1, qui présentent une croissance plus lente, montrent une dégradation moins rapide des paramètres physiologiques mesurés (croissance des parties aériennes et racinaires, statut des photosystèmes, teneur en chlorophylle par mesure de SPAD et teneur en eau des feuilles). Ils sont également plus lents pour reprendre leur croissance après un retour à des conditions optimales de culture. Ces observations phénotypiques sont en accord avec les analyses du transcriptome des racines, des tiges et des feuilles prélevées sur les deux génotypes au cours de l'expérience de stress hydrique en conditions contrôlées. L'analyse des données de transcriptomique par des outils statistiques multivariés et des réseaux de co-expression nous ont permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés (DEGs) en fonction de la disponibilité en eau des plantes. Nous avons analysé les catégories fonctionnelles concernées par ces DEGs grâce à des approches de WGCNA et de Gene Ontology afin de faire ressortir des régulations transcriptionnelles spécifiques des organes ou des génotypes étudiés (**Figure 56**). Les résultats préliminaires de ces observations s'accordent avec les données phénotypiques et les mesures physiologiques précédentes. Ils montrent que les deux génotypes présentent une plasticité différente en réponse au stress sécheresse, qui fait intervenir des mécanismes liés à : la perception des signaux de stress, la régulation de la croissance et le remodelage de l'activité métabolique reliée à la

tolérance au stress. A partir de ces données, qui sont toujours en cours d'analyse, les régulateurs clefs seront identifiés afin d'étudier leur rôle *in planta*.

Le projet B4EST nous a aussi donné l'opportunité de collaborer avec l'équipe de JM Gion (INRAe de Bordeaux), qui a procédé au génotypage de plus de 800 génotypes d'Eucalyptus de la collection d'ALTRI à l'aide d'une biopuce comprenant 72K sondes nucléotidiques. Nous avons pu identifier plus de 4000 SNPs dans les séquences promotrices, les séquences codantes ou les introns de 1800 gènes différentiellement exprimés dans notre étude de transcriptomique. Le polymorphisme de ces régions, potentiellement relié à l'expression de gènes d'intérêt, pourraient contribuer à la plasticité des différents génotypes d'Eucalyptus en réponse à la sécheresse et ainsi représenter un intérêt important pour les stratégies de sélection.

L'étude de variants structuraux de gènes d'intérêt, susceptibles de générer différentes populations d'ARN messagers par épissage alternatif, est une autre perspective de ce projet de recherche. Des études récentes ont montré que certains gènes régulateurs impliqués dans le développement des tissus du bois présentent un épissage alternatif de leurs ARN messagers afin de produire des protéines aux fonctions différentes (détaillé dans le **Chapitre 4.2**). L'expression des différentes isoformes de ces ARNm serait régulée en conditions de stress. Afin d'étudier ce mécanisme original et encore mal compris, des séquençages d'ARNm par la technologie IsoSEQ de Pacific Bioscience ont été réalisés et sont en cours d'analyse. Cette thématique fait l'objet d'un paragraphe explicatif dans le chapitre suivant, relatif au projet de recherche que je compte mener dans les années à venir.

Chapitre 4 :
Projet de recherche

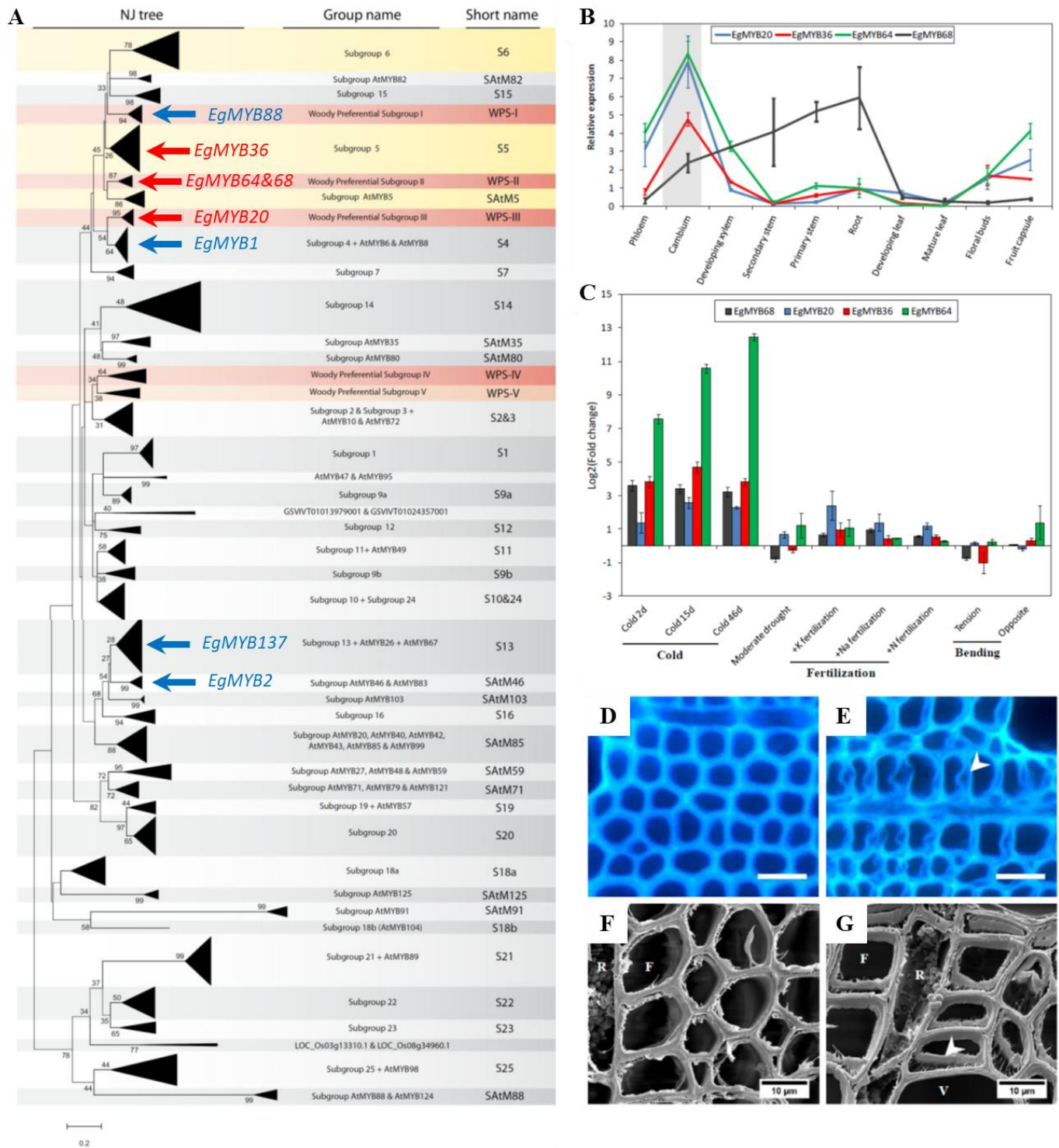


Figure 57 : Résultats préliminaires de caractérisation fonctionnelle obtenus pour *EgrMYB20*, *EgrMYB36*, *EgrMYB64* et *EgrMYB68* dans des lignées transgéniques de Peuplier surexprimant les gènes MYB d'intérêt clonés à partir du génome d'*E. grandis*. A, Arbre phylogénétique incluant l'ensemble des protéines de type MYB-R2R3 d'*Eucalyptus grandis* (*Egr*), *Vitis vinifera* (*Vv*), *Populus trichocarpa* (*Ptr*), *Arabidopsis thaliana* (*At*) et *Oryza sativa* (*Os*), adapté des travaux de Soler *et al.* (2015). En rouge les gènes candidats et en bleu les gènes MYB déjà caractérisés. B et C, Les gènes candidats ont été sélectionnés sur la base de leur profil d'expression. Ils sont préférentiellement exprimés dans les tissus lignifiés et sont différemment exprimés en réponse à des stress abiotiques. D à G, Exemple de modification dans le dépôt de la paroi secondaire induite par la surexpression du gène candidat *EgrMYB68* chez le Peuplier. L'utilisation de la microscopie confocale pour analyser l'autofluorescence de la paroi et de la MEB révèle un manque de cohésion des constituants de la paroi secondaire (D et F = WT ; E et G = 35S:*EgrMYB68*).

La formation du bois est un processus développemental complexe qui requiert la contribution de plusieurs milliers de gènes nécessaires au contrôle de l'activité cambiale. La différenciation des cellules du système vasculaire aboutit à la formation de plusieurs types de cellules hautement spécialisées qui assurent des rôles spécifiques. L'étude de la formation du bois s'accompagne de contraintes importantes qui limitent notre compréhension de ces mécanismes. Tout d'abord, ces tissus, qui sont imbriqués à l'intérieur du tronc, sont difficiles à observer et à prélever. De plus, bien qu'une lignification post mortem ait été démontrée (Déjardin *et al.*, 2010), la structure et la composition de la paroi des cellules, lentement acquises au cours de leur différenciation, sont en grande partie fixées à la mort cellulaire. Les signaux qui influencent ce mécanisme agissent sur de multiples voies de régulations mais leurs effets ne s'observent souvent qu'après la mort des cellules. Enfin chaque type cellulaire va mettre en place des programmes génétiques spécifiques et suivre une trajectoire de développement distincte. Les approches globales de génomique ont mis en évidence que les cascades de signalisation qui régulent la formation du bois peuvent être modulées par les signaux de l'environnement. Bien que l'on comprenne encore mal ces processus, il semble que les stress biotiques et abiotiques détournent les programmes de développement qui assurent la formation du bois et modifient la structure et la composition de ce tissu. Ce mécanisme, souvent défini dans la littérature par le terme de « co-optation », assure probablement un rôle fondamental dans l'adaptation à court terme et la survie des espèces pérennes vis-à-vis des changements brutaux de leur environnement (Taylor-Teeple *et al.* 2014). Cependant de nombreuses questions restent en suspens concernant (1) les voies de signalisation impliquées dans ces réponses, (2) leur impact sur les différents types de cellules qui composent le bois et (3) le rôle des modifications que nous observons pour la tolérance de l'arbre vis-à-vis des stress.

Mes travaux de recherche ont pour objectif de comprendre comment les signaux de l'environnement peuvent influencer le développement des tissus du bois. Les approches adoptées pour répondre à cette question ont mis au jour une liste de candidats, pour la plupart des facteurs de transcription appartenant à la famille des MYB, qui semblent agir à l'intersection entre les voies de réponse aux stress et le processus de xylogénèse (**Figure 57**). Dans le cadre de la thèse de Raphael Ployet, puis au cours de celle d'Ines Hadj Bachir, nous avons développé des approches pour étudier la fonction de ces candidats. Mon objectif à **court terme** sera de compléter et valoriser les données obtenues concernant *EgrMYB20*, *EgrMYB36*, *EgrMYB64* et *EgrMYB68*. De la même façon, un travail très conséquent a été engagé pour comparer la réponse à la sécheresse de deux génotypes d'*Eucalyptus globulus* (**Chapitre 3.3**). Une importante quantité de données de phénotypage et de transcriptomique ont été acquises et nécessitent d'être analysées.

A plus **long terme**, je souhaiterais orienter mes travaux de recherche selon 3 axes, développés dans les paragraphes ci-dessous :

Le premier axe vise à étudier l'influence des contraintes de l'environnement sur le développement du bois en utilisant des analyses « cellules spécifiques ». En effet, l'analyse globale du xylème, qui moyenne les paramètres de multiples types cellulaires, représente une limitation pour la compréhension des mécanismes mis en jeux. Cette axe, qui implique mes collègues de l'équipe ReDyWood, se nourrit aussi des collaborations avec des chercheurs de la plateforme GET-Santé (Toulouse) et de l'unité BioForA (INRAe d'Orléans).

(1) Le deuxième axe vise à étendre notre compréhension des différents niveaux de régulations impliqués dans le développement du xylème au-delà de la transcription des gènes. Ces niveaux de régulations sont multiples. Dans cet ouvrage, j'ai choisi de prioriser la description de deux projets prometteurs. Le premier concerne la régulation de l'épissage des ARNm transcrits dans les cellules du xylème, il a été initié dans le cadre du projet européen B4EST. Le second concerne l'étude d'une nouvelle protéine impliqués dans la régulation de la traduction des ARNm, et il implique des collaborateurs du LGDP (Perpignan) et du laboratoire BIA (INRAe de Nantes).

(2) Enfin le dernier axe, qui est probablement le plus complexe, a pour objectif de comprendre quels paramètres du xylème influencent la résistance des plantes vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques. D'un côté, la résistance à la sécheresse de différents génotypes d'arbres générés par l'équipe sera étudiée. D'un autre côté, le rôle de la paroi des cellules des tissus vasculaires dans l'infection d'Arabidopsis par Ralstonia sera analysé en collaboration avec l'équipe REACH du LIPMe.

L'élaboration de ce projet de recherche n'a pas été simple pour moi car il était nécessaire, de mon point de vue, qu'il s'intègre dans les nouvelles fonctions d'animation d'équipe qui sont les miennes depuis plus de 2 ans. Pour cette raison, le projet décrit ci-après, qui dépasse objectivement les capacités d'un seul Maître de Conférences, ne peut se réaliser qu'avec l'aide de mes collègues de l'équipe ReDyWood et au travers de collaborations. Il repose sur des considérations réalistes : (i) le besoin de renforcer la synergie entre les chercheurs de mon équipe, (ii) la nécessité de valoriser les acquis de cette équipe, et (iii) la priorisation de projets financés ou disposant des ressources nécessaires pour aboutir.

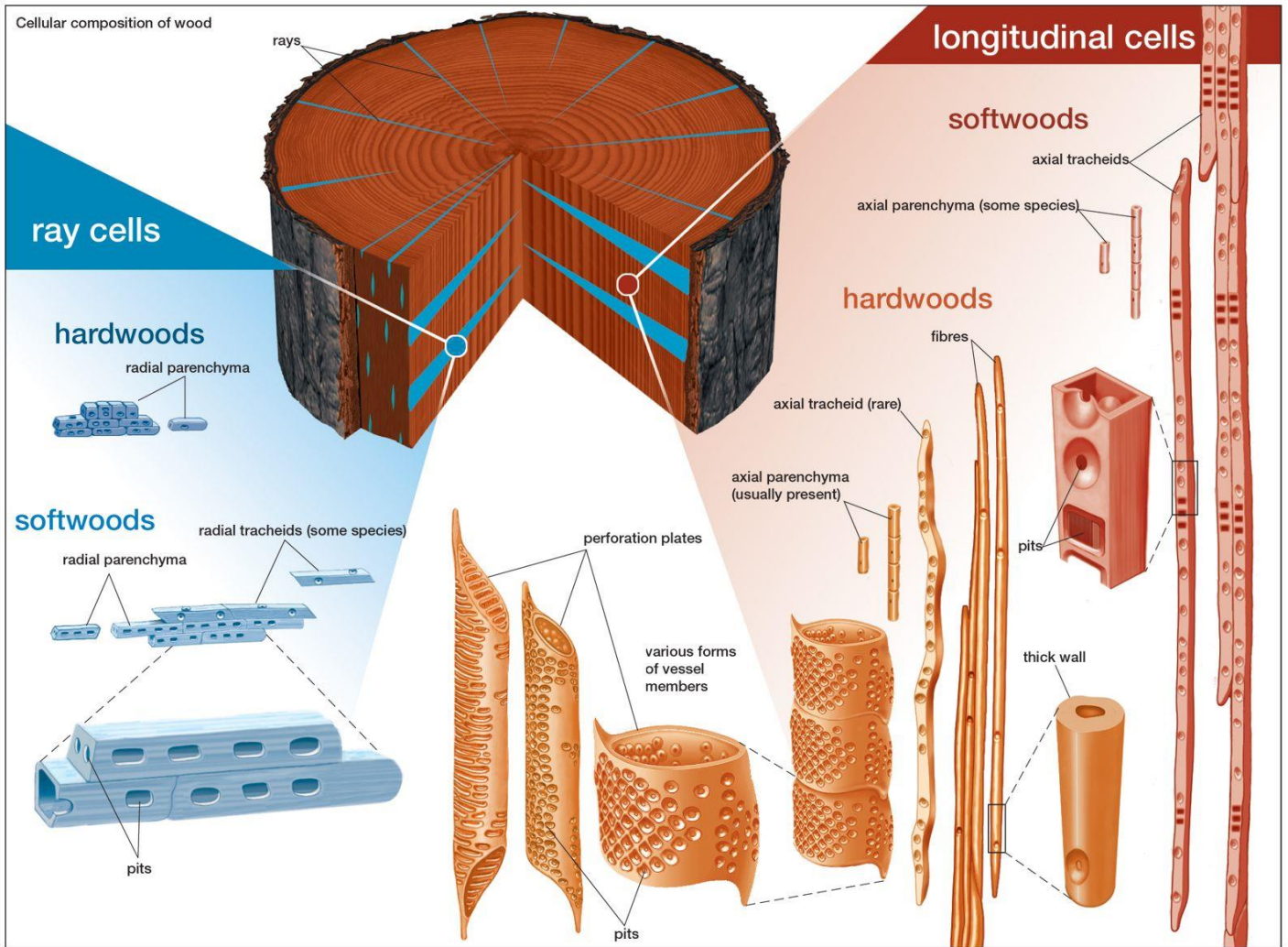


Figure 58 : Représentation schématique des différents types cellulaires présents dans les tissus vasculaires chez les arbres feuillus et les conifères (Encyclopædia Britannica, Inc.)

4.1. Comment les signaux de stress peuvent-ils orienter les trajectoires de développement des cellules du xylème ?

Les stress biotiques et abiotiques représentent des menaces majeures pour la survie des espèces végétales, en particulier les plantes pérennes, plus exposées de par leur grande longévité. Pour éviter ou tolérer ces contraintes, les plantes ont développé un très large éventail de réponses morphologiques, physiologiques et biochimiques. Si de nombreuses études concernent l'influence des stress sur les méristèmes primaires et le métabolisme, très peu de données décrivent leurs effets sur la croissance secondaire chez les arbres. Dans les travaux présentés précédemment, j'ai pu observer des modifications de la composition de la paroi secondaire, de la différenciation des cellules du xylème, notamment la taille et la densité des vaisseaux, et de profonds changements au niveau du transcriptome en réponse à différentes contraintes abiotiques. En condition de stress, il semble donc probable que des voies de signalisation spécifiques régulent la différenciation des cellules du cambium (Ployet *et al.*, 2018 ; 2019). Le terme « cambium », *sensu stricto*, réfère à une ou plusieurs assises comprenant deux types de cellules : les initiales de rayon et les initiales fusiformes. Les initiales de rayon vont générer des cellules alignées dans la section transversale du tronc. Chez les angiospermes, les initiales fusiformes assurent la formation de différents types cellulaires : de nombreuses cellules parenchymateuses, mais surtout des vaisseaux et des fibres du côté du xylème, des tubes criblés et des cellules compagnes du côté du phloème. Ce que l'on appelle la « zone cambiale » comprend à la fois les cellules initiales mais aussi les cellules mères. Alors que les initiales gardent la possibilité de produire indifféremment des cellules du xylème ou du phloème, les cellules mères du cambium présentent un état plus différencié, déjà orienté vers l'un ou l'autre de ces devenir cellulaires. Ces cellules mères vont subir plusieurs cycles de division avant de poursuivre leur différenciation vers des trajectoires de développement différentes, qui aboutissent à une grande variété de types de cellules spécialisées (Bossinger and Spokevicius, 2018).

La différenciation des cellules cambiales est fortement influencée par des facteurs internes (hormones), mais aussi externes (stress biotiques et abiotiques) qui peuvent modifier la structure et la composition du bois (Taylor-Teeple *et al.*, 2014; McCahill and Hazen, 2019). Ce remodelage dépend du type de cellule, il contribue à la remarquable plasticité phénotypique des arbres et joue un rôle primordial pour leur survie à long terme face aux changements climatiques. La formation des cellules du xylème et du phloème est un processus finement contrôlé par un réseau complexe de facteurs de transcription (Hussey *et al.*, 2015). En comparaison de ce que l'on connaît sur le fonctionnement des méristèmes primaires apicaux et racinaires, notre compréhension de la régulation spatio-temporelle de la différenciation des cellules du xylème et du phloème est très limitée.

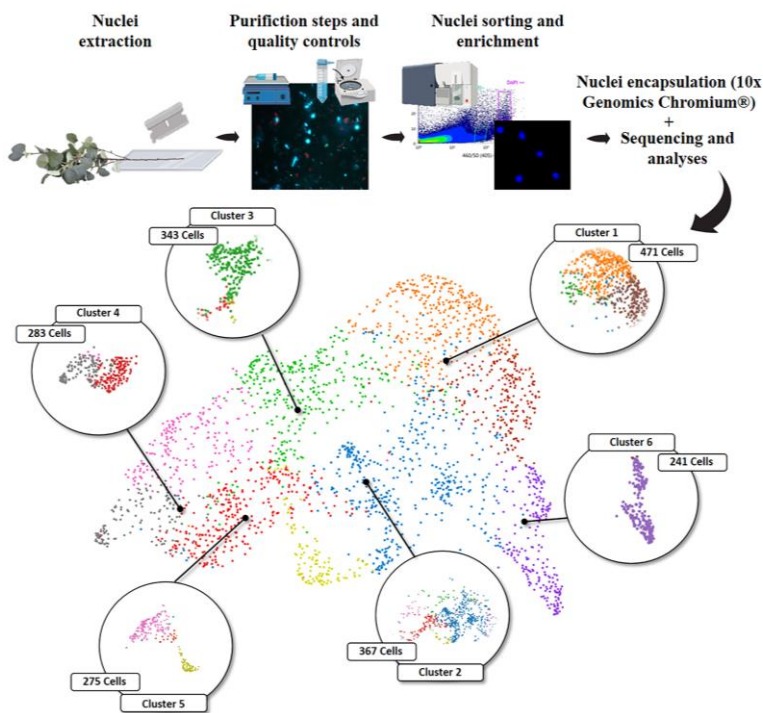


Figure 59: Analyse préliminaire des données de transcriptome de 2300 noyaux isolées à partir de tige d'*Eucalyptus grandis*. Le protocole, adapté de Conde *et al.* (2021), vise à extraire des noyaux de jeunes tiges. Après lavages, filtrations et tri, les noyaux sont encapsulés au sein de gouttelettes de gel par la technologie 10x Genomics Chromium®, qui assure une haute efficacité de capture des noyaux issus des différents types cellulaires présent dans les tissus (GET-SANTE). Les ARNm de chaque noyau, « reverse transcrits » et barcodés, constituent autant de banques d'ADNc séquencées par la technologie Illumina NOVAseq 4000 (GET-PLAGE). Un clustering K-means, réalisé à partir des données de séquençage, a permis d'identifier 6 groupes comprenant >200 à >400 noyaux partageant des transcriptomes similaires. Ces différents clusters contiennent plus de 50 gènes marqueurs du processus de xylogénèse (facteurs de transcription, synthèse de paroi secondaire, régulation hormonales).

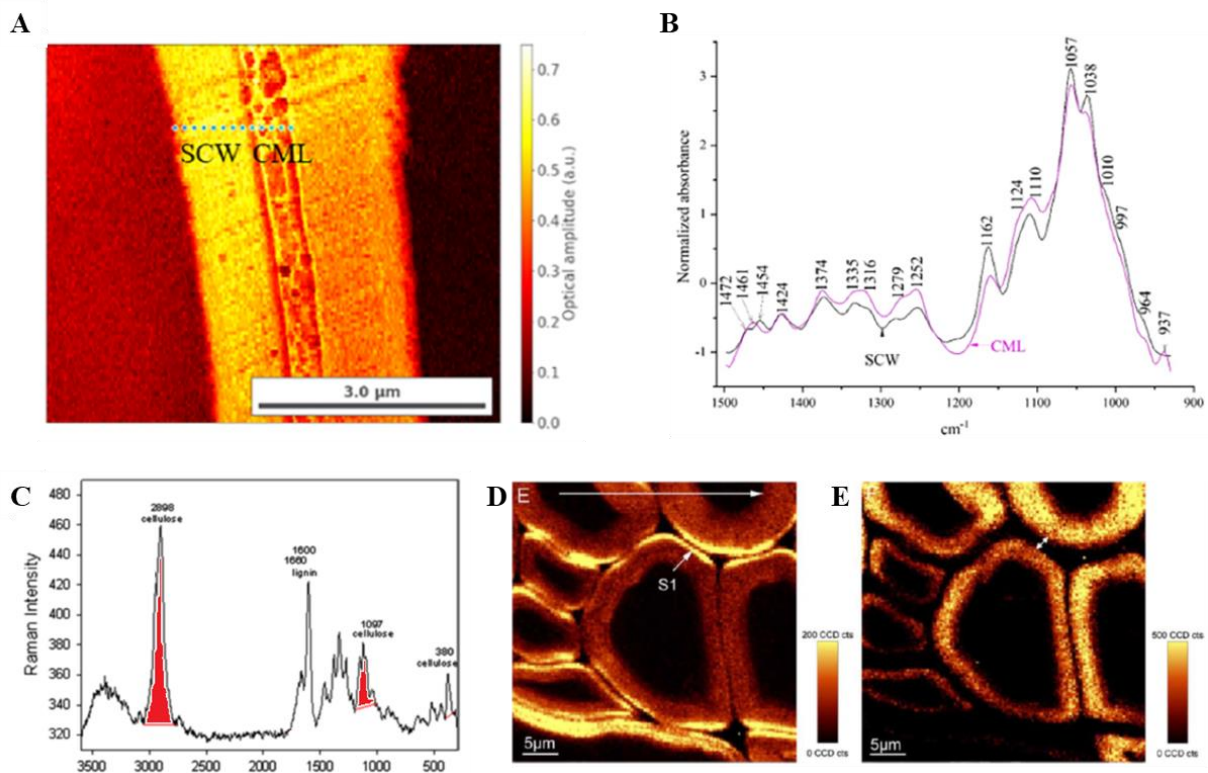


Figure 60: Exemple d'utilisation de la microscopie FT-IR et Raman pour l'étude de la composition fine des parois secondaires. A et B, Analyse en nano-FTIR de la composition de la paroi secondaire et de la lamelle moyenne (adapté de Bhagia *et al.*, 2022). C à E, Exemple de deux régions du spectre Raman permettant de discriminer différentes couches de la paroi secondaire en fonction de leur composition (adapté de Gierlinger et Schwanninger, 2007).

Le cambium est un méristème interne difficilement accessible et complexe à étudier. La plupart des travaux n'offrent qu'une vision schématique des régulations qui se déroulent dans toute la zone cambiale, obtenue à un instant donné, à partir d'un mélange de cellules dont la fonction, le stade de développement et le métabolisme sont très hétérogènes. Des études pionnières de microdissection ont démontré que les différents types de cellules du bois présentent des profils d'expression distincts (Goué *et al.*, 2012). L'utilisation de techniques de pointe pour suivre les lignées cellulaires issues des initiales (de rayon et fusiformes) et analyser leur transcriptome ont révélé des gradients d'expression pour les gènes homéotiques qui contrôlent leur différenciation (Goué *et al.*, 2012). L'analyse du transcriptome à l'échelle cellulaire représente un enjeu important pour l'étude de l'organisation du méristème cambial (Bossinger and Spokevicius, 2018; Smetana *et al.*, 2019).

Les récentes avancées dans les techniques de séquençage d'ARN à l'échelle cellulaire (Single Cell RNA sequencing, Sc-RNAseq), couplées à des algorithmes d'analyses statistique multivariés, permettent de définir les profils transcriptomiques de plusieurs milliers de cellules et d'identifier les régulations qui sous-tendent leurs trajectoires de développement. Principalement utilisée chez les animaux, cette technologie révolutionnaire a été appliquée chez *Arabidopsis* pour cartographier les cellules de la pointe racinaire chez (Denyer *et al.*, 2019; Jean-Baptiste *et al.*, 2019; Zhang, Xu and Yosef, 2019; Rich-Griffin *et al.*, 2020). En 2021, Daniel Conde et ses collaborateurs ont réussi à étudier les programmes génétiques spécifiques de différentes populations de cellules au sein d'une jeune tige de Peuplier (Conde *et al.*, 2021). Au cours de l'année 2022, Hua Cassan-Wang, Nathalie Ladouce et moi-même, en collaboration avec Frederic Martins (Plateforme GET-SANTE) et Delphine Labourdette (Plateforme GET-BioPuce) avons essayé d'adapter cette approche pour espérer analyser l'effet des stress abiotiques sur le transcriptome des cellules du bois chez l'*Eucalyptus*. Le principe consiste à isoler des noyaux à partir de cellules de tige puis d'encapsuler ces noyaux grâce à la technologie 10X Genomics Single Cell Sequencing (**Figure 59**) afin de séquencer les ARN de chacun d'entre eux. Une première expérience, réalisée sur une jeune tige d'*Eucalyptus*, a permis d'aboutir au transcriptome de plus de 2400 cellules. Avec une moyenne de >170 000 lectures par cellule, nous avons identifié environ 1000 DEGs qui sont potentiellement des marqueurs spécifiques de différents types de cellules. Sur la base de ces résultats de transcriptome, au moins 9 populations cellulaires ont pu être définies. Il reste cependant à identifier les programmes génétiques activés dans ces cellules, comparer leur transcriptome dans des conditions de stress et déterminer les voies de régulations qui sont réorientées pour modifier leur développement.

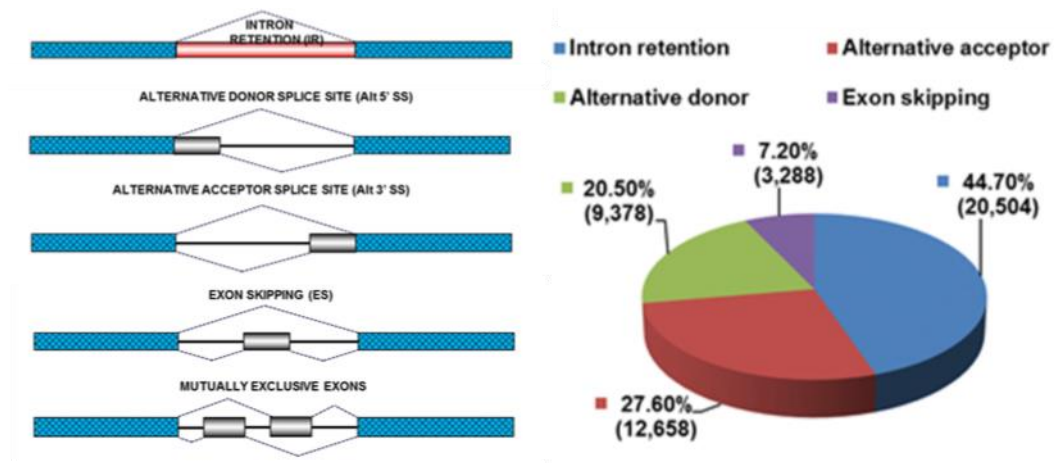


Figure 61: Description des principaux évènements d'épissages d'ARN messagers et de leur fréquence au sein du transcriptome du Peuplier (adapté de Filichkin *et al.*, 2018).

A ces profils d'expression de gènes « cellules spécifiques », nous avons pour objectif de combiner des données de microscopie vibrationnelle : des techniques non destructrices qui permettent d'obtenir des informations fonctionnelles sur la structure et la composition de la paroi des différents types de cellules du xylème (**Figure 60**). Couplée à des spectroscopes Infra Rouge ou Raman, la microscopie optique ou à fluorescence permet d'établir une « empreinte chimique » de la paroi à l'échelle micrométrique, de comparer des types cellulaires et de suivre leur composition en fonction de conditions variables (Cuello *et al.*, 2020; Bhagia *et al.*, 2022). Il est également possible de recueillir ces informations après l'utilisation de traitements visant à déconstruire de façon spécifique les différents polymères pariétaux (Gierlinger, 2017). Ces approches de microscopie fine ont été utilisées pour révéler des différences structurelles au niveau des couches de la paroi secondaire, pour comparer différentes espèces d'arbres, après l'application de contraintes physiques ou au niveau des anneaux de croissance saisonniers (Gierlinger, 2017). Je suis convaincu que l'intégration de données de transcriptomique et de microscopie fonctionnelle pourraient nous permettre de mieux décortiquer les régulations mises en œuvre dans les différentes cellules qui composent le xylème et de comprendre en quoi leur reprogrammation dans un contexte de stress peut modifier le développement de ce tissu, ses propriétés physico-chimiques et par conséquent la physiologie de l'arbre.

4.2. Quels rôles jouent les régulations post transcriptionnelles dans la dynamique de formation des tissus vasculaires en condition de stress ?

Au-delà des multiples facteurs de transcription qui contrôlent la formation du xylème, un nombre grandissant de travaux soulignent l'importance des régulations se situant aux niveaux post-transcriptionnel et post-traductionnel, qui restent à ce jour très mal comprises (Zhang *et al.*, 2018; McCahill and Hazen, 2019; Hadj Bachir *et al.*, 2022). L'implication récente de l'équipe ReDyWood dans des projets collaboratifs nationaux et internationaux m'a permis d'initier de nouveaux axes de recherches sur deux aspects liés à ces mécanismes : la régulation de l'épissage et de la traduction des ARN messagers exprimés dans le xylème.

4.2.1 Rôle de l'épissage alternatif des ARN messagers

Les travaux sur la régulation de la xylogénèse au niveau post-transcriptionnel concernent principalement le rôle des ARN dits « non codant » et celui de l'épissage alternatif des ARNm. Chez les plantes, 40% à 60% des gènes contenant des introns subissent un épissage alternatif (Hussain, Kayani and Amjad, 2011) et cela concerne environ 40% des gènes impliqués dans la formation du bois. Les données de la littérature montrent que la rétention d'intron est le type d'épissage alternatif le plus fréquent (**Figure 61**). Les

catégories dites « de donneurs alternatif » en 5' ou en 3', ainsi que l'exclusion d'exons sont décrits comme des événements un peu moins fréquents. Chez le Peuplier et l'Eucalyptus, on estime qu'environ 20% à 40% de ces événements d'épissage alternatifs seraient susceptibles de générer des modifications de la traduction des ARNm et ainsi contribuer à augmenter la complexité du protéome (Zhang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021; Muhammad *et al.*, 2022). Des exemples précis montrent que, dans le cas de gènes codant pour des facteurs de transcription, l'épissage alternatif engendre la formation d'isoformes de type « dominant-répresseur ». L'épissage du gène WND1B chez le Peuplier, par exemple, produit deux protéines, une courte et une longue, qui sont capables de se dimériser. Les homodimères et les hétérodimères régulent de façon antagonistes un set de gènes impliqués dans la formation de la paroi secondaire et entraînent des effets opposés sur l'épaisseur de cette paroi (Zhao *et al.*, 2014). Un mécanisme similaire a été mis en évidence pour le « master regulator » VND6, qui appartient aussi à la famille des NAC (Lin *et al.*, 2017). A ma connaissance, aucun exemple d'épissage alternatif n'a été rapporté pour des facteurs MYB impliqués dans la formation du xylème. L'épissage alternatif est donc un mécanisme qui semble important pour réguler le développement des tissus du bois, et il serait tout particulièrement mis en œuvre lorsque les arbres sont soumis à des contraintes de l'environnement. Chez le Peuplier, par exemple, plusieurs études de transcriptomique en réponse à des stress sécheresse, salin ou à des températures extrêmes (élevées ou basses) montrent qu'un grand nombre d'événements d'épissage alternatif dépendent des conditions de l'environnement (Filichkin *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2021). Récemment, Yang et ses collaborateurs (2021) ont démontré que l'épissage alternatif d'un grand nombre de gènes était dépendant du génotype de Peuplier étudié. Chez *Populus ussuriensis*, un génotype tolérant au froid, les événements d'épissage alternatif sont plus rapides et plus nombreux que chez *Populus trichocarpa*, qui est plus sensible. De nombreux travaux soulignent l'importance de l'épissage alternatif pour des gènes clés de la réponse aux stress, comme certains facteurs de transcription AP2/DREB2, qui jouent aussi un rôle dans le remodelage de la structure et la composition du xylème, (voir **Chapitre 3**). Chez le riz, l'arabette et le blé, les facteurs de transcription DREB2, peuvent produire de multiples variants dont le ratio d'accumulation est régulé par la température. De même, l'expression des facteurs de réponse au froid CBF est contrôlée par des variants d'épissage des gènes de régulation du rythme circadien CCA1 et LHY (Seo, Park and Park, 2013).

La régulation de l'épissage alternatif pourrait donc représenter une source de plasticité très importante pour l'adaptation à court terme des arbres face aux contraintes de leur environnement. Cependant, il n'existe que très peu d'études fonctionnelles sur les variants de gènes impliqués dans la formation du bois et aucune en condition de stress.

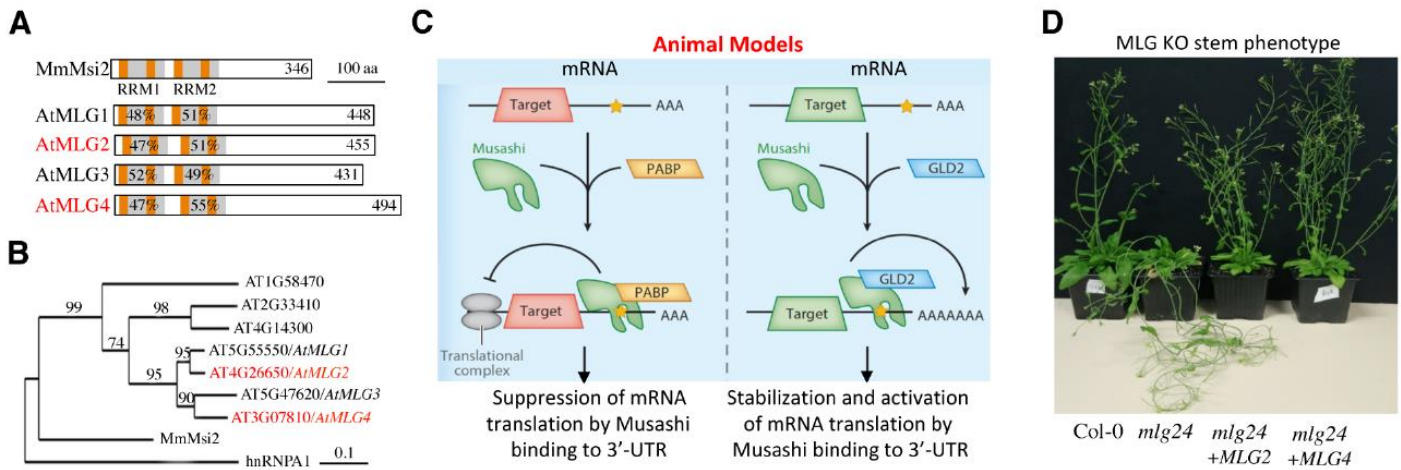


Figure 62 : Caractérisation fonctionnelle des MUSASHI chez *Arabidopsis thaliana*. **A**, Représentation schématique des 4 gènes MUSASHI-like (MLG) d'*A. thaliana*. On observe une très forte conservation des domaines RRM de liaison à l'ARN entre les MUSASHI présents dans le génome de la souris et les MLGs d'*A. thaliana*. **B**, Analyse phylogénétique comparant les séquences des protéines fixatrice d'ARN de la famille des MUSASHI. **C**, Mécanismes d'action proposés pour les MUSASHI chez les animaux. **D**, Phénotype de perte de rigidité de la tige observé dans les doubles mutants *mlg2,4* et restauration du phénotype sauvage dans les lignées complémentées avec les gènes MLG2 ou MLG4.

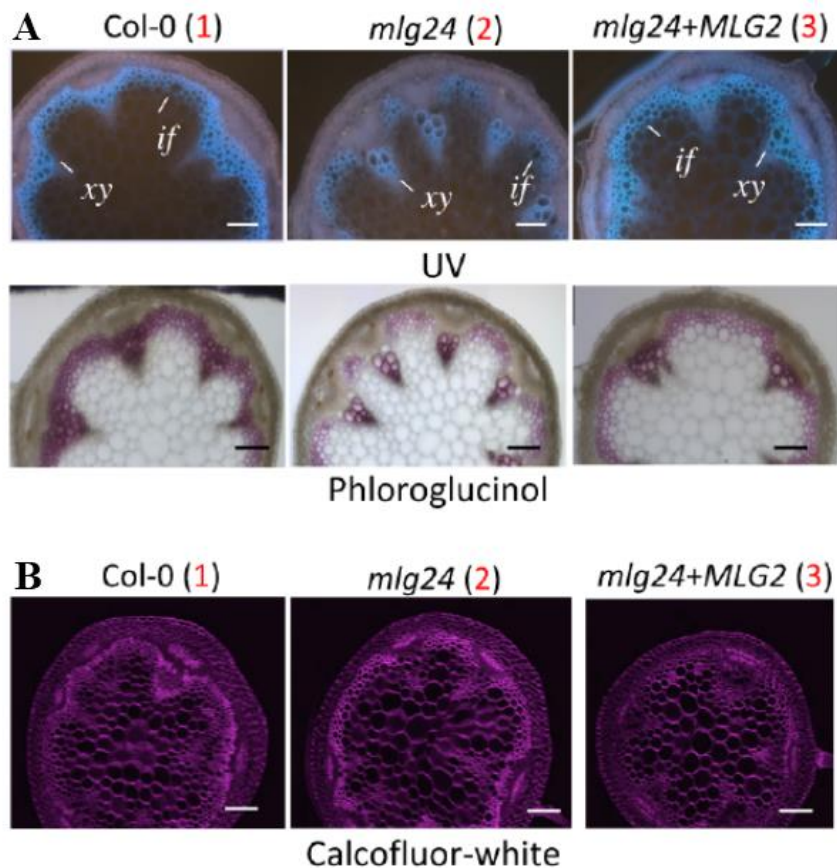


Figure 63 : Les gènes MLG régulent la formation de la paroi secondaire dans les fibres interfasciculaires chez *A. thaliana*. **A**, Diminution de la lignification des parois observée en autofluorescence et grâce à une coloration au phloroglucinol dans des coupes transversales de hampes florales de plantes sauvages, mutantes *mlg2,4* et complémentées. **B**, Augmentation du signal Calcofluor (marquage des polysaccharides) dans les fibres interfasciculaires des doubles mutants, par comparaison avec les plantes sauvages.

L'implication de l'équipe ReDyWood dans le projet européen B4EST, décrit dans le **Chapitre 3.3**, nous a fourni les moyens d'approfondir notre compréhension de ces mécanismes. Des données de séquençage d'ARN « courtes et longues lectures » (Illumina® et PacBio IsoSeq®) ont été acquises sur les racines, les tiges et les feuilles, en condition de stress hydrique, à partir de 2 génotypes d'Eucalyptus présentant des caractéristiques de croissance et de résistance à la sécheresse contrastées (**Figures 55 et 56**). Ces données représentent un point de départ prometteur pour étudier de façon globale la régulation de l'épissage alternatif en réponse aux stress abiotiques. J'ai pour objectif d'identifier les gènes soumis à des évènements d'épissage alternatif et d'évaluer l'effet de la sécheresse sur l'expression des différents variants d'ARNm. Ces profils transcriptomiques de variants d'épissage seront utilisés pour affiner la construction de réseaux de co-régulation. Les corrélations entre les profils d'expression des variants d'intérêt et les autres variables du réseaux (gènes, paramètres de croissance, paramètres structuraux du xylème) seront recherchées. Une attention particulière sera portée aux gènes candidats impliqués dans la formation du bois, qu'ils soient reliés à la réponse aux stress abiotiques ou à la formation du bois, comme des facteurs de transcription MYB par exemple. Les approches techniques développées au cours de ces dernières années dans l'équipe sont adaptées à la caractérisation de ces variants pour déterminer : 1/ les cibles des différentes isoformes de ces facteurs de transcription (Takawira *et al.*, 2023), 2/ leurs partenaires protéiques (par Y2H, Soler *et al.*, 2017) et 3/ leur fonction *in planta* (par sur-/sous-expression dans des lignées transgéniques, Plasencia *et al.*, 2016).

4.2.2 Rôle des protéines Musashi dans le développement du bois

Chez les animaux comme chez les végétaux, la traduction est régulée par l'action de protéines capables de se fixer aux ARN messagers. Ces RNA Binding Proteins (RBPs) interviennent dans une multitude de processus cellulaires, en régulant la synthèse, le repliement, la translocation, l'assemblage et le tri des ARN messagers. A ce jour, un nombre très restreint d'études se sont intéressées au rôle des RBPs dans la formation du xylème. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux protéines de type CCCH zinc-finger, peuvent se fixer aussi bien à l'ADN qu'aux ARNm, et semblent impliquées dans la formation de la paroi secondaire (Kim *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2022). De la même façon, le facteur d'initiation de la traduction eIF5a, qui favorise la synthèse de protéines en participant à l'exportation des ARNm du noyau, peut stimuler ou inhiber la formation du xylème selon s'il est surexprimé ou sous exprimé chez *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2008). Au LGDP de Perpignan, l'équipe de Thierry Lagrange s'intéresse à une famille de gènes qui codent pour des RBPs contenant des motifs RRM de liaison à l'ARN. Ces gènes, nommés MLG-1 à 4 chez *Arabidopsis*, partagent de fortes similarités de séquence, de structure et de fonction avec certains régulateurs de la transcription appelés MUSASHI chez les animaux (**Figure 62 A et B**). Les MUSASHI

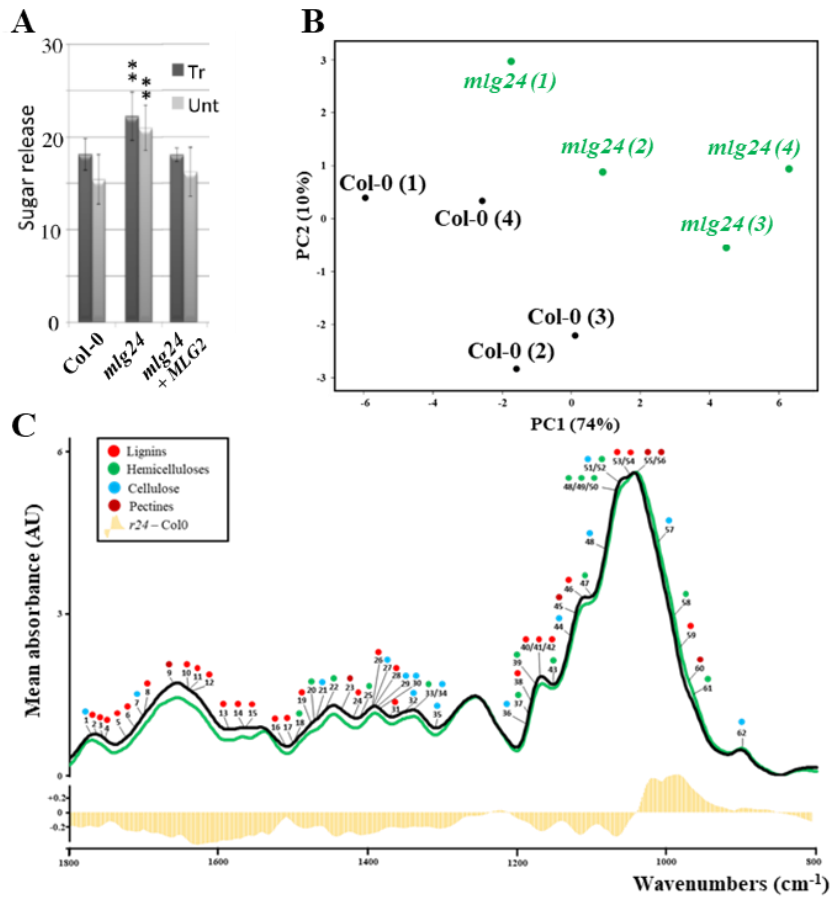


Figure 64 : Comparaison de la composition des parois des cellules de tiges entre les plantes mutantes *mlg24*, les plantes sauvages et les mutants complémentés. A, Quantité de sucres libérés après saccharification des parois avec et sans traitement à la soude. B, Analyse PLS-DA réalisée à partir des absorbances obtenues par des analyses de FT-IR sur des extraits de parois purifiées à partir des tiges. C, Spectre médians obtenus après analyse de FT-IR. Les nombres indiqués sur les courbes représentent les nombres d'onde associés à des composés de la paroi (voir Kairouani *et al.*, 2023)

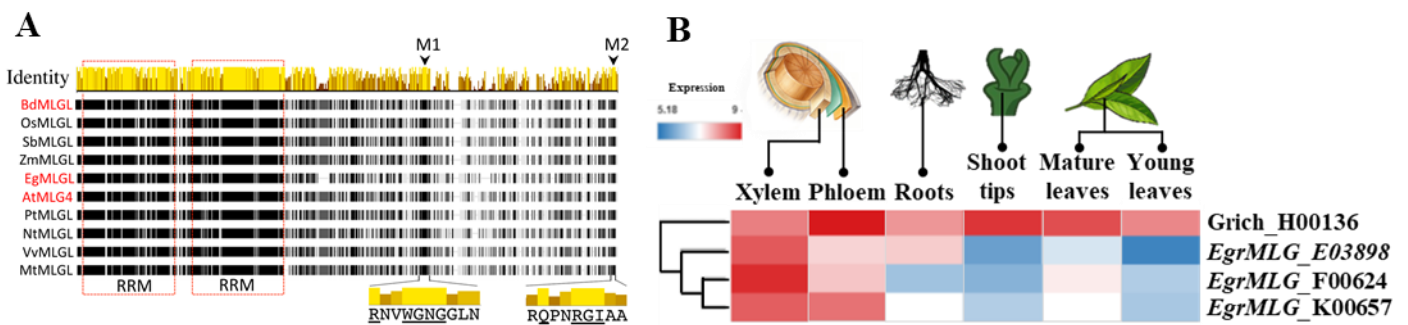


Figure 65 : Identification des orthologues putatifs de *AtMUSASHI*-like intervenant potentiellement dans la formation des tissus vasculaires dans chez l'*Eucalyptus*. A, Conservation des protéines de la famille des MUSASHI-like chez les plantes (Jalview software). *EgMLGL** correspond à *Eucgr.F00624*. *Sorghum bicolor* (*Sb*); *Zea mays* (*Zm*); *Oryza sativa* (*Os*); *Populus trichocarpa* (*Pt*); *Nicotiana tabacum* (*Nt*); *Vitis vinifera* (*Vv*); *Medicago truncatula* (*Mt*). B, Profil d'expression des 4 orthologues des gènes MUSASHI-like chez *E. grandis* (*eucgenie.org*).

peuvent se fixer dans la région 3'UTR de leur cible et moduler de façon positive ou négative la traduction des ARNm en recrutant des partenaires protéiques (**Figure 62C**). Bien que les protéines MLG aient été isolées spécifiquement à partir de protéomes associés aux ARNm, nous ne savons presque rien de leur fonction *in planta*. La perte de fonction des gènes MLG entraîne une diminution drastique de la rigidité de la hampe florale (**Figure 62D**), ce qui laisse supposer un défaut dans la formation des tissus vasculaires (**Figure 63**). Des analyses d'imagerie et d'histochimie à partir de coupes transversales de tiges ont révélé une réduction de l'épaisseur de la paroi secondaire des fibres interfasciculaires. La paroi de ces cellules est également moins lignifiée, comme le confirment les marquages au phloroglucinol et les dosages au bromure d'acétyle. L'utilisation d'un marquage au calcofluor suggère un dépôt de polysaccharides plus important que dans les plantes sauvages (**Figure 63 B**). Cette hypothèse est renforcée par des résultats de saccharification, obtenus avec et sans déstructuration de la paroi par un traitement alcalin, qui montrent une libération de sucres plus importante à partir des parois des plantes mutantes *mlg24* en comparaison des plantes Col0 (**Figure 63 A**). Ces modifications sont complétées par la restauration de la fonction MLG dans des plantes *mlg24* + MLG2 (**Figure 63 et 64**). L'utilisation de la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FT-IR) montre que la composition des parois des plantes mutantes *mlg24* est radicalement différente de celle du WT, pointant des régions du spectre associées aussi bien à l'absorption de composés de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses dans la littérature (**Figure 64 B et C**). L'analyse fine des monosaccharides pariétaux par l'équipe de Richard Sibout (INRAe de Nantes) a montré que la perte de fonction des gènes MLG2 et 4 n'entraîne en réalité aucune modification de la teneur en sucres neutres présents dans la cellulose ou les hémicelluloses, mais une réduction importante des acides glucuroniques (GlucA) qui sont les constituants les plus abondants des xylan/glucuronoxylan chez *Arabidopsis*. Ces mutants *mlg* présentent en effet des phénotypes très similaires à ceux des mutants *gux*, au sein desquels l'inactivation du gène codant pour une glucuronosyl transférase entraîne une forte diminution des GlucA au niveau des xyloxygènes et une perte de rigidité des tissus vasculaires de la tige (Lee *et al.*, 2007, 2010; Mortimer *et al.*, 2010). Bien que les cibles exactes des protéines MLG ne soient pas identifiées, nos observations mettent en évidence l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation de la formation de la paroi secondaire qui implique des RBPs spécifiques. Etant donné la présence de gènes présentant une forte homologie avec les MLG chez d'autres plantes, ce mécanisme pourrait être conservé au sein du règne végétal. On retrouve par exemple 8 MLG putatifs dans le génome du Peuplier, qui semblent s'exprimer dans tous les tissus. Chez l'Eucalyptus, seulement 4 gènes sont de potentiels orthologues des MLG et 3 d'entre eux s'expriment préférentiellement dans les tissus vasculaires (**Figure 65**). La caractérisation fonctionnelle des gènes MLG chez les arbres, en utilisant des lignées trans-

géniques sur/sous-expresseurs, nous permettra de mieux comprendre comment ces gènes sont impliqués dans la formation du bois chez les plantes pérennes.

4.3 Quelle est la contribution des tissus vasculaires dans la tolérance des arbres vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques ?

Les espèces pérennes sont particulièrement exposées aux contraintes de l'environnement, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. Les prédictions concernant l'évolution du climat laissent présager une augmentation de ces contraintes, tant sur les forêts naturelles que sur les plantations agroindustrielles (Allen *et al.*, 2010; Zeppel, Anderegg and Adams, 2013). Nous sommes encore loin de comprendre l'ensemble des mécanismes qui permettent aux arbres de faire face à leur environnement et il reste encore beaucoup à découvrir sur le rôle que pourraient jouer les tissus vasculaires dans la physiologie des arbres en condition de stress. La très grande plasticité des tissus du bois, observée aux niveaux anatomique, chimique et physique, est une réponse remarquable chez les arbres, qui contribue certainement à leur adaptation, au sens fonctionnel du terme, à des conditions contraignantes (Zinkgraf *et al.*, 2017). Les caractéristiques du bois, et les processus moléculaires associés, qui pourraient améliorer la résistance des arbres vis-à-vis des stress, restent à ce jour très peu documentés. En utilisant les ressources biologiques et le savoir-faire de l'équipe de recherche ReDyWood, et en collaboration avec des partenaires locaux, nationaux et internationaux, je souhaite développer des stratégies de recherche visant à mieux comprendre le rôle des tissus vasculaires dans la tolérance vis-à-vis des stress abiotiques et biotiques.

4.3.1 Les contraintes abiotiques

Chez les arbres en condition de stress abiotiques, on observe non seulement une réduction de l'activité du cambium mais aussi de profondes modifications anatomiques du bois qui influencent probablement les propriétés hydrauliques de conduction de sève (Polle *et al.*, 2019; Rodriguez-Zaccaro and Groover, 2019; Coleman, Brunner and Tsai, 2021). Les résultats de mes recherches antérieures, décrites dans ce document (**Chapitre 3**), montrent qu'en condition de stress hydrique, les programmes génétiques impliqués dans le développement du bois sont profondément modifiés. Ces régulations, encore mal comprises, contribuent probablement à moduler l'architecture des tissus et la composition des parois secondaires au niveau des fibres et des vaisseaux. En réponse à la sécheresse, la réduction de la taille des vaisseaux, l'augmentation de leur densité et la lignification de la paroi secondaire semblent être des modifications anatomiques fréquemment observées, et peuvent être interprétées comme une réponse au risque d'embolie des vaisseaux (Rodriguez-Zaccaro et Groover, 2018 ; Polle *et al.*, 2019). De plus, dans nos travaux

comme dans la littérature, les stress abiotiques semblent engendrer des modifications beaucoup plus subtiles de la composition des polymères pariétaux, dont on ignore encore les rôles pour la résistance de l'arbre à la sécheresse (Moura *et al.*, 2010; Moura-Sobczak *et al.*, 2011; LeGall *et al.*, 2015; Hori *et al.*, 2020). L'une des toutes premières preuves de l'importance de la paroi secondaire dans la résistance aux stress provient de la caractérisation du gène ESKIMO1 chez *Arabidopsis*. Les mutants *eskimo1* (*esk1*), qui sont plus résistants à de multiples stress (gel, salinité, sécheresse), sont aussi déficients pour une « xylan acetyl transferase » et présentent des vaisseaux collapsés, ainsi qu'une composition en polysaccharides pariétaux très différente de celle du WT (Lefebvre *et al.*, 2011). Il est intéressant de constater que ESK1 est régulé par SND1, un facteur de transcription NAC qui régule aussi la formation de la paroi secondaire. Il a été montré que SND1 assurait à la fois le rôle de régulateur positif du dépôt de paroi secondaire tout en inhibant la voie de signalisation à l'ABA en condition de stress salin (Jeong *et al.*, 2018). Des observations similaires ont été rapportées chez le saule, où *BpNAC12*, l'orthologue de SND1, était aussi capable de réguler un ensemble de gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotiques en reconnaissant les séquences en *cis* CGT[G/A] et SNBE. Lors de l'exposition à un stress, la régulation de l'expression de facteurs de transcription jouant un rôle dans la formation du bois, et la fixation de facteurs de transcription reliés à la réponse à ce stress sur des gènes impliqués dans la xylogénèse, sont deux types de mécanismes qui pourraient entraîner des modifications de la structure et de la composition des tissus du bois. Un nombre croissant de travaux soulignent l'importance d'approfondir notre compréhension de cette interface entre formation du bois et réponse aux stress chez les arbres. Une étude pionnière de Taylor-Teeple et ses collaborateurs illustrent parfaitement que les voies de régulation classiquement associées à la formation de la paroi des cellules peuvent être détournées lors de l'exposition à un stress chez *Arabidopsis thaliana* (Taylor-Teeple *et al.* 2014). D'un autre côté, le polymorphisme naturel du gène XND1, un régulateur négatif du dépôt de la paroi secondaire et de la mort cellulaire, est associé à un « trade-off » entre croissance et réponse au stress en influençant les flux de sève dans les tissus vasculaires de la racine chez *Arabidopsis* (Tang *et al.*, 2018). Chez les arbres, des observations similaires ont pu être montrées, la surexpression de gènes impliqués dans la formation du bois comme *BpMYB46* chez le bouleau, *MdMYB88* et *MdMYB124* chez le pommier, ou *PtoMYB170* chez le Peuplier, confère une meilleure résistance à différents stress (Guo *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017; Geng *et al.*, 2018). Tous ces exemples illustrent que le développement du bois est modifié en réponse à des contraintes abiotiques, et que ces modifications peuvent contribuer à une meilleure tolérance des arbres vis-à-vis de ces contraintes. Je souhaite mieux comprendre les mécanismes biologiques qui expliquent ces réponses et découvrir, si c'est

		Candidate gene	Expression - Wood specific	Expression - Stress	SCW gene co-expression	Target SCW genes (DAPseq)	SCW gene regulation	Lignin modification	Wood FTIR spectra	Saccharification yield	Histology	Plant growth	Drought tolerance
MYB	MYB1												
	MYB2												
	MYB20												
	MYB36												
	MYB64												
	MYB68												
	MYB88												
NAC	MYB137												
NAC	NAC64												
Aux/IAA	EgIAA4												
	EgIAA9A												
	EgIAA13												
	EgIAA20												
	EgIAA3B												
ARF	EgARF19												
	EgARF10												
	EgARF4												
	EgARF5												
CBF/DREB	EgCBF14												
	EgDREB2.5												
Autre	Histone linker H1.3												

(+) Observé / reproductible
(+/-) A confirmer
(-) Observation négative

Figure 66 : Tableau récapitulatif des informations et phénotypes associés aux gènes candidats analysés dans l'équipe ReDYWood. Les 3 premières colonnes correspondent à des informations relatives au profil d'expression des gènes, étudiés par RT-qPCR ou RNAseq. Une case verte signifie que le gène satisfait au critère d'intérêt, une case rouge qu'il n'y satisfait pas et une case blanche que ce paramètre n'a pas été étudié. Nous pouvons observer que 19 des 21 candidats régulent le développement des tissus vasculaires. Pour quatre d'entre eux seulement, des tests de tolérance à la sécheresse ont été réalisés.

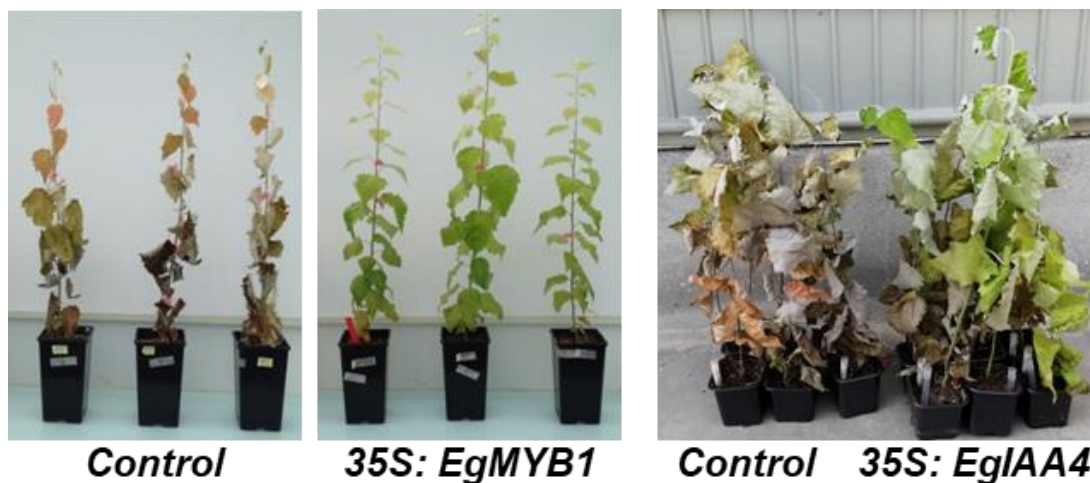


Figure 67 : Phénotypes des plantes de Peuplier transgéniques surexprimant les gènes *EgMYB1* et *EgAux/IAA4* après un arrêt d'arrosage. Les plantes transgéniques montrent une meilleure résistance à un déficit hydrique.

possible, les paramètres qui pourraient être utilisés pour améliorer la sélection d'espèces plus adaptées aux contraintes climatiques à venir.

Au cours de ces 10 dernières années, l'équipe ReDyWood a pu montrer que plusieurs dizaines de facteurs de transcription, associés à la formation du bois, agissent au sein d'un réseau de co-expression complexe susceptible d'intégrer à la fois des signaux développementaux et environnementaux (Ployet *et al.*, 2018 et 2019 ; Hadj Bachir *et al.*, 2022 et 2023, en préparation, voir **Chapitre 2.3**). Parmi ces régulateurs, nous avons prêté une attention particulière aux gènes qui codent pour des facteurs de transcription de types MYB, NAC, Aux/IAA, ARF ou DREB et qui pourraient agir à cette interface (**Figure 66**). La sur-expression de certains d'entre eux, comme par exemple *EgMYB1*, *EgMYB137* et *EgIAA4*, entraîne non seulement la modification des paramètres physico-chimiques des tissus du xylème, mais permet aussi de conférer aux plantes transgéniques une meilleure tolérance à un arrêt d'arrosage (**Figure 67**) ce que je souhaiterais approfondir dans mes recherches futures.

Pour les arbres comme pour les autres espèces végétales, la sécheresse est un stress abiotique majeur, une cause importante de mortalité qui entraîne de lourdes pertes économiques et environnementales. Cette menace est aggravée dans le contexte climatique actuel de réchauffement climatique qui place les arbres dans des situations extrêmes, renforçant le risque de rupture hydrique au sein des tissus vasculaires (Brodrigg *et al.*, 2021). J'aimerais donc valoriser la collection de plantes transgéniques disponibles dans l'équipe, qui présentent des modifications variées au niveau du xylème, afin d'identifier les paramètres qui peuvent jouer sur la résistance des arbres à la sécheresse. L'objectif est d'obtenir une vision globale des régulations qui interviennent à l'interface entre formation du bois et réponse à la sécheresse en approfondissant les points suivants :

- (1) L'évaluation de la résistance à la sécheresse des différentes lignées transgéniques.
- (2) La caractérisation de la structure et de la composition du bois des lignées plus tolérantes ou plus sensibles à la sécheresse
- (3) L'analyse des réseaux de régulation expliquant le remodelage de la paroi en réponse au stress
- (4) L'identification de nouveaux gènes candidats agissant dans ce contexte
- (5) La description des paramètres du bois (idéotypes) caractéristiques d'un arbre susceptible de mieux résister à la sécheresse sans montrer d'impact négatif sur la croissance et la productivité

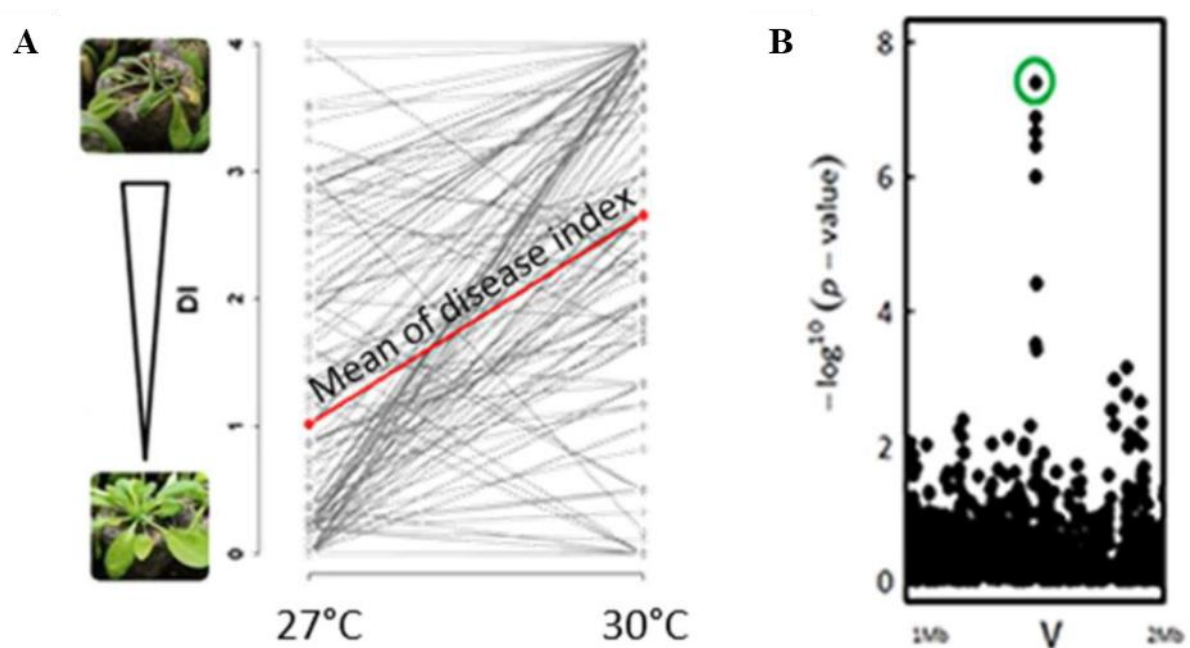


Figure 68 : Effet de la température sur l'infection d'une population de 176 accessions d'*Arabidopsis thaliana* par la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* (données non publiées fournies par M. Marchetti et R. Berthomé, équipe REACH, LIPMe). A, Augmentation de la sensibilité moyenne au pathogène lorsque la température augmente de 27°C à 30°C. B, Identification d'un SNP associé à une meilleure résistance au pathogène à une température de 30°C par GWAS.

4.3.2 Les contraintes biotiques

Les plantes, qui sont soumises à une pression constante exercée par les contraintes biotiques et abiotiques, ont développé une grande variété de mécanismes de survie. Leur immunité repose aussi bien sur des mécanismes de réponses élaborés, qui se déclenchent au contact des pathogènes, que sur des barrières physiques présentes au niveau des tissus. Il apparaît de plus en plus évident que les cellules végétales possèdent des mécanismes complexes de perception de l'intégrité de la paroi, qui est altérée au cours de l'infection par un pathogène (Hamann, 2012; Pogorelko *et al.*, 2013). Etant donné son rôle fondamental à l'interface entre la cellule et le milieu extérieur, il n'est pas surprenant que la paroi contribue aux processus d'interaction entre les plantes et les pathogènes (Hückelhoven, 2007). Plusieurs études de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans la composition ou la structure de la paroi montrent, en particulier, une meilleure résistance à l'infection par des microbes (Vogel and Somerville, 2000; Vogel *et al.*, 2002, 2004), comme l'inactivation du gène WAT1 (Walls Are Thin1) ou des gènes IRX (irregular xylem), codant pour des celluloses synthases impliquées dans le dépôt de la paroi secondaire (Hernández-Blanco *et al.*, 2007; Denancé *et al.*, 2013).

La résistance des plantes face à la plupart des pathogènes est influencée par plusieurs facteurs, et peut aussi dépendre de l'environnement abiotique. L'exposition des plantes à une élévation de la température, par exemple, semble favoriser l'émergence de nouveaux pathogènes ou renforcer la fréquence d'apparition des épidémies (Garrett *et al.*, 2006). Les recherches menées par l'équipe REACH du LIPMe ont montré que des conditions de températures plus élevées de quelques degrés suffisent pour inhiber les principaux mécanismes de résistance au pathogène *Ralstonia solanacearum* (Aoun *et al.*, 2017; Desaint *et al.*, 2021).

Ralstonia solanacearum est une bactérie tellurique à l'origine des symptômes de la pourriture brune. Elle peut infecter environ 200 espèces de plantes de grandes cultures dont la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, des arbres comme le Peuplier, et bien entendu la plante modèle *Arabidopsis*. Capable de percevoir les signaux chimiques sécrétés par les racines de la plante hôte, *Ralstonia* pénètre à l'intérieur des racines, probablement au niveau de zones de blessures ou d'émergence des racines secondaires. La colonisation de l'apoplaste est la première barrière à franchir pour la bactérie et représente une étape clef de l'infection. En cas de succès, *Ralstonia* colonise le cylindre vasculaire central et diffuse à travers le xylème. Les bactéries pathogènes produisent une grande quantité d'exopolysaccharides pour se protéger des défenses de la plante, ce qui bouche les vaisseaux et entraîne le flétrissement de la plante.

En utilisant une population de 176 accessions naturelles d'*Arabidopsis*, nos collaborateurs ont montré qu'une élévation de la température de 3°C augmente fortement

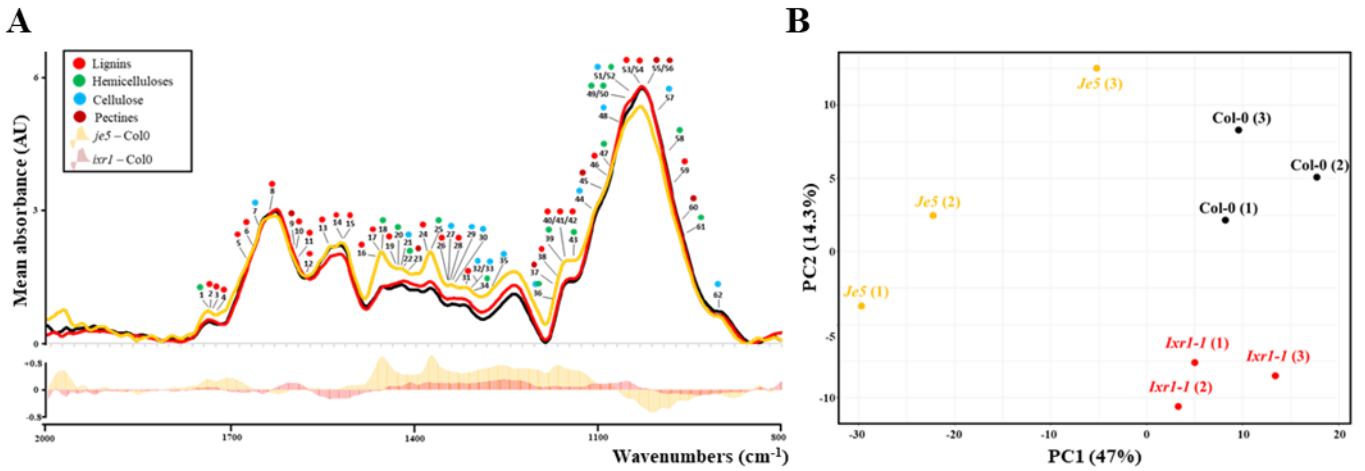


Figure 69: Comparaison de la composition de la paroi des cellules de la racine entre les plantes mutantes *je5*, *ixr1-1* et les plantes sauvages. **A**, Spectres d'absorption FT-IR normalisés obtenus à partir des parois purifiées de plantes sauvages (noir), *ixr1-1* (rouge) and *je5* (orange). Les histogrammes représentent la soustraction entre les valeurs d'absorption obtenues pour les mutants et celles des plantes sauvages. Un état de l'art a permis d'identifier 62 nombres d'onde associés à l'absorption des composés pariétaux dans l'IR. **B**, Analyse statistique multivariée PLS-DA réalisée à partir des valeurs normalisées d'absorption comprises entre 800cm⁻¹ et 2000cm⁻¹. Les deux premières composantes expliquent 61% de la variabilité totale. Les axes 1 (PC1) et 2 (PC2) séparent respectivement les mutants *je5* et *ixr1-1* des échantillons contrôles.

la sensibilité globale des plantes à la souche GMI1000 de *Ralstonia* (**Figure 66**). Lorsque la température est élevée (30°C), une analyse à l'échelle du génome a permis d'associer la résistance des plantes à l'infection au polymorphisme du gène codant pour la CesA3. Les cellulose synthases sont une famille de gènes codant pour des sous unités d'un complexe membranaire impliqué dans la synthèse de la paroi. Chez *Arabidopsis*, il existe deux types CesA : les sous unités AtCesA1, AtCesA3 et AtCesA6 sont associées à la biosynthèse de la paroi primaire, alors que AtCesA4, AtCesA7 et AtCesA8 sont requises pour la synthèse de la paroi secondaire (Fagard *et al.*, 2000; Neil G. Taylor *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2006). A ce jour, aucune étude n'a décortiqué les mécanismes de l'immunité des plantes lorsque leur infection par *Ralstonia* s'accompagne de conditions de stress abiotique (chaleur). Cette thématique est travaillée par Marta Marchetti et Richard Berthomé, de l'équipe REACH (LIPMe), avec qui nous collaborons depuis 2020. Les objectifs de ce projet commun sont :

- (1) De mieux comprendre le rôle des constituants de la paroi dans la résistance des plantes à l'infection par *Ralstonia*.
- (2) De caractériser quelles modifications fines de la paroi des cellules pourraient être impliquées dans la résistance aux stress biotiques et abiotique combinés.

Afin de répondre à ces questions, les mécanismes de défense et la composition de la paroi des cellules racinaires sont en cours d'analyse à partir (i) des accessions naturelles sensibles et résistantes au pathogène, et (ii) à partir de différents mutants pour le gène *cesA3*, en comparant des conditions normales de croissance et des conditions de température élevée. En guise d'étude préliminaire, Hua Wang et moi-même avons caractérisé la structure et la composition de la paroi des cellules au niveau des racines de plantes sauvages et des mutants *je5* et *ixr1-1* du gène *CesA3*. Ces mutations ciblent des domaines différents de la protéine et laissent supposer des effets différents sur la fonction de *CesA3*. Les analyses de ma collègue Hua Wang ont pu montrer que les mutants présentent des défauts au niveau de l'architecture des tissus vasculaires de la racine, ainsi qu'une modification de la structure de la paroi des cellules du xylème. Grâce à des analyses de FT-IR, j'ai pu observer une différence de composition entre les mutants et le sauvage, mais également entre les mutants eux-mêmes (**Figure 67**). Nos collègues ont pu montrer que les mutants présentent une réponse opposée à l'infection par *Ralstonia* : *je5* est plus résistant alors que *ixr1-1* est plus sensible. Tout porte à croire que la modification du dépôt de cellulose dans la paroi peut conditionner l'immunité des plantes d'*Arabidopsis* et nos recherches se poursuivent pour démontrer que ce paramètre est impliqué dans le phénotype des différentes accessions sauvages.

Références

- Alhagdow, M. *et al.* (2007) 'Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato', *Plant Physiol*, 145, pp. 1408–1422.
- Allen, C. D. *et al.* (2010) 'A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests', *Forest Ecology and Management*, 259(4), pp. 660–684. doi: 10.1016/j.foreco.2009.09.001.
- Aoun, N. *et al.* (2017) 'Quantitative disease resistance under elevated temperature: Genetic basis of new resistance mechanisms to *Ralstonia solanacearum*', *Frontiers in Plant Science*, 8, p. 1387.
- Arbellay, E. *et al.* (2012) 'Defining an Adequate Sample of Earlywood Vessels for Retrospective Injury Detection in Diffuse-Porous Species', *PLoS ONE*, 7(6), p. 38824. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0038824.
- Baldet, P. *et al.* (2006) 'The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants', *J Exp Bot*, 57, pp. 961–970.
- Battie-laclau, P. *et al.* (2014) 'Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment', *Plant, Cell & Environment*, 37(1), pp. 70–81. doi: 10.1111/pce.12131.
- Battie-Laclau, P., Laclau, J.-P., Domec, J.-C., Christina, M., Bouillet, J.-P., de Cassia Piccolo, M., de Moraes Gonçalves, J. L., Moreira, R. M. e, *et al.* (2014) 'Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations', *New Phytologist*, 203(2), pp. 401–413. doi: 10.1111/nph.12810.
- Battie-Laclau, P. *et al.* (2016) 'Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations', *Forest Ecology and Management*, 364, pp. 77–89. doi: 10.1016/j.foreco.2016.01.004.
- Becker, B. *et al.* (2006) 'Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) plants under long- and short-day conditions', *Planta*, pp. 1–14.
- Bhagia, S. *et al.* (2022) 'Nanoscale FTIR and Mechanical Mapping of Plant Cell Walls for Understanding Biomass Deconstruction'. doi: 10.1021/acssuschemeng.1c08163.
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) 'Lignin biosynthesis.', *Annual review of plant biology*, 54, pp. 519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- Bollhöner, B., Prestele, J. and Tuominen, H. (2012) 'Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function.', *Journal of experimental botany*, 63(3), pp. 1081–94. doi: 10.1093/jxb/err438.
- Bossinger, G. and Spokevicius, A. V. (2018) 'Sector analysis reveals patterns of cambium differentiation in poplar stems', *Journal of Experimental Botany*, 69(18), pp. 4339–4348. doi: 10.1093/JXB/ERY230.
- Boudet, A. M. *et al.* (2003) 'Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses', *Trends in Plant Science*, 8(12), pp. 576–581. doi: 10.1016/j.tplants.2003.10.001.
- Brodribb, T. *et al.* (2021) 'Linking xylem network failure with leaf tissue death', *New Phytologist*, 232(1), pp. 68–79. doi: 10.1111/nph.17577.
- Cabane, M., Afif, D. and Hawkins, S. (2012) 'Lignins and Abiotic Stresses', *Advances in Botanical Research*, 61, pp. 219–262. doi: 10.1016/B978-0-12-416023-1.00007-0.
- Cao, P. B. *et al.* (2015) 'Genome-wide analysis of the AP2/ERF family in *Eucalyptus grandis*: An intriguing over-representation of stress-responsive', *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0121041.
- Chai, G. *et al.* (2022) 'The CCCH zinc finger protein C3H15 negatively regulates cell elongation by inhibiting brassinosteroid signaling', *Plant Physiology*, 189(1), pp. 285–300. doi: 10.1093/PLPHYS/KIAC046.
- Choat, B. *et al.* (2011) 'Xylem traits mediate a trade-off between resistance to freeze-thaw-induced embolism and photosynthetic capacity in overwintering evergreens', *New Phytologist*, 191(4), pp. 996–1005. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03772.x.
- Choat, B. and Pittermann, J. (2009) 'New insights into bordered pit structure and cavitation resistance in angiosperms and conifers', *New Phytologist*, 182(3), pp. 557–560. doi: 10.1111/J.1469-8137.2009.02847.X.
- Clauß, K. *et al.* (2008) 'Role of a GDGL lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae', *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 53(5), pp. 802–813. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03374.X.
- Coleman, H. D., Brunner, A. M. and Tsai, C. J. (2021) 'Synergies and Entanglement in Secondary Cell Wall Development and Abiotic Stress Response in Trees', *Frontiers in Plant Science*, 12(March). doi:

10.3389/fpls.2021.639769.

Conde, D. *et al.* (2021) 'A robust method of nuclei isolation for single-cell RNA sequencing of solid tissues from the plant genus *Populus*', *PLOS ONE*, 16(5), p. e0251149. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0251149.

Cuello, C. *et al.* (2020) 'ATR-FTIR Microspectroscopy Brings a Novel Insight Into the Study of Cell Wall Chemistry at the Cellular Level', *Article*, 11, p. 1. doi: 10.3389/fpls.2020.00105.

Dai, Y. *et al.* (2020) 'Implementing the CRISPR/Cas9 Technology in Eucalyptus Hairy Roots Using Wood-Related Genes', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). doi: 10.3390/IJMS21103408.

Déjardin, A. *et al.* (2010) 'Wood formation in Angiosperms.', *Comptes rendus biologies*, 333(4), pp. 325–334. doi: 10.1016/j.crv.2010.01.010.

Denancé, N. *et al.* (2013) 'Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs.', *Frontiers in plant science*, 4(May), p. 155. doi: 10.3389/fpls.2013.00155.

Denyer, T. *et al.* (2019) 'Spatiotemporal Developmental Trajectories in the Arabidopsis Root Revealed Using High-Throughput Single-Cell RNA Sequencing', *Developmental Cell*, 48(6), pp. 840–852.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2019.02.022.

Desaint, H. *et al.* (2021) 'Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress', *New Phytologist*, 229(2), pp. 712–734. doi: 10.1111/NPH.16965.

Domon, J. M. *et al.* (2013) 'Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation', *Phytochemistry*, 85, pp. 51–61. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.09.001.

Dumond, L. *et al.* (2021) 'Termite Gut Microbiota Contribution to Wheat Straw Delignification in Anaerobic Bioreactors', *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(5), pp. 2191–2202.

Enders, A. and Strader, L. C. (2015) 'Auxin activity: Past, present, and future on JSTOR', *American Journal of Botany*, 102(2), pp. 180–196..

Fagard, M. *et al.* (2000) 'PROCUSTE1 Encodes a Cellulose Synthase Required for Normal Cell Elongation Specifically in Roots and Dark-Grown Hypocotyls of Arabidopsis', *The Plant Cell*, 12(12), pp. 2409–2423. doi: 10.1105/TPC.12.12.2409.

Favreau, B. *et al.* (2019) 'Distinct leaf transcriptomic response of water deficient *Eucalyptus grandis* submitted to potassium and sodium fertilization', *PLoS ONE*, 14(6), pp. 1–30. doi: 10.1371/journal.pone.0218528.

Filichkin, S. A. *et al.* (2018) 'Abiotic stresses modulate landscape of poplar transcriptome via alternative splicing, differential intron retention, and isoform ratio switching', *Frontiers in Plant Science*, 9, p. 5. doi: 10.3389/FPLS.2018.00005/BIBTEX.

Friml, J. *et al.* (2022) 'Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis', *Nature*, 415, pp. 806–809.

Fromm, J. (2010) 'Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition.', *Tree physiology*, 30(9), pp. 1140–1147. doi: 10.1093/treephys/tpq024.

Galweiler, L. *et al.* (1998) 'Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue', *Science*, 282, pp. 2226–2230.

Garrett, K. A. *et al.* (2006) 'Climate Change Effects on Plant Disease: Genomes to Ecosystems', <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143420>, 44, pp. 489–509. doi: 10.1146/ANNUREV.PHYTO.44.070505.143420.

Geng, D. *et al.* (2018) 'MdMYB88 and MdMYB124 Enhance Drought Tolerance by Modulating Root Vessels and Cell Walls in Apple', *Plant Physiology*, 178(3), pp. 1296–1309. doi: 10.1104/PP.18.00502.

Gierlinger, N. (2017) 'New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy', <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1363052>, 53(7), pp. 517–551. doi: 10.1080/05704928.2017.1363052.

Girard, A.-L. *et al.* (2012) 'Tomato GDSL1 Is Required for Cutin Deposition in the Fruit Cuticle.', *The Plant cell*, 6. doi: 10.1105/tpc.112.101055.

Goué, N. *et al.* (2012) 'Microdissection to isolate vascular cambium cells in poplar', *Silva Fennica*, 46(1), pp. 5–16. doi: 10.14214/SF.62.

Guo, H. *et al.* (2017) 'Expression of the MYB transcription factor gene BpIMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*', *Plant Biotechnology Journal*, 15(1), pp. 107–121. doi: 10.1111/pbi.12595.

- Habets, M. E. J. and Offringa, R. (2015) 'Auxin Binding Protein 1: A Red Herring After All?', *Molecular plant*, 8(8), pp. 1131–1134. doi: 10.1016/J.MOLP.2015.04.010.
- Hadj Bachir, I. *et al.* (2022) 'Regulation of secondary cell wall lignification by abiotic and biotic constraints', *Advances in Botanical Research*, 104, pp. 363–392. doi: 10.1016/BS.ABR.2022.03.008.
- Hamann, T. (2012) 'Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms', *Frontiers in Plant Science*, 3(APR), p. 77. doi: 10.3389/FPLS.2012.00077/BIBTEX.
- Hausman, J. F. *et al.* (2000) 'Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments', *Plant Cell Reports*, 19(10), pp. 954–960. Available at: <http://link.springer.de/link/service/journals/00299/bibs/0019010/00190954.htm>.
- Hernández-Blanco, C. *et al.* (2007) 'Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance.', *The Plant cell*, 19(3), pp. 890–903. doi: 10.1105/tpc.106.048058.
- Hori, C. *et al.* (2020) 'Impact of abiotic stress on the regulation of cell wall biosynthesis in populus trichocarpa', *Plant Biotechnology*, 37(3), pp. 1–11. doi: 10.5511/plantbiotechnology.20.0326a.
- Hückelhoven, R. (2007) 'Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility', 45, pp. 101–127. doi: 10.1146/ANNUREV.PHYTO.45.062806.094325.
- Hussain, S. S., Kayani, M. A. and Amjad, M. (2011) 'Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants.', *Biotechnology Progress*, 27(2), pp. 297–306. doi: 10.1002/btpr.514.
- Hussey, S. G. *et al.* (2013) 'Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition', *Frontiers in plant science*, 4(August), pp. 1–21. doi: 10.3389/fpls.2013.00325.
- Jean-Baptiste, K. *et al.* (2019) 'Dynamics of Gene Expression in Single Root Cells of Arabidopsis thaliana', *The Plant Cell*, 31(5), pp. 993–1011. doi: 10.1105/TPC.18.00785.
- Jeong, C. Y. *et al.* (2018) 'Dual role of SND1 facilitates efficient communication between abiotic stress signalling and normal growth in Arabidopsis', *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-28413-x.
- Jin, H. *et al.* (2000) 'Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis.', *The EMBO journal*, 19(22), pp. 6150–6161. doi: 10.1093/emboj/19.22.6150.
- Juraniec, M. and Gajda, B. (2008) 'Cellulose biosynthesis in plants-the concerted action of CESA and non-CESA proteins', *Biologia plantarum*, 64, pp. 363–377. doi: 10.32615/bp.2020.065.
- Kairouani, A. *et al.* (2023) 'Cell type-specific control of secondary cell wall formation by Musashi-type translational regulators in Arabidopsis', *bioRxiv*, p. 2023.03.20.532888. doi: 10.1101/2023.03.20.532888.
- Kazmi, R. H. *et al.* (2017) 'Metabolomic analysis of tomato seed germination', *Metabolomics*, 13(12), pp. 1–17. doi: 10.1007/S11306-017-1284-X/FIGURES/5.
- Kim, W. C. *et al.* (2014) 'AtC3H14, a plant-specific tandem CCCH zinc-finger protein, binds to its target mRNAs in a sequence-specific manner and affects cell elongation in Arabidopsis thaliana', *The Plant Journal*, 80(5), pp. 772–784. doi: 10.1111/TPJ.12667.
- Knaggs, A. R. (2003) 'The biosynthesis of shikimate metabolites', *Natural Product Reports*, 20(1), pp. 119–136. doi: 10.1039/b100399m.
- Ko, J. H. *et al.* (2014) 'The MYB46/MYB83-mediated transcriptional regulatory programme is a gatekeeper of secondary wall biosynthesis', *Annals of Botany*, 114(6), pp. 1099–1107. doi: 10.1093/aob/mcu126.
- Lauressergues, D. *et al.* (2015) 'Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides', *Nature*, 520, pp. 90–93. doi: 10.1038/nature14346.
- Lee, C. *et al.* (2007) 'The irregular xylem9 Mutant is Deficient in Xylan Xylosyltransferase Activity', *Plant and Cell Physiology*, 48(11), pp. 1624–1634. doi: 10.1093/PCP/PCM135.
- Lee, C. *et al.* (2010) 'The Arabidopsis Family GT43 Glycosyltransferases Form Two Functionally Nonredundant Groups Essential for the Elongation of Glucuronoxylan Backbone', *Plant Physiology*, 153(2), pp. 526–541. doi: 10.1104/PP.110.155309.
- Lefebvre, V. *et al.* (2011) 'ESKIMO1 disruption in Arabidopsis alters vascular tissue and impairs water transport.', *PloS one*, 6(2), p. e16645. doi: 10.1371/journal.pone.0016645.
- LeGall, H. *et al.* (2015) 'Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress', (i), pp. 112–166. doi: 10.3390/plants4010112.

- Legay, S. *et al.* (2010) 'EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from Eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis and poplar.', *The New phytologist*, 188(3), pp. 774–786. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03432.x.
- Lemaire-Chamley, M. *et al.* (2005) 'Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato', *Plant Physiol*, 139, pp. 750–769.
- Lemaire-Chamley, M. *et al.* (2019) 'NMR-Based Tissue and Developmental Metabolomics of Tomato Fruit', *Metabolites*, 9(5), p. 93. doi: 10.3390/metabo9050093.
- Leprince, O. *et al.* (2017) 'Late seed maturation: drying without dying', *Journal of Experimental Botany*, 68(4), pp. 827–841. doi: 10.1093/JXB/ERW363.
- Li, Z. *et al.* (2021) 'Daily temperature cycles promote alternative splicing of RNAs encoding SR45a, a splicing regulator in maize', *Plant physiology*, 186(2), pp. 1318–1335. doi: 10.1093/PLPHYS/KIAB110.
- Lin, Y.-C. J. *et al.* (2017) 'Reciprocal cross-regulation of VND and SND multigene TF families for wood formation in *Populus trichocarpa*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201714422. doi: 10.1073/pnas.1714422114.
- Liu, Z. *et al.* (2008) 'Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Experimental Botany*, 59(4), pp. 939–950. doi: 10.1093/JXB/ERN017.
- Lucas, W. J. *et al.* (2013) 'The plant vascular system: evolution, development and functions.', *Journal of integrative plant biology*, 55(4), pp. 294–388. doi: 10.1111/jipb.12041.
- Mauriat, M. *et al.* (2014) 'Wood Formation in Trees', in Ramawat, K. G., Merillon, J. M., and Ahuja, M. R. (eds) *Tree biotechnology*. CRC Press, p. 656. Available at: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01032436> (Accessed: 17 July 2018).
- McCahill, I. W. and Hazen, S. P. (2019) 'Regulation of Cell Wall Thickening by a Medley of Mechanisms', *Trends in plant science*, 24(9), pp. 853–866. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2019.05.012.
- Mortimer, J. C. *et al.* (2010) 'Absence of branches from xylan in *Arabidopsis gux* mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), pp. 17409–17414. doi: 10.1073/pnas.1005456107.
- Mounet, F. *et al.* (2007) 'Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA', *Metabolomics*, 3(3), pp. 273–288. doi: 10.1007/s11306-007-0059-1.
- Mounet, F. *et al.* (2009) 'Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development.', *Plant physiology*, 149(3), pp. 1505–28. doi: 10.1104/pp.108.133967.
- Mounet, F. *et al.* (2012) 'Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development', *Journal of Experimental Botany*, 63(13), pp. 4901–4917. doi: 10.1093/jxb/ers167.
- Moura-Sobczak, J. *et al.* (2011) 'Low temperature stress and changes in the lignin content and composition in *Eucalyptus globulus*', *BMC Proceedings*, 5(Suppl 7), p. P102. doi: 10.1186/1753-6561-5-S7-P102.
- Moura, J. C. M. S. *et al.* (2010a) 'Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants.', *Journal of integrative plant biology*, 52(4), pp. 360–76. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.
- Moura, J. C. M. S. *et al.* (2010b) 'Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants', *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(4), pp. 360–376. doi: 10.1111/j.1744-7909.2010.00892.x.
- Muhammad, S. *et al.* (2022) 'Alternative splicing: An efficient regulatory approach towards plant developmental plasticity', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, p. e1758. doi: 10.1002/WRNA.1758.
- Myburg, A. A. *et al.* (2014) 'The genome of *Eucalyptus grandis*', *Nature*, 510(7505), pp. 356–362. doi: 10.1038/nature13308.
- Navarro, M. *et al.* (2011) 'Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development', *Plant Biotechnol J*, 9(1), pp. 50–63.
- Nguyen, H. *et al.* (2017) 'Special trends of CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance', *Physiologia Plantarum*, 159(4), pp. 445–467. doi: 10.1111/ppl.12529.
- O'Malley, R. C. *et al.* (2016) 'Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape', *Cell*, 165(5), pp. 1280–1292. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.038.

- Olenichenko, N. A. and Zagoskina, N. V. (2005) 'Response of winter wheat to cold: Production of phenolic compounds and L-phenylalanine ammonia lyase activity', *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(6), pp. 600–603. doi: 10.1007/s10438-005-0109-2.
- Petit, J. *et al.* (2014) 'Analyses of tomato fruit brightness mutants uncover both cutin-deficient and cutin-abundant mutants and a new hypomorphic allele of GDSL lipase', *Plant physiology*, 164(2), pp. 888–906. doi: 10.1104/PP.113.232645.
- Plasencia, A. *et al.* (2016) '*Eucalyptus* hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation', *Plant Biotechnology Journal*, 14(6), pp. 1381–1393. doi: 10.1111/pbi.12502.
- Plomion, C., Leprovost, G. and Stokes, A. (2001) 'Wood Formation in Trees', *Plant Physiology*, 127(December), pp. 1513–1523. doi: 10.1104/pp.010816.1.
- Ployet, R. *et al.* (2018) 'Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*', *Tree Physiology*, pp. 1–14. doi: 10.1093/treephys/tpx062.
- Ployet, R. *et al.* (2019) 'A systems biology view of wood formation in *Eucalyptus grandis* trees submitted to different potassium and water regimes', *New Phytologist*, 223(2), pp. 766–782. doi: 10.1111/nph.15802.
- Pogorelko, G. *et al.* (2013) 'Cell wall integrity: Targeted post-synthetic modifications to reveal its role in plant growth and defense against pathogens', *Plant Signaling & Behavior*, 8(9). doi: 10.4161/PSB.25435.
- Pollard, M. *et al.* (2008) 'Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin', *Trends in Plant Science*, 13(5), pp. 236–246. doi: 10.1016/j.tplants.2008.03.003.
- Polle, A. *et al.* (2019) 'Engineering drought resistance in forest trees', *Frontiers in Plant Science*, 9(January). doi: 10.3389/fpls.2018.01875.
- Rennie, E. a and Scheller, H. V. (2014) 'Xylan biosynthesis.', *Current opinion in biotechnology*, 26, pp. 100–107. doi: 10.1016/j.copbio.2013.11.013.
- Rich-Griffin, C. *et al.* (2020) 'Single-Cell Transcriptomics: A High-Resolution Avenue for Plant Functional Genomics', *Trends in plant science*, 25(2), pp. 186–197. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2019.10.008.
- Riechmann, J. L. and Ratcliffe, O. J. (2000) 'A genomic perspective on plant transcription factors', *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5), pp. 423–434.
- Roach, M. *et al.* (2012) 'Fructokinase is required for carbon partitioning to cellulose in aspen wood', *The Plant Journal*, 70(6), pp. 967–977. doi: 10.1111/J.1365-313X.2012.04929.X.
- Rodriguez-Zaccaro, F. D. and Groover, A. (2019) 'Wood and water: How trees modify wood development to cope with drought', *Plants People Planet*, 1(4), pp. 346–355. doi: 10.1002/ppp3.29.
- Sakuma, Y. *et al.* (2002) 'DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression.', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(3), pp. 998–1009.
- Sauer, M. and Kleine-Vehn, J. (2019) 'PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators', *Development (Cambridge)*, 146(15). doi: 10.1242/DEV.168088/224168.
- Schapiro, A. L. *et al.* (2008) 'Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability', *The Plant cell*, 20(12), pp. 3374–3388. doi: 10.1105/TPC.108.063859.
- Schmidt, R. *et al.* (2013) 'SALT-RESPONSIVE ERF1 Regulates Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling during the Initial Response to Salt Stress in Rice', *The Plant Cell*, 25(6), p. 2115. doi: 10.1105/TPC.113.113068.
- Schuetz, M., Smith, R. and Ellis, B. (2013) 'Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms', *Journal of Experimental Botany*, pp. 11–31. doi: 10.1093/jxb/ers287.
- Sederoff, R., Myburg, A. and Kirst, M. (2010) 'Genomics, Domestication, and Evolution of Forest Trees', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 74, p. sqb.2009.74.040. doi: 10.1101/SQB.2009.74.040.
- Seo, P. J., Park, M. J. and Park, C. M. (2013) 'Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: Mechanisms and functions', *Planta*, 237(6), pp. 1415–1424. doi: 10.1007/S00425-013-1882-4/FIGURES/1.
- Shi, R. *et al.* (2010) 'Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes.', *Plant & cell physiology*, 51(1), pp. 144–163. doi: 10.1093/pcp/pcp175.

- Smetana, O. *et al.* (2019) 'High levels of auxin signalling define the stem-cell organizer of the vascular cambium', *Nature* 2019 565:7740, 565(7740), pp. 485–489. doi: 10.1038/s41586-018-0837-0.
- Soler, M. *et al.* (2015) 'The Eucalyptus grandis R2R3-MYB transcription factor family: Evidence for woody growth-related evolution and function', *New Phytologist*, 206(4), pp. 1364–1377. doi: 10.1111/nph.13039.
- Soler, M. *et al.* (2016) 'The Woody-Preferential Gene EgMYB88 Regulates the Biosynthesis of Phenylpropanoid-Derived Compounds in Wood', *Frontiers in Plant Science*, 7(September). doi: 10.3389/fpls.2016.01422.
- Soler, M. *et al.* (2017) 'The Eucalyptus linker histone variant EgH1.3 cooperates with the transcription factor EgMYB1 to control lignin biosynthesis during wood formation', *New Phytologist*, 213(1), pp. 287–299. doi: 10.1111/NPH.14129.
- Song, L., Koga, Y. and Ecker, J. R. (2016) 'Profiling of Transcription Factor Binding Events by Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq)', *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), pp. 293–306. doi: 10.1002/CPPB.20014.
- Spicer, R. and Groover, A. (2010) 'Evolution of development of vascular cambia and secondary growth.', *The New phytologist*, 186(3), pp. 577–592. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03236.x.
- Takawira, L. T. *et al.* (2022) 'Functional investigation of five R2R3-MYB transcription factors associated with wood development in Eucalyptus using DAP-seq-ML'. doi: 10.21203/RS.3.RS-2268534/V1.
- Tang, N. *et al.* (2018) 'Natural variation at XND1 impacts root hydraulics and trade-off for stress responses in Arabidopsis', *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41467-018-06430-8.
- Taylor-Teeple, M. *et al.* (2014) 'An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis.', *Nature*, 517(7536), pp. 571–575. doi: 10.1038/nature14099.
- Taylor, Neil G *et al.* (2003) 'Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), pp. 1450–1455. doi: 10.1073/pnas.0337628100.
- Taylor, Neil G. *et al.* (2003) 'Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), pp. 1450–1455.
- Tivendale, N. D. and Millar, A. H. (2022) 'How is auxin linked with cellular energy pathways to promote growth?', *New Phytologist*, 233(6), pp. 2397–2404. doi: 10.1111/NPH.17946.
- Tivendale, N. D., Ross, J. J. and Cohen, J. D. (2014) 'The shifting paradigms of auxin biosynthesis', *Trends in Plant Science*, 19(1), pp. 44–51. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2013.09.012.
- Vanholme, R. *et al.* (2019) 'Lignin biosynthesis and its integration into metabolism', *Current opinion in biotechnology*, 56, pp. 230–239. doi: 10.1016/J.COPBIO.2019.02.018.
- Verbančič, J. *et al.* (2018) 'Carbon Supply and the Regulation of Cell Wall Synthesis', *Molecular Plant*, 11(1), pp. 75–94.
- Vogel, J. P. *et al.* (2002) 'PMR6, a Pectate Lyase-Like Gene Required for Powdery Mildew Susceptibility in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 14(9), pp. 2095–2106. doi: 10.1105/TPC.003509.
- Vogel, J. P. *et al.* (2004) 'Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition', *The Plant Journal*, 40(6), pp. 968–978. doi: 10.1111/J.1365-313X.2004.02264.X.
- Vogel, J. and Somerville, S. (2000) 'Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), pp. 1897–1902.
- Xu, C. *et al.* (2017) 'PtoMYB170 positively regulates lignin deposition during wood formation in poplar and confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis', *Tree Physiology*, 37(12), pp. 1713–1726. doi: 10.1093/treephys/tpx093.
- Yang, J. *et al.* (2021) 'PacBio and Illumina RNA Sequencing Identify Alternative Splicing Events in Response to Cold Stress in Two Poplar Species', *Frontiers in Plant Science*, 12, p. 2105.
- Yang, S.-D. *et al.* (2011) 'The Arabidopsis NAC Transcription Factor VNI2 Integrates Abscisic Acid Signals into Leaf Senescence via the COR/RD Genes.', *The Plant cell*, 23(6), pp. 2155–2168. doi: 10.1105/tpc.111.084913.
- Yeats, T. H. *et al.* (2012) 'The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin', *Nature Chemical Biology* 2012 8:7, 8(7), pp. 609–611. doi: 10.1038/nchembio.960.
- Yeats, T. H. and Rose, J. K. C. (2013) 'The Formation and Function of Plant Cuticles', *Plant Physiology*, 163(1),

pp. 5–20. doi: 10.1104/PP.113.222737.

Zeppel, M. J. B., Anderegg, W. R. L. and Adams, H. D. (2013) 'Forest mortality due to drought: Latest insights, evidence and unresolved questions on physiological pathways and consequences of tree death', *New Phytologist*, 197(2), pp. 372–374. doi: 10.1111/nph.12090.

Zhang, J. *et al.* (2018) 'Recent advances in the transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in the woody plants', *Frontiers in Plant Science*, 871, p. 1535.

Zhang, X., Xu, C. and Yosef, N. (2019) 'Simulating multiple faceted variability in single cell RNA sequencing', *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41467-019-10500-w.

Zhang, Z. H. *et al.* (2014) 'A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-seq data', *PLoS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0103207.

Zhao, Y. *et al.* (2014) 'Intron-Mediated Alternative Splicing of WOOD-ASSOCIATED NAC TRANSCRIPTION FACTOR1B Regulates Cell Wall Thickening during Fiber Development in Populus Species', *Plant Physiology*, 164(2), p. 765. doi: 10.1104/PP.113.231134.

Zinkgraf, M. *et al.* (2017) 'Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in Populus under diverse environmental conditions', *New Phytologist*, 214(4), pp. 1464–1478. doi: 10.1111/nph.14492.