

Abréviations

4CL, 4-hydroxycinnamate CoA ligase
ABC-transporter, ATP Binding Cassette transporter
ACO, ACC oxidase
ADNc, ADN complémentaire
AHK, histidine kinase
ANR, anthocyanidin reductase
AP2/ERF, Apetala 2/ ethylene responsive factor
ARF, auxin response factor
ARK, Arborknox
ASL, asymmetric leaves like
At, *Arabidopsis thaliana*
ATHB, *Arabidopsis thaliana* homeobox gene
BEBT, benzyl alcohol Obenzoyltransferase
BES, BRI1-EMS-suppressor
BFN, bifunctional nuclease
bHLH, basic helix-loop-helix
BIN, brassinosteroid insensitive
BLAST, basic local alignment search tool
bp, base pair
BP, Brevipedicellus
Bpl, *Betula platyphylla*
bZIP, basic leucine zipper
C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase
C4H, cinnamate-4-hydroxylase
CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase
CALd5H, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase
CaMV35S, Cauliflower mosaic virus 35S promoter
CBF, C-repeat binding factor
CBH, circumference at breast height
CCoAOMT, caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase
CCR, cinnamoyl CoA reductase
cDNA, complementary DNA
CesA, cellulose synthase
cH, hexosanes
ChiP-Seq, chromatin immuno-precipitation - sequencing
CHS, chalcone synthase
CLE, Clavata3/ESR
COBL, Cobra-like
COMT, caffeic acid O-methyltransferase
cP, pentosanes
CRISPR-Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated protein9
CSE, caffeoyl shikimate esterase
CSI, cellulose synthase interacting
CW, cell wall
DAMs, differentially accumulated metabolites
DEGs, differentially accumulated genes
DFR, dihydroflavonol 4-reductase
DM, dry matter
Dof, DNA-binding with one finger
DRE/CRT, drought responsive element / C-repeat factor
DREB, dehydration responsive element binding
DUF, domain of unknown function
DW, dry weight

EAR, ERF-associated amphiphilic repression
EDTA, éthylène diamine tétra-acétique
Eg, Eucalyptus grandis
EPFL, epidermal patterning factor like protein
eQTL, expression quantitative trait loci
ER, Erecta
ERF, ethylene responsive factor
EtOH, ethanol
ETR, ethylene receptor
EXR, extracted xylem residue
F5H, ferulate 5-hydroxylase
FDR, false discovery rate
FPKM, fragments per kilobase million
FPU, filter paper unit
FRA : fragile fiber
FT, facteur de transcription
G, guaiacyl
GATL, galacturonosyltransferase-like
GAUT, galacturonosyltransferase
gC, gram of carbon
GC-MS, gaz chromatography - mass spectrometry
GFP, green fluorescent protein
GO, gene ontology
GPP, gross primary productivity
GT: glycosyltransferases family
GUS, β -glucuronidase
GUT, glucuronosyltransferase
GUX, glucuronic acid substitution of xylan
GXM, glucuronoxylan methyltransferases
H, p-hydroxyphenyl
HCT, hydroxycinnamoyl transferase
HD-ZIP, homeodomain-leucine zipper
HK, housekeeping genes
IAA, indoleacetic acid
IDH, isocitrate dehydrogenase
IFL, interfascicular fiberless
IPCC, intergovernmental panel on climate change
IRX : irregular xylem
KAN, Kanadi
KNAT, knotted-like homeobox of *Arabidopsis thaliana*
LAC, laccase
LBD, lateral organ boundaries domain
LC-MS, liquid chromatography - mass spectrometry
miARN, micro-ARN
MOL, more lateral growth
MP, Monopteros
MS, mass spectrometry
MSTFA, n-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MYB-R2R3, myeloblastosis-R2R3
NAC, NAM-ATAF-CUC
NST, NAC secondary wall thickening promoting factor
NW, normal wood
Os, Oryza sativa
PAL, phenylalanine ammonia-lyase
Pb, paire de base

PC, principal component
PCA, principal component analysis
PCBER, phenylcoumaran benzylic ether reductase
PER, peroxidase
PHB, Phabulosa
PHV, Phavoluta
PLS-DA, partial least square - discriminant analysis
PP2A, protein phosphatase 2
Pt, *Populus trichocarpa*
PXY, phloem intercalated with xylem
QTL, quantitative trait loci
Q-TOF, quadrupole - time of flight
R.H, relative humidity
RAM, root apical meristem
REV, Revoluta
RFP, red fluorescent protein
RLK, receptor like kinase
RNAseq, RNA sequencing
ROS, reactive oxygen species
RSW : root swelling
RT-qPCR, real time - quantitative polymerase chain reaction
RUL, reduced in lateral growth
RWA, reduced wall acetylation
S, syringyl
SABT, salicyl alcohol O-benzoyltransferase
SAM, shoot apical meristem
SCW, secondary cell wall
SND, secondary wall associated NAC domain protein
SNP, single nucleotide polymorphism
TALE, three amino-acid loop extension
TBL, trichome birefringence like
TDIF, tracheary element differentiation
T-DNA, transfer DNA
TDR, TDIF receptor
TMCS, trimethylchlorosilane
TMS, trimethylsilylated
TW, tension wood
UDP-glucose, uridine diphosphate - glucose
UPLC, ultra performance liquid chromatography
UV, ultra violet
VND, vascular NAC domain
VNI, VND interacting
Vv, *Vitis vinifera*
WES, woody expanded subgroup
WGCNA, weighted gene correlation network analysis
WND, wood associated NAC domain
WOX, wuschel related homeobox
WPS, woody preferential subgroup
WT, wild type
XCP, xylem cystein peptidase
XET, xyloglucan endotransglycosylase
XND, xylem NAC domain
XTH, xyloglucan endotranshydrolase
Zm, *Zea mais*

Résumé

Du fait de sa croissance exceptionnelle combinée aux propriétés supérieures de son bois, l'*Eucalyptus* est devenu le feuillu le plus planté au monde et s'est imposé comme source de biomasse pour la production de papier et de biocarburants de seconde génération. Le bois est composé de parois secondaires lignifiées et sa formation est finement régulée par un réseau complexe, et globalement mal connu, de facteurs de transcription (FT). Les parois secondaires sont composées de 80% de polysaccharides, ciblés pour la plupart des bioproduits à haute valeur ajoutée, tandis que la lignine (20%) est responsable de la récalcitrance de la biomasse à la dégradation enzymatique mais augmente le potentiel énergétique du bois par combustion.

Malgré son adaptabilité remarquable à différents sols et climats, la croissance de l'*Eucalyptus* varie fortement suivant ces facteurs. L'*Eucalyptus* est largement planté sur des sols lessivés dans les régions tropicales et subtropicales où les plantations industrielles font face à des épisodes de sécheresse de plus en plus fréquents, en combinaison avec des forts manques de nutriments, nécessitant de gros apports en fertilisants. Dans les régions tempérées telles que l'Europe du Nord, la principale limitation à l'implantation de cet arbre dépourvu d'endormance, est l'exposition au froid. Ces contraintes abiotiques sont aggravées par le changement climatique et leur impact sur la formation du bois et sa qualité restent peu documentés.

Quelques données suggèrent que ces stress affectent le dépôt de la paroi secondaire ainsi que la structure du xylème. Cependant, ces résultats sont très hétérogènes entre différentes espèces et principalement focalisés sur des tissus différents du bois. La sélection de clones adaptés et le développement de pratiques culturales plus viables, sont essentiels pour améliorer la productivité et la qualité du bois, ce qui requiert une meilleure compréhension de la réponse des arbres au froid et au manque d'eau en interaction avec la nutrition.

Dans le but de décrypter les régulations induites par le froid dans la différenciation du xylème, nous avons effectué une approche ciblée sur des *Eucalyptus* acclimatés au froid. Des analyses de biochimie, d'histochimie et de transcriptomique, ont révélé que le froid déclenche un dépôt de paroi secondaire précoce dans les cellules du xylème en développement, caractérisé par un fort dépôt de lignine. En parallèle, pour caractériser l'effet du manque d'eau combiné à différents régimes nutritifs, sur la formation et la qualité du bois, nous avons tiré profit d'un dispositif expérimental mis en place au champ avec un clone commercial d'*Eucalyptus*, soumis à une exclusion de pluie combinée à une fertilisation au potassium. Nous avons combiné des analyses globales du transcriptome et du métabolome, avec l'analyse des propriétés structurales et biochimiques du bois. L'approche intégrative de ces jeux de données a révélé que la fertilisation au potassium induit une répression de la biosynthèse de la paroi secondaire ainsi qu'une régulation de l'activité cambiale et la modification dans les propriétés du bois, avec une forte interaction avec l'exclusion d'eau.

Ces deux approches ont permis l'identification de différents FT non caractérisés qui constituent des candidats prometteurs dans le contrôle de l'activité cambiale et du dépôt de paroi secondaire chez un ligneux. Leur caractérisation fonctionnelle chez le peuplier et l'*Eucalyptus* a révélé un nouveau régulateur clé de la biosynthèse de paroi secondaire, et plusieurs facteurs MYB potentiellement impliqués dans la balance entre formation de la paroi secondaire et croissance.

Abstract

Due to its outstanding growth combined to superior wood properties, *Eucalyptus* genus has become the most planted hardwood on earth and emerged as the most appealing sources of renewable biomass feedstock for paper and second-generation biofuels. Wood is composed of lignified secondary cell walls (SCWs) and its formation is tightly regulated by a complex, partially unknown, transcription factors (TFs) network. SCWs are composed by 80% of polysaccharides targeted for most of value-added bioproducts, whereas lignin (20%) is responsible for biomass recalcitrance to enzymatic degradation but increase wood energetic potential for combustion.

Despite its remarkable adaptability to various soils and climate environment *Eucalyptus* growth varies strongly according to these factors. *Eucalyptus* is extensively grown in highly weathered soils in tropical and subtropical regions where plantations are facing more frequent drought episodes in combination to nutrient starvation, requiring high amounts of expensive fertilizers. In temperate regions such as North of Europe, the main limitation for the expansion of this non-dormant tree is cold exposure, which reduces dramatically its growth. The effects of these stresses are emphasized in the actual context of climate change which induces sharp contrasting periods, and their impacts on wood formation and quality remain unknown. Scarce data from literature suggest that these stresses affect secondary cell wall (SCW) deposition as well as xylem cell patterning. However these results are highly heterogeneous among different species and mainly focused on non-woody tissues. The selection of adapted clones and the development of more sustainable cultural practices are crucial to improve wood productivity and quality, which require a better understanding of tree response to cold and water stress in interaction with nutrition.

In order to unravel the regulation of xylem differentiation by low temperature, we performed a targeted approach on cold-acclimated *Eucalyptus* trees. By biochemical, histochemical and transcriptomic analyses, we revealed that low temperature trigger a precocious SCW deposition in developing xylem cells, characterized by a strong lignin deposition. In parallel, we aimed to characterize the effect of water stress combined to different mineral nutrition regimes, on wood formation and quality. To this end, we took advantage of an experimental design set up on field with a highly productive *Eucalyptus* commercial clone submitted to both rainfall exclusion combined to potassium fertilization. We combined large scale analyses of transcriptome and metabolome, with wood structural and biochemical properties analyses. The integrative approach with these datasets revealed that potassium fertilization induces a repression of SCW biosynthesis, together with regulation of cambial activity and modifications in wood properties, with a strong interaction with water exclusion.

Both approaches allowed to point out several uncharacterized yet TFs which are highly promising candidates in the control of cambial activity and SCW deposition in a woody perennial. Characterization of their function in poplar and *Eucalyptus* revealed a new key regulator of SCW biosynthesis in wood, and several MYB TFs potentially involved in the trade-off between SCW biosynthesis and growth.

Table des matières

Introduction générale.....	1
Introduction générale.....	3
1. Le système vasculaire.....	5
1.1. Formation du système vasculaire lors de la croissance primaire	6
1.2. La croissance secondaire.....	8
1.2.1. Le phloème secondaire	10
1.2.2. Le xylème secondaire ou bois	11
2. Les mécanismes moléculaires assurant la formation du bois.....	12
2.1. Les différents modèles pour l'étude de la formation du bois.....	12
2.1.1. Les cultures cellulaires de <i>Zinnia</i> et <i>Arabidopsis</i>	12
2.1.2. Les plantes herbacées	13
2.1.3. Les plantes pérennes.....	14
2.2. Le processus de formation du bois.....	14
2.2.1. Différenciation à partir du cambium, expansion et dépôt de la paroi primaire	15
2.2.2. Formation de la paroi secondaire	16
2.2.2.1. Biosynthèse des polysaccharides	19
2.2.2.2. Biosynthèse et polymérisation de la lignine	24
2.2.3. Mort programmée et formation du bois de cœur	27
3. Régulation de la formation du bois.....	28
3.1. Régulation de l'activité cambiale et de la différenciation des cellules du xylème.....	28
3.2. Régulation transcriptionnelle de la formation de la paroi secondaire	32
3.2.1. Les facteurs de transcription de type MYB et NAC sont des régulateurs clés	32
3.2.2. Le réseau de FT tel qu'il est connu chez la plante modèle <i>Arabidopsis</i>	33
3.2.3. Conservation du réseau de régulation du dépôt de paroi chez les espèces pérennes.....	39
4. Plasticité de la formation du bois dans l'adaptation aux contraintes environnementales.....	40
4.1. Quelles contraintes environnementales ?	40
4.2. Impact de ces stress sur la formation du bois.....	42
4.3. Cas du bois de réaction	43
5. L'étude de la formation du bois chez l' <i>Eucalyptus</i> est un enjeu stratégique.....	44
5.1. L' <i>Eucalyptus</i> est le feuillu le plus planté au monde	44
5.2. Différents outils pour l'amélioration génétique sont disponibles	46
6. Hypothèses et objectifs de la thèse	47

6.1. Analyse des réseaux de régulation impliqués dans le contrôle de la formation du bois en conditions de stress abiotiques.....	48
6.1.1. Caractérisation de l'effet du froid sur la formation du bois chez <i>E. gundal</i>	48
6.1.2. Caractérisation de l'effet de la sécheresse combinée à différents régimes nutritifs sur la formation du bois chez <i>E. grandis</i>	49
6.2. Caractérisation fonctionnelle de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la formation du bois en condition de stress abiotiques.....	50
7. Références	51

CHAPITRE I : Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus* 67

Abstract	69
Résumé.....	70
Préambule	71
1. Introduction.....	72
2. Materials and Methods	74
2.1. Plant material and cold treatment	74
2.2. RNA isolation	75
2.3. Quantitative RT-PCR	75
2.4. Biochemical analyses of SCWs.....	76
2.5. Microscopy and histochemistry	76
2.6. Co-expression network analyses	77
3. Results	77
3.1. Analyses of xylem structure in plants submitted to low temperatures.....	77
3.2. Effects of cold on lignin content in differentiating xylem	79
3.3. Transcriptional regulation of genes related to SCW biosynthesis	82
3.4. Xylem SCW transcriptional regulators induced by cold	85
4. Discussion	92
5. Acknowledgements:	95
6. References	96
7. Supplementary data	99

CHAPITRE II : Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in *Eucalyptus grandis* xylem105

Abstract	107
Résumé	108
Préambule	109
1. Introduction.....	110
2. Materials and Methods	113
2.1. Plant material and sampling.....	113
2.2. Ecophysiological data	114
2.3. RNA isolation	114
2.4. RNA sequencing.....	115
2.5. Validation by quantitative RT-PCR	115
2.6. Metabolite extraction and LC-MS analysis.....	115
2.7. Metabolite extraction and GC-MS analysis.....	117
2.8. Biochemical analyses of SCW	118
2.9. Microscopy and histochemistry	119
2.10. Statistical analyses and data integration.....	120
2.11. Sequence isolation and cloning.....	121
2.12. Plant transformation and sampling.....	121
2.13. GUS assay	121
3. Results	121
3.1. Gene expression are regulated by K supply and water availability in xylem	121
3.2. Soluble metabolites are regulated by K supply and water availability in xylem	125
3.3. Transcriptomic and metabolomic data integration through correlation network analyses.....	126
3.4. Correlation between wood properties and network modules	130
3.5. Identification of TFs related to wood formation in response to water exclusion and potassium fertilization.....	134
3.6. Characterization of <i>EgMYB137</i> as a key player in xylem formation in <i>Eucalyptus</i>	136
4. Discussion	138
4.1. H ₂ O availability and K fertilization trigger interconnected regulations in xylem	138
4.2. SCW formation is at the heart of xylem response to water and nutrition	140
4.3. Key regulatory genes and metabolite markers of SCW biosynthesis highlighted by co-regulation network.....	143
5. References.....	146
6. Supplemental data	152

CHAPITRE III : Caractérisation fonctionnelle de quatre nouveaux facteurs MYBs potentiellement impliqués dans la régulation de la xylogénèse chez l'*Eucalyptus*.....161

Abstract	163
Résumé	164
Préambule	165
1. Introduction.....	166
2. Matériel et méthodes.....	174
2.1. Analyse phylogénétique	174
2.2. Isolement des séquences et clonage.....	174
2.3. Transformation des plantes	175
2.4. Extraction des ARN et analyses d'expression par RT-PCR quantitative	176
2.5. Analyses biochimiques de la paroi	177
2.6. Analyses GUS.....	178
2.7. Microscopie et histochimie	178
3. Caractérisation fonctionnelle d' <i>EgMYB36</i> , membre du sous-groupe 5 « Woody-Expanded »	179
3.1. Résultats - <i>EgMYB36</i>	179
3.1.1. <i>EgMYB36</i> est membre du sous-groupe 5.....	179
3.1.2. La surexpression d' <i>EgMYB36</i> augmente faiblement la teneur en lignine des tiges des peupliers	182
3.1.3. La surexpression d' <i>EgMYB36</i> chez le peuplier modifie l'expression des gènes de biosynthèse des parois et des métabolites secondaires.....	183
3.1.4. Régulation des gènes impliqués dans le contrôle du développement du xylème et du dépôt de paroi dans les peupliers 35S: <i>EgMYB36</i>	186
3.2. Discussion - <i>EgMYB36</i>	189
4. Caractérisation fonctionnelle de trois R2R3-MYBs, membres des sous-groupes « Woody- Preferential » WPS-II et WPS-III	191
4.1. Résultats - <i>EgMYB20</i>	191
4.1.1. <i>EgMYB20</i> est un membre du sous-groupe WPS-III	191
4.1.2. La surexpression d' <i>EgMYB20</i> chez le peuplier induit une réduction de croissance et une augmentation de la teneur en lignine	193
4.1.3. La surexpression d' <i>EgMYB20</i> induit une forte réduction du niveau des transcrits codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides pariétaux.	194
4.1.4. Effets de la surexpression d' <i>EgMYB20</i> sur les gènes régulateurs contrôlant le développement du xylème et le dépôt de paroi secondaire	197
4.2. Discussion - <i>EgMYB20</i>	200

4.3.	Résultats - <i>EgMYB64/EgMYB68</i>	202
4.3.1.	<i>EgMYB64 et EgMYB68</i> d' <i>Eucalyptus</i> appartiennent au sous-groupe WPS-II.....	202
4.3.2.	<i>EgMYB64 et EgMYB68</i> ont des profils d'expression distincts.....	204
4.3.3.	Chez le peuplier, la surexpression d' <i>EgMYB68</i> affecte la formation du bois tandis qu'aucun phénotype n'est détecté pour la surexpression d' <i>EgMYB64</i>	206
4.3.4.	La surexpression d' <i>EgMYB68</i> induit une augmentation des transcrits des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire chez le peuplier	210
4.3.5.	La surexpression d' <i>EgMYB64</i> induit des modifications dans la composition des racines d' <i>E. grandis</i>	211
4.4.	Discussion - <i>EgMYB68</i>	214
4.5.	Discussion - <i>EgMYB64</i>	216
5.	Discussion - Chapitre III	217
6.	Références.....	220
7.	Données supplémentaires.....	226

Discussion générale231

1.	Les stress régulent-ils directement la formation de la paroi secondaire ?	233
2.	Qu'apportent les approches d'intégration de données ?	236
3.	Pourquoi la caractérisation de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la formation du bois en réponse au stress est un défi ?	237
4.	Références.....	241

Introduction générale

Introduction générale

Pour les autotrophes photosynthétiques, l'évolution d'un état uni- à pluri-cellulaire a constitué un avantage sélectif majeur. Cela a permis la spécialisation fonctionnelle de tissus ou d'organes, leur conférant un avantage dans la compétition pour l'accès aux ressources essentielles dans une variété d'environnements. Le passage de la vie aquatique à l'environnement terrestre, a nécessité l'évolution d'organes positionnés à la fois hors du sol pour capter la lumière indispensable à la photosynthèse, et en sous sol pour assurer l'approvisionnement en eau et ressources minérales. Contrairement aux organismes unicellulaires capables de puiser les nutriments directement du milieu environnant, à travers les membranes plasmiques, ces organismes pluricellulaires ont rapidement été confrontés au problème de l'acheminement des nutriments au sein de l'organisme. En effet, positionner un organe hors du sol, le rend adéquat pour la photosynthèse et les échanges avec l'atmosphère, mais l'éloigne des ressources essentielles telles que l'eau et les minéraux. De même, positionner un organe en sous-sol, empêche une activité photosynthétique, le rendant hétérotrophe et donc dépendant des photoassimilats des parties aériennes. Dans cette situation, les parties aériennes et en sous sol, sont devenues interdépendantes sur le plan nutritionnel, donnant lieu à une intense pression de sélection pour l'évolution d'un système de transport entre organes. Ainsi, il y a environ 430 millions d'années, les premières plantes terrestres ont commencé à élaborer un tissu positionné à travers l'ensemble des organes, qui a rapidement évolué en un système adapté pour le transport sur des longues distances d'eau et de nutriments (Lucas et al., 2013). Ce tissu spécifique sera appelé plus tard le système vasculaire. Cet évènement ici résumé en quelques lignes, a été une étape essentielle pour la colonisation de l'environnement terrestre par les végétaux et l'apparition de ce qui deviendra le type de plante le plus abondant sur Terre : les trachéophytes ou plantes vasculaires. À l'origine, le développement du système vasculaire, a nécessité la formation de faisceaux constitués de nouveaux types de cellules, arrangées bout à bout pour former des conduits équipés de paroi plus épaisses et adaptés à la conduction de l'eau contenant les nutriments. Il est estimé que la lignification est apparue au Dévonien inférieur (-409 à -386 Ma). Cette capacité à synthétiser de la lignine incorporée dans les parois des cellules conductrices, a permis d'optimiser le système vasculaire et de le rendre plus résistant à la pression de l'eau transportée. Les plantes ont également tiré parti de cette structure rigide pour s'ériger et collecter la lumière favorisant la photosynthèse. Le système vasculaire ne devait alors plus servir uniquement de système conducteur, mais aussi de renfort mécanique pour le reste des

organes. Cette double fonctionnalisation a ensuite été suivie de l'émergence d'un cambium vasculaire au Dévonien moyen (-386 à -377 Ma), permettant la croissance en épaisseur des organes. La croissance secondaire a alors conduit à l'optimisation des fonctions de conduction et de renfort mécanique, à travers la formation d'un système vasculaire secondaire.

Le bois, produit par les arbres, représente le meilleur exemple de développement d'un système vasculaire secondaire chez les trachéophytes. En effet, en tant que plantes pérennes, les arbres peuvent poursuivre le développement du système vasculaire au niveau du tronc, pendant des centaines d'années. Cela donne lieu à l'accumulation d'une quantité considérable de molécules carbonées, fixées sous forme de biopolymères ligno-cellulosiques dans les parois des cellules qui constituent le bois. La cellulose, qui représente le biopolymère le plus abondant sur Terre, est en majeure partie accumulée dans le bois.

Pour l'Homme, le bois a joué un rôle essentiel dans l'amélioration de sa condition. Il a depuis toujours été une source d'énergie par combustion, mais également un matériau pour la construction. Dans un contexte où la population mondiale est en forte augmentation, le bois est une ressource convoitée et représente un enjeu économique majeur. De plus, sa formation à partir de la fixation du carbone atmosphérique par la photosynthèse, en fait à la fois un puits de carbone essentiel dans la lutte contre le réchauffement climatique et une ressource inépuisable d'énergie renouvelable. Le développement de méthodes de bioraffinerie sont notamment à l'étude pour la production de biocarburants de seconde génération à partir de bois. La très forte demande encourage donc à l'amélioration des rendements de production de bois, mais également à une amélioration de ses propriétés.

Parmi les stratégies mises en place, des programmes de sélection visent à améliorer les traits qualitatifs et quantitatifs de certains génotypes de l'*Eucalyptus*, qui est le feuillu le plus planté au monde. L'amélioration génétique par les biotechnologies vertes, représente également une voie adoptée par certaines entreprises pour l'optimisation des propriétés de la biomasse. Dans leur ensemble, ces approches nécessitent une connaissance accrue des processus moléculaires de formation du bois. Les premières études se sont concentrées sur la recherche des gènes structuraux, impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage des composants de la paroi. La manipulation génétique de ces gènes a révélé qu'il est possible de moduler les propriétés de la paroi en altérant leur profil d'expression. Cependant il est rapidement devenu évident que les approches ciblant un seul gène, ne sont pas suffisantes pour moduler certaines propriétés générales du bois, dont la formation implique des milliers de gènes. Contrôler l'expression de gènes clés assurant la régulation de ces gènes structuraux, tels que des facteurs de transcription, est alors apparue comme une alternative. Les travaux les

plus récents ont conduit à l'identification d'un grand nombre de facteurs de transcription capables de réguler le dépôt de paroi.

Si les processus biologiques impliqués dans la formation du bois sont déjà largement documentés, leur réponse aux contraintes environnementales reste peu étudiée. Dans le contexte actuel de bouleversement climatique, les stratégies visant à optimiser les rendements de production se doivent d'intégrer les effets des contraintes environnementales. Par conséquent, une meilleure connaissance des voies de régulation de la formation du bois en conditions de stress abiotiques, apparaît comme un enjeu stratégique.

1. Le système vasculaire

Les plantes terrestres sont dotées d'un système vasculaire très organisé, qui est constitué de trois tissus principaux : le xylème, le (pro)cambium méristématique et le phloème (Lucas et al., 2013). Dans ce système parfaitement structuré, le xylème et le phloème agissent en tant que conduits spécialisés, et ont pour rôle de délivrer les ressources à chaque organe. Le xylème est en charge de transporter l'eau et les nutriments solubles puisés dans le sol, vers les parties aériennes (**Figure 1**). Dans la direction opposée, le phloème achemine les photoassimilats tels que des sucres et acides aminés, des feuilles vers tous les organes de la plante, y compris la tige et le système racinaire.

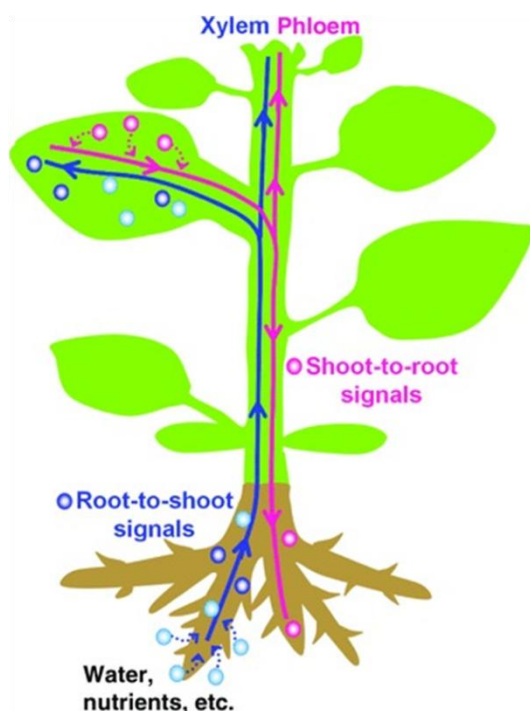


Figure 1: Représentation schématique de la fonction du système vasculaire chez les trachéophytes. Le xylème est représenté en bleu, les molécules qu'il transporte en bleu foncé et clair (eau, nutriments, molécules signaux), le phloème en rouge et les molécules qu'il transporte en rouge (photoassimilats, molécules de signalisation). Adapté de Lucas et al., 2013.

Le xylème et le phloème sont des tissus complexes composés, de façon similaire, d'un ensemble d'éléments conducteurs de sève connectés à des cellules compagnes, de fibres non

conductrices ainsi que de cellules parenchymateuses. Étant donné leur distribution spatiale, le phloème et le xylème, constituent également un système de communication à longue distance efficace, qui intègre des informations reliées aux stress abiotiques et biotiques, des parties aériennes et racinaires. Par ce transport de messagers moléculaires tels que certaines hormones, ils jouent un rôle majeur dans la coordination du développement et des réponses aux contraintes environnementales.

1.1. Formation du système vasculaire lors de la croissance primaire

De manière générale, la croissance des plantes est assurée par des zones spécifiques qui sont le siège des divisions cellulaires, les méristèmes. Ces zones comportent des cellules souches qui s'auto-entretiennent et se divisent pour donner des cellules filles qui, à leur tour, se différencient pour donner au moins un type cellulaire (Laux, 2003; Baucher et al., 2007).

Dès le stade embryonnaire, le méristème apical caulinaire (SAM, Shoot Apical Meristem), le méristème apical racinaire (RAM, Root Apical Meristem), ainsi qu'un réseau de cellules procambiales, sont mises en place. Durant le stade post-embryonnaire, la croissance indéterminée résultant des méristèmes primaires SAM et RAM, permet le déploiement des organes aériens et souterrains de la plante. Cette croissance primaire, classiquement illustrée par l'allongement de la tige et des racines, nécessite la mise en place du système vasculaire de façon simultanée. Cette tâche est assurée par les cellules procambiales, préexistantes ou formées à partir des méristèmes primaires, qui vont produire le xylème et le phloème primaires. Les initiales du procambium subissent deux types de divisions : les divisions périclines qui se produisent parallèlement à l'axe d'élongation produisant les cellules du xylème et du phloème, et les divisions anticlines qui se produisent selon l'axe d'élongation perpétuant le tissu procambial pendant l'allongement rapide des organes en croissance tels que la tige ou les racines jeunes (De Rybel et al., 2015).

Généralement, le procambium produit le xylème primaire de façon centripète, et le phloème primaire de façon centrifuge (**Figure 2**). De sorte que pour la tige et les racines, la structure la plus commune est, de l'extérieur vers l'intérieur : le phloème, le procambium et le xylème. Dans la tige, cela entraîne la formation de faisceaux vasculaires séparés par des cellules du parenchyme interfasciculaire, tandis que les racines ont une structure plus complexe.

Ainsi, durant cette première phase de croissance, les méristèmes primaires produisent les nouvelles assises cellulaires nécessaires à la croissance apicale de la plante. Pour un grand nombre de plantes vasculaires, à l'exception des monocotylédones, cette phase est suivie d'une croissance dite secondaire, qui va permettre une croissance radiale des racines et des tiges les plus anciennes.

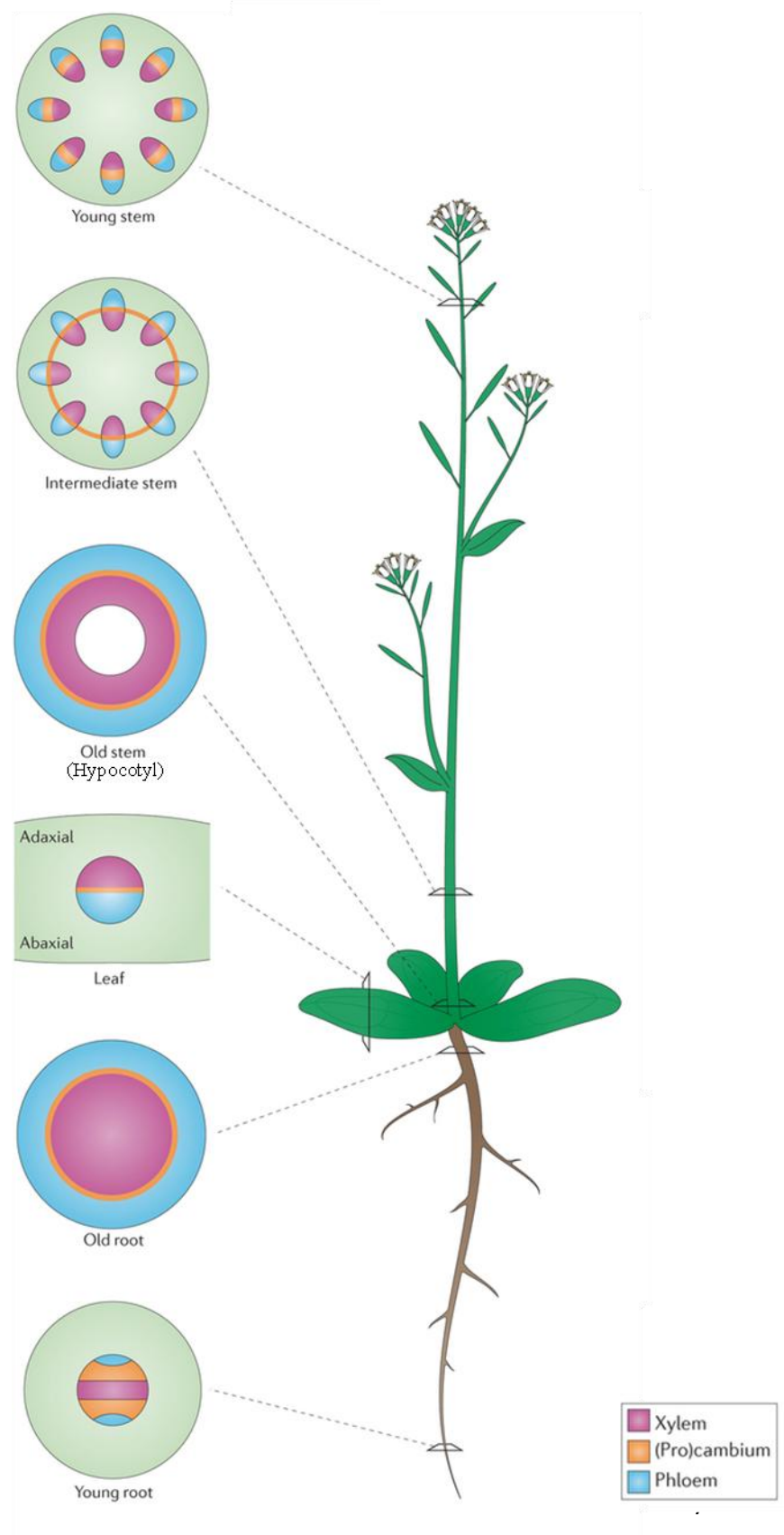


Figure 2: Représentation schématique de l'organisation des tissus vasculaires dans la tige, les feuilles et les racines d'*Arabidopsis*. Le xylème est représenté en rouge, le phloème en bleu, le procambium et cambium en orange. Adapté de De Rybel et al., 2015.

1.2. La croissance secondaire

Chez certaines plantes, cette croissance en épaisseur se produit uniquement dans une région restreinte, à l'image d'*Arabidopsis* où la croissance secondaire ne se produit que dans l'hypocotyle (**Figure 2**), alors que dans la tige des gymnospermes et de nombreuses dicotylédones, elle donne lieu à la formation du bois (**Figure 3a**). La croissance secondaire est assurée par une population de cellules pluripotentes spécialisées qui forment un méristème latéral, nommé cambium vasculaire (**Figure 3b**).

Lors de la transition de la croissance primaire vers la croissance secondaire, le cambium vasculaire de la tige, tire son origine à la fois du procambium et des cellules du parenchyme interfasciculaire. Dans ce processus, le procambium donne naissance au cambium fasciculaire, au niveau des faisceaux vasculaires. En parallèle, une dédifférenciation des cellules du parenchyme interfasciculaire, mène à la formation du cambium interfasciculaire, qui se trouve entre les faisceaux vasculaires. La jonction de ces deux populations de cellules cambiales, constitue le cambium vasculaire, qui forme alors un anneau uniforme dans la tige (**Figure 3b**). Un processus similaire se produit dans les racines. Dans ce cas, le cambium interfasciculaire dérive des cellules du péricycle (Carlsbecker and Helariutta, 2005).

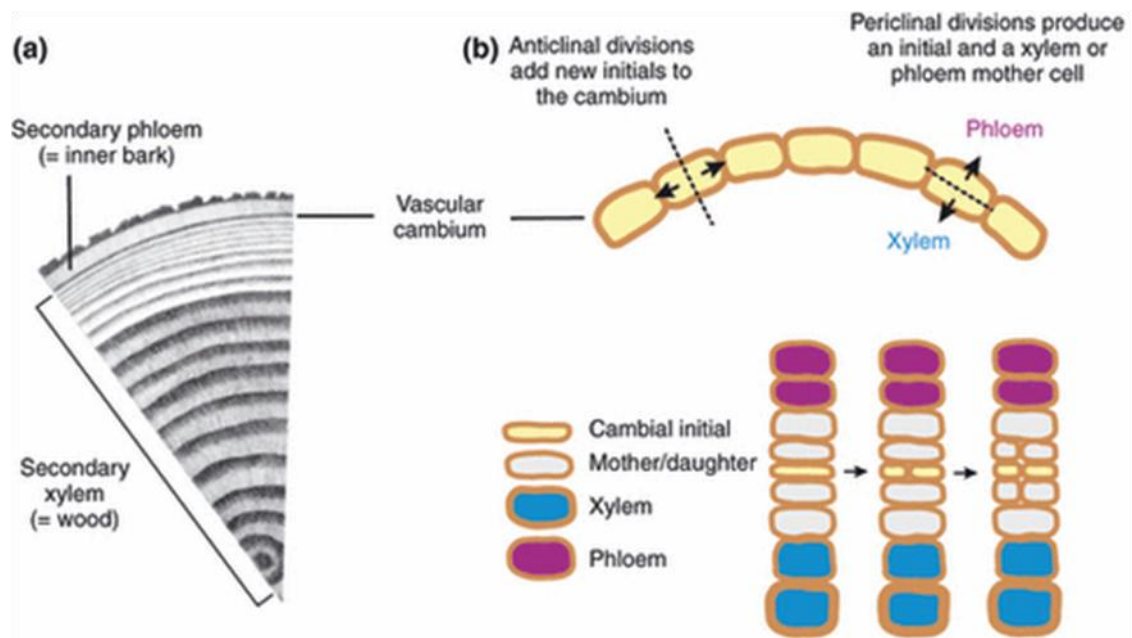


Figure 3: Schémas de la formation des tissus vasculaires secondaires. a) Organisation des tissus vasculaires secondaires. b) Schématisation des différents types de division du cambium impliqués dans la production du xylème et du phloème secondaires. Le xylème est représenté en bleu, le phloème en violet, le cambium en orange et les cellules mères en gris. Les flèches symbolisent le sens de division. Adapté de Spicer and Groover, 2010.

Le cambium vasculaire est composé d'une seule couche de deux types de cellules méristématiques : les initiales fusiformes et les initiales radiales, qui diffèrent par leur taille et leur forme (Esau, 1965; Déjardin et al., 2010). Les initiales fusiformes, présentent une forme allongée, sont orientées verticalement et ont une section transversale de forme plus ou moins circulaire, tandis que les initiales radiales sont peu allongées, orientées horizontalement et ont une section de forme rectangulaire. La subdivision de la zone cambiale en cellules initiales et cellules mères, est principalement conceptuelle car il est difficile de distinguer les deux types de cellules.

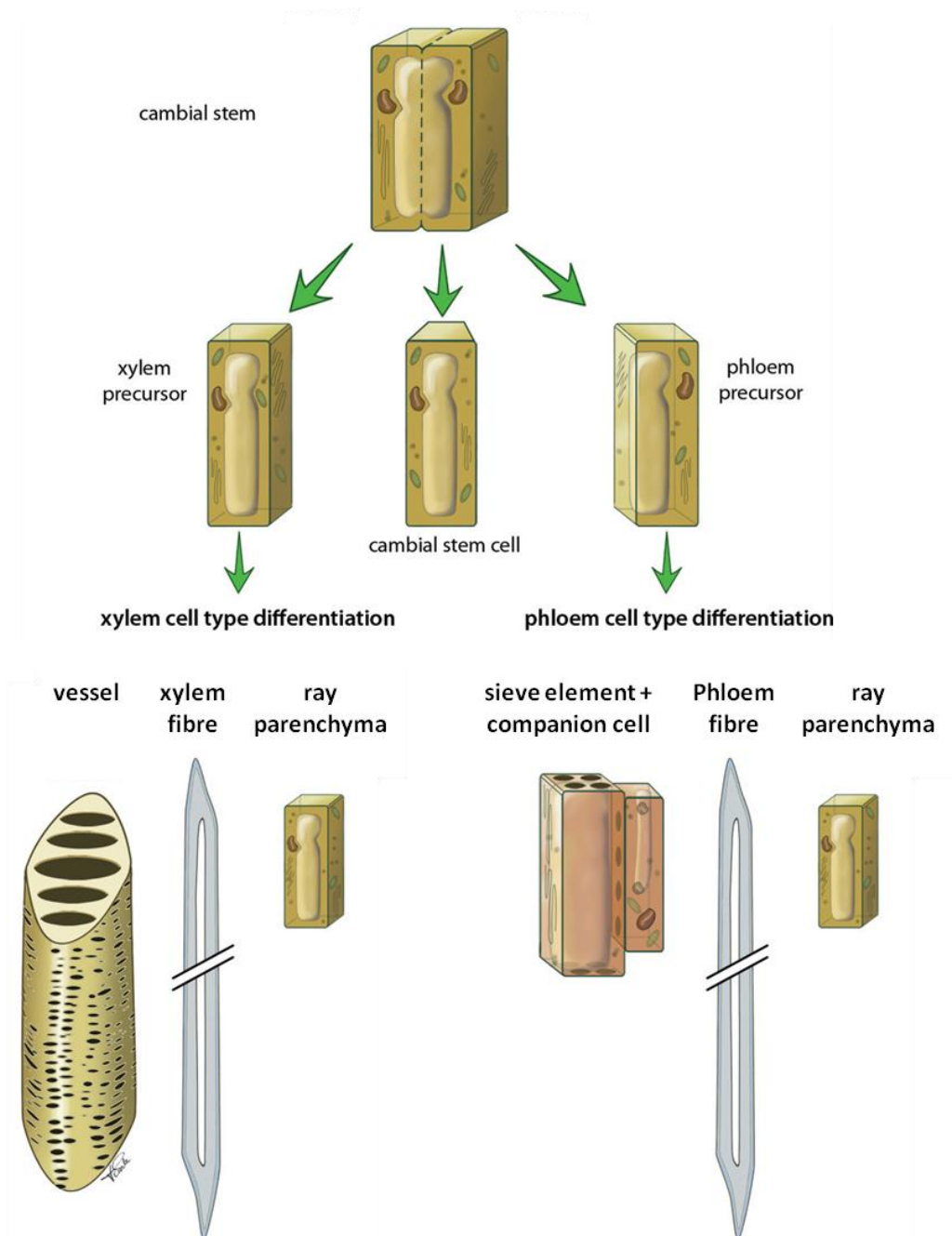


Figure 4: Différenciation des cellules du xylème et phloème secondaires. Adapté de Schuetz et al., 2013.

Durant la prolifération du cambium vasculaire, les divisions périclines asymétriques des initiales produisent des cellules mères qui sont à l'origine de la production de cellules du xylème (vers l'intérieur de la tige) et du phloème (vers l'extérieur de la tige) (**Figure 3b**). Ces divisions périclines sont dites asymétriques car elles sont plus nombreuses du côté du xylème (intérieur de la tige), que du côté du phloème. Ce qui produit une croissance radiale rapide du xylème et une augmentation de la circonférence de la tige. Les divisions anticlines des initiales du cambium produisent de nouvelles initiales qui permettent le maintien de la continuité du cambium au cours de l'élargissement de la tige. Une autre particularité du cambium, est que plusieurs types cellulaires peuvent résulter de la division des deux types d'initiales. En effet, la division péricline des initiales fusiformes va donner naissance principalement aux cellules conductrices, aux fibres, ainsi qu'aux cellules du parenchyme axial du xylème et du phloème, alors que la division péricline des initiales radiales va produire les cellules du parenchyme radial (**Figure 4**). Les deux tissus mis en place, le phloème et le xylème, ont une structure similaire et sont constitués de trois types cellulaires : les cellules conductrices, les fibres et les cellules du parenchyme (Spicer and Groover, 2010).

1.2.1. Le phloème secondaire

Les initiales du cambium sont la source des précurseurs des cellules du phloème secondaire, qui se différencient en différents types cellulaires. Le phloème mature est constitué de tubes criblés, de cellules compagnes, et dans beaucoup de cas, de fibres du phloème (**Figure 5**). Les tubes criblés, ou éléments conducteurs de sève, constituent le tissu conducteur du phloème (Esau, 1965). Ils ont pour fonction de transporter les métabolites solubilisés dans la sève élaborée, des organes sources tels que les feuilles, aux organes puits, tels que les racines et la tige. Lors de leur différenciation, les tubes criblés subissent des changements drastiques dans leur morphologie puisque la majorité de leurs organites, y compris le noyau, sont dégradés. Cependant, ils conservent une membrane plasmique et un nombre suffisant d'organites pour être maintenus vivants. Les tubes criblés sont couplés au cytoplasme des cellules compagnes, qui contribuent largement au maintien de leur activité physiologique, et qui jouent également un rôle dans le transport de la sève élaborée. La dégradation des organites et la formation de pores dans la paroi des tubes criblés, participent à l'optimisation du transport de la sève élaborée à travers ces conduits (Lucas et al., 1993).

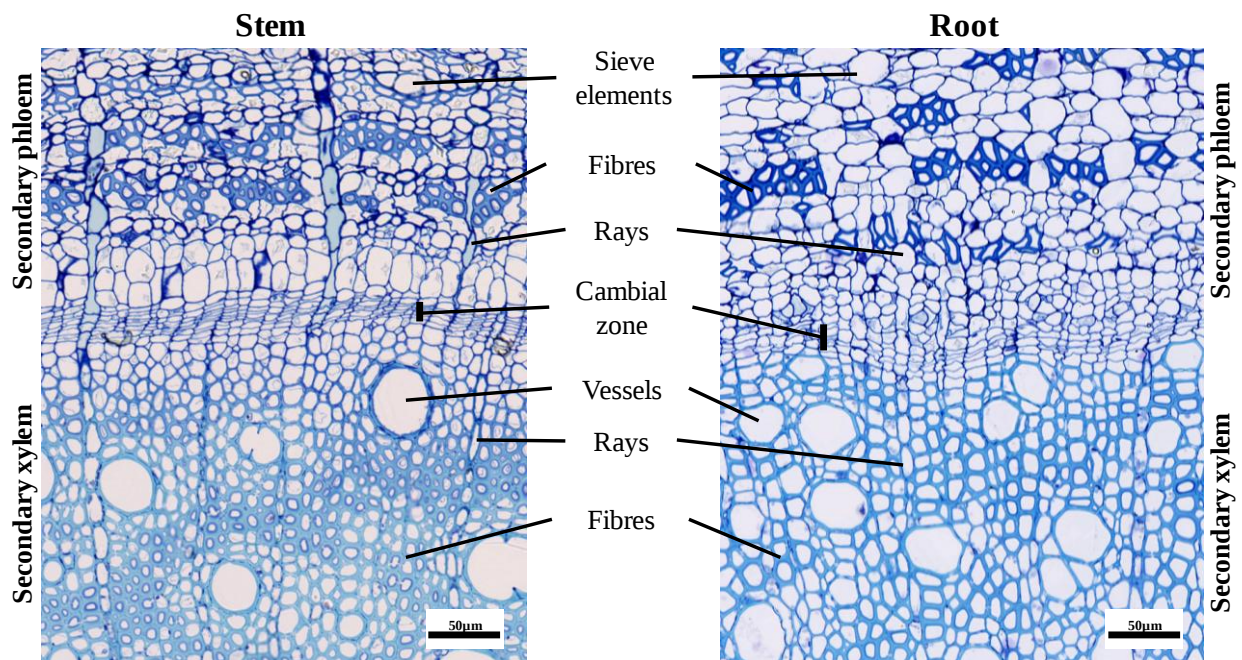


Figure 5: Anatomie de la tige et de la racine d'*Eucalyptus*. Sections transversales de tige d'*E. gundal* (~1 an) et racine d'*E. grandis* (~6 mois)

Le phloème contient également des cellules parenchymateuses qui vont avoir pour rôles principaux de favoriser les échanges entre types cellulaires et l'accumulation de réserves nutritives pour la plante. Pour beaucoup d'espèces, on note la présence de fibres à la paroi épaisse (**Figure 5**). Ces fibres assurent un renfort mécanique du phloème secondaire, et disposent pour cela d'une épaisse paroi secondaire, le plus souvent lignifiée (Esau, 1965).

1.2.2. Le xylème secondaire ou bois

Le bois, ou xylème secondaire, est un tissu tridimensionnel complexe composé de trois types cellulaires principaux, qui présentent tous une paroi secondaire lignifiée : les éléments trachéaires, les fibres et les cellules du parenchyme (**Figure 5**) (Růžicka et al., 2015). La partie essentielle du xylème mature est composée des cellules conductrices ou éléments trachéaires. Les éléments trachéaires regroupent les trachéides et les vaisseaux, qui ont tous deux pour rôle de conduire la sève brute montante, mais dont la paroi apporte également un soutien mécanique à la tige. Les trachéides matures sont des cellules sclérifiées, vidées de leur contenu, et possèdent une paroi épaisse ponctuée. Ce sont de longues cellules étroites ayant une structure tubulaire et une extrémité en biseau. Elles sont arrangées bout à bout pour former des capillaires à l'intérieur de la tige. Les vaisseaux sont les éléments conducteurs les plus évolués, et sont plus communs que les trachéides apparus plus tôt dans l'évolution (Růžicka et al., 2015). Les vaisseaux sont de longues structures tubulaires, constituées de très

larges cellules à la forme cylindrique et agencées bout à bout. À la jointure entre les extrémités en biseau des éléments de vaisseaux, se trouvent des perforations qui permettent le flux d'eau. Ces vaisseaux sont généralement plus larges et moins longs que les trachéïdes.

En plus de ces éléments conducteurs, le xylème secondaire contient des fibres sclérifiées (**Figure 5**). Ces cellules ont pour rôle de fournir un support mécanique à la croissance du système vasculaire et des parties aériennes, et composent ainsi la majeure partie du tronc. Pour assurer cette fonction, elles disposent d'une forme très allongée et d'une épaisse paroi secondaire lignifiée.

Le xylème secondaire est aussi composé de parenchyme, qui peut être axial ou vertical (**Figure 5**). Contrairement aux fibres et vaisseaux, ces cellules parenchymateuses vont rester physiologiquement actives pendant une longue durée lors du processus de maturation du xylème secondaire. Les cellules du parenchyme radial, ou rayons, assurent essentiellement le stockage des réserves ainsi que la distribution des photoassimilats vers le xylème en développement. Leur implication dans le processus de lignification des éléments conducteurs et des fibres, en fait également des acteurs indispensables pour la xylogénèse. Il a été montré, par exemple, que les rayons peuvent rester physiologiquement actifs pendant des décennies, et participer à la formation du bois de cœur.

2. Les mécanismes moléculaires assurant la formation du bois.

La découverte d'une partie des acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la formation du bois, a été rendue possible par l'utilisation de plantes modèles non pérennes telles que *Zinnia elegans* et *Arabidopsis thaliana*, en combinaison avec des études menées sur des plantes pérennes telles que *Populus trichocarpa* et *Eucalyptus grandis*. Si l'utilisation de plantes produisant du bois, peut paraître indispensable pour l'étude de la formation du xylème pendant la croissance secondaire, des modèles d'études tels qu'*Arabidopsis* et *Zinnia*, ont permis l'approfondissement des connaissances dans les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du xylème. En effet, bien que la morphologie de ce tissu varie très fortement entre plantes, un nombre croissant d'études tendent à montrer que la vaste majorité des processus biochimiques, métaboliques, cellulaires et développementaux impliqués dans la mise en place du xylème, sont conservés dans le règne végétal (Zhang et al., 2014).

2.1. Les différents modèles pour l'étude de la formation du bois

2.1.1. Les cultures cellulaires de *Zinnia* et *Arabidopsis*

Du fait de la position du xylème, à l'intérieur des organes de la plante, il est difficile d'en étudier les mécanismes de développement au niveau cellulaire et moléculaire. Pour

surmonter cette difficulté, différents systèmes de cultures cellulaires ont été mis au point (Fukuda, 2016).

Le système le plus ancien, mis au point en 1980 par Fukuda et al., est la culture xylogénique de cellules de mésophylle de feuilles de *Zinnia*, capables de se différencier en éléments conducteurs en présence d'auxine et de cytokinines (Fukuda and Komamine, 1980). Dans ces conditions, les observations sur cellules isolées, ont révélé que les cellules de mésophylle se trans-différencient en éléments trachéaires sans qu'il y ait de division de celles-ci. Les nombreuses analyses transcriptomiques effectuées sur ces cultures, ont permis de mettre au jour certains facteurs clés qui régulent la différenciation du xylème, tel que TDIF (Ito et al., 2006).

Dans le but de tirer parti des ressources génomiques disponibles pour *Arabidopsis* (génomé séquencé, banques de mutants, annotation du génome), différents types de cultures de cellules isolées d'*Arabidopsis* ont également été générées. Par exemple, des analyses transcriptomiques sur des cellules en cours de différenciation en éléments conducteurs, suite à l'ajout de brassinostéroïdes, a conduit à la découverte des deux facteurs de transcription clés *AtVND6* et *AtVND7* (Kubo et al., 2005).

2.1.2. Les plantes herbacées

Ces approches conduites *in vitro* sur des cellules isolées ont considérablement contribué à élucider les processus impliqués dans la formation du xylème. Cependant, la complexité du xylème secondaire n'a pas permis à la communauté de s'affranchir d'approches conduites sur plantes entières. Bien que le xylème produit par *Arabidopsis* n'ait pas une structure strictement identique à celui produit par les arbres (absence de rayons par exemple), la disponibilité du génome et de banques de mutants en ont fait un excellent modèle pour l'étude de la xylogenèse (Zhang et al., 2011). En effet, dans les conditions de culture adéquates, l'hypocotyle peut avoir une croissance en largeur, et produire du xylème secondaire. Des approches de génétique inverse et de biotechnologie, ont permis l'identification d'un grand nombre de régulateurs de la formation du xylème (passés en revue par Zhang et al., 2011). Il a été démontré que certains des orthologues de ces gènes ont une fonction similaire chez les ligneux, renforçant l'hypothèse d'une conservation de ces voies de régulation entre herbacées et espèces pérennes.

Comme pour beaucoup de mécanismes, *Arabidopsis* est le modèle le plus avancé concernant l'étude de la formation du xylème. Cependant, sa croissance secondaire est très

réduite par rapport aux arbres, ce qui rend impossible la caractérisation moléculaire et biochimique des processus impliqués dans la formation du bois.

2.1.3. Les plantes pérennes

Grâce aux approches menées chez *Arabidopsis* principalement, la communauté a acquis une bonne connaissance des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi des cellules du xylème secondaire, mais les voies de régulation impliquées dans le maintien de l'activité cambiale et dans le contrôle de sa prolifération restent à élucider. Chez les arbres, les dimensions de la zone cambiale et l'accès facilité au xylème en développement par excision de l'écorce, en font un meilleur modèle qu'*Arabidopsis* pour l'étude de ce tissu. À l'heure actuelle, le peuplier (*Populus*) est le modèle le plus utilisé pour l'étude fonctionnelle des gènes impliqués dans la formation du bois chez les espèces pérennes. Des analyses transcriptomiques couplées à des approches de génétique inverse ont permis de révéler un certain nombre de régulateurs clé de la formation du bois chez cette espèce (Hussey et al., 2013). Cependant, la forte redondance fonctionnelle due à la duplication d'une grande partie de ses gènes rend parfois plus difficile la caractérisation fonctionnelle des candidats les plus intéressants, en particulier les facteurs de transcription appartenant à des familles multigéniques (Tuskan et al., 2006). Pour cet aspect, l'*Eucalyptus* représente une bonne alternative, d'autant qu'il bénéficie d'un nombre croissant de ressources génomiques disponibles, qui ont permis la découverte de régulateurs maîtres impliqués dans le contrôle de la formation de la paroi tels qu'*EgMYB1* et *EgMYB2* (Goicoechea et al., 2005; Legay et al., 2010). D'autre part, sa transformation stable est possible (Tournier et al., 2003; Balasubramanian et al., 2011; Plasencia et al., 2015).

2.2. Le processus de formation du bois

Le bois est produit par la succession de cinq étapes principales, incluant (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, (4) la mort cellulaire programmée et (5) l'imprégnation des cellules par des composés phénoliques pour la formation du bois de cœur (Plomion et al., 2001).

2.2.1. Différenciation à partir du cambium, expansion et dépôt de la paroi primaire

La formation du xylème débute lorsque les cellules filles issues des initiales du cambium, se divisent pour produire les différents types cellulaires qui composent le xylème secondaire. Consécutivement à cette division, les cellules nouvellement produites vont suivre une phase d'expansion longitudinale et radiale pour atteindre leur taille définitive (**Figure 6**). Les vaisseaux et les fibres présentent un profil d'élongation distinct à l'origine de la différence de morphologie entre les deux types cellulaires. Les vaisseaux vont subir une forte expansion radiale, mais une expansion longitudinale modérée, alors qu'au contraire, les fibres vont fortement s'allonger dans la direction axiale et conserver une expansion radiale faible, atteignant jusqu'à 0.6mm de longueur chez le peuplier (Déjardin et al., 2010).

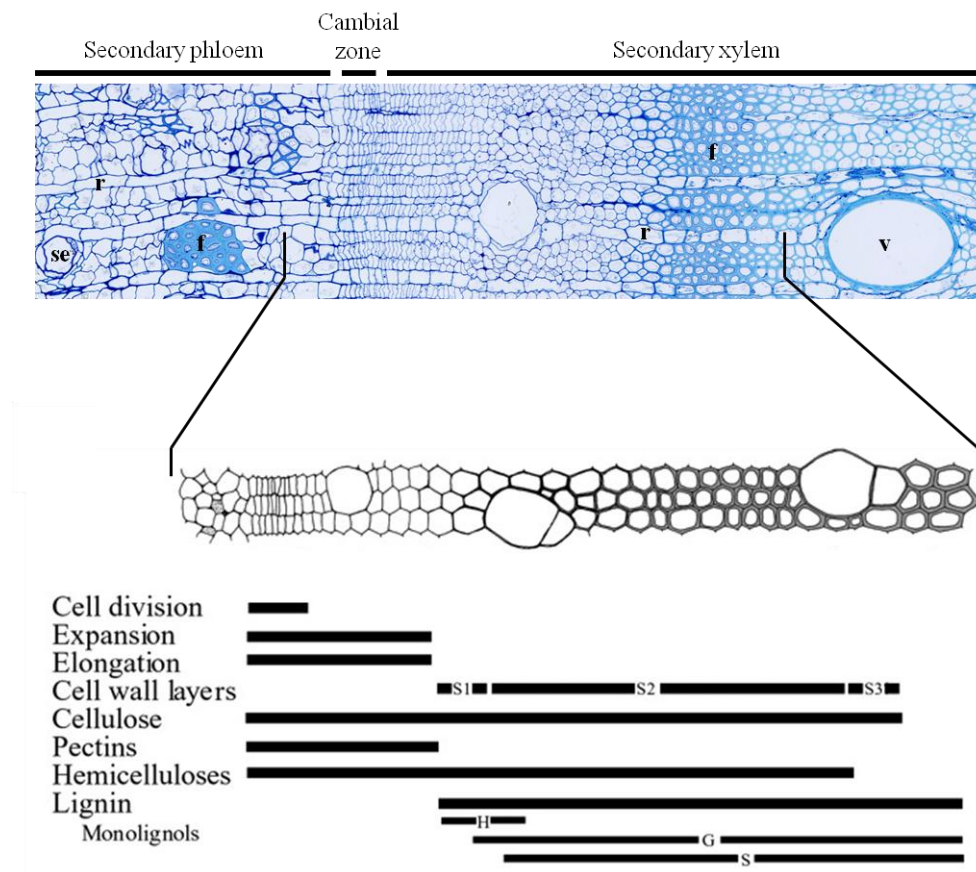


Figure 6: Étapes impliquées dans la formation du xylème secondaire. Section transversale de tige d'*E. grandis* coloré au bleu de Toluidine: f, fibres; r, rayons; se, éléments conducteurs de sève élaborée; v, vaisseaux. Adapté de Hertzberg et al., (2001).

Durant cette phase d'expansion, une paroi primaire est mise en place. Généralement, cette paroi primaire est cruciale pour le développement des plantes puisque ses propriétés

déterminent la forme et la rigidité de leurs organes. Excepté quelques rares types cellulaires, l'ensemble des cellules végétales possèdent une paroi primaire. Celle-ci est composée d'environ 90% de polysaccharides et de protéines (10%). Dans tous les types cellulaires, les fibres de cellulose sont incluses dans une matrice complexe composée d'hémicelluloses et de pectines.

La cellulose est présente sous forme de microfibrilles qui sont des assemblages d'environ 36 chaînes contenant entre 500 et 14 000 monomères de glucose liés en β -1,4 (Somerville, 2006). Ces microfibrilles sont des structures insolubles, comparables à des câbles, qui entourent la cellule et qui lui permettent de résister à des pressions osmotiques du même ordre de grandeur que la pression d'air dans un pneu de voiture (Plomion et al., 2001).

Après la cellulose, les hémicelluloses, ou xyloglucanes, représentent le deuxième type de polysaccharides les plus abondants chez les plantes. Le terme hémicelluloses, regroupe un ensemble de polysaccharides dont la composition et la structure dépendent de l'espèce et du type de paroi (pour revue, se référer à Scheller and Ulvskov, (2010)). Les xyloglucanes sont les principales hémicelluloses de la paroi primaire chez la plupart des plantes supérieures. Elles sont liées aux microfibrilles de cellulose via des liaisons hydrogènes pour rigidifier la paroi (Hoch, 2007). Les pectines contribuent également à constituer la matrice non cellulosique de la paroi primaire et la rendent hydrophile. Il s'agit d'une des familles de polysaccharides les plus complexes (pour plus de détails se référer à Doblin et al., (2010)).

La régulation du dépôt de paroi primaire, et sa réorganisation, contribuent au contrôle de l'expansion des cellules. Son relâchement, indispensable à l'expansion des cellules, est opéré via la production d'enzymes telles que les xyloglucanes endotransglycosylases, endoglucanases, expansines, pectines méthylestérases et pectinases (Plomion et al., 2001). Une fois l'expansion terminée, la formation de la paroi secondaire débute.

2.2.2. Formation de la paroi secondaire

Une fois leur taille définitive atteinte, les cellules du xylème produisent une paroi additionnelle plus épaisse et plus rigide : la paroi secondaire (**Figure 6**) (Plomion et al., 2001). À titre de comparaison, la paroi primaire présente une épaisseur d'au maximum 100 nm, tandis que l'épaisseur de la paroi secondaire est généralement de plusieurs microns (Doblin et al., 2010). Cette paroi secondaire est déposée par des types cellulaires qui ont pour fonction de résister à des contraintes mécaniques, tels que les fibres du phloème et du xylème, les cellules épidermiques, les cellules du péricarpe des fruits, les cellules de l'endothécium des

anthères et les cellules de l'endoderme des racines qui forment la bande de Caspary (Didi et al., 2015).

En règle générale, la paroi secondaire diverge de la paroi primaire par la présence de lignine qui remplace les pectines. Dans le bois, la paroi secondaire est composée de microfibrilles de cellulose, incluses dans une matrice non cellulosique constituée d'hémicelluloses et de lignine. Chez les dicotylédones, les hémicelluloses les plus abondantes du bois, sont un polymère linéaire de sous unités de xylose (xyloglucanes), liées en β -1,4 et généralement substitué par des résidus acétyle, d'acide glucuronique, d'acide 4-O-méthylglucuronique et d'arabinose (**Figure 7a**) (Scheller and Ulvskov, 2010; Rennie and Scheller, 2014). La cellulose représente environ 50% de la masse sèche de la paroi secondaire, tandis que les hémicelluloses en représentent entre 20 et 30%.

Ce qui signifie que les 20 à 30% restants sont constitués de lignine, ainsi que de traces de pectines et de protéines. La lignine est un polymère hétérogène de molécules phénoliques. Ce polymère est composé de p-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S), les trois sous-unités majeures, ou monolignols, dérivés respectivement des alcools p-coumarylique, coniferylique et sinapylique, de la voie des phénylpropanoïdes (Boudet et al., 2003). La structure, et donc les propriétés du polymère de lignine, dépendent du type de liaisons covalentes mises en place lors de la polymérisation des monolignols. D'autant qu'une grande diversité de molécules phénoliques dérivant du métabolisme secondaire peuvent être incorporées dans le polymère (**Figure 7a**) (Boudet et al., 2003).

Le dépôt de lignine provoque une transformation des propriétés physico-chimiques de la paroi secondaire. Son hydrophobicité augmente au cours de la maturation des cellules du xylème, tandis que la lignine est synthétisée. Le polymère de lignine recouvre et englobe les microfibrilles de cellulose ainsi que la matrice de polysaccharides, formant des liaisons covalentes avec celles-ci (**Figure 7b**). Ceci a pour effet d'augmenter considérablement la rigidité de la paroi (Boerjan et al., 2003; Boudet et al., 2003; Vanholme et al., 2008).

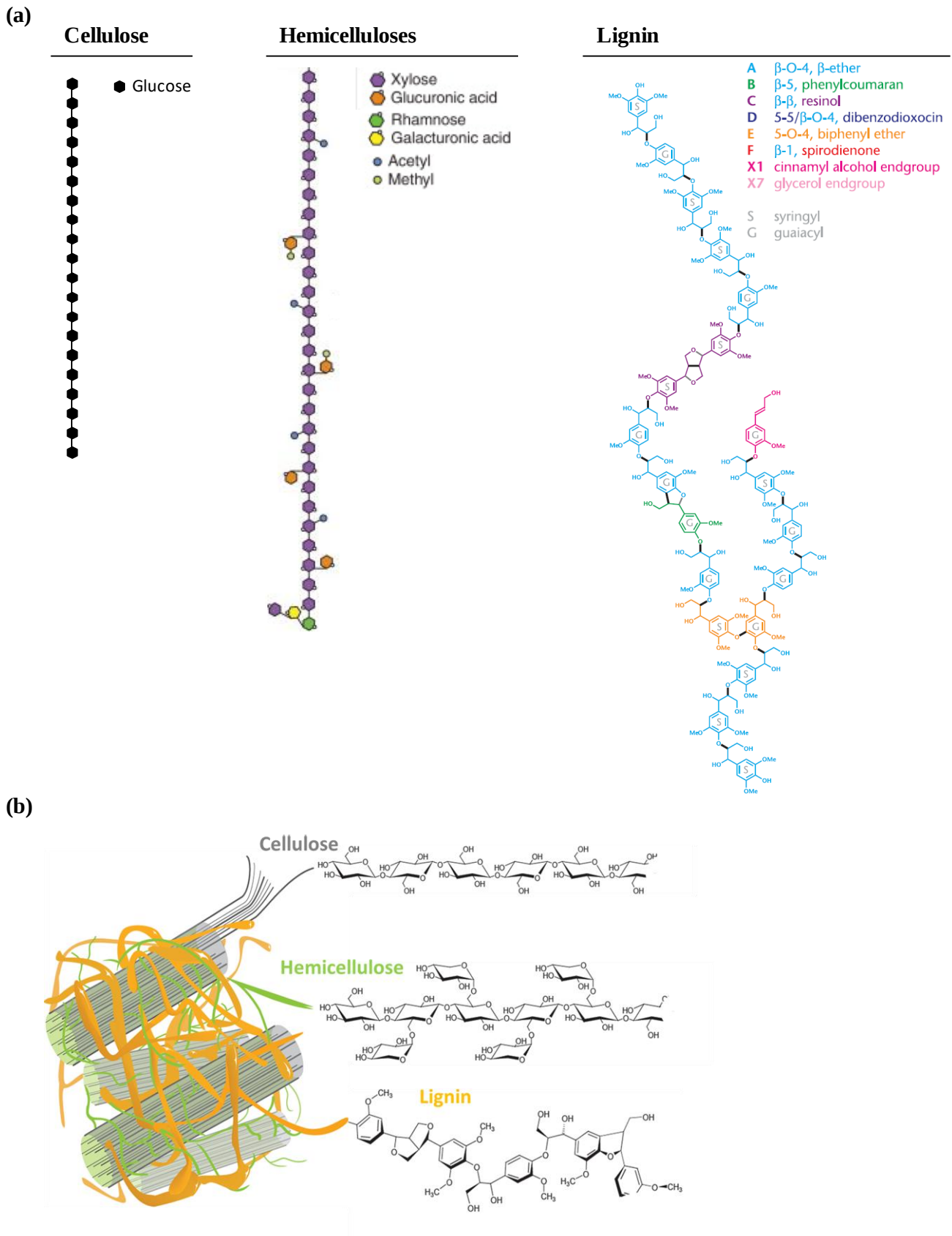


Figure 7: Représentation schématique des différents polymères de la paroi des cellules du xylème. (a) Représentation des trois principaux polymères qui composent la paroi secondaire. (b) Vue schématique de l'assemblage de ces polymères dans la paroi secondaire. Adapté de Rennie et Scheller, 2014; <https://www.psb.ugent.be/bio-energy/>

La paroi secondaire des cellules du xylème se dépose progressivement en trois couches successives S1, S2 et S3 (**Figure 6**) (Timell, 1986) qui diffèrent principalement par leur épaisseur, leur teneur en cellulose, ainsi que le degré de polymérisation et l'orientation des microfibrilles de cellulose qu'elles contiennent (**Figure 8**) (Sjöström; Buchanan et al.; Washusen and Evans, 2001; Mellerowicz and Sundberg, 2008). 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 a la plus grande importance car elle 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 (**Figure 8**) (Plomion et al., 2001).

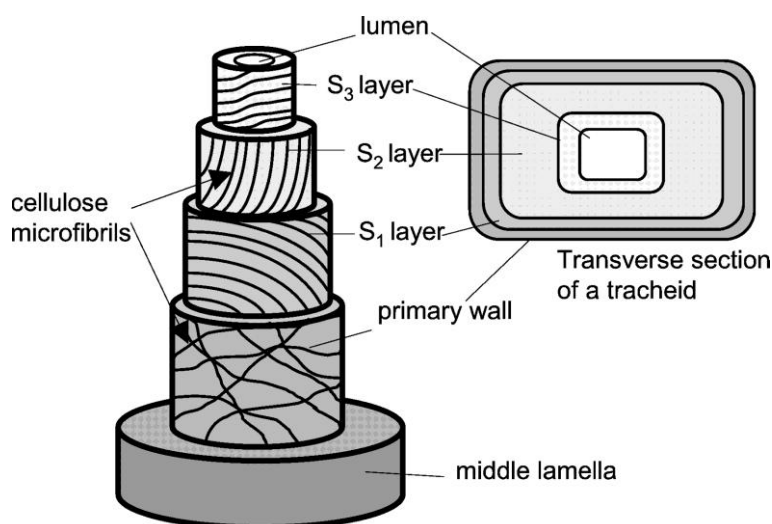


Figure 8: Structure tridimensionnelle de la paroi des cellules du xylème. Adapté de Plomion et al., 2001.

2.2.2.1. Biosynthèse des polysaccharides

La synthèse des polysaccharides peut être divisée en quatre étapes : (1) la production de sucres activés, (2) l'initiation de la synthèse du polymère, (3) l'élongation du polymère et (4) la terminaison de la synthèse (Doblin et al., 2010). Les processus impliqués dans l'initiation et la finalisation de la synthèse ne sont pas encore totalement connus. Cependant, des progrès importants ont été faits dans la compréhension de la synthèse des sucres activés et dans l'élongation des polysaccharides. L'assemblage des polysaccharides pariétaux est assuré par des glycosyltransférases ancrées aux membranes, dont deux types sont identifiés : les glycosyltransferases de type II et les polysaccharides synthases de type III. Ces deux groupes

d'enzymes catalysent la formation de liaisons covalentes entre monosaccharides obtenus de sucres activés donneurs (UDP-glucose, UDP-xylose) pour former les chaines de polysaccharides qui composent la cellulose et les hémicelluloses (Doblin et al., 2010). Les polysaccharides transférase de type III sont des enzymes impliquées dans l'élongation de la chaine principale par des évènements de glycosylation successifs. En revanche, la substitution de cette chaine principale est assurée par les glycosyltransférases de type II qui catalysent l'ajout d'un seul résidu glycosyl ou d'une courte chaine oligosaccharidique.

Biosynthèse de la cellulose

La biosynthèse de la cellulose est assurée par des polysaccharides synthases spécifiques, ou cellulose synthases (CesA), qui forment des multimères ancrés à la membrane plasmique. Ces multimères sont organisés en rosettes à six lobes, d'un diamètre total d'environ 25nm qui comprennent 6 sous-unités de CesA (**Figure 9a**). L'arrangement hexagonal des sous-unités de CesA, forme un pore central dans la membrane plasmique, par lequel les chaines de glucanes sont extrudées directement dans la paroi (Somerville, 2006). Il a été proposé que chacune des six sous unités CesA d'une rosette, synthétise six chaines de β -1,4-glucanes à partir de l'UDP-glucose. Ces chaines co-cristallisent pour former une microfibrille de cellulose d'un diamètre de 5 à 10nm, qui serait par conséquent composée de 36 chaines de glucanes. Cependant d'autres études ont proposé que ces complexes de cellulose synthase seraient constitués d'un nombre plus faible de CesA, produisant alors des microfibrilles aux caractéristiques différentes de celles énoncées précédemment (Hill et al., 2014; Wang and Hong, 2016).

L'analyse du génome de différentes plantes a suggéré que plusieurs gènes CesA y sont présents, et les études fonctionnelles montrent qu'il existe une spécialisation fonctionnelle entre les différentes isoformes encodées (Doblin et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, l'analyse des mutants *root swelling (rsw)*, *irregular xylem (irx)* et *fragile fiber (fra)* (Baskin et al., 1992; Turner and Somerville, 1997; Arioli et al., 1998; Taylor et al., 1999) dont la structure de la paroi est affectée, a révélé que les complexes de cellulose synthases sont composés d'au moins trois sous-unités CesA non redondantes. Des études complémentaires ont ensuite montré qu'il existe au moins 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 (Fagard et al., 2000; Scheible et al., 2001; Taylor et al., 2003). Ceci pourrait expliquer que la cellulose de la paroi secondaire possède des propriétés différentes de celle de la paroi primaire, avec notamment une plus forte cristallinité et un plus haut degré de polymérisation (McFarlane et al., 2014).

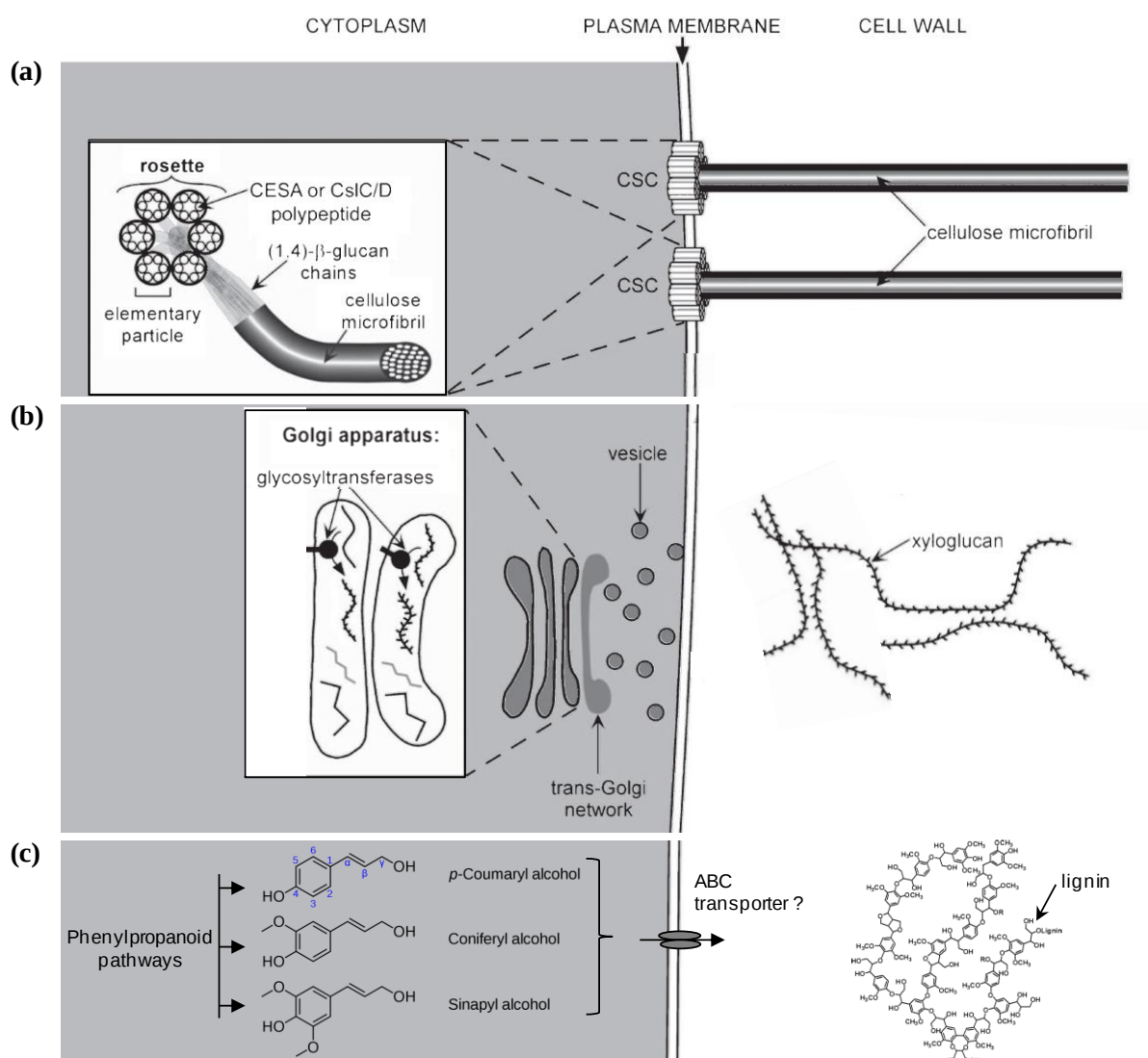


Figure 9: schématisation de la biosynthèse des principaux composants de la paroi secondaire des cellules du bois. a) Biosynthèse de la cellulose. b) biosynthèse des hémicelluloses. c) Biosynthèse de la lignine. Adapté de Doblin et al., 2010.

Pour la plante modèle *Arabidopsis*, *AtCesA1*, *AtCesA3* et *AtCesA6* sont impliquées dans la synthèse de la paroi primaire et *AtCesA4*, *AtCesA7* et *AtCesA8* sont requises pour la synthèse de la paroi secondaire. Chez l'*Eucalyptus*, 3 gènes, *EgCesA1*, *EgCesA2* et *EgCesA3* ont été associés à la synthèse de la paroi secondaire (Ranik and Myburg, 2006). Chez le peuplier 12 gènes codants pour des CesA sont exprimés dans le xylème en différenciation, mais les sous-unités impliquées spécifiquement dans la synthèse de la paroi secondaire ne sont pas encore identifiées. Des études récentes, ont suggéré que lors de la formation du bois chez le peuplier, deux types de complexes de CesA étaient impliqués, remettant en cause la spécificité de certaines CesA pour la synthèse de la paroi primaire ou secondaire (Xi et al., 2017).

Des études ont suggéré l'implication d'autres acteurs, dont une COBRA-like protéine encodée par *AtCOBL4* chez *Arabidopsis*, qui pourrait jouer un rôle dans l'orientation du dépôt des microfibrilles via une association avec les microtubules corticaux (Brown et al., 2005). En effet, de nombreux travaux ont démontré que les complexes de cellulose synthase sont associés aux microtubules, permettant à la cellule de contrôler l'angle des microfibrilles déposés dans la paroi. Chez *Arabidopsis*, l'interaction serait assurée par la protéine codée par le gène *cellulose synthase-interacting protein 1* (*AtCSI1*) et certains de ses homologues (Baskin et al., 1992; Lei et al., 2012).

Biosynthèse des polysaccharides non cellulosiques - les hémicelluloses

Contrairement à la cellulose, les polysaccharides qui composent la matrice non cellulosique, tels que les hémicelluloses et les pectines, sont synthétisés dans l'appareil de Golgi. Leur synthèse est assurée par des glycosyltransférases ancrées aux membranes et dont le site actif est positionné dans la lumière de l'organite, via un processus qui n'est pas encore entièrement élucidé (**Figure 9b**). Les polysaccharides sont ensuite transportés jusqu'à la surface de la cellule via des vésicules sécrétoires dérivées de l'appareil de Golgi, puis libérés dans le compartiment pariétal. Les progrès récents dans l'étude de ce processus, suggèrent que 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 nombreux travaux conduits sur des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la structure et la composition de leurs parois, a permis de mettre au jour différentes classes d'enzymes impliquées dans la synthèse de la chaîne principale de xyloses liés en β -1,4, dans la décoration par des résidus d'acide glucuronique, ainsi que l'acétylation et la méthylation du polymère. Deux membres de la famille des glycosyltransférases GT43 (*AtIRX9* et *AtIRX14*) et un membre de la famille GT47 (*AtIRX10*), encodent des xylosyltransférases, nécessaires à la synthèse de la chaîne principale de xylanes (Lee et al., 2007; Brown et al., 2007). Les gènes *AtIRX9-like* (*AtIRX9-L*), *AtIRX10-L*, et *AtIRX14-L*, semblent également avoir une activité de xylane synthase, et seraient des paralogues fonctionnels d'*AtIRX9*, *AtIRX10* et *AtIRX14* (Brown et al., 2007; Wu et al., 2010). L'ajout de décorations d'acide glucuronique sur la chaîne principale de xylanes est effectué par des enzymes de la famille GT8, encodées par les deux gènes *Glucuronic Acid Substitution of Xylan 1* (*AtGUX1*) et *AtGUX2* (Mortimer et al., 2010; Rennie et al., 2012). L'altération du contenu en xylanes chez les mutants d'*Arabidopsis* pour les gènes *IRX7/FRA8*, *IRX8/*

GAUT12, et *PARVUS/GATL1*, a conduit à supposer que ceux-ci pourraient également avoir la fonction de glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des hémicelluloses, sans que leur rôle n'ait encore été clairement caractérisé (Scheller and Ulvskov, 2010).

Il a été observé que la chaîne principale des xylanes peut être acétylée par l'action de plusieurs types de protéines de la famille *Reduced Wall Acetylation (RWA)* ou de la famille *Trichome Birefringence-like (TBL)*, notamment *AtESK1* qui semble spécifique des xylanes (Manabe et al., 2013; Yuan et al., 2013; Xiong et al., 2013). Enfin, les résidus d'acide glucuroniques sont méthylés, via l'action de l'enzyme encodée par le gène *AtGXMT1*, qui contient un domaine de fonction inconnue *Domain of Unknown Function 579 (DUF579)* (Urbanowicz et al., 2012; Lee et al., 2012). Les gènes *AtIRX15* et *AtIRX15-L* semblent également avoir un rôle dans la biosynthèse des hémicelluloses, mais leur fonction précise reste à caractériser (Jensen et al., 2011; Brown et al., 2011).

Chez l'*Eucalyptus* des orthologues putatifs des gènes codants pour ces différentes familles d'enzymes, ont été proposés, mais aucun d'entre eux n'a fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle (Myburg et al., 2014). En revanche, dans le cas du peuplier, la fonction de plusieurs orthologues de ces gènes a été démontrée (Zhou et al., 2006; Kong et al., 2009; Yuan et al., 2014; Ratke et al., 2015; Biswal et al., 2015).

Par ailleurs, l'hétérogénéité de la structure des hémicelluloses est également expliquée par le large spectre d'enzymes impliquées dans le remodelage des molécules de xyloglucanes lorsque celles-ci sont libérées dans la paroi. Plusieurs enzymes, membres de la famille des glycosyl hydrolases semblent assurer cette fonction clé dans la biosynthèse de la paroi (Minic and Jouanin, 2006; Minic, 2008). Par exemple, la protéine membranaire *AtKOR1* est une glycosyl hydrolase nécessaire à la synthèse de la cellulose dans la paroi secondaire. Sa fonction est encore discutée, mais il a été proposé qu'elle serait impliquée dans l'initiation ou la finalisation de la synthèse de cellulose ou encore dans l'assemblage des microfibrilles (Møhlhøj et al., 2001, 2002; Peng et al., 2002). Certaines glycosyl hydrolases telles que les xyloglucanes endotransglycosylases/hydrolases (XET/XTH), sont également considérées comme impliquées dans la biosynthèse et le remodelage des xyloglucanes (Rose et al., 2002). Les XET clivent les xyloglucanes et greffent les fragments directement sur une autre chaîne de polysaccharides via une réaction de transglycosylation. Il est considéré que cette action peut avoir deux effets : dans la paroi primaire, cela va permettre l'extension de la paroi et donc l'expansion de la cellule, tandis que dans la paroi secondaire, la création de ce réseau entre chaînes de polysaccharides aboutit à une augmentation de la rigidité de la matrice de polysaccharides. De nombreuses isoformes de cette famille ont été reliées à la biosynthèse de

la paroi dans différentes espèces (Herbers et al., 2001; Cho et al., 2006; Osato et al., 2006; Shin et al., 2006; Liu et al., 2007), et notamment à la biosynthèse de la paroi secondaire chez le peuplier (Bourquin et al., 2002; Nishikubo et al., 2011).

2.2.2.2. Biosynthèse et polymérisation de la lignine

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 et al., 2003; Boudet et al., 2003). Ce polymère a un rôle fondamental dans la paroi secondaire et lui confère une résistance mécanique, une imperméabilité ainsi qu'une résistance à la biodégradation. Du fait de ses propriétés, la lignine est résistante à la dégradation, et représente par conséquent un obstacle industriel majeur pour l'accès aux polysaccharides de la paroi. Sa présence nécessite l'emploi de prétraitements polluants et coûteux, lors de la production de pâte à papier ou de biocarburants par exemple. Les enjeux économiques ont grandement encouragé l'étude des voies de biosynthèse de la lignine (Grima-Pettenati and Goffner, 1999; Boudet et al., 2003), qui se sont avérées particulièrement complexes. Les études menées ces dernières années continuent de mettre en évidence des voies alternatives dans la biosynthèse des précurseurs de la lignine (Humphreys and Chapple, 2002; Boerjan et al., 2003; Ralph et al., 2004; Vanholme et al., 2010, 2013). Si la majorité des acteurs de la biosynthèse des précurseurs sont relativement connus, les enzymes impliquées dans leur polymérisation dans la paroi restent encore à identifier pour la plupart.

La biosynthèse de la lignine débute dans la voie du shikimate, à l'origine d'une grande variété de molécules phénoliques. Dans cette voie métabolique, le chorismate sert de précurseur, notamment pour la production des acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Knaggs et al., 2003). La biosynthèse des trois principaux alcools p-hydroxycinnamyliques (alcool p-coumarique, coniferyl et sinapyl), se produit à travers 11 étapes enzymatiques de la voie des phénylpropanoïdes (**Figure 10a**). La voie générale des phénylpropanoïdes débute avec la désamination de la phénylalanine et conduit à la production d'esters d'hydroxy-cinnamoyl CoA. Les enzymes impliquées dans cette courte série de réactions sont la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamate 4-hydroxylase (C4H) et 4-coumarateCoA ligase (4CL). Pour la production de monolignols, les esters d'hydroxy-cinnamoyl CoA subissent une succession d'hydroxylation et O-méthylation de leur cycle aromatique, via l'action des 5 enzymes : shikimate O-hydroxycinnamoyl-transferase (HCT), CSE, p-coumarate 3-hydroxylase (C3H), caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase

(CCoAOMT), ferulate 5-hydroxylase (F5H) et caffeate/5-hydroxyferulate O-méthyl-transferase (COMT). La conversion des chaînes latérales au groupement carboxyl vers un groupement alcool, est catalysée, successivement par les deux enzymes considérées spécifiques de la biosynthèse des précurseurs des monolignols : la cinnamoyl CoA reductase (CCR) et la cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) (Boerjan et al., 2003).

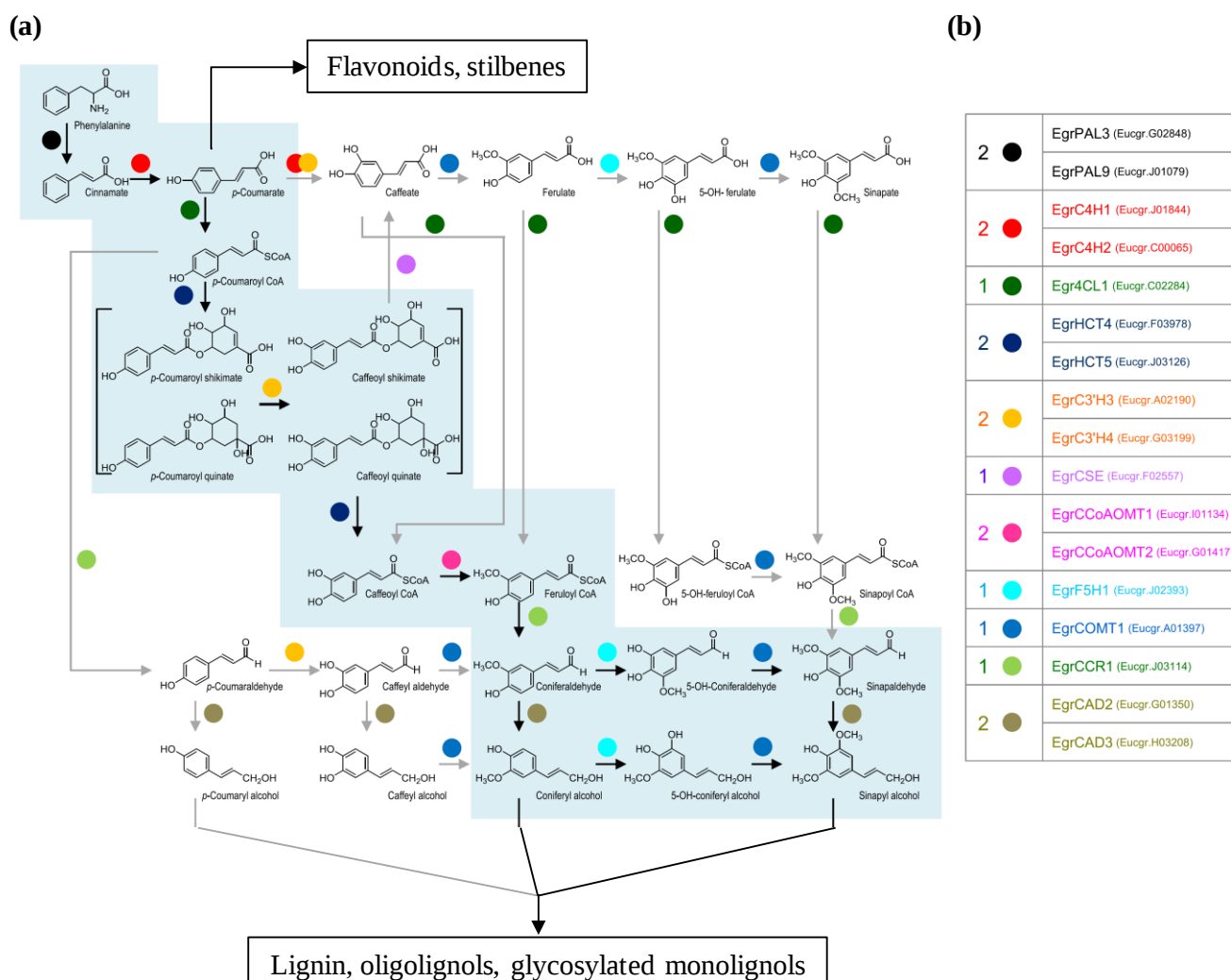


Figure 10: Représentation de la voie des phénylpropanoïdes. a) Voie générale des phénylpropanoïdes impliquée dans la biosynthèse des monolignols et de leurs dérivés, ainsi que des flavonoïdes et stilbènes. b) Gènes impliqués dans la biosynthèse des monolignols destinés à former le polymère de lignine chez l'*Eucalyptus*. Adapté de Carocha et al., 2015.

Le gène codant pour la CCR et l'activité enzymatique correspondante ont été caractérisés pour la première fois chez l'*Eucalyptus gunnii* (Lacombe et al., 1997), puis chez *Arabidopsis* (Lauvergeat et al., 2001) et le peuplier (Leplé et al., 2007). Un travail pionnier similaire a conduit à la caractérisation du gène d'*Eucalyptus* EguCAD2 (Grima-Pettenati et al., 1993). Les études fonctionnelles des autres gènes impliqués dans la voie des

phénylpropanoïdes ont été conduites principalement chez *Arabidopsis*, via des analyses de mutants (Vanholme et al., 2012).

La disponibilité de la séquence du génome de l'*Eucalyptus* a récemment permis une annotation experte des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine (Soler et al., 2014). L'annotation combinée à une analyse phylogénétique comparative, ont permis d'identifier 38 gènes appartenant aux clades *bona fide*, qui codent pour les enzymes impliquées dans les 11 étapes de la voie des phénylpropanoïdes. L'analyse de leur profils d'expression a permis d'identifier les 17 gènes considérés comme nécessaires pour la biosynthèse de la lignine au cours du développement du xylème (**Figure 10b**). Une approche similaire a été conduite chez le peuplier (Shi et al., 2010) pour l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine.

Lorsque les précurseurs des monolignols sont synthétisés, ceux-ci sont transférés dans l'apoplaste par un mécanisme qui implique probablement des transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC transporter) (**Figure 9c**). Récemment, il a été montré que le transporteur ABC, AtABCG29, est capable de transporter l'alcool p-coumarylique chez la levure et que l'accumulation de lignine est réduite chez un mutant d'*Arabidopsis* muté pour ce gène (Alejandro et al., 2012). Si la biosynthèse des précurseurs de la lignine est bien connue, l'étape de polymérisation bénéficie de beaucoup moins de preuves fonctionnelles. Le modèle actuel considère que lorsque les précurseurs des monolignols sont exportés dans la paroi, ceux-ci sont oxydés par des peroxydases et des laccases, et polymérisent avec la macromolécule de lignine pour former les monolignols. Leur oxydation, qui peut se faire sans le contact direct avec une de ces enzymes, conduit également à la mise en place de liaisons covalentes avec les polysaccharides environnants. Les gènes codant pour les laccases AtLAC4 et AtLAC17, ainsi que la peroxydase AtPER64 ont été associés à la polymérisation de la lignine (Lee et al., 2013; Berthet et al., 2011).

Chez les dicotylédones, la lignine est principalement composée des sous-unités G et S, tandis que les H sont minoritaires (Vanholme et al., 2012). La structure finale du polymère de lignine va dépendre notamment de la quantité de sous-unités S/G/H. En effet, celles-ci diffèrent par leur degré de méthylation, et par conséquent, par le type de liaison qu'elles vont établir lors de la multimérisation dans la paroi. Ainsi, il est considéré que plus de 60% des liaisons entre monolignols, chez les dicotylédones, sont de type β -O-4. Ces liaisons β -aryl éther, sont clivées par des traitements alcalins ou acides agressifs et sont ciblées dans le protocole de thioacidolyse couramment utilisé pour évaluer le ratio S/G (Sarkanen and

Ludwig, 1971). Les deux autres liaisons trouvées dans le polymère de lignine sont de type phénylcoumaranes et résinols formées par un couplage en β -5 ou β - β respectivement. Ce sont des liaisons carbone - carbone extrêmement stables qui forment un polymère de lignine plus condensé, qu'il est impossible de dégrader sans endommager également les polysaccharides. Ces trois types de liaisons forment un polymère linéaire, mais des branchements en positions 4-O- ou 5-, peuvent être ajoutés et densifier le polymère final (pour plus de détails, voir Ralph et al., 2004).

Le polymère de lignine est dérivé d'esters d'hydroxy-cinnamoyl CoA, qui sont également les précurseurs d'une large gamme de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, anthocyanes et tannins condensés (Boerjan et al., 2003). Les monolignols sont également utilisés pour la production d'au moins trois classes de composés secondaires : les oligolignols, les monolignols 4-O-hexosides et les lignanes. Les oligolignols sont des petits polymères issus du couplage des monolignols et qui ne sont pas liés au polymère de lignine (Morreel et al., 2004, 2010b, 2010a; Ralph et al., 2004). Les monolignols 4-O-hexosides regroupent des monolignols glycosylés tels que la coniferine et la syringine, qui pourraient être des formes de stockage des monolignols (Lim et al., 2005). Les lignanes sont des dimères de monolignols dont le type de liaison diffère de celles trouvées dans le polymère de lignine, et ont des propriétés antioxydantes (Umezawa, 2003). Récemment, il a été démontré chez le peuplier, que l'enzyme phenylcoumaran benzylic ether reductase (*PtPCBER*), est impliquée dans la synthèse de lignanes, ayant un rôle dans la protection contre le stress oxydatif (Niculaes et al., 2014). Ce processus de lignification de la paroi secondaire est la dernière étape précédant la mort de la cellule.

2.2.3. Mort programmée et formation du bois de cœur

Lorsque le dépôt de la paroi secondaire est terminé, les vaisseaux et fibres vont entamer un processus de mort programmée. Les vaisseaux entament le processus de mort programmée dans les jours qui suivent leur différenciation de la zone cambiale, tandis que les fibres peuvent rester en vie pendant environ 1 mois (Bollhöner et al., 2012). Il a également été constaté que le processus de mort programmée des fibres est plus long que celui observé pour les vaisseaux conducteurs. Les cellules du parenchyme radial sont les seules cellules pouvant rester en vie après la maturation du xylème. Celles-ci sont impliquées dans les échanges entre xylème et phloème, dans le stockage de molécules de réserves (amidon et lipides), dans la construction des parois secondaires des cellules adjacentes et dans la formation du bois de

cœur. Le bois de cœur, ou duramen, correspond à la partie la plus interne du tronc, qui apparaît souvent plus foncé que l'aubier, c'est à dire la partie la plus récente du tronc. Chez certaines espèces, l'aubier dispose de vaisseaux fonctionnels, tandis que les vaisseaux du duramen sont obstrués par des bouchons de tylose produits par les rayons adjacents. Plus généralement, le duramen est enrichi en composés phénoliques qui le rendent plus résistant. Cette accumulation de composés phénoliques est assurée par les cellules des rayons qui produisent ces composés et les libèrent dans les parois, ainsi que dans la lumière des cellules adjacentes (Déjardin et al., 2010).

La mort programmée des cellules du xylème est une étape clé dans leur processus de maturation (Bollhöner et al., 2012). Il semblerait que les acteurs moléculaires nécessaires à cette étape soient produits dès que le processus de différenciation des cellules du xylème est entamé. En effet, durant la différenciation des cellules du xylème, un large spectre de protéases, lipases et nucléases sont produites et stockées dans la vacuole. Par un signal qui reste inconnu, la rupture du tonoplaste entraîne un relargage et une activation de ces enzymes dans le cytoplasme menant à l'autolyse des composants de la cellule (Courtois-Moreau et al., 2009). Les protéases à cystéine XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE1 (*AtXCP1*) et *AtXCP2*, ainsi que la nucléase BIFUNCTIONAL NUCLEASE1 (*AtBFN1*) ont été associées à ce processus d'autolyse chez *Arabidopsis*.

3. Régulation de la formation du bois

La xylogénèse, est un processus complexe et dynamique influencé par de nombreux signaux endogènes et exogènes qui interviennent à plusieurs échelles. Ce mécanisme nécessite la coordination transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes structuraux, qui est assurée, à plusieurs niveaux, par un jeu d'hormones et autres molécules signal, ainsi qu'un réseau de gènes régulateurs. 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.

3.1. Régulation de l'activité cambiale et de la différenciation des cellules du xylème

Le maintien du caractère pluripotent des cellules cambiales est indispensable pour une l'activité méristématique continue du cambium. Il a été montré, chez *Arabidopsis*, qu'à l'instar des méristèmes apicaux caulinaires et racinaires, le maintien et la prolifération du cambium sont contrôlés par une voie de signalisation impliquant des peptides, leur récepteur et un facteur de transcription (Fisher and Turner, 2007; Hirakawa et al., 2008; Etchells and

Turner, 2010). Le peptide TDIF est produit dans le phloème à partir des protéines CLE41/CLE44. Il est perçu par le récepteur kinase TDR/PXY (TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM) produit dans le cambium. Cette perception va induire une voie de signalisation impliquant le FT de type WUSCHEL HOMEODOMAIN RELATED, *AtWOX4* (**Figure 11**). Ce processus inhibe la différenciation des cellules cambiales et participe à maintenir leur caractère pluripotent. La mutation de *AtWOX4* entraîne une réduction de l'activité cambiale, ce qui indique que ce FT est également requis pour la prolifération des cellules cambiales. Un autre gène de la même famille, *AtWOX14* semble occuper une fonction similaire (Etchells et al., 2013). En parallèle, la différenciation des cellules cambiales en cellules du xylème est assurée par l'activation de protéines de type GSK3 (glycogen synthase kinase 3 family), dont BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2), qui inactivent le facteur de transcription BES1, impliqué dans la différenciation du xylème (**Figure 11**) (Fukuda, 2016). Récemment, les orthologues fonctionnels des gènes *AtPXY* et *AtCLE41*, ont été caractérisés chez le peuplier (Etchells et al., 2015). Les auteurs ont montré que la surexpression ectopique de ces gènes entraîne une désorganisation des tissus conducteurs et une réduction de croissance. Cependant la surexpression plus spécifique de *CLE41* dans le phloème et de *PXY* dans le cambium entraîne une forte augmentation de la croissance primaire et secondaire.

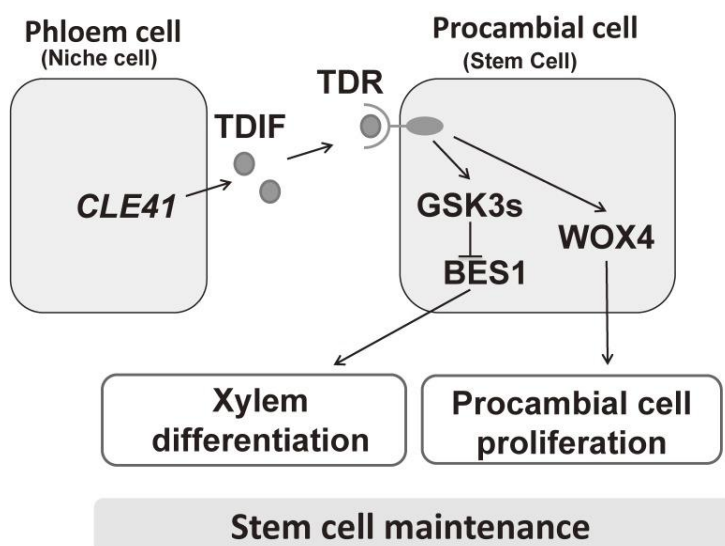


Figure 11: Voie de signalisation TDIF/PXY régulant le maintien du cambium. Adapté de Fukuda, 2016.

Chez *Arabidopsis*, des partenaires potentiels interagissant avec TDR/PXY ont été identifiés : les récepteurs kinases (RLKs) ERECTA (ER) et ER-LIKE1 ainsi que leur ligands EPFL4 et EPFL6 (Uchida et al., 2013). Deux autres RLKs, MORE LATERAL GROWTH1 (MOL1) et

REDUCED IN LATERAL GROWTH1 (RUL1), semblent être des régulateurs négatifs de l'activité cambiale et pourraient agir en amont de TDR/PXY-WOX4. MOL1 agirait en tant que répresseur et RUL1 comme activateur de la croissance secondaire (Agusti et al., 2011).

Toujours chez la plante modèle *Arabidopsis*, un autre FT de type KNOX classe I, BREVIPEDICELLUS (BP)/ KNAT1, est impliqué dans la différenciation du xylème. Des plantes surexprimant ce gène montrent une inactivation du dépôt de lignine, tandis que les mutants pour ce gène montrent une lignification ectopique (Mele et al., 2003). Chez le peuplier, un orthologue de ce gène, ARBORKNOX2 (PtARK2), est exprimé dans les meristèmes, dont le cambium. D'autre part, lorsque ce gène est surexprimé, une expansion de la zone cambiale est associée à une inhibition de la production de nouvelles assises cellulaires dans le xylème et le phloème, ainsi qu'une régulation négative des gènes reliés à la synthèse de paroi (Du et al., 2009). Ces observations indiquent qu'ARK2 participe au maintien de l'activité cambiale, bien que la régulation qu'il exerce sur les gènes de biosynthèse de la paroi, ait parfois conduit à le considérer uniquement comme un régulateur de la formation de la paroi (Hussey et al., 2013).

Certaines hormones telles que les cytokinines, l'auxine, les gibbérellines et l'éthylène sont considérées comme nécessaires dans la régulation de l'activité cambiale (Didi et al., 2015). Les études fonctionnelles conduites chez *Arabidopsis* et le peuplier, suggèrent que la voie de signalisation des cytokinines régule à la fois le maintien et la prolifération du cambium (Mahonen et al., 2006; Matsumoto-Kitano et al., 2008; Nieminen et al., 2008; Hejátko et al., 2009). L'analyse de peupliers surexprimant un gène encodant une enzyme de biosynthèse de l'éthylène (*PtACO1*) et un mutant d'*Arabidopsis* pour le gène encodant le récepteur de l'éthylène (*AtETR1*), ont montré que cette hormone végétale stimule l'activité cambiale ainsi que la différenciation des cellules du xylème (Love et al., 2009). Il a été proposé que l'éthylène participe à la régulation de l'activité cambiale via les voies de signalisation à l'auxine, puisque les gènes reliés à la biosynthèse de l'éthylène sont induits par l'auxine dans la tige du peuplier (Nilsson et al., 2008). Chez le peuplier, la stimulation de l'activité cambiale par l'application d'auxine et d'acide gibbérellique, est en faveur de l'hypothèse d'un rôle clé de ces hormones dans le contrôle de la formation du bois (Björklund et al., 2007).

Un nombre croissant d'études associent l'auxine à la formation du xylème. Chez *Arabidopsis*, un flux d'auxine va participer à la dédifférenciation des cellules précurseurs du

cambium, puis au maintien de celui-ci (Donner et al., 2009; Ohashi-Ito et al., 2010). De plus, la formation des faisceaux vasculaires est induite par un pic d'auxine dans le procambium, généré par un transport polarisé assuré par le transporteur PINFORMED 1 (*AtPIN1*) (Donner et al., 2009). Chez le peuplier, la surexpression d'une version mutée du gène *PtIAA3*, qui entraîne une plus faible sensibilité à l'auxine, est associée à une réduction importante de l'activité cambiale et de la croissance secondaire (Nilsson et al., 2008). La surexpression d'une version stabilisée de la protéine EgIAA4 d'*E. grandis* chez *Arabidopsis*, entraîne un retard de la lignification des fibres interfasciculaires et des faisceaux vasculaires (Yu et al., 2014). Ces observations montrent que l'auxine exercerait un rôle à la fois dans le contrôle de l'activité cambiale et dans la différenciation des cellules du xylème. Cependant, les voies de signalisation impliquées sont encore mal connues.

En aval des voies de signalisation de ces hormones, différents FT sont impliqués dans la différenciation du système vasculaire. Le FT de type HD-ZIP de classe III, *ATHB8*, est requis pour le développement du procambium et la différenciation des tissus vasculaires chez *Arabidopsis*. Son expression est induite par le FT de type ARF (Auxin Response Factor), *MONOPTEROS* (MP), suite à la perception de l'auxine (Donner et al., 2009). En plus de ce gène, quatre autres FT du même type ont été reliés à la différenciation du xylème : *PHB/ATHB14*, *PHV/ATHB9*, *REV/IFL1* et *CNA/ATHB15* (Baima et al., 2001; Ilegems et al., 2010). La caractérisation fonctionnelle des orthologues de certains de ces gènes chez le peuplier, comme *ATHB8* (*PtHB7*), *ATHB15* (*POPCORONA*) et *REV/IFL* (*POPREVOLUTA*), a confirmé leur implication dans la formation du cambium et la différenciation des tissus vasculaires chez les arbres (Du et al., 2011; Robischon et al., 2011; Zhu et al., 2013). Ceci suggère que ce mécanisme observé chez les plantes herbacées, serait conservé chez les arbres. Le FT de type GARP, *KANADI 1* (*AtKAN1*), exprimé dans le phloème, a un rôle antagoniste aux FT de type HD-ZIP de classe III dans la régulation de la différenciation des cellules du xylème, en réponse à l'auxine (Izhaki and Bowman, 2007; Ilegems et al., 2010). L'intervention de ces FT HD-ZIP et GARP, n'est pas réduite à la formation du xylème, mais plus généralement à l'activité méristématique et l'organisation des organes (Schuetz et al., 2013). En plus de la régulation par l'auxine, les FT HD-ZIP classe III subissent des régulations post-transcriptionnelles par les micro ARN (miARN) 165 et 166. Dans le modèle généralement admis, les FT de type HD-ZIP activent l'expression des transporteurs d'auxine PIN dans le cambium, ce qui induit un pic d'auxine dans la zone cambiale et active la prolifération du cambium ainsi que la différenciation de nouvelles assises cellulaires dans le

xylème. Les FT de type KAN et les miARN exprimés dans le phloème vont réguler négativement le transport d'auxine et l'expression des FT HD-ZIP, dans la zone cambiale coté phloème, dans le but de favoriser la différenciation d'assises cellulaires du phloème (Ilegems et al., 2010).

Lors de leur différenciation, les cellules du xylème vont subir une série de modifications morphologiques. Une des étapes majeures dans ce processus est le dépôt d'une épaisse paroi secondaire qui constituera ensuite le bois.

3.2. Régulation transcriptionnelle de la formation de la paroi secondaire

3.2.1. Les facteurs de transcription de type MYB et NAC sont des régulateurs clés

Les FT sont des protéines chargées de réguler la transcription de gènes cibles, via la reconnaissance de motifs présents dans leurs promoteurs. Prés de 60 familles de FT ont été identifiées chez *Arabidopsis*, le peuplier et l'*Eucalyptus* (Jin et al., 2017). Les FT de type MYB-R2R3 constituent une des plus grandes familles et régulent un grand nombre de processus, tels que le métabolisme primaire et secondaire, la différenciation cellulaire, le développement, et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Jin and Martin, 1999; Dubos et al., 2010). Les FT MYB-R2R3 sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN (MYB pour MYeloBlastosis) composé de deux répétitions adjacentes (R2R3) en N-terminal, et une région C-terminale variable portant l'activité d'activation ou répression de la transcription (passé en revue par Jin and Martin, 1999; Dubos et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, l'analyse phylogénétique de cette famille et la détection de motifs dans la région C-terminale variable, a permis de définir 22 sous-groupes regroupant la majorité des gènes MYB-R2R3. Cependant, pour beaucoup d'entre eux, aucun motif conservé n'a pu être détecté (Kranz et al., 1998; Stracke et al., 2001). Des études de phylogénie ont ensuite été conduites chez d'autres espèces, telles que le riz (*Oryza sativa*; Jiang et al., 2004; Yanhui et al., 2006), la vigne (*Vitis vinifera*; Matus et al., 2008), le peuplier (*Populus trichocarpa*; Wilkins et al., 2009), le maïs (*Zea mays*; Du et al., 2012), le soja (*Glycine max*; Du et al., 2012b), le pommier (*Malus domestica*; Cao et al., 2013) et le millet (*Panicum virgatum*; Zhao and Bartley, 2014). Ces travaux ont révélé que la plupart des sous-groupes décrits chez *Arabidopsis* sont conservés. Cependant, certains sous-groupes, absents chez *Arabidopsis* sont détectés. Plus récemment, Soler et al., (2014) ont tiré profit de la disponibilité du génome d'*E. grandis*, pour réaliser une analyse phylogénétique comparative incluant des espèces ligneuse (*E. grandis*, *V. vinifera* et *P. trichocarpa*) et des espèces herbacées (*A. thaliana* et *O. sativa*). Ce travail a montré que les

sous-groupes contenant les FT clés de la régulation de la formation de la paroi, sont conservés entre les espèces. De façon intéressante, cette étude a également révélé l'existence de trois sous-groupes enrichis en gènes d'arbres (woody-expanded subgroups, WES; S5, S6, SAtMYB5) et 5 sous-groupes préférentiellement détectés chez les arbres (woody-preferential subgroups, WPS; WPS-I à V). La diversification de ces FT permettrait d'assurer la régulation de fonctions spécifiques aux espèces pérennes. L'expression préférentielle de certains des membres de ces sous-groupes dans les tissus du bois, suggère un rôle spécifique dans la régulation de la croissance secondaire (Soler et al., 2014).

Les FT de type NAC, définis par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN NAC (NAM, ATAF1/2 et CUC2) en N-terminal, représentent une autre grande famille de FT pour les plantes. Cette famille de FT a également fait l'objet d'une annotation et d'une étude phylogénétique chez l'*Eucalyptus* (Hussey et al., 2015). Cette étude montre que ces FT, qui sont impliqués dans la régulation d'un grand nombre de fonctions biologiques, pourraient jouer un rôle important dans le développement et la réponse des tissus vis à vis des stress biotiques et abiotiques.

Dans l'état actuel des connaissances, il est supposé qu'un grand nombre de ces FT, pour la plupart inconnus, s'organiseraient en un réseau de régulation complexe, impliquant des boucles de rétrocontrôle positives et négatives, qui régulent le dépôt de la paroi secondaire.

3.2.2. Le réseau de FT tel qu'il est connu chez la plante modèle *Arabidopsis*

Le dépôt de la paroi secondaire est activé lorsque la cellule a terminé son élongation, et nécessite par conséquent une coordination spatio-temporelle précise de l'expression de l'ensemble des gènes codants pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de ses composants. Cette activation coordonnée des gènes de biosynthèse est contrôlée par un réseau de FT hiérarchisé à plusieurs niveaux (Hussey et al., 2013) (**Figure 12**). 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 "régulateurs maitres" (ou "Master regulators") de la formation de la paroi secondaire. En général, leur mutation inhibe le dépôt de paroi, tandis que leur surexpression ectopique entraîne une induction des gènes impliqués dans la synthèse de cellulose, lignine et xylanes, entraînant un dépôt de paroi secondaire. Par conséquent, ils constituent le premier niveau de régulateurs impliqués dans le contrôle de la formation de la paroi secondaire (Hussey et al., 2013). Malgré leur position très en amont dans le réseau, il a été montré qu'ils peuvent se lier aux promoteurs de gènes cibles codant

pour des FT en aval, ou des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi (Zhong et Ye, 2015; Hussey et al., 2013).

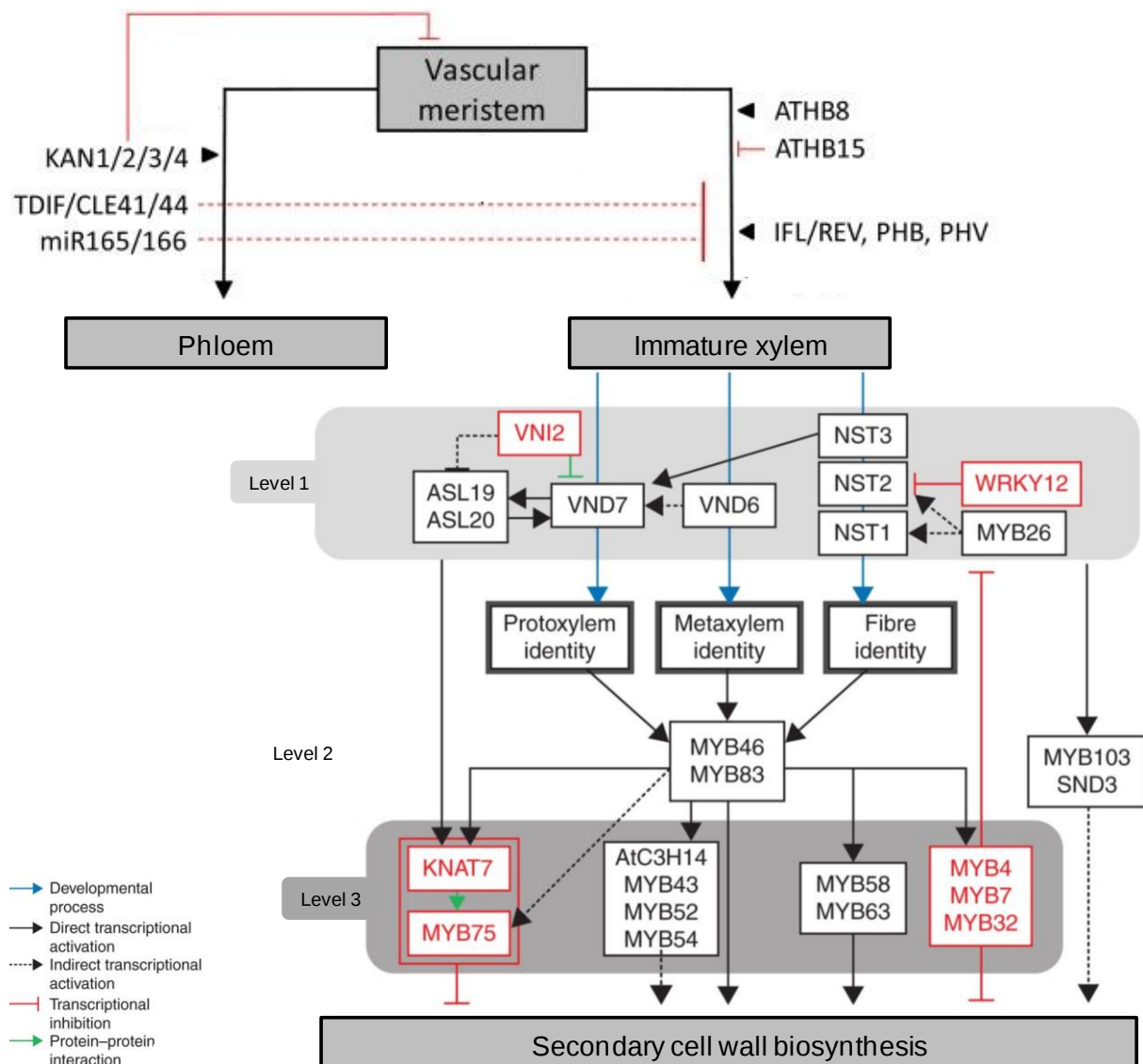


Figure 12: Réseau de régulation impliqué dans le contrôle du dépôt de paroi secondaire dans les cellules du xylème en différenciation. Adapté de Hussey et al., 2013 et Ko et al., 2014.

Chez *Arabidopsis*, 10 FT (*AtVND1* à *AtVND7*, *AtSND1*, *AtNST1* et *AtNST2*) appartiennent à cette catégorie de régulateurs maitres de type NAC, et initient la formation de la paroi dans différents types cellulaires (Zhong et al., 2010a). Les FT *AtVND1* à *AtVND7* sont spécifiquement exprimés dans les vaisseaux et induits lors de la différenciation de cultures cellulaires d'*Arabidopsis* en vaisseaux (Kubo et al., 2005; Yamaguchi et al., 2008). Ces gènes sont phylogénétiquement proches et appartiennent au sous-groupe des VND (VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN) (Ohtani et al., 2011; Zhu et al., 2012).

L'implication de ces gènes dans la régulation de la formation de la paroi secondaire spécifiquement dans les vaisseaux a été démontrée uniquement pour les gènes *VASCULAR RELATED NAC DOMAIN6* (*AtVND6*) et *AtVND7*, qui semblent avoir une fonction redondante (Yamaguchi et al., 2008, 2010a, 2011). *AtVND7* interagit avec *AtVND1*, *AtVND2*, et *AtVND3*, mais la fonction de ces gènes dans la différenciation des vaisseaux, n'est pas encore clairement définie (Yamaguchi and Demura, 2010; Hussey et al., 2013). Une étude récente a mis en évidence que tous les FT VNDs activent l'expression d'*AtVND7*, tandis que la réciproque n'est pas vraie. Ce qui suggère que *AtVND7* pourrait être positionné à la fin d'une cascade de régulations transcriptionnelles (Endo et al., 2015).

Les gènes *NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR 1* (*AtNST1*), *AtNST2* et *SECONDARY WALL ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN 1* (*AtSND1/AtNST3*), sont les trois autres régulateurs maîtres de la formation de la paroi secondaire caractérisés à ce jour (Ko et al., 2007; Mitsuda et al., 2007; Mitsuda and Ohme-Takagi, 2008). Ils sont exprimés dans les fibres, les racines et les siliques, mais leur expression n'est pas détectée dans les cultures de cellules qui se différencient en vaisseaux. Un triple mutant pour ces gènes présente une perte totale de la formation de la paroi secondaire dans les fibres du xylème tandis que les vaisseaux ne sont pas affectés (Zhong et al., 2006; Mitsuda et al., 2007; Zhong et al., 2007b; Mitsuda and Ohme-Takagi, 2008; Zhong and Ye, 2014). *AtNST1* et *AtNST2* sont également exprimés dans les cellules de l'endothécium des anthères et le double mutant ne forme plus de paroi secondaire dans ces types cellulaires (Mitsuda et al., 2005). Ces observations conduisent à affirmer que ces trois gènes sont impliqués dans la régulation de la formation de la paroi spécifiquement dans les fibres. Cependant, l'expression de *AtNST1* dans les stades précoces de la différenciation des vaisseaux et le profil du dépôt de paroi ressemblant à celle des vaisseaux dans les surexprimeurs *AtNST1*, ne permet pas d'exclure un rôle dans les vaisseaux également (Mitsuda et al., 2005, 2007).

Il est connu qu'une combinaison d'hormones, peptides mobiles et de FT de type bZIP de classe III, participent à déterminer le devenir des nouvelles assises cellulaires produites par le cambium (Schuetz et al., 2013; Partie 3.1). Cependant la paroi secondaire n'est pas mise en place dès les premières étapes de la différenciation. Ce qui implique l'existence de mécanismes moléculaires contrôlant l'expression spatio-temporelle des régulateurs maîtres de la formation de la paroi. Récemment, les gènes *ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30* (*AtASL19/AtLBD30*), *AtASL20/AtLBD18* et *VND-*

INTERACTING2 (*AtVNI2*), ont été identifiés comme régulateurs de l'expression des VNDs (Soyano et al., 2008; Yamaguchi et al., 2010b). Des lignées mutées dans le gène *AtWRKY12*, montrent un dépôt ectopique de paroi secondaire, associé à une activation des gènes reliés à la biosynthèse des composants de la paroi et une augmentation du niveau de l'expression d'*AtNST2* (Wang et al., 2010). L'hypothèse est que le FT *AtWRKY12* inhiberait la formation de la paroi secondaire en régulant négativement les régulateurs maitres NST. *AtMYB26* semble lui aussi réguler l'expression de *AtNST1* et *AtNST2* dans les anthères, contribuant au contrôle de la formation de la paroi secondaire (Yang et al., 2007).

En dépit d'une apparente spécificité cellulaire de ces régulateurs maitres, les travaux conduits ces dernières années suggèrent que l'essentiel de leurs cibles seraient communes. Les régulations induites par *AtVND6/AtVND7* et *AtNST2* sont largement communes à celles induites par *AtSND1/AtNST1*, bien qu'un certain nombre de cibles soient spécifiques à *AtVND6*, *AtVND7* ou *AtSND1* (Hussey et al., 2013). Notamment, *AtVND6/AtVND7* régulent la différenciation des vaisseaux en induisant les gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée, alors que ces derniers ne sont pas régulés par *AtSND1/AtNST1* qui contrôlent la différenciation des fibres (Ohashi-Ito et al., 2010; Zhong et al., 2010b). De plus, le couple *AtVND6/AtVND7* est impliqué dans une boucle de rétrocontrôle positif avec les FT *AtASL19* (ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN) et *AtASL20* (Soyano et al., 2008). Enfin, *AtVND7* interagit avec le répresseur *AtVNI2*, qui n'est pas détecté dans un autre type cellulaire que les vaisseaux (Yamaguchi et al., 2010b).

Ces régulateurs maitres du niveau 1 interviennent très en amont dans les voies de régulation de la formation de la paroi secondaire et régulent un ensemble de FT de niveau 2 (**Figure 12**) (Hussey et al., 2013) parmi lesquels *AtMYB46*, *AtMYB83* et *AtMYB103*, *AtXND1* et *AtSND3*, ainsi que *AtASL11* (Zhong et al., 2010b; Yamaguchi et al., 2011). *AtMYB46* et *AtMYB83* sont fonctionnellement redondants et sont les cibles de tous les régulateurs maitres cités précédemment. Ils sont exprimés dans les fibres et vaisseaux, et sont capables d'induire la formation d'une paroi secondaire lorsqu'ils sont surexprimés (Zhong et al., 2007a; Ko et al., 2009; McCarthy et al., 2009). Ils semblent donc former un carrefour de régulation s'appliquant directement aux FT du niveau 1 : *AtMYB43*, *AtMYB52*, *AtMYB54*, *AtMYB58* et *AtMYB63*, le trio de gènes redondants *AtMYB4/AtMYB7/AtMYB32*, le FT *AtC3H14* de type C3H-type zinc finger et le FT *AtKNAT7* de type homeobox (**Figure 12**) (Ko et al., 2009; McCarthy et al., 2009; Nakano et al., 2010; Zhong and Ye, 2012). *AtMYB46* et *AtMYB83* sont également capables de réguler directement des gènes impliqués dans la

biosynthèse de la paroi, l'organisation du cytosquelette, le transport vésiculaire et la mort cellulaire programmée (Zhong and Ye, 2012). *AtMYB103*, qui est phylogénétiquement proche d'*AtMYB61* et *AtMYB55* (Dubos et al., 2010), est une cible directe du régulateur maître *AtSND1*. *AtMYB103* régule la biosynthèse de la lignine, particulièrement la voie conduisant aux sous unités S (Öhman et al., 2013). *AtMYB61* semble également activer l'expression de gènes structuraux de façon directe, notamment les gènes reliés à la biosynthèse de lignine (Hussey et al., 2013). La répression dominante d'*AtMYB103* et *AtSND3* provoque une réduction du dépôt de paroi, mais leur surexpression n'entraîne pas un dépôt ectopique de paroi secondaire. Ils permettraient donc d'ajuster le dépôt de paroi, mais leur rôle n'est pas clairement défini (Zhong et al., 2008). *AtXND1* a été proposé comme régulateur négatif de la biosynthèse de paroi secondaire et de la mort programmée, mais sa fonction précise reste à définir (Zhao et al., 2008).

Des études fonctionnelles, et notamment des analyses de ChipSEQ et de simple hybride (Hussey et al., 2013), ont pu montrer que parmi les régulateurs les plus en aval du réseaux (niveau 1), on peut trouver deux groupes de FT : des régulateurs positifs et des régulateurs négatifs du dépôt de SCW. Les principaux régulateurs positifs sont *AtMYB43*, *AtMYB54*, *AtMYB58*, *AtMYB63*, *AtMYB20*, *AtMYB69*, *AtMYB79*, *AtMYB85*, *AtC3H14*, *AtSND2*, *AtBES1*. À l'inverse, *AtKNAT7*, *AtMYB4*, *AtMYB7*, *AtMYB32*, *AtMYB52* semblent réprimer la formation de la paroi secondaire (**Figure 12**) (Hussey et al., 2013). Il a été observé que la mutation du gène *AtMYB52* provoque une augmentation de la lignification dans les fibres du xylème, suggérant une fonction de répresseur de la lignification (Cassan-Wang et al., 2013). Lorsque un domaine conférant une activité de répression dominante est ajouté à *AtMYB52*, ainsi qu'à *AtMYB54* et *AtMYB69*, qui sont phylogénétiquement proches (Dubos et al., 2010), le phénotype observé est une réduction de l'épaisseur de paroi, tandis que des lignées qui surexpriment ces gènes ne montrent pas de phénotype (Zhong et al., 2008). Ce qui suggère qu'ils ne sont pas suffisants pour induire le dépôt de paroi, mais pourraient intervenir en complément de l'action d'autres régulateurs du niveau 1. Les gènes *AtMYB63*, *AtMYB58*, *AtMYB46* et *AtMYB83* semblent être directement régulés par les régulateurs maîtres *NST1* et *SND1* (Zhong and Ye, 2012). Ces FT présentent une redondance fonctionnelle et leur surexpression entraîne un dépôt de lignine ectopique sans que cela affecte la biosynthèse des polysaccharides pariétaux (Mele et al., 2003; Zhou et al., 2009; Mitsuda et al., 2010). Par conséquent, ils sont considérés comme des régulateurs positifs de la biosynthèse de lignine. Les gènes *AtMYB20*, *AtMYB43* et *AtMYB85* sont

phylogénétiquement proches, et clusterisent près du sous-groupe 3 qui contient *AtMYB63* et *AtMYB58* (Dubos et al., 2010). Ils sont également des cibles directes des régulateurs maitres, notamment *AtMYB20* dont l'expression est régulée par *AtSND1* (Zhong et al., 2008; Öhman et al., 2013). Ces trois FT, ainsi qu'*AtMYB79* sont généralement considérés comme capables de réguler la biosynthèse de lignine (Hussey et al., 2013), bien que cette régulation n'ait pu être mise en évidence que pour *AtMYB85* (Zhong et al., 2008).

Parmi les régulateurs négatifs, le trio de FT *AtMYB4/7/32*, sont caractérisés par la présence d'un motif répresseur de type ERF-associated amphiphilic repression (EAR), caractéristique des FT répresseurs chez les plantes (Ohta et al., 2001). Cependant, seul *AtMYB32* a été relié de façon directe à la formation de la paroi (Preston et al., 2004). Certaines données de caractérisation fonctionnelle suggèrent que ces gènes sont reliés à la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes (Jin et al., 2000; Preston et al., 2004). Le FT *AtKNAT7* est directement activé par les régulateurs maitres NAC de niveau 3 ainsi que *AtMYB46/83*. Il réprime les gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine (Zhong et al., 2008; Li et al., 2012).

D'autres FT tels que *AtC3H14* et *AtSND2* ont été associés, plus généralement, à la régulation de gènes impliqués dans la biosynthèse de plusieurs types de composants de la paroi secondaire (Hussey et al., 2013). Bien que positionné très en amont dans la voie de régulation de la différenciation du xylème, *AtBES1* est le seul FT de ce réseau pour lequel une liaison aux promoteurs de gènes de *CesA* nécessaires à la biosynthèse de la paroi secondaire, a été démontrée (Xie et al., 2011). Par ailleurs, de nombreux FT de types bZIP, homeodomain, BEL1-like et zinc-finger ont été listés comme cibles des FT *AtMYB46* et *AtMYB83*, mais n'ont pas été reliés à la biosynthèse de la paroi (Zhong and Ye, 2012).

Les analyses globales de transcriptomique et d'interaction ADN-protéines, conduites ces dernières années, suggèrent que les réseaux de régulation contrôlant le dépôt de paroi sont bien plus complexes que ce qui est connu. Dans ces approches, l'utilisation de réseaux de corrélation notamment, a permis de mettre en évidence de nombreux régulateurs dont la fonction reste inconnue (Yang et al., 2011; Taylor-Teeple et al., 2015; Shi et al., 2010; Zinkgraf et al., 2017; Mizrachi et al., 2017).

3.2.3. Conservation du réseau de régulation du dépôt de paroi chez les espèces pérennes

Plusieurs études conduites chez des espèces pérennes telles que le peuplier et l'*Eucalyptus*, suggèrent que ces voies de régulation décryptées chez la plante herbacée *Arabidopsis*, sont conservées chez les arbres (Zhang et al., 2014). Chez le peuplier, 16 gènes sont phylogénétiquement proches des régulateurs maitres de type NAC (NST/SND/VND). Ils sont généralement nommés *PtVNS* (*P. trichocarpa* VND-, NST/SND-, SMB-related proteins) ou *PtWNDs* (wood-associated NAC domain). Parmi ces gènes, les orthologues d'*AtSND1* chez le peuplier (*PtWND2B* et *PtWND6B*) sont capables d'induire un dépôt ectopique de paroi secondaire et complètent le double mutant *snd1 nst1* d'*Arabidopsis* (Zhong et al., 2011). Parmi les 8 gènes qui sont proches phylogénétiquement des *AtVND*, l'orthologue d'*AtVND7* (*PtVNS07/PtWND6A*) semble réguler le dépôt de paroi secondaire chez le peuplier (Ohtani et al., 2011).

Parmi les régulateurs du niveau 2, des orthologues du gène *AtMYB46* ont été décrits dans de nombreuses espèces dont des monocotylédones telles que le riz (*OsMYB46*) et le maïs (*ZmMYB46*) (Zhong et al., 2011). Les premiers orthologues d'*AtMYB46* ont été caractérisés chez le pin (*PtMYB4*; Patzlaff et al., 2003), puis chez l'*Eucalyptus* (*EgMYB2*; Goicoechea et al., 2005). La surexpression d'*EgMYB2* chez le tabac entraîne une induction des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine, une modification du ratio S/G, ainsi qu'une induction des gènes reliés à la biosynthèse de la cellulose et des hémicelluloses. Les auteurs ont également démontré qu'*EgMYB2* est capable de se lier aux promoteurs des gènes d'*Eucalyptus* *EgCCR* et *EgCAD2*, impliqués dans la biosynthèse de lignine, et d'activer leur transcription (Goicoechea et al., 2005). Plus récemment, il a été démontré qu'*EgMYB2* complète le double mutant *myb46 myb83* d'*Arabidopsis* (Zhong and Ye, 2009). La conservation du jeu de régulateurs *AtMYB46/AtMYB83*, chez les arbres, a à nouveau été démontrée lors de la caractérisation de leurs orthologues *PtMYB2/PtMYB21* et *PtMYB3/PtMYB20*, qui assurent une fonction similaire chez le peuplier (McCarthy et al., 2010; Zhong et al., 2013). Toujours chez le peuplier, les orthologues fonctionnels d'*AtXND1* et *AtSND2/3* jouent également un rôle dans la régulation de la formation de la paroi secondaire (Grant et al., 2010).

Le FT de l'*Eucalyptus* *EgMYB1*, appartient au sous-groupe 4, qui est constitué de régulateurs de la voie des phénylpropanoïdes chez *Arabidopsis* (*AtMYB4*, *AtMYB7*, *AtMYB32*) (Soler et al., 2015). *EgMYB1* a été le premier membre de ce sous-groupe à être relié à la synthèse de lignine pour la formation de la paroi secondaire (Legay et al., 2007, 2010). Il est

capable de se lier aux promoteurs des gènes *EgCCR* et *EgCAD2* pour réguler négativement leur transcription (Legay et al., 2007). Sa surexpression chez *Arabidopsis* et le peuplier entraîne une réduction de l'épaisseur de paroi associée à une plus faible accumulation de lignine dans le xylème (Legay et al., 2010). Plus récemment, il a été découvert qu'*EgMYB1* interagit avec l'histone linker EgH1.3 pour inhiber l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de lignine, ce qui suggère que cette régulation pourrait être associée à un mécanisme de remodelage de la chromatine (Soler et al., 2016). La caractérisation fonctionnelle récente des orthologues d'*EgMYB1* chez le peuplier (*PtMYB156/PtMYB221*), a confirmé leur activité de répresseurs de la formation de la paroi secondaire (Tang et al., 2015; Yang et al., 2017). Parmi les nombreux FT du niveau 3, les paires de FT *PtMYB216/170* orthologues d'*AtMYB61*, *PtMYB92/125* orthologues d'*AtMYB42*, *PtMYB90/167* orthologues d'*AtMYB52* et *PtMYB10/128* orthologues d'*AtMYB103*, ainsi que l'orthologue d'*AtKNAT7* ont été caractérisés chez le peuplier (Li et al., 2012; Chai et al., 2014; Li et al., 2015).

Ces études suggèrent que 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. Par exemple, le FT *EgMYB1* est impliqué dans le contrôle du dépôt de lignine dans le xylème de l'*Eucalyptus*, tandis que son plus proche orthologue chez *Arabidopsis* (*AtMYB4*) ne semble pas impliqué dans ce processus, mais dans la régulation de la synthèse des phénylpropanoïdes lors de la réponse au stress UV (Jin et al., 2000; Legay et al., 2010). Il a également été constaté l'existence de sous-groupes de FT de type MYB détectés préférentiellement chez les arbres (Soler et al., 2015). Ces données laissent supposer qu'il pourrait exister des mécanismes de régulation de la formation de la paroi secondaire, spécifiques aux espèces ligneuses. Ces régulations pourraient intervenir dans la formation de la paroi dans des tissus ou des conditions spécifiques.

4. Plasticité de la formation du bois dans l'adaptation aux contraintes environnementales

4.1. Quelles contraintes environnementales ?

Dans leur environnement naturel, les plantes doivent faire face à une variété de stress biotiques et abiotiques. Parmi les stress abiotiques les plus fréquemment rencontrés, la sécheresse et le froid, sont responsables de très fortes réductions du rendement en agriculture (Wang et al., 2013). Dans de nombreuses régions du monde, ils représentent également une

contrainte majeure affectant la croissance des plantes pérennes, y compris l'*Eucalyptus* (Teulieres et al., 2007). Le froid et la sécheresse étant les deux facteurs qui limitent le plus l'implantation de ce ligneux dans certaines régions du monde (Teulière et al., 2007). Par ailleurs, les espèces d'*Eucalyptus* les plus productives sont cultivées en zones tropicales et subtropicales, où il est prédit que les changements climatiques altéreront les régimes de précipitation et de températures, exacerbant les épisodes de sécheresse et de températures extrêmes (Wu et al., 2011).

Pour faire face aux contraintes environnementales, les plantes ont élaboré des réseaux de signalisation complexes qui consistent en (1) la perception des signaux de l'environnement, (2) l'activation des voies de transduction du signal et (3) l'induction d'une réponse génétique en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation de la physiologie en vue de la mise en place d'un état de tolérance. Les mécanismes de perception de ces stress par la cellule ne sont pas encore clairement démontrés. Dans le cas du stress froid, il a été avancé qu'il pourrait être perçu directement au niveau de la membrane plasmique, via des changements dans les propriétés physicochimiques de celle-ci, et notamment dans sa fluidité, impliquant la réorganisation du cytosquelette et l'activation de canaux calciques (Plieth et al., 1999; Huang et al., 2012; Knight and Knight, 2012). Chez *Arabidopsis*, il a été proposé que le stress osmotique induit par le manque d'eau, serait perçu notamment par l'histidine kinase *AtAHK1* localisée dans la membrane plasmique (Tran et al., 2007; Osakabe et al., 2014).

En aval de ces mécanismes de perception, les FT de type DREB (drought-responsive element binding) qui appartiennent à la famille AP2/ERF (Apetala 2/ethylene-responsive factor), ont pour rôle de réguler l'expression des gènes impliqués dans la protection (Licausi et al., 2013). Ils sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN conservé de type AP2, pour la liaison aux éléments *cis* de type DRE/CRT (C-repeat factor) dans le promoteur des gènes cibles (Stockinger et al., 1997; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). Chez *Arabidopsis*, les FT de type DREB2 sont principalement impliqués dans la mise en place de la tolérance à la déshydratation ou aux fortes températures (Xu et al. 2011). Le deuxième groupe, les FT DREB1 ou CBF (C-repeat binding factor), sont impliqués dans la tolérance au gel (Miller et al., 2006; Lata and Prasad, 2011; Dhillon and Stockinger, 2013; Motomura et al., 2013; Park et al., 2015). Dans le cas de l'*Eucalyptus*, 17 gènes composent la famille CBF, ce qui est beaucoup plus que chez *Arabidopsis*, et seulement 6 gènes à la famille DREB2 (Cao et al., 2015; Nguyen et al., 2017). La surexpression ectopique d'un des *EgCBF*, entraîne des modifications de la croissance similaires à celles observées lors d'une acclimatation au

froid, dont : une augmentation de la résistance au froid associée à une réduction de la croissance (Navarro et al., 2011). Un effet similaire a été observé dans d'autres espèces pérennes (Benedict et al., 2006; Siddiqua and Nassuth, 2011; Tillett et al., 2012; Artlip et al., 2013; Wisniewski et al., 2015). Ceci suggère que ces FT induisent des mécanismes de protection, mais également des régulations dans les processus développementaux. Ce contrôle de la croissance par les CBFs pourrait être contrôlée par la régulations des voies de signalisation des gibbérellines et des cytokinines (Achard et al., 2006, 2008; Huang et al., 2009). Bien que les CBFs soient principalement induits en réponse au froid et les DREB2 principalement induits en réponse au stress osmotique, un nombre croissant d'études mettent en évidence des régulations croisées entre ces deux voies de réponse (Lata and Prasad, 2011; Huang et al., 2012; Yoshida et al., 2014). Chez l'*Eucalyptus*, des membres des deux groupes sont induits en réponse au froid et à la sécheresse, suggérant que certaines adaptations sont similaires entre ces deux stress (Nguyen et al., 2017).

4.2. Impact de ces stress sur la formation du bois

Dans les nombreuses études menées sur la réponse des plantes aux stress abiotiques, la paroi a reçu moins d'attention que les réponses moléculaires impliquées dans la préservation des processus biologiques cellulaires. De nombreuses études s'accordent à dire que la paroi joue également un rôle dans la mise en place de la résistance à des stress tels que la sécheresse ou le froid (Moura et al., 2010; Cabane et al., 2012; Gall et al., 2015).

Le plus souvent, l'exposition au froid ou au manque d'eau, semble activer les voies de biosynthèse de la paroi dans des organes tels que les feuilles et les racines. Pour la paroi primaire, une augmentation de la synthèse des hémicelluloses, et parfois de cellulose, est observée. Généralement, les auteurs relient ce phénomène à des changements de potentiel osmotique et des ajustements dans la croissance (Gall et al., 2015). Les études de l'adaptation de la paroi secondaire des cellules du système vasculaire sont plus rares, et suggèrent le plus souvent une augmentation de la biosynthèse de lignine en réponse aux stress (Moura et al., 2010; Cabane et al., 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.

Dans le cas de l'exposition au froid, la majorité de ces observations sont parcellaires, parfois contradictoires, et reposent 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 (Hausman

et al., 2000; Moura et al., 2010; Cabane et al., 2012; Domon et al., 2013). En ce qui concerne la réponse à la sécheresse dans le xylème, la majorité des études conduites chez les espèces pérennes se sont concentrées sur les modifications structurales du système conducteur (Vander Willigen and Pammenter, 1997; Awad et al., 2010; Plavcová and Hacke, 2012; Pattathil et al., 2016; Fonti et al., 2013; Eldhuset et al., 2013), et suggèrent le plus souvent une activation de la biosynthèse de paroi (Arend and Fromm, 2007). Cependant, très peu de données sont disponibles quant à l'impact de la sécheresse sur la régulation transcriptionnelle de la biosynthèse de paroi secondaire (Gall et al., 2015).

Par ailleurs, un nombre croissant d'études mettent en lien l'adaptation au manque d'eau et le régime de fertilisation minérale (Wang et al., 2013). Le potassium notamment est connu pour être un ion essentiel dans le développement du bois (Fromm, 2010), mais également dans les processus d'adaptation des plantes aux stress (Cakmak, 2005; Wang et al., 2013). Il a récemment été montré que sa disponibilité impacte la croissance de l'*Eucalyptus*, et son adaptation au manque d'eau (Laclau et al., 2009; Battie-Laclau et al., 2014, 2016). Mais les régulations transcriptionnelles induites dans le développement du xylème secondaire d'arbres fertilisés et soumis au manque d'eau n'ont pas été étudiées.

Des gènes impliqués à la fois dans le contrôle de la tolérance aux stress abiotiques et de la formation de la paroi secondaire commencent à être identifiés. Par exemple, la surexpression de *MYB46* chez le bouleau, impacte à la fois la tolérance et le dépôt de paroi secondaire (Guo et al., 2017). De même, les lignées d'*Eucalyptus* surexprimant un CBF, présentent des modifications de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire ainsi qu'une meilleure résistance aux stress (Navarro et al., 2011).

4.3. Cas du bois de réaction

La formation du bois de réaction en réponse à une contrainte mécanique, est l'exemple le plus marquant et le mieux caractérisé de l'impact d'un stress abiotique sur la formation du bois. Le bois de réaction est généralement formé en réponse à une orientation non verticale de la tige, inclinaison qui peut être causée par différents facteurs externes. Dans le processus de développement, ce type de bois est produit dans le but réorienter la tige pour une croissance verticale. Chez les angiospermes il est caractérisé par une croissance excentrique dans la zone de la tige maintenue en tension, par la stimulation de l'activité cambiale sur la face supérieure (bois de tension) et l'inhibition de la croissance sur la face inférieure (bois de compression) (Hellgren et al., 2004). Chez de nombreux angiospermes tels que l'*Eucalyptus* et le peuplier,

le bois de tension se distingue du bois normal, par des changements drastiques dans sa composition et sa structure (Jourez et al., 2001; Toghraie et al., 2006). Lors de sa mise en place, la modulation de l'activité cambiale est accompagnée d'une réduction de la production de nouveaux vaisseaux au profit des fibres, et des changements dans leur morphologie (Jourez et al., 2001). Le bois de tension est caractérisé par des modifications importantes dans le programme de biosynthèse de la paroi secondaire des cellules qui le composent. Les changements les plus remarquables sont une réduction de l'épaisseur des différentes couches de la paroi secondaire, une réduction de l'angle des microfibrilles de cellulose et le remplacement de la couche S3 par une couche G (Jourez et al., 2001; Pilate et al., 2004; Mellerowicz and Sundberg, 2008). La couche G est mise en place par les fibres et représente un volume conséquent qui peut occuper une grande part de la lumière de ces cellules. Elle est composée exclusivement de polysaccharides, dont principalement de la cellulose ayant un angle faible par rapport à l'axe longitudinal de la cellule, et qui est responsable de la mise en tension du xylème secondaire (Jourez et al., 2001).

Dans l'étude de la réponse du xylème secondaire aux contraintes environnementales, la formation du bois de tension est la réponse la mieux caractérisée au niveau anatomique et mais également moléculaire. Bien que les mécanismes de perception qui en sont à l'origine restent mal connus, les régulations transcriptionnelles et métaboliques induites ont largement été étudiées (Pilate et al., 2004; Paux et al., 2005; Mellerowicz et al., 2006; Mizrachi et al., 2015). Ces études ont mis en évidence une reprogrammation du processus de dépôt de paroi en réponse à ce stress. Avec notamment des régulations négatives d'un ensemble de gènes impliqués dans la biosynthèse de lignine et des hémicelluloses. Par ailleurs, les analyses transcriptomiques effectuées sur le bois de tension, ont permis l'identification de nombreux gènes impliqués dans la formation et la réorganisation de la paroi chez le peuplier. Certains de ces gènes semblent spécifiquement impliqués dans la réorganisation de la paroi dans la réponse à ce type de stress (Andersson-Gunnerås et al., 2006; Mizrachi et al., 2015).

5. L'étude de la formation du bois chez l'*Eucalyptus* est un enjeu stratégique

5.1. L'*Eucalyptus* est le feuillu le plus planté au monde

Le genre *Eucalyptus* est natif d'Australie et Nouvelle Guinée où la plupart des climats sont représentés. Ils sont implantés naturellement du niveau de la mer jusqu'en altitude, dans des zones humides, tempérées et semi-arides (Eldridge, 1994). Avec environ 700 espèces, ce genre présente une adaptabilité remarquable à une variété de climats. L'Australie ayant un

climat globalement chaud, la majorité des espèces ont une bonne tolérance aux conditions arides, mais ne sont pas résistantes aux conditions gélives. Hormis quelques espèces d'altitude, l'*Eucalyptus* n'est pas adapté au froid intense. Bien que ses mécanismes d'acclimatation apparaissent très efficaces (Keller et al.; Nguyen et al., 2017), sa croissance opportuniste du fait de l'absence d'endodormance et la persistance de ses feuilles en hiver, le rendent très vulnérable aux gelées hivernales. Par ailleurs, le fait qu'il dispose d'un lignotuber, lui donne la possibilité de produire des rejets de la souche suite à la coupe, ce qui le rend adéquat pour la culture en taillis.

Cette grande diversité a permis l'introduction de l'*Eucalyptus* dans plus de cent pays aux climats très variés. Il représente actuellement environ 8% des forêts plantées dans le monde, avec une implantation en constante progression (Rockwood et al., 2008). Ceci en fait le feuillu le plus planté avec plus de 20 millions d'hectares de plantations (Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2011; Myburg et al., 2014). Quatre espèces, *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. globulus*, et leurs hybrides, représentent 80% de ces plantations (Teulières et al., 2007). L'*Eucalyptus grandis* et des hybrides *E. grandis* x *E. urophylla*, sont les plus plantés dans des régions tropicales et subtropicales d'Amérique du sud, d'Afrique et d'Asie. *Eucalyptus globulus* est l'espèce la plus plantée en régions tempérées, autour du bassin méditerranéen, au Portugal, Espagne, Chili et Australie, tandis qu'*Eucalyptus camaldulensis* est principalement planté dans des zones semi-arides à arides (Afrique du nord par exemple). Dans des régions froides d'Europe, telles que la France, ou d'Amérique du Nord, *Eucalyptus gunnii* est cultivé en tant qu'espèce pure ou utilisé pour l'introggression de la tolérance au gel dans des espèces à plus forte productivité telles qu'*E. dalrympleana* (hybrides *E. gunnii* x *E. dalrympleana*, souvent nommé *E. gundal*).

La plus grande part des plantations d'*Eucalyptus* se trouvent en zones tropicales et subtropicales où l'*E. grandis* (W. Hill ex Maiden) assure des rendements de production records dépassant les $70\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{an}^{-1}$ sur des plantations à temps de rotation courts (6 à 8 ans) (Rockwood et al., 2008). Au Brésil, sur les 170 millions de m^3 de bois consommés, environ 80% correspondent à du bois d'*Eucalyptus*. Ce bois est utilisé principalement pour la production de pâte à papier (36.1%), comme source d'énergie par combustion directe (26.3%) ou production de charbon (10%), et comme bois d'œuvre ou d'ameublement (26.2%) (Gonçalves et al., 2013). Ces très fortes productions et les propriétés exceptionnelles du bois de certaines espèces, font de l'*Eucalyptus* une excellente source de biomasse pour la production de bioénergie. Que ce soit par combustion ou pour la production de produits

dérivés de la cellulose tels que les biocarburants de seconde génération, la production de bioénergie représente un enjeu économique considérable dans une période où la demande d'énergie à l'échelle mondiale explose (Rockwood et al., 2008; Carroll and Somerville, 2009; Mizrachi et al., 2012). Par conséquent, on observe une forte implication des entreprises privées dans les programmes de sélection variétale, ainsi que dans les approches de biotechnologies qui ont pour but d'optimiser la qualité de la biomasse ainsi que les processus industriels de transformation.

5.2. Différents outils pour l'amélioration génétique sont disponibles

De par sa très large implantation au niveau mondial et son mode de culture en temps de rotation courts, il est de plus en plus désigné comme une espèce de grande culture ligneuse (Hinchee et al., 2009). À ce titre, il bénéficie de programmes d'amélioration génétique initiés depuis une trentaine d'années (Sederoff et al., 2009). Par des approches de génétique classique, plusieurs régions du génome, ou QTLs (quantitative trait *loci*), ont été associées à la croissance (Grattapaglia et al., 2009). Par exemple, la propagation de l'*Eucalyptus* se faisant généralement par bouturage, des QTLs pour la capacité à enraciner, à rejeter et pour la croissance de la tige, ont été détectés chez plusieurs espèces d'*Eucalyptus* (*E. grandis*, *E. globulus* notamment) (Grattapaglia et al., 1995; Marques et al., 1999). Des QTLs ont également été décrits pour la croissance et la qualité du bois chez *E. grandis* (Grattapaglia et al., 1996; Kirst et al., 2004). L'accès aux phénotypes moléculaires comme la quantification des transcrits des gènes par exemple, apportent des informations complémentaires aux données obtenues par des approches de génétique classique. Les données génomiques peuvent alors être analysées comme des traits moléculaires quantitatifs. Ce qui permet d'identifier des *loci* qui contribuent à la variation de l'expression de certains gènes, nommés QTL d'expression ou eQTL. Ces données peuvent ensuite être intégrées dans un modèle en prenant en compte des interactions avec a priori (appartenance à des voies métaboliques, interactions protéine-protéine ou sens de régulation) et des traits phénotypiques (croissance, qualité du bois) (Mizrachi and Myburg, 2016; Mizrachi et al., 2017).

Le fait que le génome de l'*Eucalyptus* ait récemment été séquencé (Myburg et al., 2014), permet également la conduite d'approches de génomique et l'identification de gènes candidats dans la formation du bois notamment. Ceci a encouragé la mise en place de différentes approches de transgénèse pour la caractérisation fonctionnelle de ces gènes (Tournier et al., 2003; Plasencia et al., 2015). Bien que longue, sa transformation stable via la

régénération de plantes entières est possible (Tournier et al., 2003; Navarro et al., 2009). Récemment un protocole de transformation plus rapide a été mis au point au laboratoire (Balasubramanian et al., 2011; Plasencia et al., 2015). Il permet la production de plantes composites dont seules les racines sont transformées. Ceci représente un excellent modèle d'étude de la formation de la paroi secondaire des cellules du xylème (Plasencia et al., 2015).

6. Hypothèses et objectifs de la thèse

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 et de la différenciation des cellules du xylème. L'ensemble de ces gènes est régulé par des signaux endogènes faisant intervenir un réseau complexe de FT, qui n'est que partiellement décrypté. Les données disponibles dans la littérature suggèrent que des contraintes environnementales pourraient agir en tant que signaux exogènes capables d'influencer la xylogénèse et de permettre l'adaptation des arbres à leur environnement. Cette réponse pourrait impliquer des gènes régulateurs se trouvant à l'interface entre les voies de réponse aux stress et les mécanismes assurant la formation du bois.

Dans le contexte de changement climatique, il est prédit une augmentation de l'occurrence des épisodes prolongés de sécheresse et/ou de froid. Or ce sont les principales contraintes environnementales qui affectent la croissance de l'*Eucalyptus*, et par conséquent son exploitation. Étant donné l'importance économique que représente l'*Eucalyptus*, il apparaissait essentiel d'évaluer l'impact de ces stress sur la formation du bois, pour que ces informations soient prises en compte lors de la sélection de nouveaux génotypes.

Les objectifs de mon projet de thèse étaient :

- (1) de caractériser l'effet de stress abiotiques sur la composition et la structure du bois;**
- (2) d'analyser et de comprendre les régulations qui sont impliqués dans le remodelage de la paroi secondaire en réponse à ces stress, pour identifier les régulateurs clés impliqués dans cette réponse;**
- (3) caractériser la fonction de ces régulateurs dans la formation du bois.**

Pour répondre à ces objectifs, j'ai mis en place les stratégies suivantes :

- (1) L'étude de jeunes *Eucalyptus* en conditions contrôlées et d'arbres au champ soumis à des températures basses, des restrictions d'eau ou de nutriments;**

- (2) **L'intégration de données globales par des approches de réseaux de corrélation afin de mettre en évidence les gènes potentiellement impliqués dans les réponses observées;**
- (3) **La caractérisation fonctionnelle de ces gènes candidats en les surexprimant chez le peuplier ou l'*Eucalyptus*.**

Ces stratégies sont décrites plus en détails dans les paragraphes 6.1 et 6.2 ci-dessous.

6.1. Analyse des réseaux de régulation impliqués dans le contrôle de la formation du bois en conditions de stress abiotiques

6.1.1. Caractérisation de l'effet du froid sur la formation du bois chez *E. gundal*

Les données de la littérature, ainsi que les résultats préliminaires obtenus dans l'équipe, suggéraient des modifications dans la dynamique de formation du xylème, ainsi que dans le métabolisme de la paroi secondaire en réponse au froid. Mon premier objectif a donc été d'analyser les changements dans la structure et la composition du xylème secondaire, par des techniques d'histochimie et des dosages de lignine (klason, thioacidolyse), sur des tiges de clones d'*E. gundal* soumis à une exposition au froid prolongée, en conditions contrôlées ou au champ. J'ai pu constater une modification des mécanismes de différenciation des cellules du xylème localisées sous le cambium en réponse au froid, qui se traduisaient par des modification profonde du dépôt de la paroi secondaire.

Afin de renforcer ces observations, j'ai analysé l'expression des gènes (RT-qPCR) encodant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des différents composants de la paroi secondaire ainsi que des FT régulant la formation de la paroi (principalement de types MYB et NAC).

Enfin, à partir de données d'expression de plus de 250 gènes dans plus de 30 conditions différentes (incluant différents tissus et différentes conditions de stress), acquises avant mon arrivée dans l'équipe, j'ai généré des réseaux de co-régulation afin de mettre en évidence les FT potentiellement impliqués dans les réponses observées en condition de stress froid. Une vingtaine de gènes MYB, dépourvus d'orthologues proches chez *Arabidopsis* et n'ayant jamais été caractérisés dans d'autres espèces, sont ressortis de cette étude.

Cette approche, présentée dans le **Chapitre I**, a fait l'objet d'une publication récemment acceptée dans la revue internationale à comité de lecture "Tree Physiology".

6.1.2. Caractérisation de l'effet de la sécheresse combinée à différents régimes nutritifs sur la formation du bois chez *E. grandis*

La première partie de ma thèse a révélé plusieurs FT régulés par le froid et potentiellement impliqués dans des mécanismes de régulation de la formation du bois en réponse à ce stress. Les données obtenues dans l'équipe avant mon arrivée, suggéraient que certains de ces FT répondaient également à d'autres stress abiotiques tels que la sécheresse, le stress mécanique ou l'apport en nutriments azotés. Par conséquent, j'ai voulu déterminer si une partie des mécanismes régulant la formation du bois n'étaient pas communs à plusieurs stress et s'il serait possible d'identifier les régulations concernées, au niveau transcriptionnel et métabolique.

Au travers d'une collaboration avec le CIRAD de Montpellier et un laboratoire Brésilien de l'université de Sao Paulo, j'ai eu l'opportunité de partir pendant 3 mois au Brésil pour analyser la formation du bois d'*Eucalyptus* soumis à des stress abiotiques, dans le cadre d'un système expérimental unique au monde.

Dans ce système, des clones d'*E. grandis* ont été soumis à une exclusion de l'eau de pluie (de 33%) conduisant à une sécheresse modérée, combinée à différents régimes nutritifs (fertilisation minimale, fertilisation au potassium, fertilisation au sodium). J'avais pour objectif de caractériser les modifications induites dans la composition et la structure du xylème de ces arbres, par des approches de microscopie et de dosage biochimiques (teneur en lignine, rendement de saccharification), combinées à des analyses transcriptomiques et métabolomiques. Profondément impliqué dans le projet Agropolis-Capes, visant à intégrer des données globales de transcriptomique, de métabolomique et d'écophysiologie obtenues sur ces arbres, j'ai, dans un second temps, développé des approches de biologie des systèmes dans le but d'identifier des FTs impliqués dans le contrôle de la formation du bois en réponse au manque d'eau et à la fertilisation. Cette étude, présentée dans le **Chapitre II**, décrit l'effet combiné de la restriction d'eau et de la fertilisation au potassium sur le dépôt de paroi et son impact sur les propriétés physico-chimiques du bois. Un réseau complexe de FTs, dont certains sont communs avec la première partie de mon étude, a révélé des gènes candidats dont la caractérisation fonctionnelle suggère un rôle central dans la formation du bois en condition de stress abiotiques.

L'ensemble de ces résultats, présentés sous forme de manuscrit d'article (**Chapitre II**), doit être valorisé très prochainement.

6.2. Caractérisation fonctionnelle de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la formation du bois en condition de stress abiotiques

Les deux approches présentées précédemment devaient permettre l'identification de FT candidats non caractérisés et potentiellement impliqués dans le contrôle de la formation du bois en condition de stress. Durant mon doctorat, j'ai entamé la caractérisation fonctionnelle de ces candidats dans des lignées de plantes transgéniques. La transformation de l'*Eucalyptus* étant longue et fastidieuse, nous avons choisi de sur-exprimer les gènes candidats dans un système hétérologue, chez le peuplier, ou dans un système homologue, des racines transgéniques d'*Eucalyptus*. En effet, j'ai pu bénéficier d'une technique récemment mise en place au sein de l'équipe visant à développer un système de transformation stable, efficace et rapide, afin procéder à la caractérisation fonctionnelle de gènes d'intérêt potentiellement impliqués dans la formation du bois chez l'*Eucalyptus*. Cette technique consiste à transformer des plantules d'*E. grandis* par *A. rhizogenes*, générant ainsi des racines transgéniques sur-exprimant le gène cible. Il est alors possible d'étudier, dans ces racines, le développement du xylème qui est analogue à celui observé dans la tige.

Cinq gènes de la famille des MYB-R2R3 ont été choisis : *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64*, *EgMYB68* et *EgMYB137*. La fonction de ces gènes étant totalement inconnue, mon premier objectif a été d'analyser l'expression spatio-temporelle de leur promoteur fusionné au gène rapporteur encodant le gène GUS (β -glucuronidase). Le deuxième objectif était de tester la capacité de ces gènes à réguler la formation du bois via l'analyse de la croissance, de la structure, de la composition ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la formation du bois, dans la tige ou les racines de lignées sur-exprimant ces gènes candidats.

Les résultats concernant *EgMYB137* ont été intégrés dans le projet de publication du Chapitre II. Les observations réalisées sur les gènes *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68*, sont présentées dans le **Chapitre III**.

7. Références

- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., and Harberd, N.P. (2006). Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals. *Science* (80-.). **311**.
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008). The Cold-Inducible CBF1 Factor-Dependent Signaling Pathway Modulates the Accumulation of the Growth-Repressing DELLA Proteins via Its Effect on Gibberellin Metabolism. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 2117–2129.
- Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., Bovet, L., Lee, Y., Geldner, N., Fernie, A.R., and Martinoia, E. (2012). AtABCG29 Is a Monolignol Transporter Involved in Lignin Biosynthesis. *Curr. Biol.* **22**: 1207–1212.
- Andersson-Gunnerås, S., Mellerowicz, E.J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P.M., Nilsson, P., Henrissat, B., Moritz, T., and 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. *Plant J.* **45**: 144–165.
- Arend, M. and Fromm, J. (2007). Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiol.* **27**: 985–92.
- Arioli, T. et al. (1998). Molecular Analysis of Cellulose Biosynthesis in Arabidopsis. *Science* (80-.). **279**.
- Artlip, T.S., Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Norelli, J.L., A, N., P-B, C., A, B., S, R., and SA, K. (2013). CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. *Tree Physiol.* **33**: 866–877.
- Awad, H., Barigah, T., Badel, E., Cochard, H., and Herbette, S. (2010). Poplar vulnerability to xylem cavitation acclimates to drier soil conditions. *Physiol. Plant.* **139**: 280–288.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, a, Wisman, E., Altamura, M.M., Ruberti, I., and Morelli, G. (2001). The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**: 643–55.
- Balasubramanian, A., Venkatachalam, R., Selvakesavan, K.R., Mary, A., Gherbi, H., Svistoonoff, S., Franche, C., Bogusz, D., Krishna Kumar, N., and Nambiar-Veetil, M. (2011). Optimisation of methods for *Agrobacterium rhizogenes* mediated generation of composite plants in *Eucalyptus camaldulensis*. *BMC Proc.* **5**: O45.
- Baskin, T., Betzner, A., Hoggart, R., Cork, A., and Williamson, R. (1992). Root Morphology Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**: 427.
- Battie-Laclau, P., Delgado-Rojas, J.S., Christina, M., Nouvellon, Y., Bouillet, J.-P., Piccolo, M. de C., Moreira, M.Z., Gonçalves, J.L. de M., Rounsard, O., and Laclau, J.-P. (2016). Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *For. Ecol. Manage.* **364**: 77–89.
- Battie-Laclau, P., Laclau, J.-P., Domec, J.-C., Christina, M., Bouillet, J.-P., de Cassia Piccolo, M., de Moraes Gonçalves, J.L., e Moreira, R.M., Krusche, A.V., Bouvet, J.-M., and Nouvellon, Y. (2014). Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytol.* **203**: 401–13.
- Baucher, M., El Jaziri, M., and Vandeputte, O. (2007). From primary to secondary growth: origin and development of the vascular system. *J. Exp. Bot.* **58**: 3485–3501.
- Benedict, C., Skinner, J.S., Meng, R., Chang, Y., Bhalerao, R., Huner, N.P.A., Finn, C.E., Chen, T.H.H., and Hurry, V. (2006). The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulon and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp. *Plant. Cell Environ.* **29**: 1259–72.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., Borrega, N., Hervé, J., Blondet, E., Balzergue, S., Lapierre, C., and Jouanin, L. (2011). Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* **23**: 1124–37.

- Biswal, A.K. et al.** (2015). Downregulation of GAUT12 in *Populus deltoides* by RNA silencing results in reduced recalcitrance, increased growth and reduced xylan and pectin in a woody biofuel feedstock. *Biotechnol. Biofuels* **8**: 41.
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., and Sundberg, B.** (2007). Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J.* **52**: 499–511.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Bollhöner, B., Prestele, J., and Tuominen, H.** (2012). Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *J. Exp. Bot.* **63**: 1081–94.
- Boudet, A.M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., and Goffner, D.** (2003). Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* **8**: 576–81.
- Bourquin, V., Nishikubo, N., Abe, H., Brumer, H., Denman, S., Eklund, M., Christiernin, M., Teeri, T.T., Sundberg, B., and Mellerowicz, E.J.** (2002). Xyloglucan endotransglycosylases have a function during the formation of secondary cell walls of vascular tissues. *Plant Cell* **14**: 3073–88.
- Brown, D., Wightman, R., Zhang, Z., Gomez, L.D., Atanassov, I., Bukowski, J.-P., Tryfona, T., McQueen-Mason, S.J., Dupree, P., and Turner, S.** (2011). Arabidopsis genes IRREGULAR XYLEM (IRX15) and IRX15L encode DUF579-containing proteins that are essential for normal xylan deposition in the secondary cell wall. *Plant J.* **66**: 401–413.
- Brown, D.M., Goubet, F., Wong, V.W., Goodacre, R., Stephens, E., Dupree, P., and Turner, S.R.** (2007). Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *Plant J.* **52**: 1154–1168.
- Brown, D.M., Zeef, L.A.H., Ellis, J., Goodacre, R., and Turner, S.R.** (2005). Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *17*: 2281–2295.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** Biochemistry and molecular biology of plants.
- Cabane, M., Afif, D., and Hawkins, S.** (2012). Chapter 7 – Lignins and Abiotic Stresses. In *Advances in Botanical Research*, pp. 219–262.
- Cakmak, I.** (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**: 521–530.
- Cao, P.B., Azar, S., SanClemente, H., Mounet, F., Dunand, C., Marque, G., Marque, C., and Teulière, 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**: e0121041.
- Cao, Z.-H., Zhang, S.-Z., Wang, R.-K., Zhang, R.-F., and Hao, Y.-J.** (2013). Genome Wide Analysis of the Apple MYB Transcription Factor Family Allows the Identification of MdoMYB121 Gene Confering Abiotic Stress Tolerance in Plants. *PLoS One* **8**: e69955.
- Carlsbecker, A. and Helariutta, Y.** (2005). Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 512–7.
- Carroll, A. and Somerville, C.** (2009). Cellulosic Biofuels. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 165–182.
- Cassan-Wang, H., Goué, N., Saidi, M.N., Legay, S., Sivadon, P., Goffner, D., and Grima-Pettenati, J.** (2013). Identification of novel transcription factors regulating secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **4**: 189.
- Chai, G., Wang, Z., Tang, X., Yu, L., Qi, G., Wang, D., Yan, X., Kong, Y., and Zhou, G.** (2014). R2R3-MYB gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flowering time. *J. Exp. Bot.* **65**: 4255–4269.
- Cho, S.K., Kim, J.E., Park, J.-A., Eom, T.J., and Kim, W.T.** (2006). Constitutive expression of abiotic stress-

- inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Lett.* **580**: 3136–3144.
- Courtois-Moreau, C.L., Pesquet, E., Sjödin, A., Muñiz, L., Bollhöner, B., Kaneda, M., Samuels, L., Jansson, S., and Tuominen, H.** (2009). A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem. *Plant J.* **58**: 260–274.
- Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., and Leplé, J.-C.** (2010). Wood formation in Angiosperms. *C. R. Biol.* **333**: 325–34.
- Dhillon, T. and Stockinger, E.J.** (2013). Cbf14 copy number variation in the A, B, and D genomes of diploid and polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* **126**: 2777–2789.
- Didi, V., Jackson, P., and Hejátko, J.** (2015). Hormonal regulation of secondary cell wall formation. *J. Exp. Bot.* **66**: 5015–5027.
- Doblin, M.S., Pettolino, F., and Bacic, A.** (2010). *Evans Review* : Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Funct. Plant Biol.* **37**: 357.
- Domon, J.-M., Baldwin, L., Acket, S., Caudeville, E., Arnoult, S., Zub, H., Gillet, F., Lejeune-Hénaut, I., Brancourt-Hulmel, M., Pelloux, J., and Rayon, C.** (2013). Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry* **85**: 51–61.
- Donner, T.J., Sherr, I., and Scarpella, E.** (2009). Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development* **136**: 3235–46.
- Du, H., Feng, B.-R., Yang, S.-S., Huang, Y.-B., and Tang, Y.-X.** (2012a). The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. *PLoS One* **7**: e37463.
- Du, H., Yang, S.-S., Liang, Z., Feng, B.-R., Liu, L., Huang, Y.-B., and Tang, Y.-X.** (2012b). Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean. *BMC Plant Biol.* **12**: 106.
- Du, J., Mansfield, S.D., and Groover, A.T.** (2009). The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth. *Plant J.* **60**: 1000–1014.
- Du, J., Miura, E., Robischon, M., Martinez, C., and Groover, A.** (2011). The *Populus* Class III HD ZIP Transcription Factor POPCORONA Affects Cell Differentiation during Secondary Growth of Woody Stems. *PLoS One* **6**: e17458.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **15**: 573–581.
- Eldhuset, T.D., Nagy, N.E., Volařík, D., Børja, I., Gebauer, R., Yakovlev, I.A., and Krokene, P.** (2013). Drought affects tracheid structure, dehydrin expression, and above- and belowground growth in 5-year-old Norway spruce. *Plant Soil* **366**: 305–320.
- Eldridge, K.** (1994). *Eucalypt domestication and breeding* (Clarendon Press).
- Endo, H., Yamaguchi, M., Tamura, T., Nakano, Y., Nishikubo, N., Yoneda, A., Kato, K., Kubo, M., Kajita, S., Katayama, Y., Ohtani, M., and Demura, T.** (2015). Multiple Classes of Transcription Factors Regulate the Expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a Master Switch of Xylem Vessel Differentiation. *Plant Cell Physiol.* **56**: 242–254.
- Esau, K.** (1965). *Plant Anatomy* 2nd edn. N. Wiley & Sons, Inc., ed.
- Etchells, J.P., Mishra, L.S., Kumar, M., Campbell, L., and Turner, S.R.** (2015). Wood Formation in Trees Is Increased by Manipulating PXY-Regulated Cell Division.
- Etchells, J.P., Provost, C.M., Mishra, L., and Turner, S.R.** (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development* **140**: 2224–2234.
- Etchells, J.P. and Turner, S.R.** (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional

- pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development* **137**.
- Fagard, M., Höfte, H., and Vernhettes, S.** (2000). Cell wall mutants. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 15–25.
- Fisher, K. and Turner, S.** (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. *Curr. Biol.* **17**: 1061–1066.
- Fonti, P., Heller, O., Cherubini, P., Rigling, A., and Arend, M.** (2013). Wood anatomical responses of oak saplings exposed to air warming and soil drought. *Plant Biol.* **15**: 210–219.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations.** (2011). State of the world's forests 2011. (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Fromm, J.** (2010). Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiol.* **30**: 1140–7.
- Fukuda, H.** (2016). Signaling, transcriptional regulation, and asynchronous pattern formation governing plant xylem development. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **92**: 98–107.
- Fukuda, H. and Komamine, A.** (1980). Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* **65**: 57–60.
- Gall, H., Philippe, F., Domon, J., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C.** (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* **4**: 112–166.
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N., and Grima-Pettenati, J.** (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* **43**: 553–67.
- Gonçalves, J.L. de M. et al.** (2013). Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. *For. Ecol. Manage.* **301**: 6–27.
- Grant, E.H., Fujino, T., Beers, E.P., and Brunner, A.M.** (2010). Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*. *Planta* **232**: 337–352.
- Grattapaglia, D., Bertolucci, F.L., Penchel, R., and Sederoff, R.R.** (1996). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics* **144**: 1205–14.
- Grattapaglia, D., Bertolucci, F.L., and Sederoff, R.R.** (1995). Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 933–47.
- Grattapaglia, D., Plomion, C., Kirst, M., and Sederoff, R.R.** (2009). Genomics of growth traits in forest trees. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 148–156.
- Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G., and Boudet, a M.** (1993). Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol. Biol.* **21**: 1085–95.
- Grima-Pettenati, J. and Goffner, D.** (1999). Lignin genetic engineering revisited. *Plant Sci.* **145**: 51–65.
- Guo, H., Wang, Y., Wang, L., Hu, P., Wang, Y., Jia, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, C., and Yang, C.** (2017). Expression of the MYB transcription factor gene BplMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*. *Plant Biotechnol. J.* **15**: 107–121.
- Hausman, J.F., Evers, D., Thiellement, H., and Jouve, L.** (2000). Compared responses of poplar cuttings and in vitro raised shoots to short-term chilling treatments. *Plant Cell Rep.* **19**: 954–960.
- Hejátko, J., Ryu, H., Kim, G.-T., Dobesová, R., Choi, S., Choi, S.M., Soucek, P., Horák, J., Pekárová, B.,**

- Palme, K., Brzobohaty, B., and Hwang, I.** (2009). The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in Arabidopsis shoots. *Plant Cell* **21**: 2008–21.
- Hellgren, J.M., Olofsson, K., and Sundberg, B.** (2004). Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol.* **135**: 212–20.
- Herbers, K., Lorences, E.P., Barrachina, C., and Sonnewald, U.** (2001). Functional characterisation of *Nicotiana tabacum* xyloglucan endotransglycosylase (Nt XET-1): generation of transgenic tobacco plants and changes in cell wall xyloglucan. *Planta* **212**: 279–287.
- Hertzberg, M. et al.** (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14732–14737.
- Hill, J.L., Hammudi, M.B., and Tien, M.** (2014). The Arabidopsis cellulose synthase complex: a proposed hexamer of CESA trimers in an equimolar stoichiometry. *Plant Cell* **26**: 4834–42.
- Hinchee, M., Rottmann, W., Mullinax, L., Zhang, C., Chang, S., Cunningham, M., Pearson, L., and Nehra, N.** (2009). Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* **45**: 619–629.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H.** (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15208–13.
- Hoch, G.** (2007). Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. *Funct. Ecol.* **21**: 823–834.
- Huang, G.-T., Ma, S.-L., Bai, L.-P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M., and Guo, Z.-F.** (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol. Biol. Rep.* **39**: 969–987.
- Huang, J.-G., Yang, M., Liu, P., Yang, G.-D., Wu, C.-A., and Zheng, C.-C.** (2009). GhDREB1 enhances abiotic stress tolerance, delays GA-mediated development and represses cytokinin signalling in transgenic Arabidopsis. *Plant. Cell Environ.* **32**: 1132–1145.
- Humphreys, J.M. and Chapple, C.** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 224–229.
- Hussey, S.G., Mizrachi, E., Creux, N.M., and Myburg, A.A.** (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* **4**: 325.
- Hussey, S.G., Saïdi, M.N., Hefer, C.A., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2015). Structural, evolutionary and functional analysis of the NAC domain protein family in Eucalyptus. *New Phytol.* **206**: 1337–50.
- Ilegems, M., Douet, V., Meylan-Bettex, M., Uyttewaal, M., Brand, L., Bowman, J.L., and Stieger, P.A.** (2010). Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* **137**: 975–984.
- Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H.** (2006). Dodeca-CLE Peptides as Suppressors of Plant Stem Cell Differentiation. *Science* (80-.). **313**: 842–845.
- Izhaki, A. and Bowman, J.L.** (2007). KANADI and class III HD-Zip gene families regulate embryo patterning and modulate auxin flow during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 495–508.
- Jensen, J.K., Kim, H., Cocuron, J.-C., Orler, R., Ralph, J., and Wilkerson, C.G.** (2011). The DUF579 domain containing proteins IRX15 and IRX15-L affect xylan synthesis in Arabidopsis. *Plant J.* **66**: 387–400.
- Jiang, C., Gu, X., and Peterson, T.** (2004). Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of Arabidopsis and *Oryza sativa* L. ssp. indica. *Genome Biol.* **5**: R46.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in

- Arabidopsis. *EMBO J.* **19**: 6150–6161.
- Jin, H. and Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**: 577–85.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., and Gao, G.** (2017). PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* **45**: D1040–D1045.
- Jourez, B., Riboux, A., and Leclercq, A.** (2001). Anatomical characteristics of tension wood and opposite wood in young inclined stems of poplar (*Populus euramericana* cvGhoy'). *Iawa J.*
- Keller, G., Cao, P.B., Clemente, H.S., Kayal, W. El, Marque, C., and Teulière, C.** Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of *Eucalyptus gunnii* cold acclimation. *Trees*: 1–23.
- Kirst, M., Myburg, A.A., De León, J.P.G., Kirst, M.E., Scott, J., and Sederoff, R.** (2004). Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of eucalyptus. *Plant Physiol.* **135**: 2368–78.
- Knaggs, A.R., Murakami, S., Aishima, T., Ayabe, S.-I., Odell, J., Fader, G., McGonigle, B., Yamaguchi, M., and Kusumi, T.** (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 119–136.
- Knight, M.R. and Knight, H.** (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytol.* **195**: 737–751.
- Ko, J.-H., Kim, W.-C., and Han, K.-H.** (2009). Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **60**: 649–665.
- Ko, J.-H., Yang, S.H., Park, A.H., Lerouxel, O., and Han, K.-H.** (2007). ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **50**: 1035–1048.
- Kong, Y., Zhou, G., Avci, U., Gu, X., Jones, C., Yin, Y., Xu, Y., and Hahn, M.G.** (2009). Two Poplar Glycosyltransferase Genes, PdGATL1.1 and PdGATL1.2, Are Functional Orthologs to PARVUS/AtGATL1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2**: 1040–1050.
- Kranz, H.D. et al.** (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 263–76.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., and Demura, T.** (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* **19**: 1855–1860.
- Laclau, J.-P., Almeida, J.C.R., Gonçalves, J.L.M., Saint-André, L., Ventura, M., Ranger, J., Moreira, R.M., and Nouvellon, Y.** (2009). Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in *Eucalyptus* plantations. *Tree Physiol.* **29**: 111–24.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, a M., and Grima-Pettenati, J.** (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11**: 429–41.
- Lata, C. and Prasad, M.** (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* **62**: 4731–4748.
- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D., and Grima-Pettenati, J.** (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* **57**: 1187–95.
- Laux, T.** (2003). The Stem Cell Concept in Plants: A Matter of Debate. *Cell* **113**: 281–283.
- Lee, C., Teng, Q., Zhong, R., Yuan, Y., Haghighat, M., and Ye, Z.-H.** (2012). Three *Arabidopsis* DUF579 Domain-Containing GXM Proteins are Methyltransferases Catalyzing 4-O-Methylation of Glucuronic

- Acid on Xylan. *Plant Cell Physiol.* **53**: 1934–1949.
- Lee, C., Zhong, R., Richardson, E.A., Himmelsbach, D.S., McPhail, B.T., and Ye, Z.-H.** (2007). The PARVUS Gene is Expressed in Cells Undergoing Secondary Wall Thickening and is Essential for Glucuronoxylan Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **48**: 1659–1672.
- Lee, Y., Rubio, M.C., Alassimone, J., and Geldner, N.** (2013). A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* **153**: 402–12.
- Legay, 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**: 774–86.
- Legay, S., Lacombe, E., Goicoechea, M., Brière, C., Séguin, A., Mackay, J., and Grima-Pettenati, J.** (2007). Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci.* **173**: 542–549.
- Lei, L., Li, S., and Gu, Y.** (2012). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) mediates the intimate relationship between cellulose microfibrils and cortical microtubules. *Plant Signal. Behav.* **7**: 714–718.
- Léplé, J.-C. et al.** (2007). Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. *Plant Cell* **19**: 3669–91.
- Li, C., Wang, X., Ran, L., Tian, Q., Fan, D., and Luo, K.** (2015). PtoMYB92 is a Transcriptional Activator of the Lignin Biosynthetic Pathway During Secondary Cell Wall Formation in *Populus tomentosa*. *Plant Cell Physiol.* **56**: 2436–46.
- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M.C., Forneris, N., Savidge, R.A., Johnson, L.A., Mansfield, S.D., Ellis, B.E., and Douglas, C.J.** (2012). The Class II KNOX gene KNAT7 negatively regulates secondary wall formation in Arabidopsis and is functionally conserved in *Populus*. *New Phytol.* **194**: 102–115.
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., and Perata, P.** (2013). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytol.* **199**: 639–649.
- Lim, E.-K., Jackson, R.G., and Bowles, D.J.** (2005). Identification and characterisation of Arabidopsis glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde.
- Liu, Y.-B., Lu, S.-M., Zhang, J.-F., Liu, S., and Lu, Y.-T.** (2007). A xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in Arabidopsis. *Planta* **226**: 1547–1560.
- Love, J., Bjorklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjarvi, J., and Sundberg, B.** (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 5984–5989.
- Lucas, W.J. et al.** (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions F. J. Integr. Plant Biol. **55**: 294–388.
- Lucas, W.J., Ding, B., and Schoot, C.** (1993). Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**: 435–476.
- Mahonen, A.P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K.M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., and Helariutta, Y.** (2006). Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development. *Science (80-.)*. **311**: 94–98.
- Manabe, Y., Verhertbruggen, Y., Gille, S., Harholt, J., Chong, S.-L., Pawar, P.M.-A., Mellerowicz, E.J., Tenkanen, M., Cheng, K., Pauly, M., and Scheller, H.V.** (2013). Reduced Wall Acetylation proteins play vital and distinct roles in cell wall O-acetylation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**: 1107–17.
- Marques, C.M., Vasquez-Kool, J., Carocha, V.J., Ferreira, J.G., O'Malley, D.M., Liu, B.-H., and Sederoff, R.** (1999). Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *TAG Theor. Appl. Genet.* **99**: 936–946.

- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., and Kakimoto, T.** (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 20027–31.
- Matus, J.T., Aquea, F., and Arce-Johnson, P.** (2008). Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes. *BMC Plant Biol.* **8**: 83.
- McCarthy, R.L., Zhong, R., Fowler, S., Lyskowski, D., Piyasena, H., Carleton, K., Spicer, C., and Ye, Z.-H.** (2010). The Poplar MYB Transcription Factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are Involved in the Regulation of Secondary Wall Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1084–1090.
- McCarthy, R.L., Zhong, R., and Ye, Z.-H.** (2009). MYB83 Is a Direct Target of SND1 and Acts Redundantly with MYB46 in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1950–1964.
- McFarlane, H.E., Döring, A., and Persson, S.** (2014). The Cell Biology of Cellulose Synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 69–94.
- Mele, G., Ori, N., Sato, Y., and Hake, S.** (2003). The knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes Dev.* **17**: 2088–93.
- Mellerowicz, E.J., Love, J., Segerman, B., Ohmiya, Y., Coutinho, P.M., Andersson-gunnera, S., Nilsson, P., Henrissat, B., and Moritz, T.** (2006). Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus* : global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis.: 144–165.
- Mellerowicz, E.J. and Sundberg, B.** (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 293–300.
- Miller, A.K., Galiba, G., and Dubcovsky, J.** (2006). A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-A m 2 in *Triticum monococcum*. *Mol. Genet. Genomics* **275**: 193–203.
- Minic, Z.** (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta* **227**: 723–740.
- Minic, Z. and Jouanin, L.** (2006). Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol. Biochem.* **44**: 435–449.
- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., and Ohme-Takagi, M.** (2010). Efficient Yeast One-/Two-Hybrid Screening Using a Library Composed Only of Transcription Factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **51**: 2145–2151.
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., and 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**: 270–80.
- Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M.** (2008). NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity. *Plant J.* **56**: 768–778.
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M.** (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* **17**: 2993–3006.
- Mizrachi, E., Maloney, V.J., Silberbauer, J., Hefer, C.A., Berger, D.K., Mansfield, S.D., and Myburg, A.A.** (2015). Investigating the molecular underpinnings underlying morphology and changes in carbon partitioning during tension wood formation in *Eucalyptus*. *New Phytol.* **206**: 1351–1363.
- Mizrachi, E., Mansfield, S.D., and Myburg, A.A.** (2012). Cellulose factories: Advancing bioenergy production from forest trees. *New Phytol.* **194**: 54–62.
- Mizrachi, E. and Myburg, A.A.** (2016). Systems genetics of wood formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **30**: 94–100.

- Mizrachi, E., Verbeke, L., Christie, N., Fierro, A.C., Mansfield, S.D., Davis, M.F., Gjersing, E., Tuskan, G.A., Van Montagu, M., Van de Peer, Y., Marchal, K., and Myburg, A.A. (2017). Network-based integration of systems genetics data reveals pathways associated with lignocellulosic biomass accumulation and processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 1195–1200.
- Mølhøj, M., Pagant, S., and Höfte, H. (2002). Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1399–406.
- Mølhøj, M., Ulvskov, P., and Dal Degan, F. (2001). Characterization of a functional soluble form of a Brassica napus membrane-anchored endo-1,4-beta-glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Physiol.* **127**: 674–84.
- Morreel, K., Dima, O., Kim, H., Lu, F., Niculaes, C., Vanholme, R., Dauwe, R., Goeminne, G., Inze, D., Messens, E., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010a). Mass Spectrometry-Based Sequencing of Lignin Oligomers. *PLANT Physiol.* **153**: 1464–1478.
- Morreel, K., Kim, H., Lu, F., Dima, O., Akiyama, T., Vanholme, R., Niculaes, C., Goeminne, G., Inzé, D., Messens, E., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010b). Mass Spectrometry-Based Fragmentation as an Identification Tool in Lignomics. *Anal. Chem.* **82**: 8095–8105.
- Morreel, K., Ralph, J., Lu, F., Goeminne, G., Busson, R., Herdewijn, P., Goeman, J.L., Van der Eycken, J., Boerjan, W., and Messens, E. (2004). Phenolic profiling of caffeic acid O-methyltransferase-deficient poplar reveals novel benzodioxane oligolignols. *Plant Physiol.* **136**: 4023–36.
- Mortimer, J.C., Miles, G.P., Brown, D.M., Zhang, Z., Segura, M.P., Weimar, T., Yu, X., Seffen, K.A., Stephens, E., Turner, S.R., and Dupree, P. (2010). Absence of branches from xylan in *Arabidopsis* gux mutants reveals potential for simplification of lignocellulosic biomass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 17409–17414.
- Motomura, Y., Kobayashi, F., Iehisa, J.C.M., and Takumi, S. (2013). A major quantitative trait locus for cold-responsive gene expression is linked to frost-resistance gene Fr-A2 in common wheat. *Breed. Sci.* **63**: 58–67.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360–76.
- Myburg, A.A. et al. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**: 356–62.
- Nakano, Y., Nishikubo, N., Goué, N., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Katayama, Y., and Demura, T. (2010). MYB transcription factors orchestrating the developmental program of xylem vessels in *Arabidopsis* roots. *Plant Biotechnol.* **27**: 267–272.
- Navarro, M., Ajax, C., Martinez, Y., Laur, J., El Kayal, W., Marque, C., and Teulière, C. (2011). Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. *Plant Biotechnol. J.* **9**: 50–63.
- Navarro, M., Marque, G., Ajax, C., Keller, G., Borges, J.P., Marque, C., and Teulière, C. (2009). Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. *J. Exp. Bot.* **60**: 2713–24.
- Nguyen, H.C., Cao, P.B., San Clemente, H., Ployet, R., Mounet, F., Ladouce, N., Harvengt, L., Marque, C., and Teulière, C. (2017). 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.* **159**: 445–467.
- Niculaes, C. et al. (2014). Phenylcoumaran benzylic ether reductase prevents accumulation of compounds formed under oxidative conditions in poplar xylem. *Plant Cell* **26**: 3775–91.
- Nieminen, K. et al. (2008). Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 20032–7.

- Nilsson, J., Karlberg, A., Antti, H., Lopez-Vernaza, M., Mellerowicz, E., Perrot-Rechenmann, C., Sandberg, G., and Bhalerao, R.P.** (2008). Dissecting the Molecular Basis of the Regulation of Wood Formation by Auxin in Hybrid Aspen. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 843–855.
- Nishikubo, N., Takahashi, J., Roos, A.A., Derba-Maceluch, M., Piens, K., Brumer, H., Teeri, T.T., Stålbrand, H., and Mellerowicz, E.J.** (2011). Xyloglucan endo-transglycosylase-mediated xyloglucan rearrangements in developing wood of hybrid aspen. *Plant Physiol.* **155**: 399–413.
- Ohashi-Ito, K., Oda, Y., and Fukuda, H.** (2010). Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell* **22**: 3461–73.
- Öhman, D., Demedts, B., Kumar, M., Gerber, L., Gorzsás, A., Goeminne, G., Hedenström, M., Ellis, B., Boerjan, W., and Sundberg, B.** (2013). MYB103 is required for *FERULATE-5-HYDROXYLASE* expression and syringyl lignin biosynthesis in Arabidopsis stems. *Plant J.* **73**: 63–76.
- Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M.** (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**: 1959–68.
- Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu, B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Goué, N., Shi, F., Ohme-Takagi, M., and Demura, T.** (2011). A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* **67**: 499–512.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P.** (2014). Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* **5**: 86.
- Osato, Y., Yokoyama, R., and Nishitani, K.** (2006). A principal role for AtXTH18 in Arabidopsis thaliana root growth: a functional analysis using RNAi plants. *J. Plant Res.* **119**: 153–162.
- Park, S., Lee, C.-M., Doherty, C.J., Gilmour, S.J., Kim, Y., and Thomashow, M.F.** (2015). Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant J.* **82**: 193–207.
- Pattathil, S., Ingwers, M.W., Victoriano, O.L., Kandemkavil, S., McGuire, M.A., Teskey, R.O., and Aubrey, D.P.** (2016). Cell Wall Ultrastructure of Stem Wood, Roots, and Needles of a Conifer Varies in Response to Moisture Availability. *Front. Plant Sci.* **7**: 882.
- Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan, M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., and Campbell, M.M.** (2003). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J.* **36**: 743–54.
- Paux, E., Carocha, V., Marques, C., De Sousa, A.M., Borralho, N., Sivadon, P., and Grima-Pettenati, J.** (2005). Transcript profiling of Eucalyptus xylem genes during tension wood formation. *New Phytol.* **167**: 89–100.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., and Delmer, D.** (2002). Sitosterol-beta -glucoside as Primer for Cellulose Synthesis in Plants. *Science* (80-.). **295**: 147–150.
- Pilate, G., Déjardin, A., Laurans, F., and Leplé, J.-C.** (2004). Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytol.* **164**: 63–72.
- Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., Lapierre, C., Franche, C., Truchet, I., and Grima-Pettenati, J.** (2015). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnol. J.*
- Plavcová, L. and Hacke, U.G.** (2012). Phenotypic and developmental plasticity of xylem in hybrid poplar saplings subjected to experimental drought, nitrogen fertilization, and shading. *J. Exp. Bot.* **63**: 6481–6491.
- Plieth, C., Hansen, U.P., Knight, H., and Knight, M.R.** (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *Plant J.* **18**: 491–7.
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A.** (2001). Wood Formation in Trees Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* **127**: 1513–1523.

- Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **40**: 979–995.
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Ralph, S.A., Christensen, J.H., and Boerjan, W.** (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.* **3**: 29–60.
- Ranik, M. and Myburg, A.A.** (2006). Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. *Tree Physiol.* **26**: 545–56.
- Ratke, C., Pawar, P.M.-A., Balasubramanian, V.K., Naumann, M., Duncranz, M.L., Derba-Maceluch, M., Gorzsás, A., Endo, S., Ezcurra, I., and Mellerowicz, E.J.** (2015). *Populus GT43* family members group into distinct sets required for primary and secondary wall xylan biosynthesis and include useful promoters for wood modification. *Plant Biotechnol. J.* **13**: 26–37.
- Rennie, E.A., Hansen, S.F., Baidoo, E.E.K., Hadi, M.Z., Keasling, J.D., and Scheller, H.V.** (2012). Three members of the *Arabidopsis* glycosyltransferase family 8 are xylan glucuronosyltransferases. *Plant Physiol.* **159**: 1408–17.
- Rennie, E.A. and Scheller, H.V.** (2014). Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**: 100–107.
- Robischon, M., Du, J., Miura, E., and Groover, A.** (2011). The *Populus* Class III HD ZIP, popREVOLUTA, Influences Cambium Initiation and Patterning of Woody Stems. *PLANT Physiol.* **155**: 1214–1225.
- Rockwood, D.L., Rudie, A.W., Ralph, S.A., Zhu, J.Y., and Winandy, J.E.** (2008). Energy product options for eucalyptus species grown as short rotation woody crops. *Int. J. Mol. Sci.* **9**: 1361–78.
- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., and Nishitani, K.** (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1421–35.
- Růžicka, K., Ursache, R., Hejátko, J., and Helariutta, Y.** (2015). Xylem development - from the cradle to the grave. *New Phytol.* **207**: 519–535.
- De Rybel, B., Mähönen, A.P., Helariutta, Y., and Weijers, D.** (2015). Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**: 30–40.
- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C.H.** (1971). Lignins: occurrence, formation, structure and reactions, (Wiley-Interscience).
- Scheible, W.R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., and Somerville, C.** (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* *Ixr1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10079–84.
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P.** (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 263–289.
- Sederoff, R., Myburg, A., and Kirst, M.** (2009). Genomics, Domestication, and Evolution of Forest Trees. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**: 303–317.
- Shi, R., Sun, Y.-H., Li, Q., Heber, S., Sederoff, R., and Chiang, V.L.** (2010). Towards a Systems Approach for Lignin Biosynthesis in *Populus trichocarpa*: Transcript Abundance and Specificity of the Monolignol Biosynthetic Genes. *Plant Cell Physiol.* **51**: 144–163.
- Shin, Y.-K., Yum, H., Kim, E.-S., Cho, H., Gothandam, K.M., Hyun, J., and Chung, Y.-Y.** (2006). BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of *Arabidopsis* XTH9, is associated with cell expansion. *Planta* **224**: 32–41.
- Siddiqua, M. and Nassuth, A.** (2011). *Vitis* CBF1 and *Vitis* CBF4 differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. *Plant. Cell Environ.* **34**: 1345–1359.
- Sjöström, E.** Wood chemistry : fundamentals and applications.
- Soler, M., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Cassan-Wang, H., San Clemente, H., Savelli, B., Hefer, C.A.,**

- Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2014). The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytol.*
- Somerville, C.** (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 53–78.
- Soyano, T., Thitamadee, S., Machida, Y., and Chua, N.-H.** (2008). ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE19/LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN30 and ASL20/LBD18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 3359–73.
- Spicer, R. and Groover, A.** (2010). Evolution of development of vascular cambia and secondary growth. *New Phytol.* **186**: 577–592.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F.** (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 1035–40.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447–56.
- Tang, X., Zhuang, Y., Qi, G., Wang, D., Liu, H., Wang, K., Chai, G., and Zhou, G.** (2015). Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Sci. Rep.* **5**: 12240.
- Taylor, N.G., Howells, R.M., Huttly, A.K., Vickers, K., and Turner, S.R.** (2003). Interactions among three distinct CesaA proteins essential for cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1450–5.
- Taylor, N.G., Scheible, W.R., Cutler, S., Somerville, C.R., and Turner, S.R.** (1999). The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* **11**: 769–80.
- Taylor-Teeples, M. et al.** (2015). An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **517**: 571–5.
- Teulieres, C., Bossinger, G., Moran, G., and Marque, C.** (2007). *Plant stress*. (Global Science Books).
- Tillett, R.L., Wheatley, M.D., Tattersall, E.A.R., Schlauch, K.A., Cramer, G.R., and Cushman, J.C.** (2012). The *Vitis vinifera* C-repeat binding protein 4 (VvCBF4) transcriptional factor enhances freezing tolerance in wine grape. *Plant Biotechnol. J.* **10**: 105–124.
- Timell, T.E.** (1986). *Compression wood in gymnosperms / 1. Bibliography, historical background, determination, structure, chemistry, topochemistry, physical properties, origin, and formation of compression wood.* (Springer).
- Toghraie, N., Parsapajouh, D., Ebrahimzadeh, H., Thibaut, B., Gril, J., and Moghadam, H.R.Y.** (2006). Tension Wood in *Eucalypt* Trees. **32**: 13–22.
- Tournier, V., Grat, S., Marque, C., El Kayal, W., Penchel, R., de Andrade, G., Boudet, A.-M., and Teulieres, C.** (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Res.* **12**: 403–11.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 20623–8.
- Turner, S.R. and Somerville, C.R.** (1997). Collapsed xylem phenotype of *Arabidopsis* identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. *Plant Cell* **9**: 689–701.
- Tuskan, G.A. et al.** (2006). The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* (80-.). **313**.
- Uchida, N., Tasaka, M., Fukaki, H., Malamy, J., Benfey, P., Kakimoto, T., Tasaka, M., Torii, K., and Fukuda, H.** (2013). Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide

- hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. *J. Exp. Bot.* **64**: 5335–5343.
- Umezawa, T.** (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.* **2**: 371–390.
- Urbanowicz, B.R. et al.** (2012). 4-O-methylation of glucuronic acid in Arabidopsis glucuronoxylan is catalyzed by a domain of unknown function family 579 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 14253–8.
- Vanholme, R. et al.** (2013). Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Science* **341**: 1103–6.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**: 895–905.
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J.H., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2012). Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol.* **196**: 978–1000.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2008). Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 278–85.
- Wang, H., Avci, U., Nakashima, J., Hahn, M.G., Chen, F., and Dixon, R.A.** (2010). Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 22338–43.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S.** (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 7370–90.
- Wang, T. and Hong, M.** (2016). Solid-state NMR investigations of cellulose structure and interactions with matrix polysaccharides in plant primary cell walls. *J. Exp. Bot.* **67**: 503–514.
- Washusen, R. and Evans, R.** (2001). The association between cellulose crystallite width and tension wood occurrence in *Eucalyptus globulus*. *IAWA J.* **22**: 235–243.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N.J., and Campbell, M.M.** (2009). Expansion and diversification of the *Populus* R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol.* **149**: 981–93.
- Vander Willigen, C. and Pammenter, N.W.** (1997). Relationship between growth and xylem hydraulic characteristics of clones of *Eucalyptus* spp. at contrasting sites. *Tree Physiol.* **18**: 595–600.
- Wisniewski, M., Norelli, J., and Artlip, T.** (2015). 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.* **6**: 85.
- Wu, A.-M., Hornblad, E., Voxeur, A., Gerber, L., Rihouey, C., Lerouge, P., and Marchant, A.** (2010). Analysis of the Arabidopsis IRX9/IRX9-L and IRX14/IRX14-L Pairs of Glycosyltransferase Genes Reveals Critical Contributions to Biosynthesis of the Hemicellulose Glucuronoxylan. *PLANT Physiol.* **153**: 542–554.
- Wu, Z., Dijkstra, P., Koch, G.W., Peñuelas, J., and Hungate, B.A.** (2011). Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation. *Glob. Chang. Biol.* **17**: 927–942.
- Xi, W., Song, D., Sun, J., Shen, J., and Li, L.** (2017). Formation of wood secondary cell wall may involve two type cellulose synthase complexes in *Populus*. *Plant Mol. Biol.* **93**: 419–429.
- Xie, L., Yang, C., and Wang, X.** (2011). Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **62**: 4495–506.
- Xiong, G., Cheng, K., and Pauly, M.** (2013). Xylan O-Acetylation Impacts Xylem Development and Enzymatic Recalcitrance as Indicated by the Arabidopsis Mutant *tbl29*. *Mol. Plant* **6**: 1373–1375.
- Yamaguchi, M. and Demura, T.** (2010). Transcriptional regulation of secondary wall formation controlled by NAC domain proteins. *Plant Biotechnol.* **27**: 237–242.

- Yamaguchi, M., Goué, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J.C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., Dupree, P., and Demura, T.** (2010a). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system. *Plant Physiol.* **153**: 906–14.
- Yamaguchi, M., Kubo, M., Fukuda, H., and Demura, T.** (2008). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 is involved in the differentiation of all types of xylem vessels in Arabidopsis roots and shoots. *Plant J.* **55**: 652–664.
- Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Ohtani, M., Ohme-Takagi, M., Kato, K., and Demura, T.** (2011). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation. *Plant J.* **66**: 579–590.
- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., and Demura, T.** (2010b). VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 1249–63.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* **10**: 88–94.
- Yang, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Vizcay Barrena, G., and Wilson, Z.A.** (2007). Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *Plant Cell* **19**: 534–48.
- Yang, L. et al.** (2017). PtoMYB156 is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Sci. Rep.* **7**: 41209.
- Yang, X., Ye, C.-Y., Bisaria, A., Tuskan, G. a, and Kalluri, U.C.** (2011). Identification of candidate genes in Arabidopsis and Populus cell wall biosynthesis using text-mining, co-expression network analysis and comparative genomics. *Plant Sci.* **181**: 675–87.
- Yanhui, C. et al.** (2006). The MYB Transcription Factor Superfamily of Arabidopsis: Expression Analysis and Phylogenetic Comparison with the Rice MYB Family. *Plant Mol. Biol.* **60**: 107–124.
- Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **21**: 133–139.
- Yu, H., Soler, M., Mila, I., San Clemente, H., Savelli, B., Dunand, C., Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., Bouzayen, M., Grima-Pettenati, J., and Cassan-Wang, H.** (2014). Genome-Wide Characterization and Expression Profiling of the AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) Gene Family in Eucalyptus grandis. *PLoS One* **9**: e108906.
- Yuan, Y., Teng, Q., Zhong, R., and Ye, Z.-H.** (2013). The Arabidopsis DUF231 Domain-Containing Protein ESK1 Mediates 2-O- and 3-O-Acetylation of Xylosyl Residues in Xylan. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1186–1199.
- Yuan, Y., Teng, Q., Zhong, R., Ye, Z.-H., and Nei, M.** (2014). Identification and Biochemical Characterization of Four Wood-Associated Glucuronoxylan Methyltransferases in Populus. *PLoS One* **9**: e87370.
- Zhang, J., Elo, A., and Helariutta, Y.** (2011). Arabidopsis as a model for wood formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 293–9.
- Zhang, J., Nieminen, K., Serra, J.A.A., and Helariutta, Y.** (2014). The formation of wood and its control. *Curr. Opin. Plant Biol.* **17**: 56–63.
- Zhao, C., Avci, U., Grant, E.H., Haigler, C.H., and Beers, E.P.** (2008). XND1, a member of the NAC domain family in Arabidopsis thaliana, negatively regulates lignocellulose synthesis and programmed cell death in xylem. *Plant J.* **53**: 425–436.
- Zhao, K. and Bartley, L.E.** (2014). Comparative genomic analysis of the R2R3 MYB secondary cell wall regulators of Arabidopsis, poplar, rice, maize, and switchgrass. *BMC Plant Biol.* **14**: 135.

- Zhong, R., Demura, T., and 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**: 3158–70.
- Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z.-H.** (2010a). Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. *Plant Physiol.* **152**: 1044–55.
- Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z.-H.** (2010b). Global Analysis of Direct Targets of Secondary Wall NAC Master Switches in Arabidopsis. *Mol. Plant* **3**: 1087–1103.
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L., and Ye, Z.-H.** (2008). A Battery of Transcription Factors Involved in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* **20**: 2763–2782.
- Zhong, R., McCarthy, R.L., Haghighat, M., Ye, Z.-H., and Jouanin, L.** (2013). The Poplar MYB Master Switches Bind to the SMRE Site and Activate the Secondary Wall Biosynthetic Program during Wood Formation. *PLoS One* **8**: e69219.
- Zhong, R., McCarthy, R.L., Lee, C., and Ye, Z.-H.** (2011). Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Plant Physiol.* **157**: 1452–68.
- Zhong, R., Richardson, E.A., and Ye, Z.-H.** (2007a). The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2776–92.
- Zhong, R., Richardson, E.A., and Ye, Z.-H.** (2007b). Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of Arabidopsis. *Planta* **225**: 1603–1611.
- Zhong, R. and Ye, Z.-H.** (2014). Complexity of the transcriptional network controlling secondary wall biosynthesis. *Plant Sci.* **229**: 193–207.
- Zhong, R. and Ye, Z.-H.** (2012). MYB46 and MYB83 Bind to the SMRE Sites and Directly Activate a Suite of Transcription Factors and Secondary Wall Biosynthetic Genes. *Plant Cell Physiol.* **53**: 368–380.
- Zhong, R. and Ye, Z.-H.** (2009). Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* **4**: 1028–1034.
- Zhou, G.-K., Zhong, R., Richardson, E.A., Morrison, W.H., Nairn, C.J., Wood-Jones, A., and Ye, Z.-H.** (2006). The Poplar Glycosyltransferase GT47C is Functionally Conserved with Arabidopsis Fragile Fiber8. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1229–1240.
- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., and Ye, Z.-H.** (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 248–66.
- Zhu, T., Nevo, E., Sun, D., and Peng, J.** (2012). Phylogenetic analyses unravel the evolutionary history of NAC proteins in plants. *Evolution (N. Y.)* **66**: 1833–1848.
- Zhu, Y., Song, D., Sun, J., Wang, X., and Li, L.** (2013). PtrHB7, a class III HD-Zip Gene, Plays a Critical Role in Regulation of Vascular Cambium Differentiation in Populus. *Mol. Plant* **6**: 1331–1343.
- Zinkgraf, M., Liu, L., Groover, A., and Filkov, V.** (2017). Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in Populus under diverse environmental conditions. *New Phytol.*

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

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

Raphael Ployet¹, Marçal Soler¹, Victor Carocha¹⁻², Nathalie Ladouce¹, Ana Alves³, José-Carlos Rodrigues³, Luc Harvengt⁴, Christiane Marque¹, Chantal Teulières¹, Jacqueline Grima-Pettenati¹ and Fabien Mounet^{1*}

¹ Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31326 Castanet-Tolosan, France.

² Instituto de Tecnologia de Química Biológica (ITQB), Biotecnologia de Células Vegetais, Av. da Republica, 2781-157 Oeiras, Portugal.

³ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

⁴ FCBA, Biotechnology and Advanced Silviculture Dept., Genetics and Biotechnology Team, F-33610 Cestas, France

*Author for correspondence:

Fabien Mounet Tel: +33 534323825

Email: mounet@lrsv.ups-tlse.fr

Abstract

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 *E. gunnii* x *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* x *E. dalrympleana* hybrids to cold.

Keywords: Abiotic stress, cold, correlation network, eucalyptus, lignin, transcription factors.

Résumé

Malgré que l'*Eucalyptus* soit le feuillu le plus planté à travers le monde, la majorité des espèces sont sensibles aux gelées. 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'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. 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. 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, excepté 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*.

Préambule

Lors de mon arrivée dans l'équipe Génomique Fonctionnelle de l'*Eucalyptus*, des données préliminaires obtenues par les membres de l'équipe, en particulier F. Mounet, suggéraient que l'exposition au froid affecte la formation du bois chez l'*Eucalyptus*, avec notamment une lignification précoce des cellules du xylème en développement. Cependant, ces observations avaient été faites chez *E. grandis*, qui est une espèce cultivée en zone tropicale et subtropicale, et qui présente une très faible résistance au froid. De plus, cette expérience avait été conduite sur une courte durée (15 jours au maximum) et avec un faible nombre de répétitions biologiques.

Dans le cadre de mon stage de 5 mois de deuxième année de master, puis de ma thèse, mon objectif a été de caractériser l'effet du froid sur la formation du bois chez l'*Eucalyptus*, au niveau transcriptionnel, biochimique et anatomique, puis d'identifier les régulateurs clés impliqués dans ces changements. La formation du bois étant un processus long, nous avons mis en place une expérience d'acclimatation au froid de longue durée (46 jours), sur un plus grand nombre de plantes. Nous avons fait le choix d'effectuer cette étude sur un génotype hybride *E. gundal* (*E. gunnii* x *E. dalrympleana*), sélectionné par le FCBA et qui fût un clone commercial planté en France, finalement retiré du marché récemment du fait de sa sensibilité aux températures gélives.

L. Harvengt a fourni les clones d'*E. gundal*. Les analyses par pyrolyse analytique ont été effectuées à l'Université de Lisbonne, par A. Alves et J.-C. Rodrigues. N. Ladouce a contribué aux analyses transcriptomiques. F. Mounet a été impliqué dans l'ensemble des expérimentations et dans la rédaction du manuscrit.

1. 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 *E. 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 more than 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 *E. gunnii*, a species originating from the Central Plateau of Tasmania (Potts et al. 2001), and *E. dalrympleana*, known under the generic name of *E. 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 DREB family of transcription factors 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. 2016).

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). SCWs are mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin, in proportions of approximately 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) which 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 depolymerisation 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 eleven 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 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 responses to environmental signals (Dixon and Paiva 1995). Based on comparative phylogeny and patterns of expression, a total 38 genes were identified as *bona fide* members of the eleven 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 CAD, CCoAOMT and 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 transcription factors of the NAC and R2R3-MYB families act as first and second-level master switches, respectively, to regulate a battery of downstream transcription factors (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 orthologs 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 transcription factor 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 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 acclimatisation 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 Le Gall et al., 2015). In some cases, lignin synthesis is enhanced during cold acclimatisation 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 acclimatisation 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 (Teulière 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 two 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 seven weeks and in adult trees grown in field conditions over three seasons in the south west 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.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and cold treatment

Eucalyptus gundal plants (*E. gunnii* X *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 (16h light /8h dark) at 25°C/22°C (light/dark) and 80% relative humidity. They were first exposed to a short acclimatisation period of three 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 (0d, control). Further samples were collected at 2d and 15d after the start of cold treatment. Final samples were collected at the end of the experiment (46d). Each sampling was performed on six to 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) 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 south west 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): autumn 2014 (mean temperatures 17°C ± 6°C), winter 2015 (mean temperatures 5°C ± 5°C) and summer 2015 (mean temperatures 22°C ± 6°C). After removing the bark at a height of about 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 5mm diameter punch and were immediately fixed in 80% ethanol until use.

2.2. 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), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were checked by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and 1% agarose gels. DNA contamination was evaluated by PCR using the housekeeping gene *Tubulin* (Table S1).

2.3. Quantitative RT-PCR

First strand cDNAs were synthesized from 1 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) 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. Transcript abundance was assessed by using high-throughput microfluidic qPCR (96.96 Dynamic Array Fluidigm®, BioMark) according to the manufacturer's protocol and by conventional RT-qPCR using 1µl 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 $E^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Pfaffl 2001) using primers efficiency calculated through

LinRegPCR (Ruijter et al. 2009). Expression was normalized against reference genes *PP2A1*, *PP2A3*, *IDH*, *SAND*, *EF1a* (Cassan-Wang et al. 2012).

2.4. Biochemical analyses of SCWs

Biochemical analyses of young trees were performed on bark-free stem samples, dried for 48h 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 48h. Extractives content analyses and Analytical Pyrolysis (Py-GC/FID) applied to extractive-free xylem residues (EXR), 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 Laluc 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 (Acros Organics) and then adjusted the final volume of 100 mL with dioxane (Fischer Scientific). Lignin monomers were then extracted with 7 mL of dichloromethane (Fischer Scientific). Extracts were trimethylsilylated (TMS) by incubating with 50 µL of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (Sigma) 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 to 650 m/z scanning range. The column was a ZB5-MSi column (Phénomenex) operated in the temperature program mode (from 45 to 180 °C at +30 °C/min, then from 180 to 260 °C at +3 °C/min), with helium carrier gas at a 1.5 mL/min flow rate. S and G peaks were identified using m/z (respectively 399 and 369) and integrated using Xcalibur© software.

2.5. Microscopy and histochemistry

Tissues fixed in 80% ethanol were cut into thin sections (20µm) by using a Vibratome VTS1000 (Leica) and a sapphire vibratome knife (Delaware Diamond Knives). Lignin and cellulose were stained respectively with a mix of Safranine (0.1%) and Astra Blue (1%) according to the protocol of Vazquez-Cooz & 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) by immersion in 4 consecutive baths (24h) of increasing concentrations of resin (33%, 50%, 66% and 100%). Semi-thin sections (1µm) were obtained by using a Histo Diamond Knife (DiATOME) 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 minutes at room temperature, rinsed in distilled water, dried at 60°C and mounted under coverslips in mounting medium (Richard-Allan Scientific). Semi-automatic image acquisition was performed using a Nanozoomer C9600-12 (Hamamatsu, Japan) in bright field at 40x 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 more than 15000 cells in 7–20 stem sections for each tree.

2.6. 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, Soler et al. 2015, Hussey 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). 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).

3. Results

3.1. 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 to 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 characterised 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 (Figure S2 a, b). 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 CW, are supposed to be newly generated (Figure S2 c to f). Likewise, in adult eucalyptus trees grown in forest plantations, the SCWs were thicker in autumn (average temperature 17°C ± 6°C) and in winter (average temperature 5°C ± 5°C) than in summer (average temperature 22°C ± 6°C) (Figure 1e–g, Figure S1). 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 to 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 (Figure S3) 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.

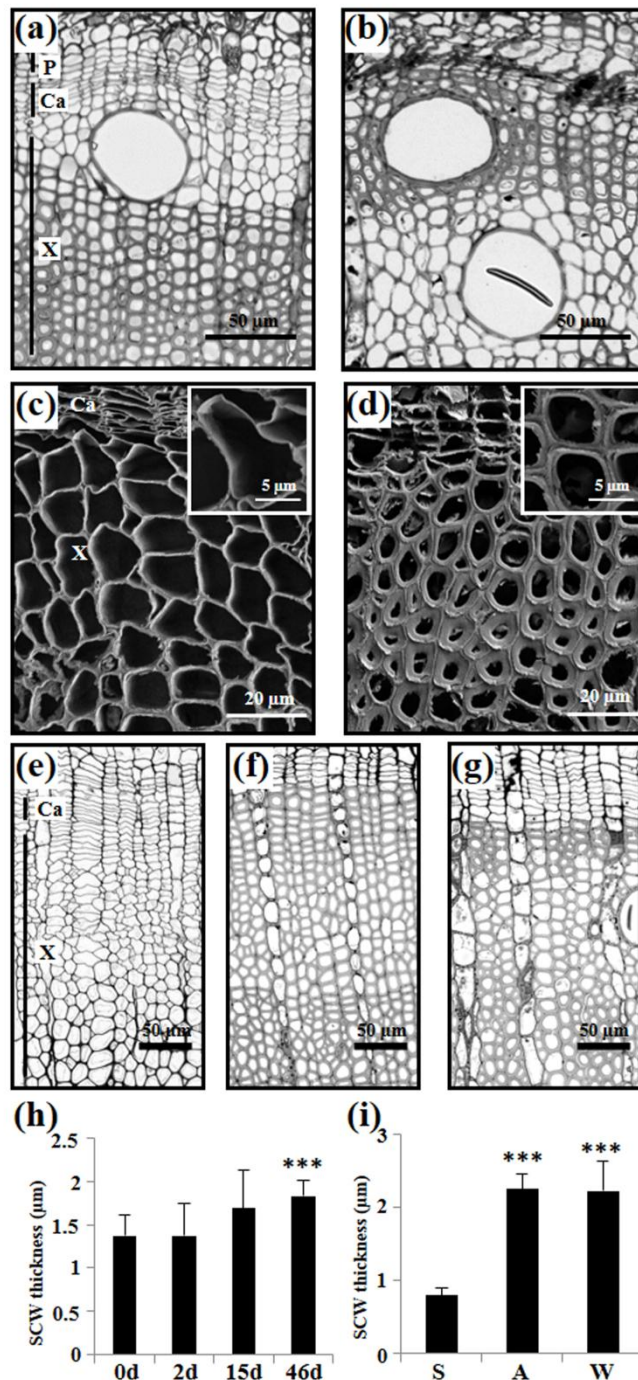


Figure 1: Cold increases the thickness of xylem SCWs. (a, b) Bright field microscopy of transverse sections of xylem from the stems of young control plants grown at 25°C (a) and similar plants exposed to cold for 46 days (b). (c, d) Scanning electron microscopy (x1000 magnification) of sections as in (a, b). Insets show x4000 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, i) Histograms showing the SCW thickness (average of fibers 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 from the control (0d) for young trees and from samples collected in summer for adult trees are indicated by asterisks where * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ according to Student's t test. X: xylem; P, phloem; Ca, cambial zone. 0d, control; 2d, two days; 15d, 15 days; 46d, 46 days of cold treatment. S, summer; A, autumn; W, winter.

3.2. 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 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.

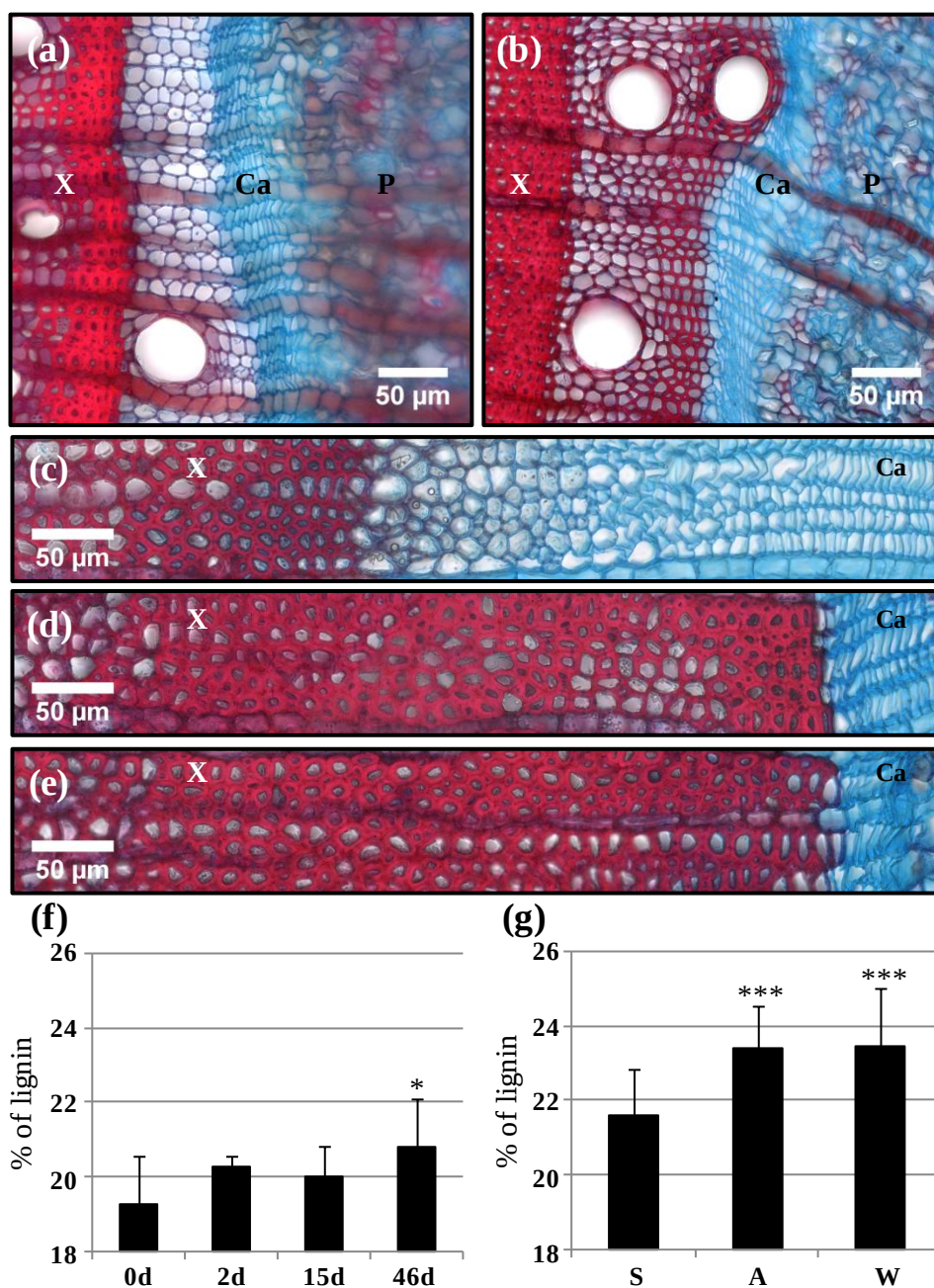


Figure 2: Cold enhances lignin deposition in xylem SCW. (a–e) Safranin-Astra Blue double staining of transverse sections from the stems of young plants (a, control; b, 46 days of cold exposure) and adult trees (c, summer; d, autumn and e, winter). Phenolic compounds are stained red and polysaccharides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

An increase in the insoluble lignin (called Klason lignin) content of 1.5% (Figure 2f) and 1.9% (Figure 2g), respectively, 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-extractible compounds increased five-fold in xylem samples from cold-treated young plants when compared to controls (Table 1).

Sample	EtOH	Lignin content					S/G ratio	
Type	Extractives	Klason	Pyrolysis	G yield _(β-O-4)	S yield _(β-O-4)	S+G yield KL	Pyrolysis	Thioacidolysis
0d	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
2d	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
15d	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
46d	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

Table 1: Analyses of SCW composition in xylem. Wood composition was assessed in young control plants (0d), in similar plants after two days (2d), 15 days (15d) or 46 days (46d) 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 g of cell wall (G and S yield) or μ moles per g of Klason lignin (for S+G yield KL). Bold values represent significant differences (Student's t test, n = 6 to 8; a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$) compared to controls (0d, for young plants and Summer for adult plants); -, not analysed.

We analysed the lignin structure by thioacidolysis, which specifically targets the G and S units involved in labile β -O-4 linkages (Mechin 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

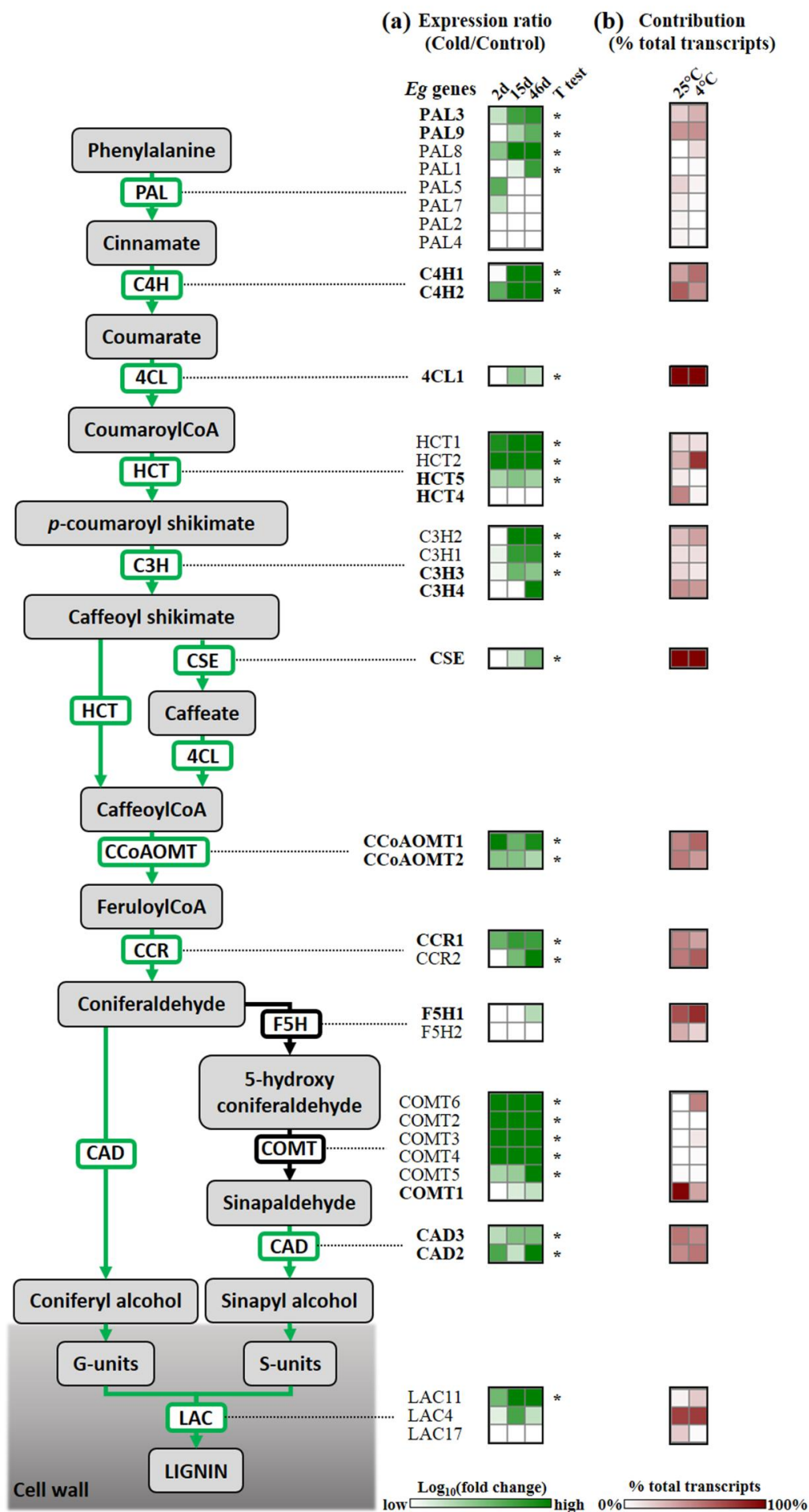
compared to the summer level and S units were 27% and 19% higher, respectively, in autumn and winter than in summer.

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

3.3. Transcriptional regulation of genes related to SCW biosynthesis

We performed RT-qPCR analyses on young eucalyptus trees sampled at 2 days, 15 days and 46 days after exposure to cold and compared to controls (0 days) (Table S1 and Figure 3). A two-fold 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* transcription factor 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 to controls (Table S1).

Figure 3: Cold induces genes of the lignin biosynthesis pathway in Eucalyptus. (a) The transcript levels of the genes encoding the eleven-enzymatic steps involved in the monolignol biosynthetic pathway were analysed by RTqPCR 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 orthologs 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 two days, 15 days and 46 days compared to controls. The white to green colour scale represents $\log_{10}$ of expression ratio (2d, 15d or 46d 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**. Genes short names were given according 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.



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 (Table S1). 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 Table S1 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* that encode enzymes catalysing the two key steps in S unit biosynthesis were not significantly induced in response to cold (Table S1 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 (Table S1 and Figure 3a). For instance, in the PAL family, *EgPAL1* thought to be involved in anthocyanin production was induced 10-fold and *EgPAL8* whose role is unknown was induced up to 330-fold (Table S1). In the COMT family, except *EgCOMT1*, all the genes were induced from 12-fold up to 618-fold (for *EgCOMT6*) (Table S1). 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 orthologs of *AtLac11* and *AtLac4* (involved the lignin polymerization step in *Arabidopsis* (Zhao et al. 2013), were induced by cold 9- and 3-fold, respectively (Table S1). Considering polysaccharides biosynthesis, two of the four cellulose synthases genes analysed (*EgCesA2* and *EgCesA6*) (Ranik and Myburg 2006) were induced 5- and 2-fold, respectively, whereas only one of the eight genes involved in hemicelluloses biosynthesis – the closest *Eucalyptus*

ortholog of *AtIRX10* (GUT2, a member of GT47 family, Wu et al. 2009) – was induced >4-fold by cold (Table S1).

3.4. 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-Teeple et al. 2015). To investigate whether the response to cold in *Eucalyptus* might also induce genes that regulate SCW biosynthesis, we selected 25 close orthologs of the *Arabidopsis* transcription factors involved in the 3 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 Table S1). Four genes presented a non-significant 2-fold induction or repression. The differentially regulated genes were found mainly in the lower third level of the SCW regulatory network (Level 3). These transcription factors 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. orthologs of *AtMYB20*, *AtMYB54*, *AtMYB58*, *AtMYB63*, *AtMYB69* and *AtMYB79*) whereas three of the down-regulated genes are negative regulators of SCW deposition (i.e. orthologs of *AtMYB7*, *AtMYB75*, and *AtKNAT7*). Only four of the 14 genes significantly affected by cold are involved in the upper part of the regulatory network (Level 1 and 2). Of these, three were repressed (orthologs of *AtMYB83*, *AtMYB55* and *AtSND1*) and one was induced (one ortholog of *AtSND3*).

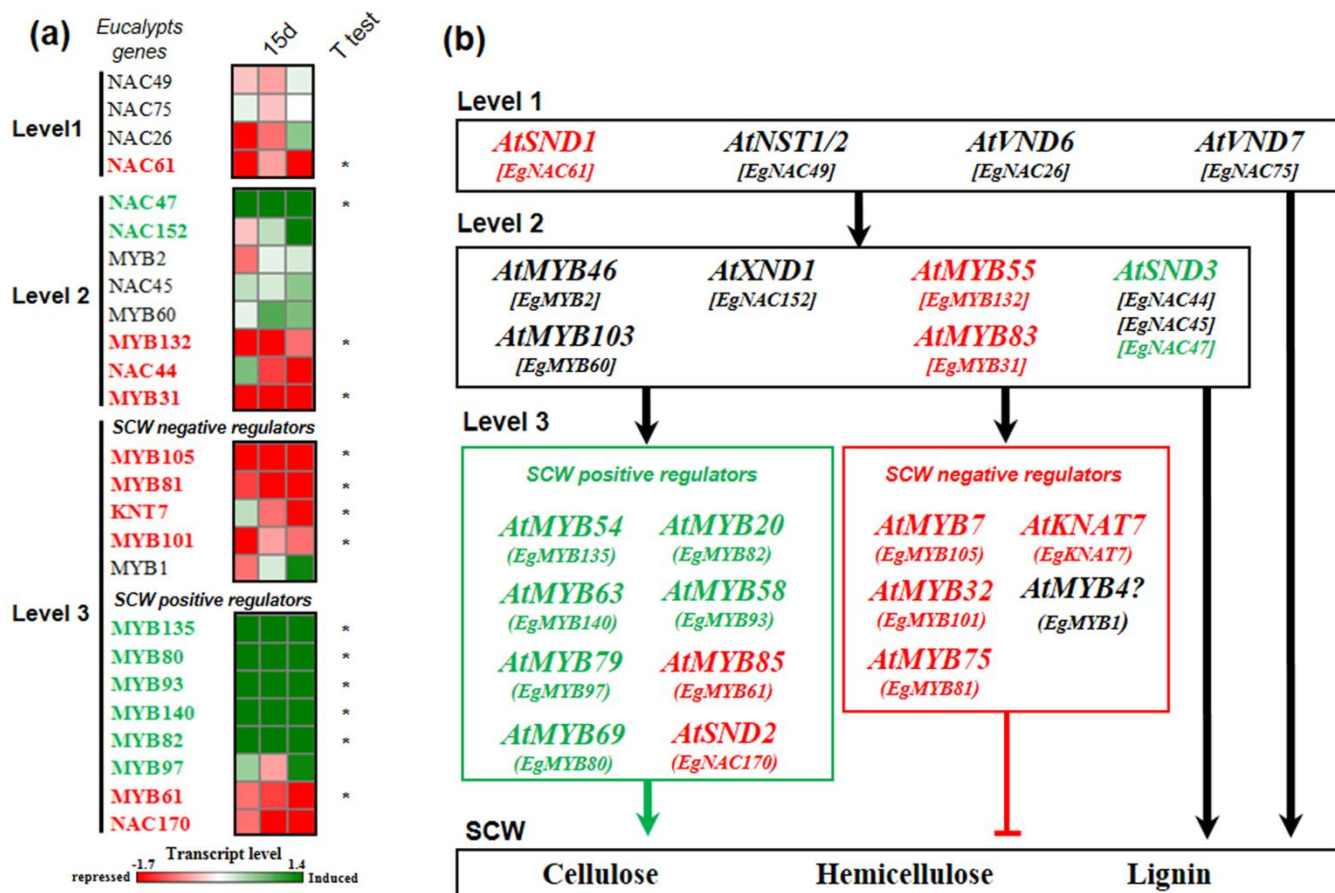


Figure 4: SCW-related MYB and NAC TFs are regulated by cold to promote SCW deposition
(a) The 25 genes represented are the closest eucalypts orthologs of *Arabidopsis* NACs and MYBs TFs involved in the control of SCW deposition (Hussey et al. 2013). For each gene, heat maps represent expression ratios after 2 days, 15 days and 46 days of cold exposure normalised by control (0d). The red to green colour scale represents log2 of expression ratios (available in **Table S1**). Gene names in green indicate those induced more than two-fold by cold and those in red indicate those repressed by more than two-fold. The genes marked with asterisks indicate those whose transcription was significantly up or down regulated at two or more time points (0d, control; 2d, two days; 15d, fifteen days; 46d, forty-six days of cold exposure, $n=6$, $p<0.05$; according to Student's t test). **(b)** The genes are grouped into the three-level hierarchical network of transcription factors that regulates xylem cell differentiation and deposition of lignin, cellulose and hemicellulose in SCWs of *Arabidopsis* (adapted from Hussey et al. 2013). The putative orthologs of *Arabidopsis* NAC and MYB genes in eucalypts are indicated in brackets below their *Arabidopsis* counterparts. Arrows indicate positive regulation and the blocked line indicates negative regulation.

In addition to the orthologs of known regulators of SCW in *Arabidopsis*, potential new SCW regulators have been pointed out by the works of (Hussey et al. 2015, 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 yet uncharacterized NAC and MYB transcription factors. 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 (Table S2). 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 (Figure S5). Because we focused our interest in woody tissues, we set up nodes 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 (Figure S6). 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 orthologs of known transcription factors that regulate SCW biosynthesis (Figure 5). Interestingly, it also contained uncharacterised transcription factors. The intermediate or 'cambium cluster' contained 17 genes expressed preferentially in vascular cambium, mainly composed of transcription factors of unknown function (with no orthologs in *Arabidopsis*). The lower 'non-woody tissues' cluster contained 29 genes; of which 11 encoded enzymes of unknown function (COMT_like, CAD_like, HCT_like) and 18 were unknown transcription factors. We chose a subset of 23 uncharacterised transcription factors, 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 3 were down regulated. Those of the 'xylem cluster' were being either up- or down-regulated by cold from 2- to 8-fold. The ten transcription factors of the 'cambium cluster' regulated by cold were all induced, some being dramatically up-regulated such as *EgMYB64* (>5000-fold) and *EgMYB59* (>100-fold).

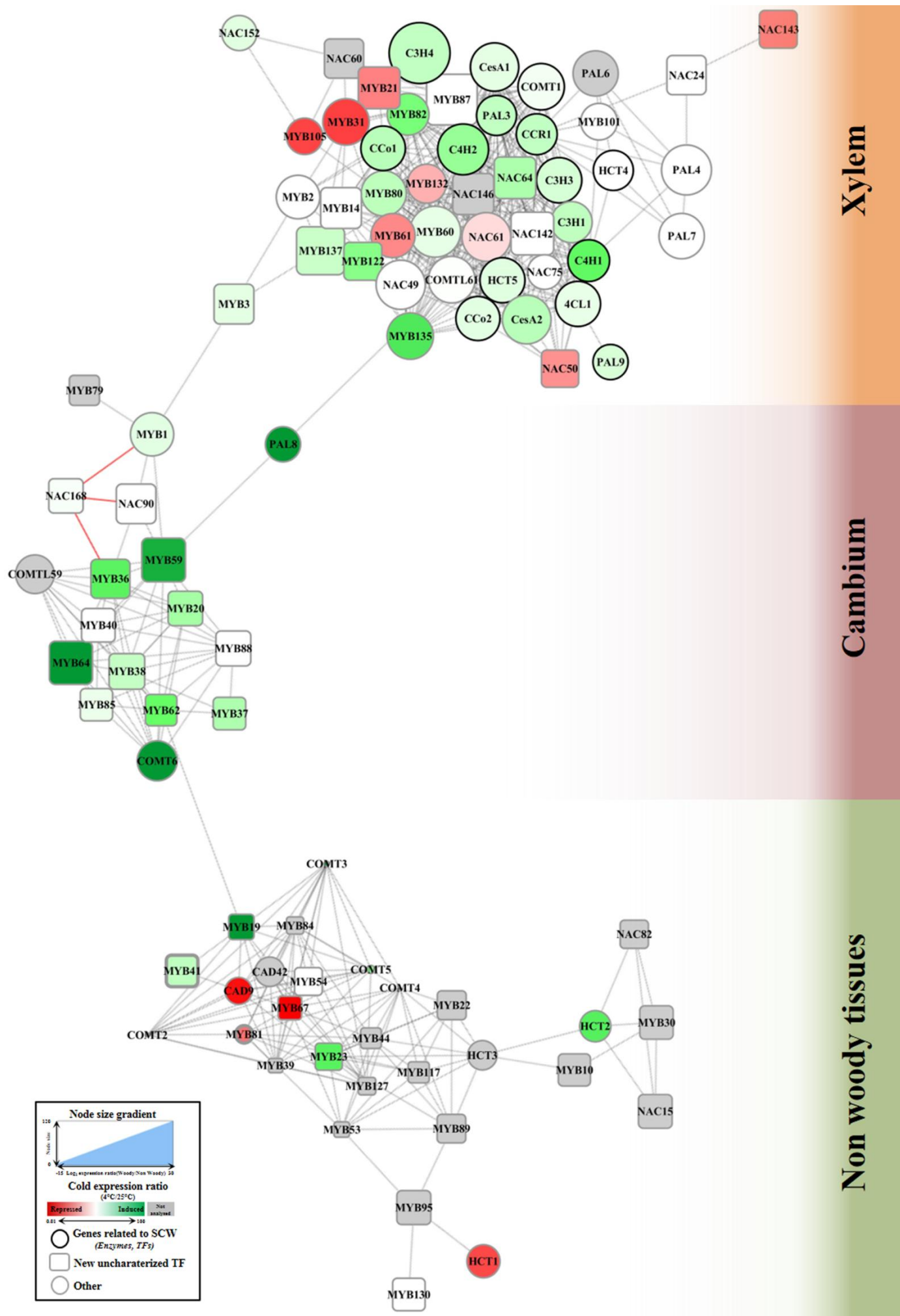
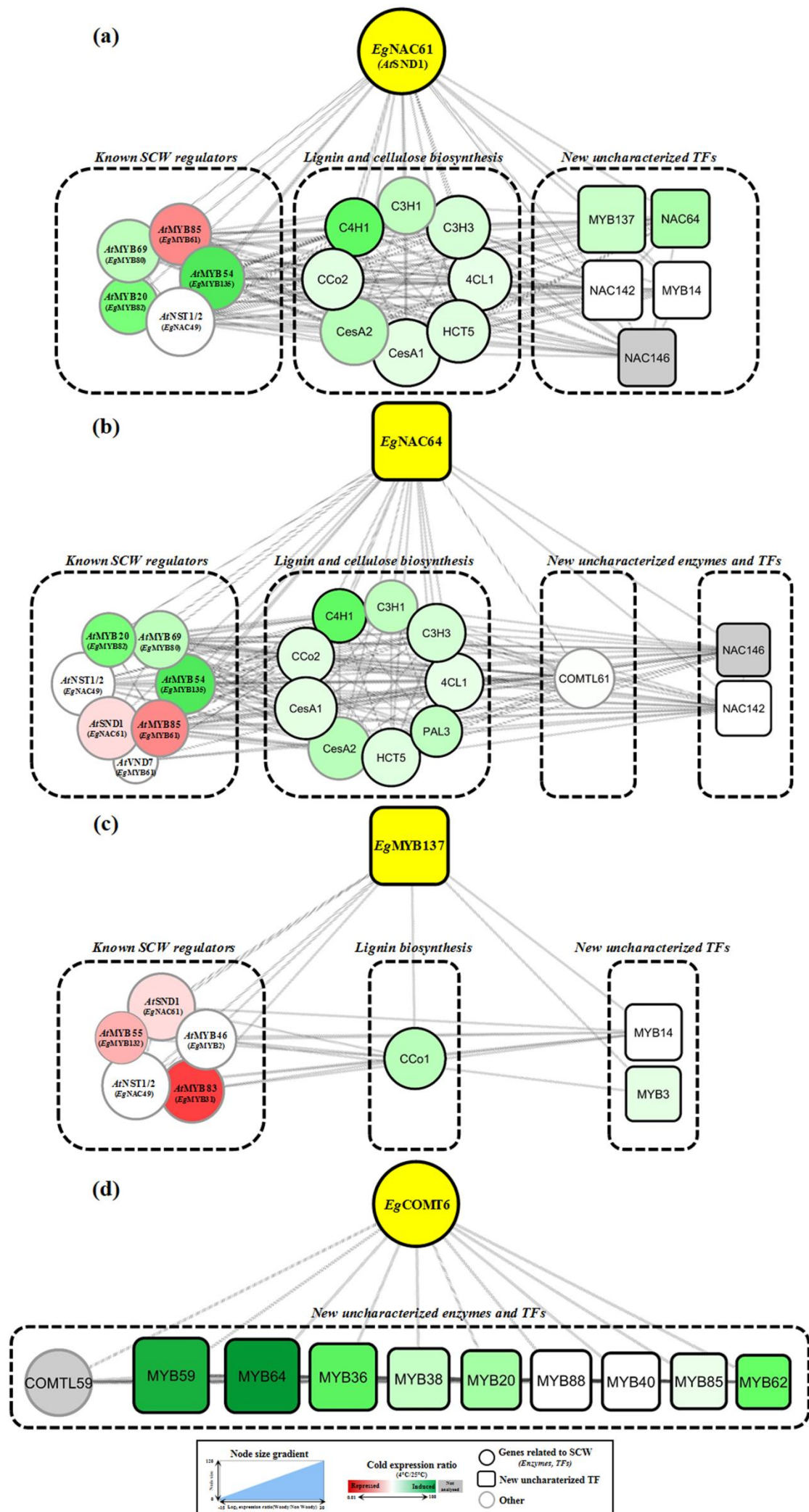


Figure 5: Correlation network analyses highlight xylem and cambium clusters enriched in cold responsive TFs. Transcript profiling of 146 genes encoding members of the MYB, NAC families of TFs as well as enzymes involved in SCW biosynthesis in a panel of 22 conditions were obtained from previous studies in eucalypts (see **Table S2**) (Wang et al. 2013, Carocha et al. 2014, Soler et al. 2015, Hussey 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**. Node sizes are proportional to the expression ratio between woody and non-woody tissues (**Table S2**). Circles represent genes related to SCW formation (enzymes or transcription factors), squares represent new, uncharacterised transcription factors. 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. 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). Transcript levels were measured in young eucalypts plants submitted to cold (2 days, 15 days and 46 days at 4°C) and compared to control (25°C, 0 days). Node colour gradient (red to green) represent gene expression ratios between cold and control conditions (Table S1; ratio = $\text{Cold}_{\text{mean}(15\text{d}/46\text{d})} / \text{Control}_{(0\text{d})}$). Green and red colours represent gene induction or repression in response to cold, respectively. Grey nodes represent genes with no expression data.

One way to verify the accuracy of the co-expression clusters is to investigate whether orthologous genes are also co-expressed in other species (Ruprecht and Persson 2012). We extracted, for instance, the subset of genes co-expressed with the *Eucalyptus* ortholog (*EgNAC61*) of the first level master regulator *AtSND1* (Figure 6a). The *EgNAC61* node-vicinity network included second and third levels transcription factors of the hierarchical SCW regulating network (see Figure 5) as well as lignin and cellulose biosynthesis genes (Figure 6a). The *Arabidopsis* orthologs of all these genes are also co-expressed with *AtSND1*, which regulates their transcription levels (Ruprecht et al. 2011, Yao et al. 2012) thereby strengthening the validity of the co-expression network. Interestingly, the *EgNAC61* node-vicinity network also contained new, yet uncharacterized transcription factors, such as *EgNAC64* and *EgMYB137* that has no orthologs in *Arabidopsis*, and were both significantly induced by cold (Table S1). The co-expression network of *EgNAC64* is composed of 19 genes mostly SCW-related genes, more than that of *EgNAC61* (*AtSND1*) (Figure 6b). Remarkably, it contains *EgNAC61* itself, suggesting that *EgNAC64* could also be a SCW-master regulator. This led us to investigate more precisely the phylogenetic relationships between *Arabidopsis* and *Eucalyptus* NAC sequences (Hussey et al. 2015). We found that *EgNAC64* belongs to the NAC subgroup II and could be a co-ortholog of *AtSND3*, a second level SCW-master regulator in *Arabidopsis* whose closest co-orthologs are four *Eucalyptus* genes duplicated in

tandem. We then extracted the co-expression network of *EgMYB137* that has no close orthologs in *Arabidopsis* (Soler et al. 2015). It contains 9 genes of which five are SCW regulators, one is a lignin biosynthesis gene *CCoAOMT1* supporting a possible involvement in SCW regulation in response to stress (Figure 6c). It also includes two yet uncharacterized TFs. Finally, we extracted the sub-network of *EgCOMT6* (Figure 6d), the most strongly induced COMT gene in response to cold. *EgCOMT6* which belongs to the cambium cluster presents a high degree of connectivity with 9 uncharacterized MYB TFs, which form the core of a module enriched in stress-induced woody-specific genes preferentially expressed in cambium.

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.



4. Discussion

Cell wall adjustment under abiotic stress is an important process in plant adaptation to cope with non-optimal growth conditions (LeGall et al. 2015). Cell wall changes induced by cold have been studied extensively in crop plants and mostly in their leaves, but they have been only rarely investigated in trees and 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 the 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 five-fold increase in ethanol-extractable 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 & 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 to 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 levels, we observed very significant inductions by cold of both a SCW-specific cellulose synthase gene *EgCesA2* (Eucgr.A01324; Myburg et al. 2014), and of *EgIRX10*, which encodes a GT47 glycosyl transferase involved in chain elongation of the most abundant hemicellulose 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 hypothesise, 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 contents 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 unfavorable 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* orthologs of *Arabidopsis* transcription factors 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 transcription factors, 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* orthologs 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 ortholog of *AtSND3* given its phylogenetic proximity even if it is not the closest *Eucalyptus* ortholog. *EgMYB137* is a new uncharacterized TFs, co-expressed with *EgNAC61* (*AtSND1*) and other orthologs 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* x *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 & Butorina (2003) and Harfouche et al. (2011).

5. Acknowledgements

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 TREEFORJOULES 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). The authors acknowledge F. Melun (FCBA) for his help with the identification of field-grown eucalypt clones in Longages (France), to R. Simões (CEF) for the extraction of xylem samples, to B. Savelli and H. San Clemente (LRSV) for their help with bioinformatics, to A. Gauthier and A. Desplat for their technical help during their Master internships, to the Genotoul Bioinformatics Platform Toulouse Midi-Pyrenees for computing and storage resources and to 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. R.P. was supported by a PhD grant from the *Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*.

6. 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* 48:381–90.
- 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, Salazar MM, Lepikson-Neto J, Marques WL, Alves A, Teixeira PJPL, Mieczkowski P, Carazzolle MF, Martinez Y, Deckmann AC, Rodrigues JC, Grima-Pettenati J, Pereira GAG (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, Fevereiro P, Myburg AA, Paiva JAP, Grima-Pettenati J (2015) Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol* 206:1297–313.
- Cassan-Wang H, Soler M, Yu H, Camargo ELO, Carocha V, Ladouce N, Savelli B, Paiva JP, Leplé JC, Grima-Pettenati J (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, Caudeville E, Arnoult S, Zub H, Gillet F, Lejeune-Hénaut I, Brancourt-Hulmel M, Pelloux J, Rayon C (2013) Cell wall compositional modifications of *Miscanthus* ecotypes in response to cold acclimation. *Phytochemistry* 85:51–61.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J (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 and Lapierre C (eds). *Advances in Botanical Research: Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*. Elsevier, 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, Mizrachi 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(1):112–66.
- 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, Pavy N, Baghdady A, Tremblay L, Levasseur C, Ladouce N, Lapierre C, Séguin A, Hawkins S, Mackay J, Grima-Pettenati J (2010) EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor

- from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in Arabidopsis and poplar. *New Phytol* 188:774–86.
- Lepikson-Neto J, Alves A, Simões R, Deckmann AC, Camargo ELO, Salazar MM, Rio MCS, do Nascimento LC, Pereira GAG, Rodrigues JC (2013) Flavonoid supplementation reduces the extractive content and increases the syringyl/guaiacyl ratio in eucalyptus grandis x eucalyptus urophylla hybrid trees. *BioResources* 8:1747–1757.
- Mashkina OS, Butorina AK (2003) Genetic engineering of forest woody plants. *Genetika* 39:309–17.
- 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 AA, Grattapaglia D, Tuskan GA, Hellsten U, Hayes RD, Grimwood J, Jenkins J, Lindquist E, Tice H, Bauer D, Goodstein DM, Dubchak I, Poliakov A, Mizrahi E, Kallan ARK, Hussey SG, Pinard D, van der Merwe K, Singh P, Van Jaarsveld I, Silva-Junior OB, Togawa RC, Pappas MR, Faria DA, Sansaloni CP, Petroli CD, Yang X, Ranjan P, Tschaplinski TJ, Ye C-Y, Li T, Sterck L, Vanneste K, Murat F, Soler MM, Clemente HSHS, Saidi N, Cassan-Wang H, Dunand C, Hefer CA, Bornberg-Bauer E, Kersting AR, Vining K, Amarasinghe V, Ranik M, Naithani S, Elser J, Boyd AE, Liston A, Spatafora JW, Dharmawardhana P, Raja R, Sullivan C, Romanel E, Alves-Ferreira M, Lheim CK, Foley W, Carocha V, Paiva J, Kudrna D, Brommonschenkel SH, Pasquali G, Byrne M, Rigault P, Tibbits J, Spokevicius A, Jones RC, Steane DA, Vaillancourt RERE, Potts BM, Joubert F, Barry K, Pappas Jr. GJ, Strauss SH, Jaiswal P, Grima-Pettenati J, Salse JJ, Van de Peer Y, Rokhsar DS, Schmutz J, Külheim C, Foley W, Carocha V, Paiva J, Kudrna D, Brommonschenkel SH, Pasquali G, Byrne M, Rigault P, Tibbits J, Spokevicius A, Jones RC, Steane DA, Vaillancourt RERE, Potts BM, Joubert F, Barry K, Pappas GJ, Strauss SH, Jaiswal P, Grima-Pettenati J, Salse JJ, Van de Peer Y, Rokhsar DS, Schmutz J (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510:356–362.
- Myburg A, Potts B, C M, Kirst M, Gion J, Grattapaglia D, Grima-Pettenati J (2007) *Eucalyptus*. In: Kole C E (ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants*. Springer, New York, NY, USA, pp 115–160.
- 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 (2016) 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* in press
- 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 R Soc Tasmania* 135:57–61.
- Ranik M, Myburg AA (2006) Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis. 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(6):e45
- 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* 2–23.
- Ruprecht C, Persson S (2012) Co-expression of cell wall-related genes : new tools and insights. *Front Plant Sci*. 3:1–7.
- 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 Phytol* 206:1364–1377.
- 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.
- Southerton SG, Marshall H, Mouradov A, Teasdale RD (1998) Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol* 118:365–372.
- Taylor-Teeples M, Lin L, Lucas M De, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Lin L, de Lucas M, Turco G, Toal TW, Gaudinier A, Young NF, Trabucco GM, Veling MT, Lamothe R, Handakumbura PP, Xiong G, Wang C, Corwin J, Tsoukalas A, Zhang L, Ware D, Pauly M, Kliebenstein DJ, Dehesh K, Tagkopoulos I, Breton G, Pruneda-Paz JL, Ahnert SE, Kay SA, Hazen SP, Brady SM (2015) An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* 517:571–575.
- Teulières C, Marque C, Nagata T, Lörz, Wildhom JM (2007) Eucalyptus. In: Pua EC, Davey MR (eds) ‘Tropical crops’. Springer Verlag, Berlin, Deutschland
- 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* 77:277–82.
- 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, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang Z-Y, Dixon R (2013) Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:3976–3987.
- 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* 18:3158–70.
- Zhong R, Ye ZH (2015) Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol* 56:195–214.

7. Supplementary data

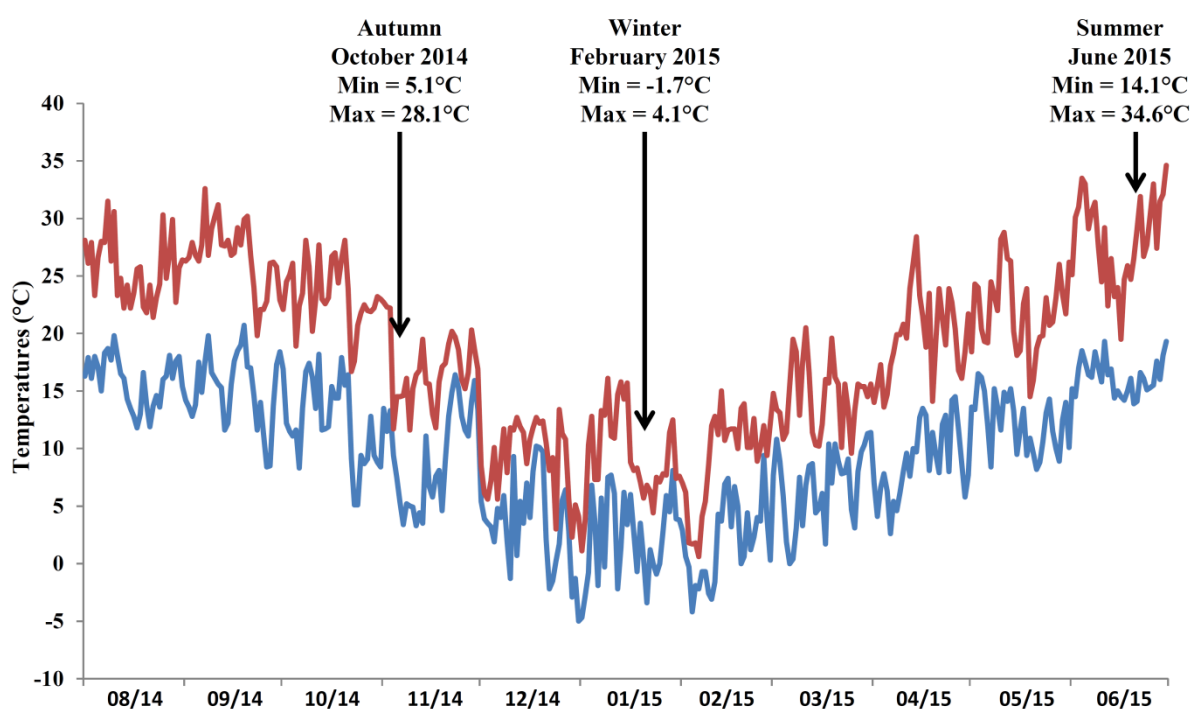


Figure S1: Temperature curves during the harvesting period of adult trees. Blue and red curves represent, respectively, the daily maximum and minimum temperatures. Monthly average maximum and minimum temperatures are indicated for the three harvesting periods, October 2014 (autumn), February 2015 (winter) and June 2015 (summer). The x axis represents the period between August 2014 and June 2015. Data were obtained from the “Météo France” website (<http://www.meteociel.com/climatologie/>).

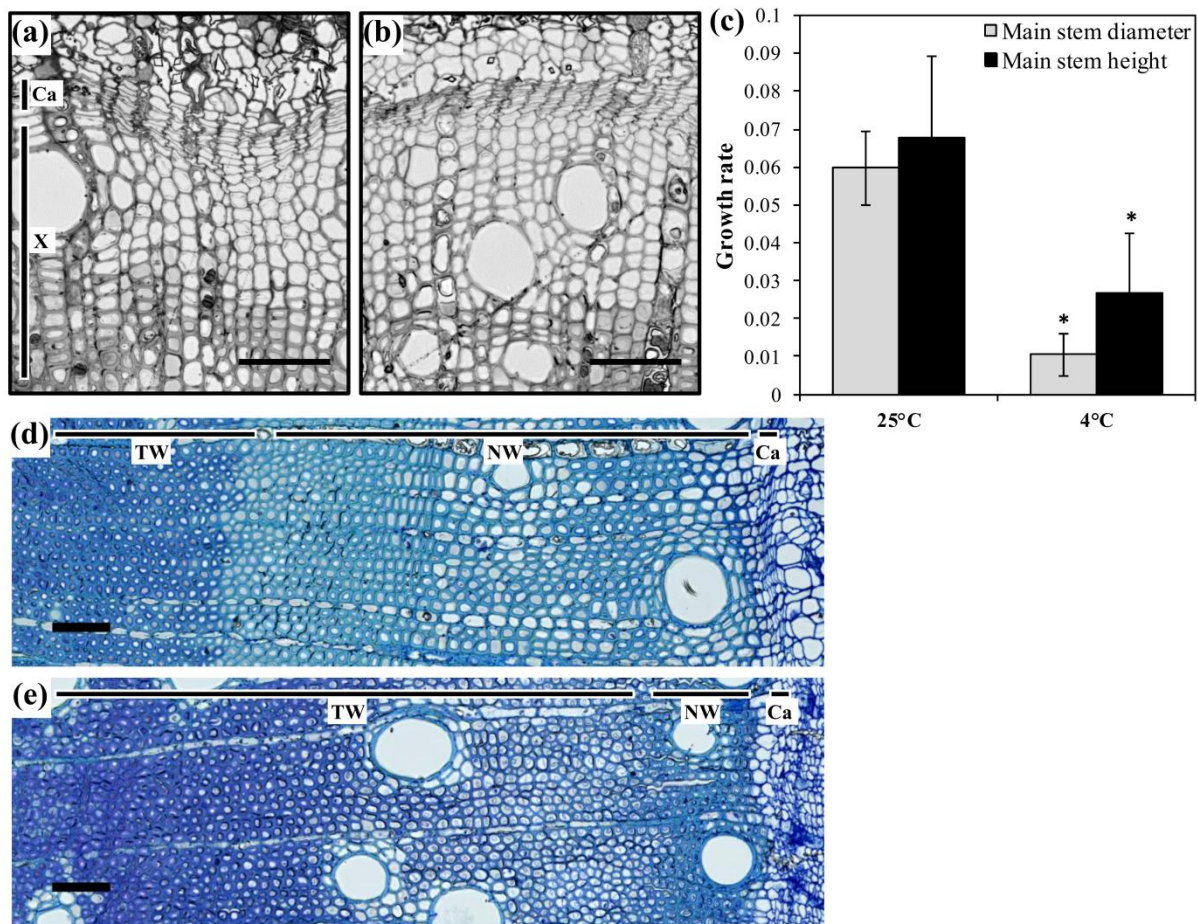


Figure S2: Effect of cold on the production of new xylem cell layers from cambial zone. Transverse stem sections of young *E. gundal* before (a) and after (b) 46 days at 25/22°C (day/night). After 46 days at 25°C, SCW of xylem cells below the cambium are thinner and less lignified than after 46 days at 4°C. (c) Main stem apical and radial growth rate of *E. gundal* clones (growth ratio from measurements performed before and after 46 days at 25°C and 4°C). (d) and (e) represent the formation of new xylem cell layers in transverse stem sections when trees are exposed respectively to 25°C and 4°C. In order to stain cells generated before the experiment, trees were bent at an angle of 45° during 3 weeks. A toluidine blue staining clearly identifies a thick polysaccharides enriched dark blue G layer when tension wood zone is observed (TW). One group of 3 independent trees were submitted to 46 days of cold exposure (4°C) whereas 3 others were left at 25°C. A large zone of about 40 cell layers was generated at 25°C and a small zone of about 10 cell layers appeared at 4°C. All together, these observations showed that despite a strong reduction of growing rate after 46 days of cold, the main stem of eucalypts continued to undergo primary as well as secondary growth at 4°C. Ca, cambium; NW, normal wood; TW, tension wood; X, xylem. (T test, n = 3 to 4, * p<0.05).

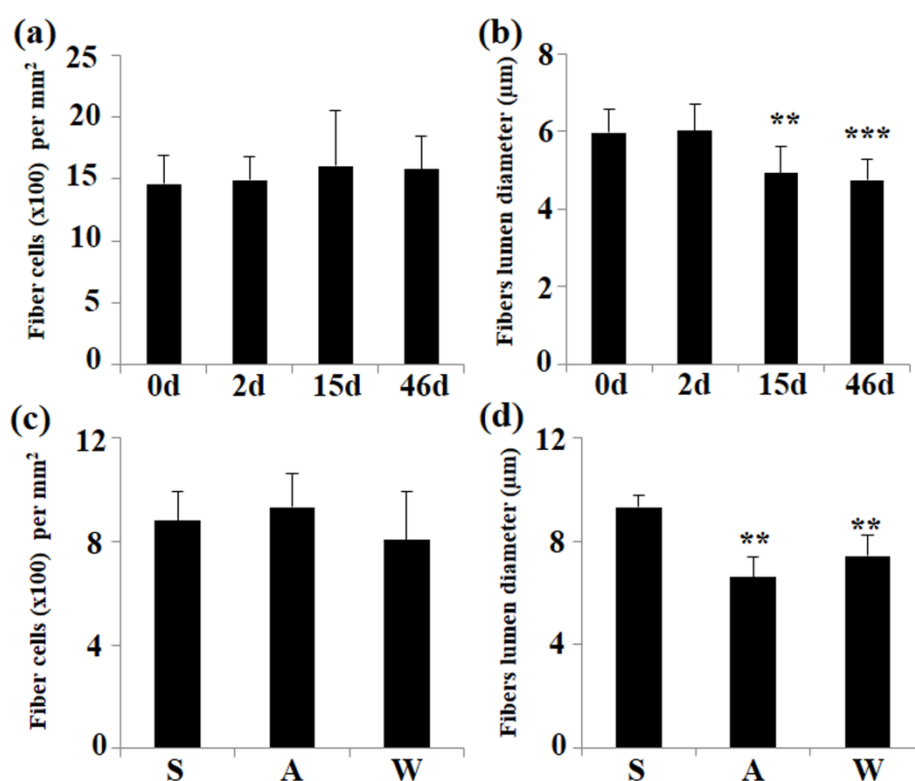


Figure S3: Cold decreases xylem fibres lumen diameter. Xylem fibre density and lumen diameter were measured on stem sections of young plants (a and b) and adult trees (c and d). Significant differences from the control (0d) for young plants and from samples collected in summer for adult trees are indicated as in Figure1. Abbreviations as in Figure 1.

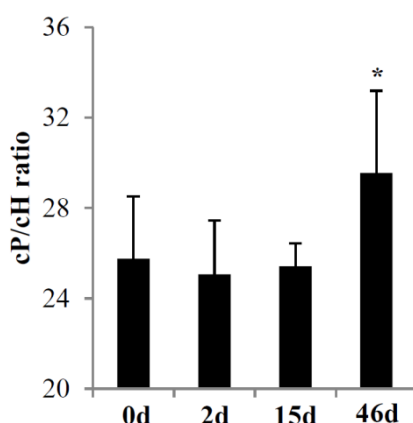


Figure S4: Pentosane/hexosane ratio in young eucalyptus xylem. Bark-free xylem obtained from young eucalyptus plants grown at 25°C (0d) or 4°C for two days, 15 days or 46 days were analysed by analytical pyrolysis. The cP/cH ratio (y axis) was calculated from the sum of the peak areas of the characteristic pyrolysis products of pentosanes (cP) and hexosanes (cH). This provides a rough estimation of the relative proportion of hemicellulose and cellulose (Lepikson-Neto et al. 2013). *, represents significant differences (Student's t test, n = 6; $p < 0.05$) when compared to controls (0d).

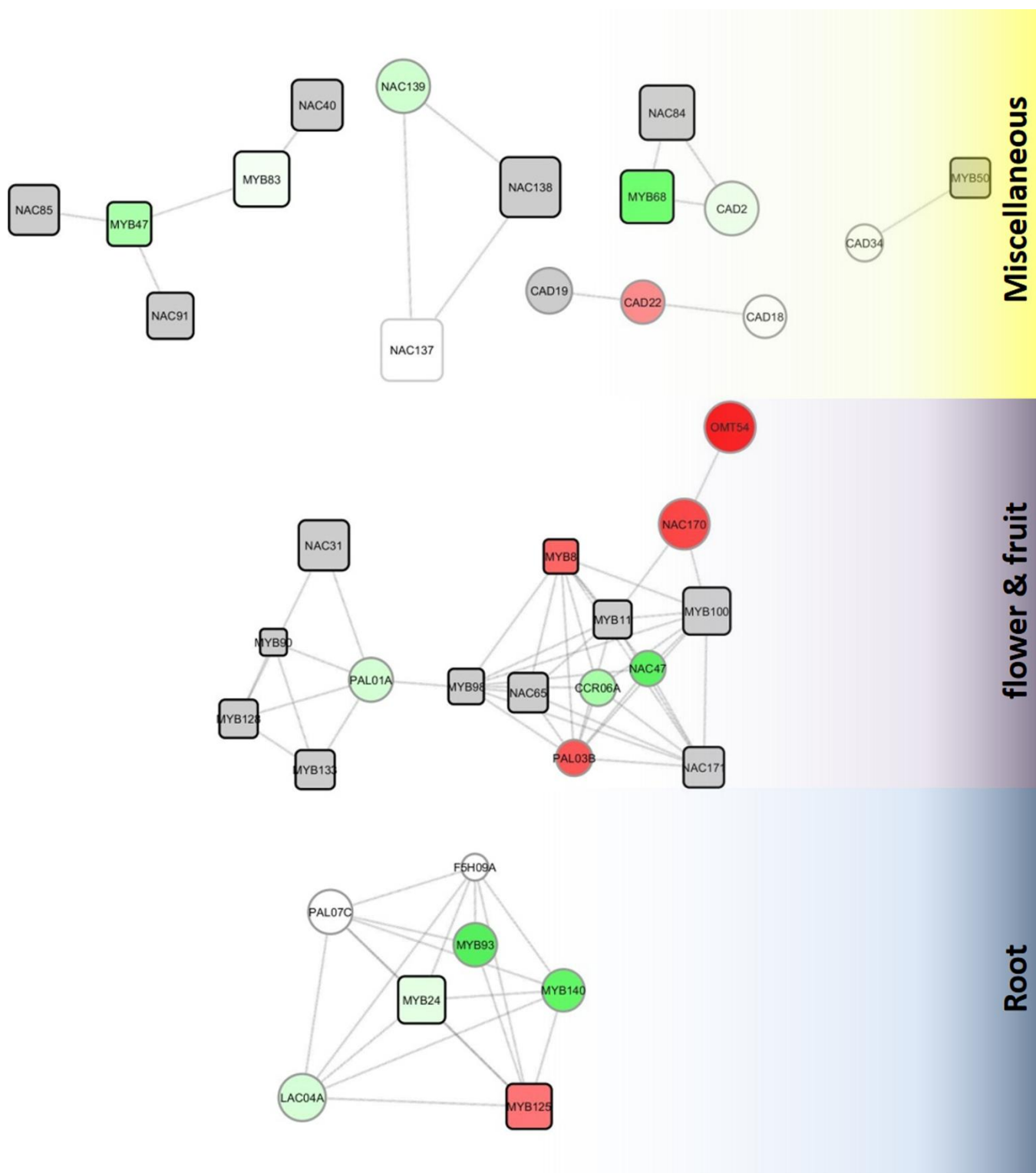


Figure S5: Subnetworks regrouping gene clusters from roots, flowers and miscellaneous tissues. This figure represents the small isolated subnetworks containing 39 genes belonging to root, flowers or miscellaneous clusters (i.e. preferentially expressed in various non-woody tissues tissues). Nodes and edges attributes are described in Figure 6.



Figure S6: Hierarchical clustering of genes included in the network analysis. Gene expression values are provided in Table S2. The hierarchical clustering algorithm of Expander V7.1[®] software (Tel Aviv University, 2003) revealed six main clusters. The ‘Xylem’, ‘Cambium’ and ‘Non-woody tissues’ clusters contained similar genes to those obtained by the correlation network analysis in Figure 6 of the main text. The gradient of green to red colour represents the gradient of gene expression (green = low, red = high expression, as indicated in the inset). EgnCa, juvenile cambium; EgnCm, mature cambium; EgnPh, phloem; EgnX, xylem; EgnXj, juvenile xylem; EglXm, mature xylem; EglRCt, root; EglLyCt, young leaves; EglMal, mature leaves; EglFb, flower buds; EglFc, fruit capsules (see Cassan-wang *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2015).

CHAPITRE II : Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in *Eucalyptus grandis* xylem

Chapitre II : Water deficiency and potassium supply trigger interconnected signals to modulate wood formation in *Eucalyptus grandis* xylem.

Raphael Ployet¹, Mônica T. Veneziano Labate², Thaís Regiani Cataldi², Hélène San Clemente¹, Mathias Christina³, Bénédicte Favreau⁴, Marie Morel¹, Jean-Paul Laclau^{3,5,6}, Marie Denis⁴, Carlos Alberto Labate², Gilles Chaix⁴, Jacqueline Grima-Pettenati¹ and Fabien Mounet¹

¹ Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31326 Castanet-Tolosan, France.

² Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, CEP 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil.

³ CIRAD, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France.

⁴ CIRAD, UMR AGAP, 34398 Montpellier, France.

⁵ Departamento de Ciências Florestais, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, CEP 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil.

⁶ Departamento de Ciência Florestal, Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”, CEP 18610-300 Botucatu, SP, Brazil.

Abstract

Fast growing *Eucalyptus* tree is well adapted to various soils and climate environment, but its growth varies strongly according to these factors. Thanks to potassium fertilization to supply deficient soils, plantation productivity in the south of Brazil is one of the highest in the world. But potassium consumption is rising with negative consequences from an economical point of view, resources are limited, and plantations are facing more and more drought events. The development of more sustainable cultural practices requires an improved understanding of tree response to water stress in interaction with mineral nutrition. We aimed to characterize the effect of water availability and nutrition supply on wood formation and quality. An experimental design was set up on field with a highly productive *Eucalyptus grandis* clone planted in a split-plot design, with 2 factors tested in interaction: the water availability with 100% rainfalls (+W) or 63 % of rainfalls (-W) set up with rainfall exclusion system, and the fertilization with +K or Control (-K). We analyzed wood properties (composition and structure) and performed large scale analysis of transcriptome (RNAseq) and metabolome (GC-MS) in developing xylem. These data were integrated using multivariate statistical analyses, which allowed the identification of several transcription factors as new highly promising candidates in the regulation of cambial activity and secondary cell wall deposition in *Eucalyptus*. The functional characterization of one of these transcription factor, *EgMYB137*, in *E. grandis* transgenic roots, demonstrated its implication in secondary cell wall biosynthesis in xylem. This confirmed the potential of our system biology approach in the identification of new key regulators of wood formation in woody plants.

Keywords: System biology, Correlation networks, Omics integration, Drought, Nutrition, Xylem, Transcription factors, *Eucalyptus*.

Résumé

L'*Eucalyptus* est un arbre à croissance rapide bien adapté à différents sols et climats, mais sa croissance varie fortement en fonction de ces facteurs. Grâce à la fertilisation au potassium qui compense des sols pauvres, la productivité des plantations du sud du Brésil est une des plus élevée au monde. Cependant, la consommation croissante en potassium a des conséquences négatives, d'un point de vue économique, du fait que les ressources sont limitées, et car les plantations font face à de plus en plus d'épisodes de sécheresse. Le développement de pratiques culturales plus viables requiert une meilleure compréhension de la réponse des arbres au manque d'eau en interaction avec la nutrition minérale. Notre objectif était de caractériser l'effet de la disponibilité en eau et de l'apport en éléments nutritifs, sur la formation du bois et sa qualité. Un dispositif expérimental, a été mis en place au champ avec un clone commercial d'*Eucalyptus grandis* très productif. Deux facteurs sont testés en interaction : la disponibilité en eau avec 100% d'eau de pluie (+W) ou 63 % d'eau de pluie (-W) via un système d'exclusion, et la fertilisation au potassium +K ou Contrôle (-K). Nous avons analysé les propriétés du bois (composition et structure) et conduit des analyses globales du transcriptome (RNAseq) et du métabolome (GC-MS) du xylème en développement de ces arbres. Ces données ont été intégrées en utilisant des analyses statistiques multivariées, qui ont permis l'identification de plusieurs facteurs de transcription qui constituent de nouveaux candidats dans la régulation de l'activité cambiale et du dépôt de paroi secondaire chez l'*Eucalyptus*. La caractérisation fonctionnelle d'un de ces facteurs de transcription, *EgMYB137*, dans les racines d'*E. grandis*, a permis de démontrer son implication dans la biosynthèse de paroi secondaire dans le xylème. Cela a confirmé le potentiel de notre approche de biologie des système dans l'identification de nouveaux régulateurs clés de la formation du bois chez un ligneux.

Préambule

Dans un dispositif unique au monde, créé dans le cadre d'une collaboration entre l'Université de São Paulo (ESALQ) et le CIRAD (UMR Eco & Sols) de Montpellier, plusieurs centaines d'arbres d'un génotype commercial d'*E. grandis* ont été soumis à un total de 6 traitements: 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 un tiers de celle-ci, conduisant à un manque d'eau modéré. En combinaison avec ces deux traitements, les arbres bénéficient d'une fertilisation au potassium, ou au sodium, ou encore une fertilisation de base minimale (Battie-Laclau et al., 2014a).

Ce dispositif a été mis à profit pour étudier l'effet du manque d'eau, combiné à différents régimes nutritifs, sur la formation du bois chez l'*Eucalyptus*. Dans le cadre de ce projet, impliquant le CIRAD de Montpellier, l'ESALQ (Université de São Paulo) et le LRSV, et au cours d'un séjour de 3 mois à Piracicaba (Brésil) durant ma première année de thèse, j'ai eu la possibilité de collecter moi même les échantillons sur le terrain avec l'aide de G. Chaix. Pendant cette mission, j'ai également débuté les analyses transcriptomiques et métabolomiques avec l'aide de B. Favreau, au laboratoire Max Feffer (Genética de Plantas) dirigé par le Professeur A. C. Labate.

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 m'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.

1. Introduction

Wood, or secondary xylem, is formed by the activity of an internal meristematic tissue, 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 mankind, providing raw material for timber, paper, energy, second generation biofuels as well as 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 on the chemical composition and the structure of the fibers' secondary cell walls (SCWs), determine wood industrial end-uses (Mansfield, 2009). In xylem, SCWs are made of approximately 80% of polysaccharides (cellulose and hemicelluloses), while the remaining biomass represent mainly lignin, a complex hydrophobic phenolic polymer. The SCW biopolymers are cross-linked into a supramolecular network that determines SCW ultrastructure (Vanholme et al., 2010).

Among hardwoods, the fast growing eucalypts characterized by outstanding growth performance, short-rotation time and wide adaptability are the most planted tree worldwide for wood biomass production, and are often referred as woody biomass crops (Hinchee et al., 2009). Large-scale eucalypts plantations are mostly established in tropical and subtropical regions where the main environmental constraints are soil nutrients starvation and drought episodes (Gonçalves et al., 1997). In highly weathered tropical soils, potassium (K) is a major limiting factor of tree growth (Laclau et al., 2009; Wright, 2011; Epron et al., 2012). Besides its essential role in a variety of cellular processes, as reviewed by Sardans and Peñuelas (2015), K is considered as a key player in wood formation (Fromm, 2010). K-fertilization usually results in a dramatic increase in wood biomass production in tree species such as *Picea* (Dünisch and Bauch, 1994), pine (Smethurst et al., 2007), poplar (Arend et al., 2004; Wind et al., 2004) and eucalypts (Laclau et al., 2009). This enhanced wood production was shown to result from a higher cambial activity correlated with a peak of K in the cambial zone (Kuhn et al., 1997b; Arend et al., 2002; Langer et al., 2004; Wind et al., 2004; Fromm, 2010). K also influences xylem structure likely through its role in turgor-driven elongation of new xylem cells. It has an impact on SCW deposition dynamics as K-starved trees show earlier initiation of SCW deposition than controls (Langer et al., 2002; Dünisch et al., 1998).

In a context of climate change, the intensity and frequency of future drought episodes are likely to increase in tropical and subtropical regions, affecting *Eucalyptus* plantations

productivity (Hawkins and Sutton, 2012; IPCC, 2013). Besides its essential roles in developmental processes, K contributes to plant resistance to abiotic stresses, including drought by improving processes like osmotic adjustment, stomatal aperture control, photosynthesis activation, ROS detoxification and phloem loading of photoassimilates (reviewed in Wang et al., 2013). Some studies suggested that K modulates xylem hydraulic conductance, possibly by interacting with pectins in intervessel pits, to enhance tree resistance to drought (Nardini et al., 2010; Trifilò et al., 2008; Jansen et al., 2011; Zwieniecki et al., 2001). Recently, using a large-scale through-fall exclusion experiment combined to K fertilization, Battie-Laclau et al. (2016) showed that K improves water use efficiency for biomass production in *Eucalyptus*. However, during drought episodes, these authors noticed that the beneficial effect of K may be not 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). This exacerbated water deficit could reduce the safety margins of K-fertilized trees in severe droughts. Tree response to drought in interaction with K fertilization starts to be well documented in organs such as leaves and roots (Cakmak, 2005; Anschütz et al., 2014; Wang et al., 2013), but xylem has received much less attention. Most of the studies performed in this tissue focused on the drought-induced structural modifications and their impact on water transport properties (Arend and Fromm, 2007; Zwieniecki and Secchi, 2015). Up to now, the changes occurring at the transcriptomic and metabolomic levels in xylem in response to the combined action of drought and K fertilization remain unstudied.

Wood formation is indeed highly plastic and involves the dynamic integration of environmental signals into complex developmental pathways, resulting into functional adaptation to environmental conditions (Zinkgraf et al., 2017). For instance, SCW remodeling (changes in thickness, composition and/or structure) has been observed in response to several abiotic or nutritional stresses such as nitrogen excess or depletion (Camargo et al., 2014), mechanic stress (Mellerowicz and Gorshkova, 2012), cold stress (Ployet et al., 2017). In the latter case, SCW remodeling was proposed to contribute to cold stress tolerance (LeGall et al., 2015; Ployet et al., 2017).

SCW biosynthesis and deposition is a highly regulated process mainly controlled at the transcriptional level and the expression of cell wall-associated genes is tightly spatio-temporally co-regulated (Hertzberg et al., 2001; Demura and Fukuda, 2007). Most of our current knowledge on the regulation of SCW deposition comes from the herbaceous model plant *Arabidopsis thaliana* in which a complex hierarchical regulatory network has been

proposed to control SCW deposition (Hussey et al., 2013; Yang and Wang, 2016). Within this network, the most prominent families of transcription factors (TFs) involved are NAC (NAM/ATAF/CUC) and R2R3-type MYB (MYELOBLASTOSIS) family proteins. They act downstream of Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III) type TFs which initiate xylem cell specification and secondary cell wall deposition. SCW deposition is then controlled by a first level of NAC master regulators and a second-level of MYB regulators, which regulate a battery of downstream transcription factors (mainly MYB family) and SCW biosynthesis genes (Grima-Pettenati et al., 2012; Nakano et al., 2015; Zhong and Ye, 2015; Hussey et al., 2013).

Recent studies have highlighted the importance of a dynamic cross-talk between the regulation of SCW during development and in response to stresses, likely necessary to promote adaptation to environmental changes. For instance, an increasing number of SCW-TFs and subset of SCW associated genes were reported to be induced by environmental constraints such as high salinity, iron deprivation in *Arabidopsis* (Taylor-Teeple et al., 2015) or cold stress in *Eucalypts* (Ployet et al., 2017). Some of these TFs are clearly involved in biotic or abiotic stress tolerance (Ramírez et al., 2011; Guo et al., 2017). In birch, Guo et al. (2017) recently reported that overexpression of the SCW master regulator *BplMYB46* increases lignin deposition as well as SCW thickness and leads to an improved salt and osmotic stress tolerance.

To get a comprehensive view of a complex process such as the regulation of wood formation in response to environmental cues, system biology approaches are particularly adapted. They offer a framework for integration of 'omics' datasets (like transcriptome and metabolome) allowing to (i) identify metabolic pathways resulting from genes - metabolites interactions, (ii) gain insights in candidate gene functions and (iii) highlight new key regulatory genes or metabolites (Aoki et al., 2007). So far, co-expression networks have allowed gaining insights into xylem SCW biosynthesis in *Arabidopsis* (Ruprecht and Persson, 2012). Recently, they have been applied in *Eucalyptus* by exploiting natural variations of transcriptome across populations (Dharanishanthi and Dasgupta, 2016), with integration of genetic data in some cases (Mizrachi and Myburg, 2016). 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 likely involved in xylem formation under abiotic stresses (Cai et al., 2014; Zinkgraf et al., 2017). In *Arabidopsis*, Taylor-Teeple et al. (2015) constructed co-regulation networks inferred from protein-DNA interaction data to

refine the SCW regulatory network under abiotic stresses and highlighted new putative key regulators. None of these studies integrated transcriptomic and metabolomic data with wood properties. Moreover, there are no available system-based views of wood formation in response to K-fertilization or to a combination of K-fertilization and water-status.

In the present study, we aimed to gain a comprehensive view of the effects of K fertilization on wood formation in *E. grandis* trees grown under contrasting water supply regimes. We used differentiating xylem to perform both transcriptomic (RNAseq) and metabolomic (GC-MS and LC-MS) profiling to detect differentially expressed genes and differentially accumulated mass signatures, respectively. We also evaluated trunk growth, SCW composition and xylem structure. We then developed a system biology approach based on co-regulation network to correlate changes in transcriptome, metabolome and wood properties. This enabled us to identify subset of genes and biological processes impacted by fertilization and water limitation. Moreover, it pointed new (not yet studied) key TFs involved in SCW regulation. We chose one of the best candidate and confirmed by functional characterization in transgenic eucalypts hairy roots its ability to regulate SCW deposition in *E. grandis*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material and sampling

Eucalypts plantation was conducted as described by Battie-Laclau et al. (2014), at the Itatinga Experimental Station of the University of São Paulo in Brazil. Briefly, a split-plot experimental design was set up with a highly productive *E.grandis* commercial clone (Suzano Company, São Paulo, Brazil). The experimental field was divided in 3 independent blocks in which treatment were applied. Water supply regime was the whole plot factor, 37% of throughfall water was excluded from soil irrigation by plastic sheets covering (+W: 'exclusion-free' plots or -W: 'exclusion' plots). Nested within each plot, the split-plot factor was fertilisation regimes. In our case, we harvested xylem samples on trees submitted to 4 treatments: C+W (no fertilization and no throughfall exclusion), C-W (no fertilization and 37% of throughfall excluded), K+W (0.45 mol K.m⁻² applied as KCl and no throughfall exclusion) and K-W (0.45 mol K.m⁻² applied as KCl and no throughfall exclusion). Tree growth monitoring on height and circumference (at breast height) on 36 individuals within each plot was done. Samples were collected on 4 independent trees, representative of the 4 co-dominant classes in the range of cross-sectional areas in each treatment.

After removing bark, developing xylem including cambium were collected by scrapping using single edge sharp blade and immediately frozen in liquid nitrogen. Frozen samples were milled to fine powder in liquid nitrogen using mortar and pestle and stored at -80°C until use. Micro-core samples (15mm in length and 2mm in diameter) were collected using Trephor (Rossi et al., 2006), fixed and stored in 80% ethanol. Trees were cut down and above ground biomass was measured. For each tree, one transversal section of tree trunk was collected at 1.3 m above the ground level and the corresponding trunk diameter was measured. These wood disks were air dried and stored for further analysis of wood density.

2.2. Ecophysiological data

Tree circumference at breast height (CBH) was measured for each tree sampled at 4 years. On these trees, trunk biomass was quantified after cutting down, according to procedure already described in Battie-Laclau et al., 2016. From these parameters, an allometric equation was established for each treatment to link the average CBH and the average biomass of the trunk, according to (Almeida et al., 2014). This equation was applied to predict the biomass production for each individual tree, over the days preceding sampling. Biomass production by day ($\text{kgDM} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{tree}^{-1}$) over the period preceding the sampling, was predicted from CBH monitored every 15 days since planting on 36 inner trees within each subplot.

The daily average gross primary productivity (GPP, $\text{gC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1}$) was estimated for each treatment from the model already established on the experiment by Christina et al., 2015. The proportion of carbon allocated to trunk secondary growth ($\% \text{GPP}_{\text{stem}}$), was obtained for each tree by dividing the tree trunk biomass increment ($\text{kgDM} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{tree}^{-1}$), by the simulated tree gross primary productivity ($\text{gC} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{tree}^{-1}$).

2.3. RNA isolation

Total RNAs were extracted from frozen scrapping samples using protocols already described (Southerton et al., 1998). RNA quantity and quality were checked by spectrophotometry using NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) and 1% agarose gel. Half of the amount of total RNA was kept for RNA sequencing. Contaminating DNA was removed in the remaining amount of RNA by using TURBO DNA-free kit (Ambion), according to the manufacturer's instructions. Absence of genomic DNA contamination was checked by PCR with the housekeeping gene *Tubulin* (see Supp. Table 1). RNA quantity and quality were checked a second time before reverse transcription.

2.4. RNA sequencing

Samples were first checked for RNA degradation using RNA Nano Chip electrophoresis technology (Agilent). Libraries were prepared from total RNA according to TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) protocol instructions. Briefly, mRNAs were purified using poly-T beads and fragmented to generate double stranded cDNAs. After adaptators ligation, a 11 cycles pre-amplification was applied. Resulting libraries were checked for quality using Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies) and for quantity by quantitative PCR using Library Quantification Kit (Kapa) according to protocol instructions. Paired-end reads of 2x150 pb in length were obtained by sequencing libraries on one lane of HiSeq3000 (Illumina), according to manufacturer instructions.

Raw reads were mapped to *E. grandis* genome (v1.1) using Star software (Dobin et al., 2013). CuffLinks (v2.2.1) suite was used to extract raw counts and compute FPKM values (Trapnell et al., 2012 Nature protocols). We combined CuffDiff (v2.2.1) (Trapnell et al., 2012 Nature methods) and DEseq2 R package v1.10 (Love et al., 2014) for differential expression testing. In both methods, genes were considered differentially expressed when fold change was ≥ 2 or ≤ 0.5 and adjusted P_{value} (FDR) < 0.01 .

2.5. Validation by quantitative RT-PCR

First strand cDNAs were synthesized from 1 μg of total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions and checked by PCR amplification of housekeeping gene *Tubulin*. Primers pairs were designed using QuantPrime online software (Arvidsson et al., 2008). Transcript abundance was assessed using 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 $E^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Pfaffl, 2001) using primers efficiency calculated through LinRegPCR (Ruijter et al., 2009) and normalization with reference genes *PP2A1*, *PP2A3*, *IDH*, *SAND* (Cassan-wang et al., 2012).

2.6. Metabolite extraction and LC-MS analysis

Metabolites were extracted from frozen scrapping samples from 4 independent biological replicates and analyzed according to the method described by (De Vos et al., 2007), with minor changes. Samples (25 mg) of ground tissue were homogenized using a vibration mill (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Germany), set to a frequency of 20 Hz s^{-1} for 1 min, with 3 mm tungsten carbide beads (Retsch GmbH, Haan, Germany) added to each extraction tube to increase the extraction efficiency. After, 500 μL of a chloroform-methanol-water mix

(3v:1v:1v) containing quercetin (50 pmol), as internal standard, was added to the samples which were homogenized again in the vibration mill, under the same conditions specified above. The extracts were then centrifuged (16.000 g), for 10 min at 4°C in an Eppendorf centrifuge (model 5415R). The supernatants were filtered (Millex®, JBR6 103 03, 0,22 µm), using a 1 mL seringe, into a vial and an aliquot of 100 µL of each sample was transferred to a new LC-vial. Metabolites were then analysed by online chromatography using a Cap-UPLC coupled to a Q-TOF Ultima API mass spectrometer with eletrospray ionization (Waters, Corp., Milford, USA). Three technical replicates of each biological replica were used for each treatment. Samples (5 µL) were automatically injected into a reversed-phase column (C₁₈ - 100 x 2.1 mm Acquity 1.7 µm (Waters).

Metabolites were eluted by 2 eluents used as mobile phase, eluent A (0.1% v/v FA in ultrapure water) and B (0.1% v/v FA in ACN). A gentle and continuous acetonitrile (ACN) gradient was used, during 15 min: [95% A + 5% B for 6 min, 25% A + 75% B for 6 min, 5% A + 95% B for 2 min], followed by 1 min at [95% A + 5% B] for column stabilization, which was maintained at 35°C, for adequate separation of metabolites. All data were acquired in centroid mode using both, positive and negative ion mode with eluent flow of 0.5 mL min⁻¹, for 15 min. Voltage was set at 3 kV and 35kV for the capillar and cone, respectively. The temperature of the ESI-source and desolvation were set, respectively at 150°C and 450°C, and the gas flow of 50 L h⁻¹ and 550 L h⁻¹ was set, respectively for the cone and desolvation. The mass range was set from 100 to 2,000 *m/z*, automatically corrected by MassLynx 4.1 Software, using a solution of 0.05 mM ammonium formate in ACN: H₂O (9v/1v) as reference *lock mass* and for online MS calibration of the mass accuracy, during sample acquisition.

The processing and interpretation of the data obtained by Mass Spectrometry were done after the correction of the base lines, exclusion of noises, deconvolution of the spectra, detection and integration of pikes and alignment of the chromatograms. The data generated by LC-MS were analyzed using MassLynx software (Waters).

Mass signatures detected in at least 2 technical repetitions over 3, in 2 biological replicates over 4 were kept. For these selected mass signatures, missing values were substituted by random forest imputation (Gromski et al., 2014), using missForest R package (Stekhoven, 2013) and differential accumulation was tested using Student's T test.

2.7. Metabolite extraction and GC-MS analysis

Metabolites were extracted from frozen scrapping samples from 4 independent biological replicates and analyzed according to the method described by Hoffman *et al.* (2010), with minor changes. Samples (25 mg) of ground tissue were homogenized using a vibration mill (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Germany), set to a frequency of 20 Hz s⁻¹ for 1 min, with 3 mm tungsten carbide beads (Retsch GmbH, Haan, Germany) added to each extraction tube to increase the extraction efficiency. After, 500 µL of a chloroform-methanol-water mix (3v:1v:1v), was added to the samples which were homogenized again in the vibration mill, under the same conditions specified above. The extracts were then centrifuged for 10 min at 16.000 g, at 4°C in an Eppendorf centrifuge (model 5415R). The supernatants were filtered (Millex®, JBR6 103 03, 0,22 µM), using a 1 mL seringe, into a vial and an aliquot of 100 µL of each sample was transferred to a GC-vial, to which stable isotope reference compounds: (1,2,3-¹³C₃) myristic acid, (²H₄) succinic acid and (1,2,3,4-¹³C₄) palmitic acid at a final concentration of 10 ng mL⁻¹ each, were added to the samples. They were then evaporated to dryness in a Speed-vac Eppendorf concentrator (model 5301), and derivatized with 30 µL of methoxyamine hydrochloride (20 mg mL⁻¹) in pyridine for 16 h at room temperature. Trimethylsilation was performed by adding 30 µL of n-methyl-n-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) to the samples followed by incubation for 1 h, at room temperature. After silylation, 30 µL of heptane was added. Samples were analyzed in randomized order, 30 min after silylation reagents were added, according to Gullberg *et al.* (2004), using gas chromatography hyphenated with time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF/MS (Pegasus HT, LECO, St. Joseph, MI, USA) together with blank control samples and a series of *n*-alkanes (C₁₂ - C₄₀), which allowed retention time indices to be calculated (Schauer *et al.* 2005). Four biological replicates were used for each treatment. The derivatized samples (1 µL) were automatically injected using a split/splitless injector in splitless mode by a CTC Combi Pal Xt Duo (CTC Analytics AG, Switzerland) autosampler into an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with 2 columns of fused silica. The first column (DB 5-Agilent J&W Scientific, Folsom, CA, USA) dimension was 20m length x 0.18 mm internal diameter (i.d) x 0.18 µm of film thickness, and the second column (RXT-17, ResteK Corporation, Bellefonte, PA, USA) dimension was 0.84m length x 0.1 mm (i.d) x 0.1 µm of film thickness. The injector temperature was 280°C, the septum purge flow rate was 20 mL min⁻¹ and the purge was turned on at 250 s after the beginning of the data acquisition. The gas flow rate through the column was 1 mL min⁻¹. The first column temperature was held at 80°C for 2 min, then

increased by $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 305°C , and held there for 10 min. The second column temperature was held at 85°C for 2 min, then increased by $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to 310°C , and held there for 10 min. The column effluent was introduced into the ion source of the GC-TOF/MS Pegasus HT time-of-flight mass spectrometer (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). The transfer line and the ion source temperatures were 280 and 250°C , respectively. Ions were generated by a 70-eV electron beam at an ionization current of 2.0 mA , and 20 spectra s^{-1} were recorded in the mass range $45\text{--}800m/z$ and the detector voltage was $1,500\text{ V}$. All non-processed MS-files from the metabolic analysis were exported into the ChromaTOF 2.12 Software (LECO Corporation), in which all metabolites identifications were done. All data treatment procedures (base-line correction, exclusion of noises, deconvolution of the spectra, detection and integration of pikes and alignment of the chromatograms) were performed using the TargetSearch Software written in the R programming language (Cuadros-Inostroza et al., 2009).

Mass signatures detected in at least 2 biological replicates over 4 were kept. According to already described procedure (Gromski et al., 2014), missing values were substituted by random forest imputation, using missForest R package (Stekhoven and Buhlmann, 2012) and differential accumulation accross the different conditions tested using Student's T test.

2.8. Biochemical analyses of SCW

Ground samples were freeze dried for 48h and extracted by hot solvents (successively water, ethanol, ethanol/toluene (1:1 v/v) and acetone) to obtain extractive-free xylem residues (EXR). The determination of acetyl bromide lignin was adapted from the standard protocol (Pitre et al., 2007). Briefly, 1.5 mL of a mix of acetyl bromide / glacial acetic acid (1:3 v/v) was added to 10 mg of EXR in a glass tube fitted with a Teflonlined screw-cap. The reaction was then allowed to proceed for 2.5 h at 55°C while shaking, cooled in ice and $100\mu\text{L}$ was added to 3 mL of aqueous NaOH (2M) diluted in acetic acid (45:250 v/v) and 0.5 mL of aqueous hydroxylamine (0.5M). The lignin concentration was calculated by measuring the absorbance at 280 nm . All analyses were done in triplicate.

Saccharification was performed on EXR treated or not by alkali pre-treatment, following a protocol adapted from Van Acker et al. (2013). Pre-treated samples were mixed with NaOH (0.25%), incubated at 90°C for 3 h while shaking at 750 rpm and washed 3 times with water. Before enzymatic digestion, all samples (pre-treated or not) were washed 3 times with 1 mL EtOH 70% at 55°C , 1 time with acetone and dried overnight at 55°C . Ten mg of washed samples were mixed with $400\mu\text{L}$ sodium acetate buffer 0.1M pH 4.8 and $100\mu\text{L}$ of cellulase

(C2730 Sigma Cellulase) at 50°C at 750 rpm. Reducing sugar concentration was assessed with dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (Miller, 1959) using a 10µl aliquot of the supernatant at 6h, 24h and 48h after beginning of reaction. Saccharification yield concentration was calculated by referring to a glucose standard curve analysed in the same conditions. Enzyme activity was assessed at 0.25 FPU/ml in our condition.

2.9. Microscopy and histochemistry

Wood disks were cut along the diameter with double blade saw machine to obtain a wood fragment

equivalent to a crossing core sample from bark to bark of approximately 1 cm large (on the tangential direction of the disk) and 1.7 mm thick (on the longitudinal direction of the disk). One sample per tree was prepared and then seasoned at 20°C and 65% R.H (12% MC) before analysis by X-ray. Radial density profile was obtained using a QTRS-01X Tree Ring Analyzer (Quintek Measurement Systems, Knoxville, TN. 1999), according to manufacturer protocol. Sample density profile (g.cm^{-3}) at each measurement point (every 40 µm) from bark to bark, was calculated from the ratio between the measured attenuation and the collimated X-ray beam intensity, according to manufacturer procedure (QMS, 1999). The average density for the first millimetre of youngest xylem below cambium was considered for analysis.

For the 4 independent trees in each treatment, microcore samples were collected and fixed in 80% ethanol. Fragments of 4mm of the microcore samples, corresponding to the most recent xylem below the cambium were embedded in LR White resin (London Resin Company Ltd) by immersion in 4 consecutive baths (24h) of increasing concentrations of resin (33%, 50%, 66% and 100%). Semi-thin sections (1µm) were obtained by using a Histo Diamond Knife (DiATOME) 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 minutes at room temperature, rinsed in distilled water, dried at 60°C and mounted under coverslips in mounting medium (Richard-Allan Scientific). Semi-automatic image acquisition was performed using a Nanozoomer C9600-12 (Hamamatsu, Japan) in bright field at 40x magnification. Images were exported from raw data by using NDPview 2.3.1 and subsequently treated with ImageJ software (V1.5) to determine cell density and average lumen diameter. Cells with diameter superior to 35 µm were considered as vessels. Average vessel diameter was determined by measuring about 400 vessels in each treatment (1 section by tree).

2.10. Statistical analyses and data integration

Expression profiles of 5573 differentially expressed genes (listed in **TableS1**) and relative quantification of 516 mass signatures (231 and 285 for LC-MS and GC-MS datasets respectively) were used to perform datamining.

Discrimination of the different treatments and biological replicates was done using Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA), from R package mixOmics (Lê Cao et al., 2016).

We used *Eucalyptus grandis* annotation (Phytozome V12) to perform gene ontology enrichment on transcriptomic data using BiNGO package (Cytoscape© software) based on *Arabidopsis thaliana* GO classification (Maere et al., 2005). Two networks of GO enrichment were obtained for genes regulated by either water availability (+W treatments versus –W treatments) or potassium supply (+K treatments versus –K treatments). They were merged and manually curated to remove redundant GO terms (**Figure 2**).

Transcriptomic and metabolomics data represented a set of 6089 variables obtained for 3 biological replicates in 4 conditions. Pearson pairwise correlations were calculated as described previously (Ployet et al., 2017) from standardized data. Distances were computed and modules were detected using WGCNA method (Langfelder and Horvath, 2008). Only the most significant distances were kept ($FDR < 5.10e-5$) to graphically represent gene correlation network using Cytoscape© software (force-directed layout). Modules were related to 7 phenotypic variables (**Figure4**) by testing correlation between the summary profile of each module with standardized profile of each phenotypic variable, according to WGCNA method (Langfelder and Horvath, 2008).

Correlations between standardized profiles of 516 mass signatures (2 datasets of 231 and 285 mass signatures for LC-MS and GC-MS respectively) and 2400 genes belonging to modules enriched in genes related to cell wall metabolism, 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 Partial Least Square Discriminant Analysis (sPLS-DA) adapted for multiple datasets in mixDIABLO model, a full design was chosen in which all datasets are connected, all variables were kept and number of components set to 3. Similarity matrix, extended to the case of multiple data sets from ((Singh et al., 2016) computed in mixDIABLO model was filtered to keep only the highest correlations (≥ 0.9) which were visualized as a network built with Cytoscape © software (force-directed layout).

2.11. Sequence isolation and cloning

The full-length encoding region (1050bp) of *EgMYB137* (*Eucgr.K02806*), and a fragment of 2kb upstream of *EgMYB137* start codon were amplified from *E. grandis* using specific primers. Sequences were cloned into Gateway-adapted binary vectors (pGWAY-0 and pGWAY-1) containing the DsRed reporter gene, as already described in Plasencia et al., 2016.

2.12. Plant transformation and sampling

Transgenic hairy roots were produced from *E. grandis* seedlings using *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation, according to already established protocol (Plasencia et al., 2016). Plants 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) and roots harboring DsRed fluorescence were collected.

For *EgMYB137* over-expressing roots, a fragment of ~5 mm of the main root was collected immediately below the crown and fixed in 80% ethanol for histology. All remaining roots with diameter ≥ 2 mm were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further molecular analyses. For promoter expression localization, root fragments were immediately immersed in GUS staining solution.

2.13. GUS assay

Root fragments of 5 months old composite Eucalyptus plants were incubated in GUS solution for 12h at 37°C as described in Plasencia et al. (2016). For further observation, samples were then washed with 100 mM sodium phosphate buffer and fixed in 80% ethanol.

3. Results

3.1. Gene expression are regulated by K supply and water availability in xylem

An average of 46 million reads for each of the 12 samples were generated from Illumina© mRNAs sequencing of 12 xylem samples scrapped on 4 years old *Eucalyptus grandis* trees submitted to four different treatments: [+W-K] 100% rainfall water and no potassium (K) supplementation, [-W-K] 67% rainfall water by rainfall exclusion and no potassium supplementation, [+W+K] 100% rainfall water and standard K supplementation, [-W+K] 67% rainfall water and standard K supplementation. An average of 92% of reads mapped to *E. grandis* reference genome (v1.1). Using both Cuffdiff2 (Trapnell et al., 2012) and DESeq2 (Love et al., 2014) methods, we detected in total 5,573 differentially expressed genes (DEGs, i.e. fold change ≥ 2 and FDR < 0.01). Most of them (62%) were detected by both

methods (**Figure 1a**, **Table S1**), however DESeq2 seemed to be more sensitive allowing the detection of more DEGs (4957 DEGs) than Cuffdiff2 (4075 DEGs). Most of the 5,573 DEGs were exclusively regulated by K (>60%, **Figure 1b**) whereas only 4% were regulated only by water availability. More than one third of the DEGs (34.7%) were regulated by both water and K treatments illustrating the high degree of interaction between the two treatments. Indeed, 90% of the DEGs regulated by water were also regulated by K and 36% of DEGs regulated by K were also regulated by water.

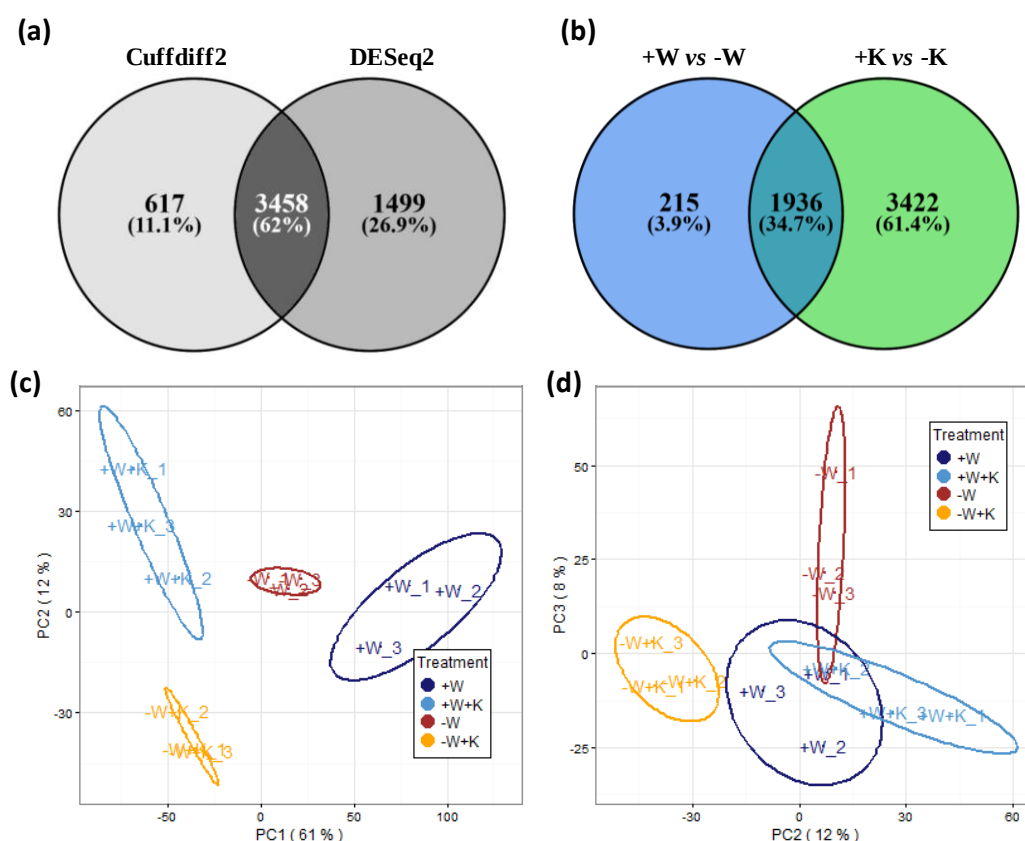


Figure 1: Water exclusion and K fertilization induce changes in transcriptome. (a) Detection of a total of 5573 differentially expressed genes (DEGs) using Cuffdiff2 and DESeq2. For both methods, genes were considered differentially expressed when fold change ≥ 2 or ≤ 0.5 and $P_{FDR} < 0.01$ ($n = 3$). **(b)** Number of genes whose expression is significantly affected by water exclusion (+W-K vs -W-K and +W+K vs -W+K) and K fertilization (+W-K vs +W+K and -W-K vs -W+K). **(c-d)** Discrimination of the four conditions by Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA, mixOmics, Le Cao et al., 2016), performed on standardized RNAseq expression data (FPKM) of the 5573 DEGs.

We used Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA), a supervised classification method, which was shown to be one of the best statistical approaches for variable prediction when there is a larger number of variables than observations and a high multicollinearity in predictors (Pérez-Enciso and Tenenhaus, 2003). When tested on our datasets, this method was more effective than unsupervised method such as Principal

Component Analysis (PCA) in discrimination of the class of samples. The first three principal components (PC) of PLS-DA performed on the expression profiles of all DEGs explain 82% of total variance and clearly separated the four different treatments (**Figure 1 c and d**). The first component (PC1) explains the highest percentage of variance (61%), and the separation between K fertilized [+ K] and non-fertilized samples [- K]. The separation between [-W] and [+W] samples is explained by PC2 and PC3 (12% and 8% of total variance, respectively).

We then investigated the functional categories to which belong the DEGs using a Gene Ontology (GO) enrichment approach (**Figure 2**). A total of 159 biological processes (GO categories) were significantly enriched (**Figure 2a, Table S2**). We made a hierarchical classification of these categories from the most general (level 1) to the most specialized level (level 9). Level 9 categories (45 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). We represented in blue dots the categories enriched in DEGs regulated by water (38.5% of DEGs), in green dots those regulated by K (96% of DEGs). Grey dots represent “non-specific” GOs enriched in genes regulated either by water, K fertilization or both (15 out of 45 level 9 GOs). For each “level 9” category, heat maps of the transcript abundance profiles were generated and genes presenting similar profiles were grouped into 17 expression clusters (clusters I to XVII; **Figure 2b**).

Blue coloured GOs (W-regulated DEGs) were over-represented within only 7 (out of 45) “level 9” GOs including abiotic stresses responses (3/10 GOs) and transport (1/2 GOs). In abiotic stress-related GO categories, most of these genes were induced in response to [-W] when trees were not fertilized [-K], while they were repressed when trees were fertilized [+K] (cluster II , **Figure 2b**). Genes belonging to GO categories related to transport were mainly induced in [-W] whatever the K fertilization regime (cluster VI, **Figure 2b**).

Green coloured GOs (K-regulated DEGs) were over-represented in 23 out of 45 “level 9” GOs related to development (10/13 GOs), primary metabolism (6/7 GOs), cell wall formation (2/3 GOs), biological regulation (2/4 GOs), transport (1/2 GOs) and abiotic stress. Most of the genes found in these green coloured GO categories belong to two cluster types presenting opposite expression profiles. In the first cluster type (clusters III, VII, VIII, XI, XIV, XVI), genes were drastically down-regulated in response to K treatment with a minor impact of water (**Figure 2b**). In the second cluster, genes were induced in response to [+ K].

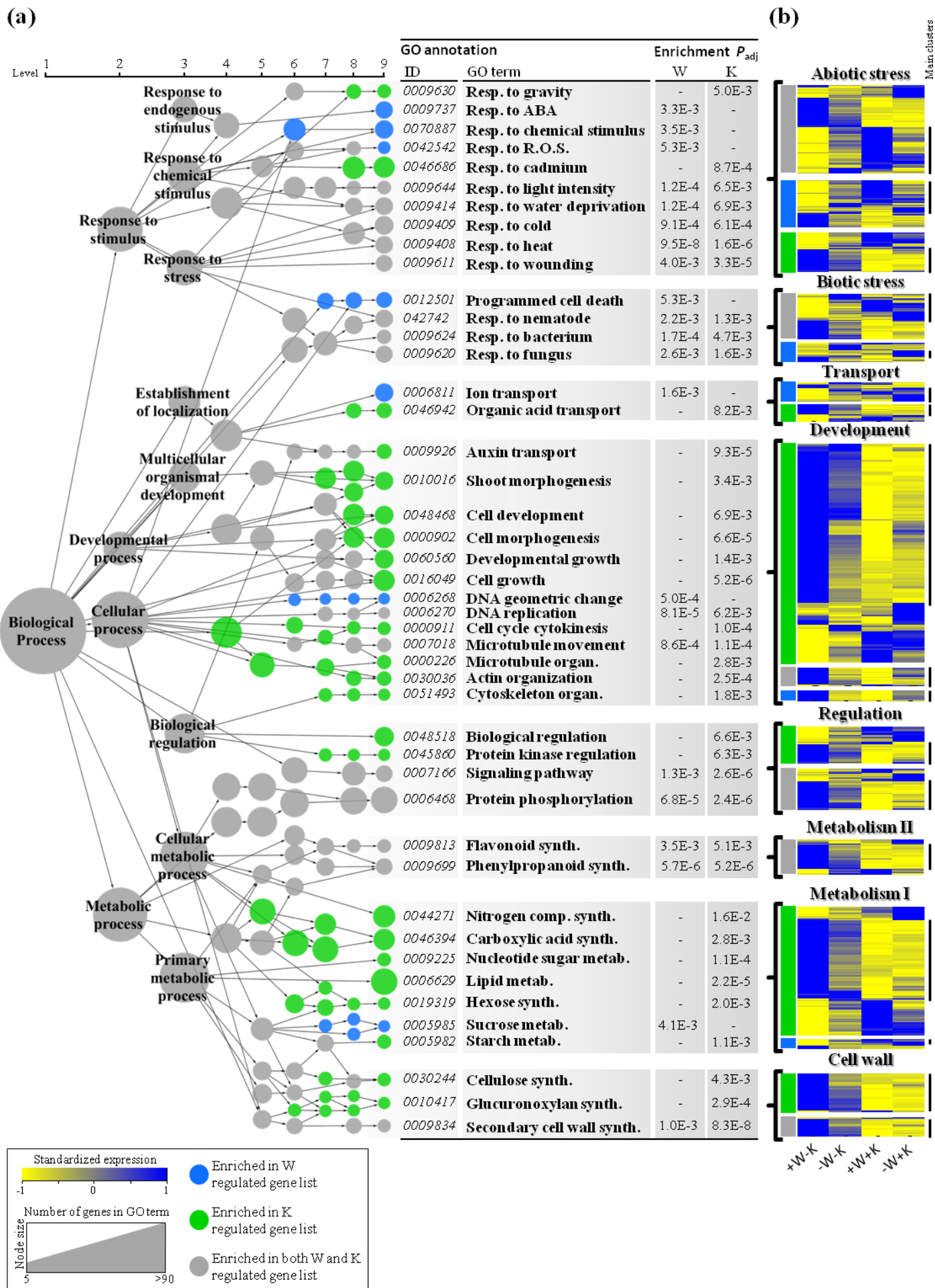


Figure 2: The changes in transcriptome occur in a broad range of biological pathways. (a) Gene Ontology enrichment analysis on genes differentially expressed in response to water exclusion (2151 DEGs) or K fertilization (5358 DEGs). Network created from BiNGO (Maere et al., 2005) results, manually reorganized and curated to remove non-informative GO terms. Only significantly enriched GO terms ($P_{\text{FDR}} < 0.01$) were kept. Node size was set proportional to number of genes found within GO term. Complete list of GO terms of levels 1 to 9 is provided in **Table S2. (b)** Standardized RNAseq expression data of the genes belonging to these enriched GO categories.

Non-specific GOs in grey significantly enriched in W-regulated, K-regulated and/or regulated by both, genes are related to secondary metabolism (2/2 GOs), biotic stress responses (3/4 GOs), abiotic stress responses (5/10 GOs), and biological regulation (2/4 GOs). These genes show heterogeneous profiles, with the clearest regulation in response to K fertilization. The main cluster detected in grey GOs related to biotic and abiotic stress response is composed of genes induced in response to [-W, +K] (clusters I and IV), while the second largest cluster show the completely opposite profile (**Figure 2b**). In GO categories related to biological regulation, secondary metabolism development and cell wall biosynthesis, grey coloured GOs contain genes mainly repressed by water exclusion and K fertilization (clusters IX, XII, XIII, XVII).

3.2. Soluble metabolites are regulated by K supply and water availability in xylem

A total of 2,250 mass signatures were obtained by LC-MS (850) and GC-MS (1400) for soluble metabolites extracted from the same scrapped-xylem tissues used for transcript abundance. Among those, 516 were differentially accumulated mass signatures (DAMs) (fold change ≥ 2 and FDR $< 1\%$) between at least two conditions (**Figure 3a**). About 42% of the DAMs (218) were differentially accumulated in response to K fertilization, whereas only 12% (63) were regulated by water treatment only. The highest proportion of DAMs ($>45\%$, 235) was observed in response to both water and K treatments. In total, 79% of DAMs regulated by water were also regulated by K while 52% of K-regulated DAMs were also regulated by water exclusion.

The first three principal components of PLS-DA performed on abundance profiles of DAMs explained 76% of total variance and clearly separate the four different treatments in four groups of replicates (**Figure 3b**). The first component explained the highest proportion of variance (39%) clearly separating of K fertilized [+K] from non-fertilized [-K] samples. The separation of water treatments [-W versus +W] is explained by PC2 and PC3 (21% and 16% of total variance, respectively).

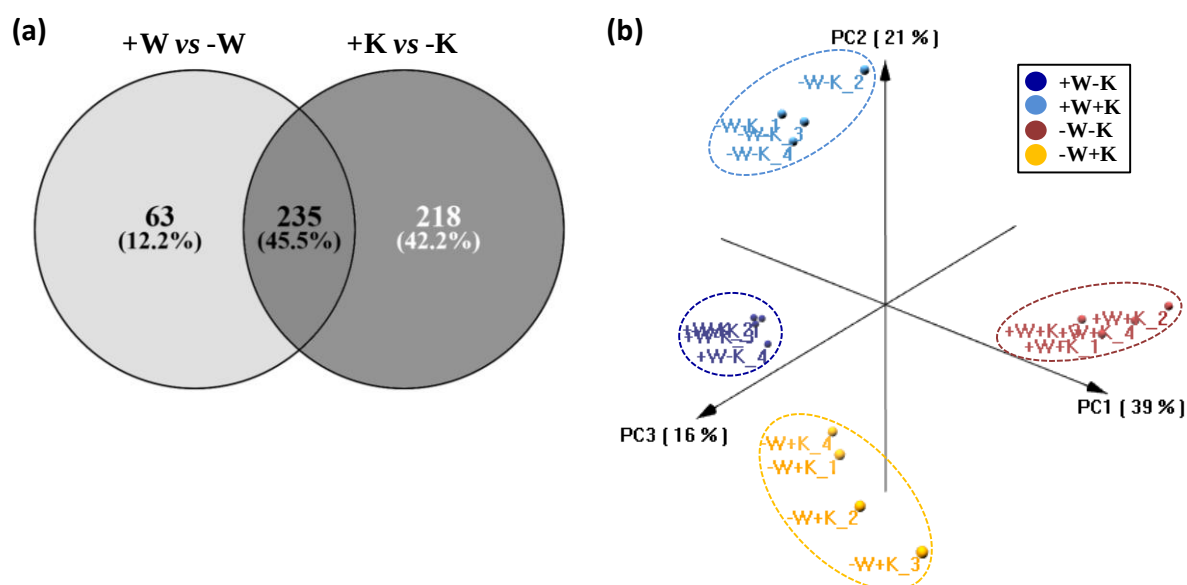


Figure 3: Water exclusion and K fertilization induce modifications in metabolome. (a) Detection of 516 GC-MS and LC-MS mass signatures differentially accumulated (DAMs, $P_{\text{FDR}} < 0.05$, $n=4$, peak intensity fold change ≥ 2 or ≤ 0.5) in response to water exclusion (+W-K vs -W-K and +W+K vs -W+K) and K fertilization (+W-K vs +W+K and -W-K vs -W+K). (b) Discrimination of the 4 treatments by PLS-DA performed on standardized peak intensities of DAMs in response to water exclusion (298 DAMs) and K fertilization (453 DAMs). Three dimensional representation of the 3 first components.

3.3. Transcriptomic and metabolomic data integration through correlation network analyses

To integrate transcriptomic and metabolomic data and get a transcript-metabolite correlation network, we analyzed the correlations between 6089 variables representing DEGs (5573 genes) and DAMs (516 mass signatures). Correlation network analysis based on Pearson pairwise correlations between each pair of variables was used to detect gene-gene or gene-metabolite profiles similarities. Based on the assumption that two variables that are significantly correlated are likely to have a common *in vivo* role. We then selected the most robust correlations based on a FDR adjusted *p value* threshold of 5.10×10^{-5} , and used them to build an undirected correlation network in which 4,305 nodes (representing either genes or mass signatures) were connected by 170,629 edges of length proportional to the absolute values of the corresponding correlations (**Figure 4**). Only 2135 correlations were negative (**Table S4**), represented in red edges in the network. As visualized using Cytoscape software, we obtained a dense, strongly correlated core network linked to six small subnetworks (**Figure 4**). The smallest subnetworks (<10 variables) not linked to the main network were considered as poorly informative and discarded from further analyses. Sixty percent of the

155 DAMs were spread across the network and correlated to DEGs. However, the remaining 40% were clustered in a specific subnetwork poorly connected with DEGs.

To detect groups or modules containing highly correlated variables (DEGs or DAMs) potentially involved in the same biological, we used the WGCNA method (Langfelder and Horvath, 2008). This approach enabled to underscore 12 different modules (**Figure 4**) of densely connected variables. We then used a GO enrichment approach to unravel discrete functions arising from interactions of variables within each module (**see Table S5**). For each module, gene expression profiles in the four treatments are represented by heatmaps. With the exception of modules 7 and 12, which are poorly connected to the core network, all the genes of the 10 remaining modules presented expression profiles influenced more by K fertilization than by water status.

M7 is enriched in “DNA replication and cell cycle” related-genes which show opposite profiles in response to water exclusion, depending on K fertilization, with a strong down-regulation in [-W-K], and an upregulation in [-W+K]. M12 is enriched in genes related to molecules transport which are dramatically up-regulated in [-W-K] treatment.

Modules M1 to M5 are all enriched in cell wall-related genes. Module M1 presents a GO enrichment in genes related to phenylpropanoids and/or hemicellulose biosynthesis, M2, in genes related to polysaccharides metabolism, M3, in genes related to carbohydrates metabolism, M4 in genes related to cell metabolism and protein modifications and M5 in genes related to lignin and xylan biosynthesis. These five modules are positioned in the core of the network gathering 55% of the variables (2400 over 4305 variables in the whole network) and presenting the highest variables connectivity (i.e. each variable is connected to an average of 79 other variables). Considering together these five modules, 80% of the genes were down-regulated in response to +K fertilization. The remaining 20% presented opposite profiles being up-regulated in +K. The latter are grouped within modules M1 to M5 because of strong negative correlations with the other genes. GO enrichment on this subset of negatively correlated genes revealed their relations with cell primary metabolism and especially starch metabolism (**Table S2**).

Nested in the core of the network, M6 is highly interlocked with M1 to M5 modules and significantly enriched with genes involved in cytoskeleton remodeling. In this core-network of densely correlated variables (modules M1 to M6), we found 97 genes belonging to families involved in the biosynthesis of secondary cell walls polymers including cellulose (22 genes),

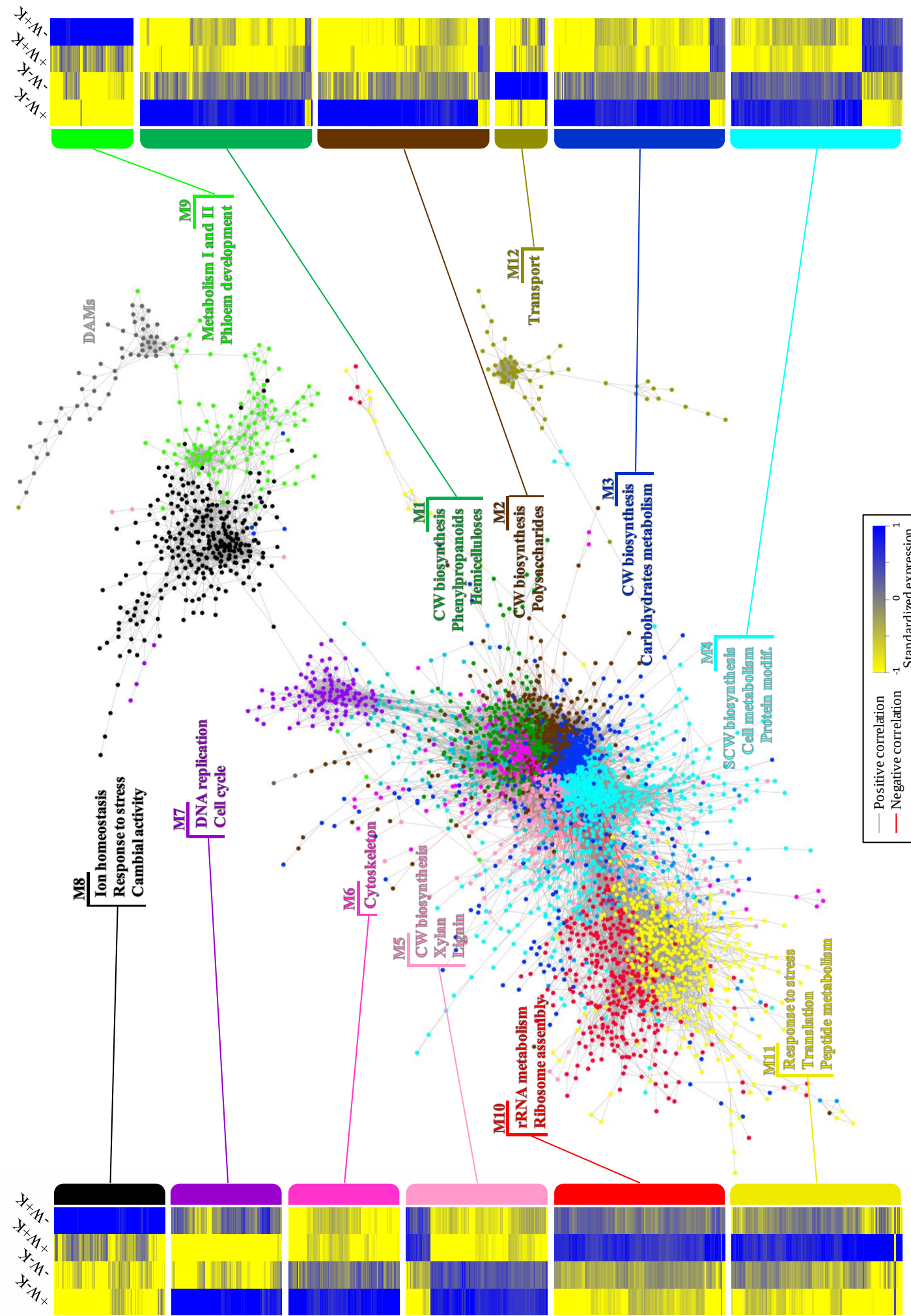
hemicelluloses (56 genes) and lignin (19 genes) (Carocha et al., 2015; Myburg et al., 2014). The six modules also contain 109 genes identified as putative TFs, 36 belonging to families MYBs, NACs, AP2/ERFs, ARF and GRAS annotated in *E. grandis* (Soler et al., 2015; Hussey et al., 2015; Li et al., 2015; see details per family in **Table S6**). Seventeen of them are *Eucalyptus* putative orthologs of masters regulators of wood formation (mostly MYBs and NACs TFs) characterized mainly in Arabidopsis (**Table S6**). The positive regulator of SCW formation *EgMYB2* is also found within these modules (Goicoechea et al., 2005). The other TFs (67), annotated through automatic domain research (**Table S6**), represent uncharacterized candidate genes. Among these putative TFs, 32 show a strong correlation with other genes related to SCW biosynthesis with a connectivity degree ≥ 30 .

Modules M8 and M9 both contain genes strongly up-regulated by K fertilization, especially in [−W+K] treatment. They are involved in ion homeostasis, stress response, defense mechanisms and cambial activity for M8; in primary and secondary metabolisms, as well as in phloem development for M9.

Modules M10 and M11 contain genes related to cell activity (ribosome metabolism, protein metabolism and stresses responses) which present a complex transcriptional response in interaction between K fertilization and water availability. These genes were slightly up-regulated in absence of K, by a reduction of water availability ([+W-K] compared to [−W-K]), whereas an opposite profile was observed in presence of K ([+W+K] compared to [−W+K]).

Considering the soluble metabolites (155 DAMs), 40% of them were clustered in a specific subnetwork poorly connected with DEGs while the remaining 60% (93 DAMs) were spread across the network and correlated to DEGs. Fifty-two DAMs were correlated with the core of the network (M1 to M5), 19 with M10 and M11; 12 to M9; 4 to M8; 1 to M12.

Fig 4: co-regulation network highlight modules of highly correlated genes involved in biological processes associated to CW formation. Weighted co-expression network obtained by computing Pearson correlations between standardized expression of 5573 DEGs and 516 DAMs, across the 4 conditions (3 biological replicates). Edge length is proportional to correlation. Correlations were filtered according to their adjusted *P* value ($P_{\text{FDR}} < 5e-5$). In total, 170,629 significant correlations were detected, linking 4305 nodes. Grey colored edges represent positive correlation, while red ones represent negative correlation. WGCNA method allowed the detection of 16 modules represented by different node colors (Langfelder and Horvath, 2008). Network was visualized using Cytoscape software (force directed layout).



M2 is the module presenting the highest number of DAMs (22) while modules M6 and M7 do not contain any DAMs. Within modules M1 to M5, enriched in genes linked to cell wall formation, connectivity of DAMs with other variables ranged from 1 to 66 (average of 6). Amongst the 52 DAMs present in these modules, 75% were poorly connected with other variables (connectivity < 10) with only 13 DAMs connected to at least 10 other variables (**TableS5**).

3.4. Correlation between wood properties and network modules

We analyzed phenotypic traits, related to SCW formation, which could be affected by water and K fertilization treatments in xylem of the same trees sampled for 'omics' approaches (**Figure 5**). We analyzed wood composition by measuring lignin content and saccharification yield on scrapped xylem tissues. We also measured xylem anatomical properties (vessels density and diameter, wood micro-density), as well as eco-physiological parameters linked to trunk growth (stem biomass increment and carbon allocation to trunk growth). In order to predict the average daily trunk biomass increment (Δstem), for each tree over the 3 months' period preceding sampling, an allometric equation linking trunk biomass to trunk circumference was established. The average proportion of carbon allocated to trunk secondary growth (GPP_{stem}), was obtained from calculated daily trunk biomass production (Δstem) and gross primary productivity (GPP) simulated through the already established MAESPA model (Christina et al., 2015).

Saccharification yield, vessel density and vessel diameter were all almost exclusively regulated by K fertilization. Saccharification yields were reduced up to 10% between [-K] and [+K] treatments and tended to be reduced although not significantly between [+W] and [-W] in absence of K fertilization. Vessel densities were reduced in [+K] compared to [-K] conditions without significant effect of water exclusion. Vessels diameters were increased in response to K fertilization with no significant effect of water exclusion. Stem biomass increment, wood density and GPP-stem were affected by both water exclusion and K fertilization. The average daily stem biomass increment was significantly reduced by water exclusion but drastically increased by K treatment. In water exclusion treatments, wood density tended to increase but only significantly for [-W+K] treatment. Carbon allocation in trunk growth (GPP_{stem}) was drastically reduced when water was excluded without K fertilization whereas it increased when trees were K-fertilized. Lignin content was significantly increased when water was excluded without K fertilization but tended to be reduced when K was supplied (**Figure 5**).

The WGCNA method was then used to compute the correlations between summary profiles of modules M1 to M12 and phenotypic traits (**Figure 5**). “Summary profiles” represent the mean profiles established from variables belonging to modules. For representation, we selected, within each module, the variables presenting the highest correlation values with at least one phenotypic traits (correlation threshold according to **Figure S1**, $P < 0.05$). We generated a correlation network with 7 phenotypic traits profiles, 12 modules profiles and 2184 variables (36 mass signatures and 2148 genes), connected by 5726 edges. Significant positive and negative correlations between modules and phenotypic traits were represented, by white bold lines and dotted lines, respectively (**Figure 5**). The core-network is composed of modules M1 to M6 (related to cell wall formation and cytoskeleton, **Figure 4**). Their “summary profiles” are positively correlated to saccharification and vessel density (see correlation heat map in **Figure S1**), and negatively correlated to vessel diameter, except M4 and M2 which are not significantly correlated to vessel density and diameter, respectively. The modules [M1 to M6] contain 1554 variables (1540 genes and 14 mass signatures). Most of the variables (1187) are positively correlated to saccharification and vessel density, while 720 variables are negatively correlated to vessel diameter. More than 50% of the variables included in M1 to M6 are correlated to the 3 phenotypic traits, positively to saccharification and vessel density, and negatively to vessel diameter. Within modules M1 to M6, several genes are related to CW formation including 13 related to cellulose formation, 42 to hemicelluloses synthesis, and 17 to lignin synthesis (Carocha et al., 2015, Myburg et al., 2014). In addition, 65 putative TFs were detected (**Table S7**). Eighteen belong to families already annotated in *E. grandis* genome, mainly MYB, NAC, AP2/ERF and GRAS (Soler et al., 2015, Hussey et al., 2015, Li et al., 2015). Twelve are putative orthologs of TFs proved to be involved in regulation of wood formation, mainly in *Arabidopsis* (Hussey et al., 2013). More than 65% of putative TFs result from automatic annotation of *E. grandis* genome (TF database, ref). The most represented families are MYB, C2H2, NAC and bHLH with respectively 9, 8, 5 and 5 putative TFs detected (**Table S7**).

Stem biomass increment was positively correlated to modules 10 and 11 (209 variables, 202 genes and 7 mass signatures) but negatively correlated to modules M4 and M5 (237 variables, 232 genes and 5 mass signatures). In modules M4 and M5, most of the variables (55%) correlated negatively to stem biomass increment were also negatively correlated to vessel diameter, and positively to vessel density or saccharification yield. A total of 24 TFs are connected to stem biomass increment parameter, including 7 TFs which belong to families

MYB and NAC annotated in *E. grandis* (Soler et al., 2014; Hussey et al., 2015) and 17 putative TFs from automatic genome annotation (**Table S7**).

Wood density profile was positively correlated to 130 genes and 12 mass signatures belonging to modules M8 and M9. These modules are negatively correlated to saccharification yield and M8 is also negatively correlated to vessel diameter. In modules M8 and M9, 23% of the variables positively correlated to wood density are also negatively correlated to vessel diameter or saccharification. Among the 130 genes, 18 are possible TFs according to current annotation (Soler et al., 2015, Hussey et al., 2015, Li et al., 2015, Plant Transcription Factor Database, Jin et al., 2016). The most represented TFs families are Dof (4 TFs), NAC (2 TFs) and AP2 (2 TFs). Among the best BLAST hits of these 18 TFs in *Arabidopsis*, 10 are linked to cell differentiation and proliferation, 5 are related to meristematic regions activity with 3 TFs involved in cambial activity regulation and 3 are related to auxin response or transport (**Table S7**). GPPstem is positively correlated with module M7 and negatively with M12. This profile correlates with only 33 and 7 variables for M7 and M8 respectively. Neither mass signature, nor transcription factor were detected among these variables. Finally, lignin content did not correlate with any module.

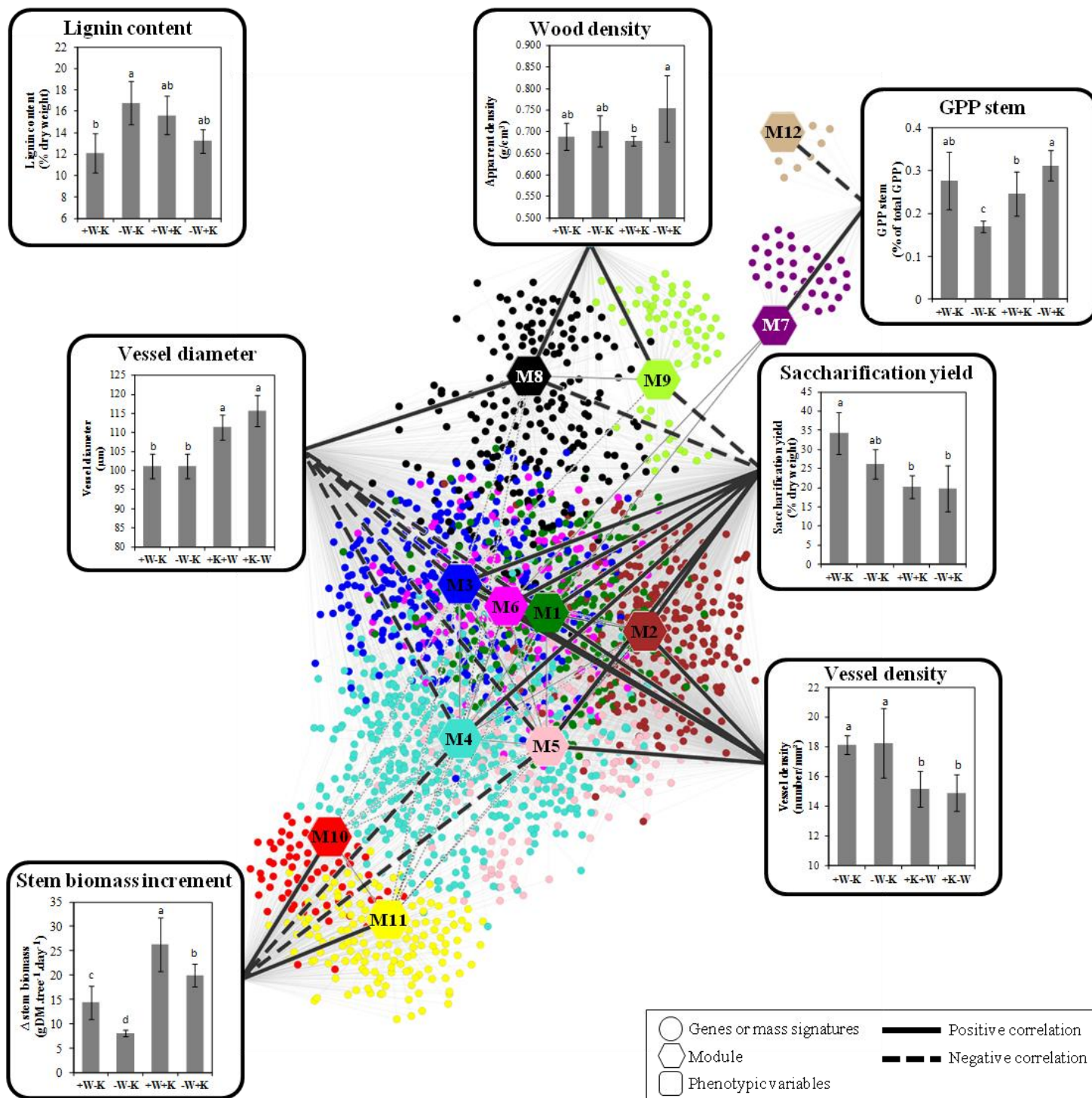


Fig 5: Modules of highly co-regulated variables are correlated to modifications in wood growth, composition and structure. The average stem biomass increment (Δ stem biomass) over the last 3 months preceding sampling, was calculated using an allometric relation linking tree trunk diameter and trunk biomass production. The average gross primary productivity allocated to stem growth (GPP stem) was simulated for the 3 months period preceding sampling using an already established model (Christina et al., 2015). Saccharification yield and lignin content were measured on developing xylem samples (scrapping samples). Wood density was measured on the 1 mm youngest xylem zone immediately below cambium. Vessels properties were evaluated by measuring vessels density and vessel lumen diameter in the 5 mm youngest xylem immediately below cambium. These 7 phenotypic traits were correlated to average profile of each module and variables through WGCNA method. Only the significant correlations ($P < 0.05$) were represented by solid lines for positive correlations and dash

lines for negative correlations. Correlation values between phenotypic traits and modules were used as threshold to filter correlations between phenotypic traits and variables in each module (Figure S1). Genes are represented by circles, phenotypic traits by squares and modules by hexagons.

3.5. Identification of TFs related to wood formation in response to water exclusion and potassium fertilization

To identify new regulators involved in the control of SCW structure and composition in response to K fertilization and water exclusion, we extracted from modules M1 to M6 (Figure 4), the genes related to SCW deposition: 14 TFs and 95 genes involved in SCW polymers biosynthesis (20 genes for cellulose, 56 genes for hemicelluloses and 19 genes for lignin). These genes are strongly co-regulated: their expression was reduced in response to water exclusion in absence of fertilization [-W,-K], and drastically decreased when trees are K fertilized [-W,+K] (Figure 7, Figure S2). These expression profiles of SCW-related genes is positively correlated to saccharification yield (95 correlations > 0.60), and vessel density (60 correlations > 0.57) but negatively correlated to vessel diameter (65 correlations < -0.58). From a total of 109 TFs belonging to modules M1 to M6, 56 are positively correlated to CW biosynthesis genes, saccharification yield, vessel density, and negatively correlated to vessel diameter (Figure 5, Table S7). Fourteen of them are the closest orthologs of TFs already associated to regulation of CW biosynthesis with a connectivity ranging from 7 to 55 (Hussey et al., 2013). Among the remaining 42 with no functionally characterized ortholog in *Arabidopsis* or *Populus*, we selected the 32 showing the highest degree of connectivity (from 7 to 62) which belong to 14 different families. The zinc-finger domain C2H2 family was over-represented with 5 members, while the MYB, bHLH, TALE, GATA and G2-like families all contained 3 members (Table S8). Only 6 TFs (*EgMYB137*, *EgMYB14*, *EgMYB17*, *EgERF50*, *EgERF80* and *EgGRAS15*) belong to families annotated in *E. grandis* (MYB, ERF and GRAS, (Li et al., 2015; Soler et al., 2014) while the 26 other putative TFs were detected through automatic domain research (Plant Transcription Factor Database, Jin et al., 2016). Among the new uncharacterized TFs already annotated, *EgMYB137* was the most connected and the most highly expressed across the different conditions (Table S8). It is correlated to 22 CW biosynthesis genes, including 14 genes related to hemicelluloses, 4 related to cellulose and 4 related to lignin biosynthesis. It is highly correlated to 14 TFs, including 5 TFs (*EgNAC61*, *EgNAC49*, *EgMYB2*, *EgMYB31* and *Eucgr.F02796*) which are the orthologs of TFs known to be involved in the regulation of SCW deposition (*AtSND1*, *AtNST1*, *AtMYB46*, *AtMYB83* and *AtC3H14*). *EgMYB137* is also positively correlated to saccharification yield and vessel density, and negatively correlated to vessel diameter.

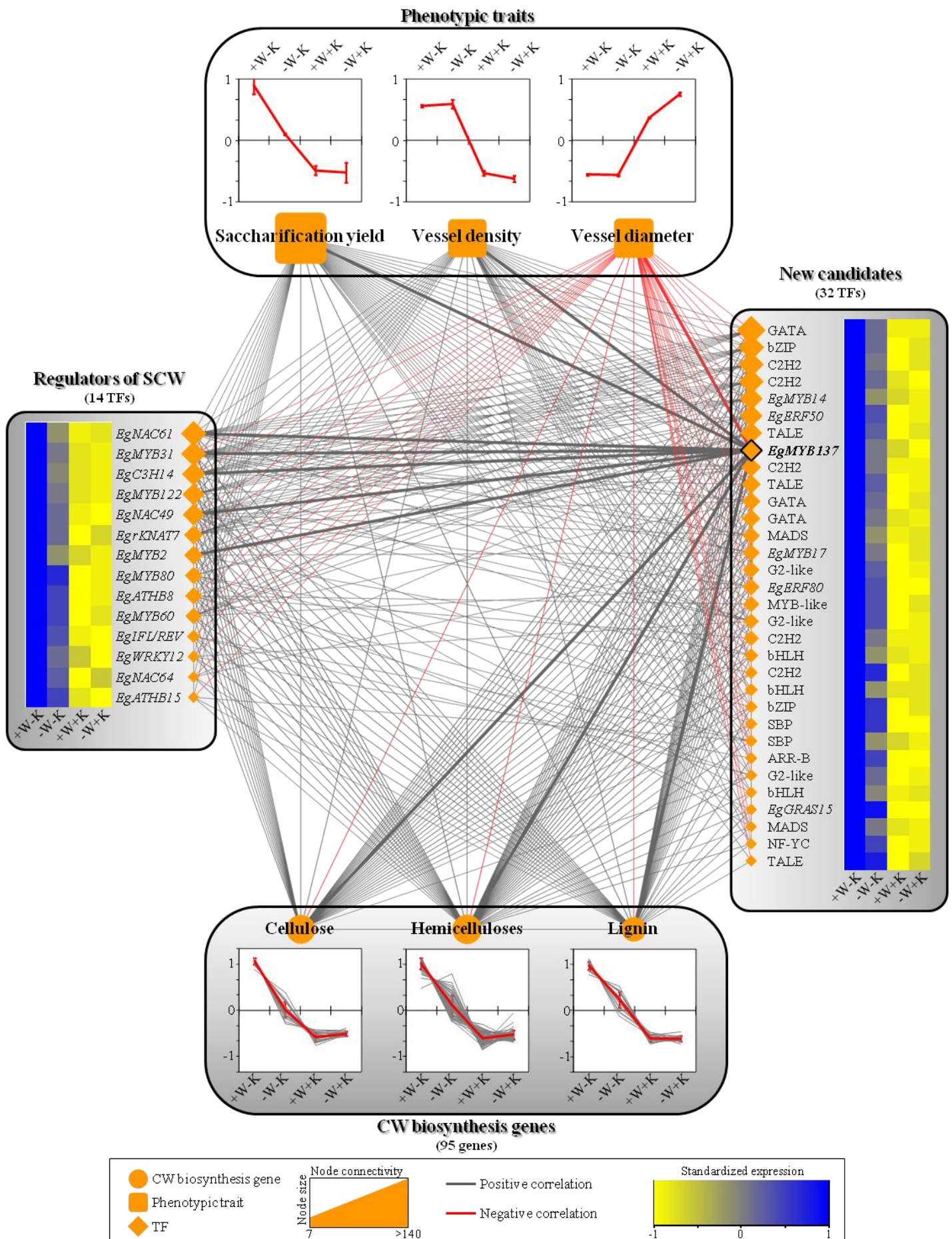


Figure 7: A set of uncharacterized TFs are found highly co-regulated with genes involved in biosynthesis of cell wall. Co-regulation network represent significant correlations ($P_{\text{FDR}} < 5.10^{-5}$) between 95 CW biosynthesis related genes (22 related to cellulose, 56 to hemicelluloses, 19 to lignin, bottom panel) and 46 TFs found in the modules M1 to M6 in co-regulation network (**Figure 4**). Correlations of these genes with phenotypic traits (saccharification yield, vessel density and vessel diameter, upper panel) obtained using WGCNA method (**Figure 5**) were added to this network. Only the TFs showing a connectivity ≥ 7 were kept. The TFs which are putative orthologs of TFs involved in the regulation of xylem formation were grouped as TFs regulators of CW (14 TFs, left panel). The TFs with no identified function in xylem formation were grouped as TFs new candidates (32 TFs, right panel). Node size was set proportional to node connectivity degree. Circles represent CW biosynthesis genes, squares represent phenotypic traits and diamond-shaped nodes represent TFs.

3.6. Characterization of *EgMYB137* as a key player in xylem formation in *Eucalyptus*

In order to functionally characterize this promising new candidate, we first investigate its spatial expression using *E. grandis* transgenic hairy roots containing 2kb of the *EgMYB137* promoter fused to the GUS reporter. Histochemical analyses on transgenic roots sections, revealed that *EgMYB137* promoter drives GUS expression in the apical meristem and central cylinder of young roots (diameter < 0.5 mm, **Figure 8a**). In older roots, which are ongoing secondary growth (diameter > 2 mm), GUS reporter gene was detected in parenchyma cells surrounding developing vessels immediately below the cambial zone (**Figure 8b-d**).

To investigate the ability of *EgMYB137* to regulate SCW biosynthesis, we overexpressed the coding sequence under the control of CamV35S promoter. Cross sections of transgenic roots ongoing secondary growth reveal an enhanced deposition of secondary CW in xylem (**Figure 8e,f**). SCW of fibers in *p35S:EgMYB137* lines were significantly thicker (2.60 ± 0.05 μm , $P = 6.5\text{E-}16$) compared to control lines (2.29 ± 0.04 μm). In contrast, average vessels CW were significantly ($P = 3.9\text{E-}5$) thinner in *p35S:EgMYB137* (1.99 ± 0.04 μm), compared to control lines (2.07 ± 0.06 μm) (**Figure 8g**). Vessel density was significantly decreased by more than 35% in *p35S:EgMYB137* (10.4 ± 1.4 per mm^2 , $P = 8\text{E-}3$), compared to control lines (16.1 ± 3.1 per mm^2) (**Figure 8h**). No significant change in vessel and fibres lumen diameter is observed (**Figure 8i**).

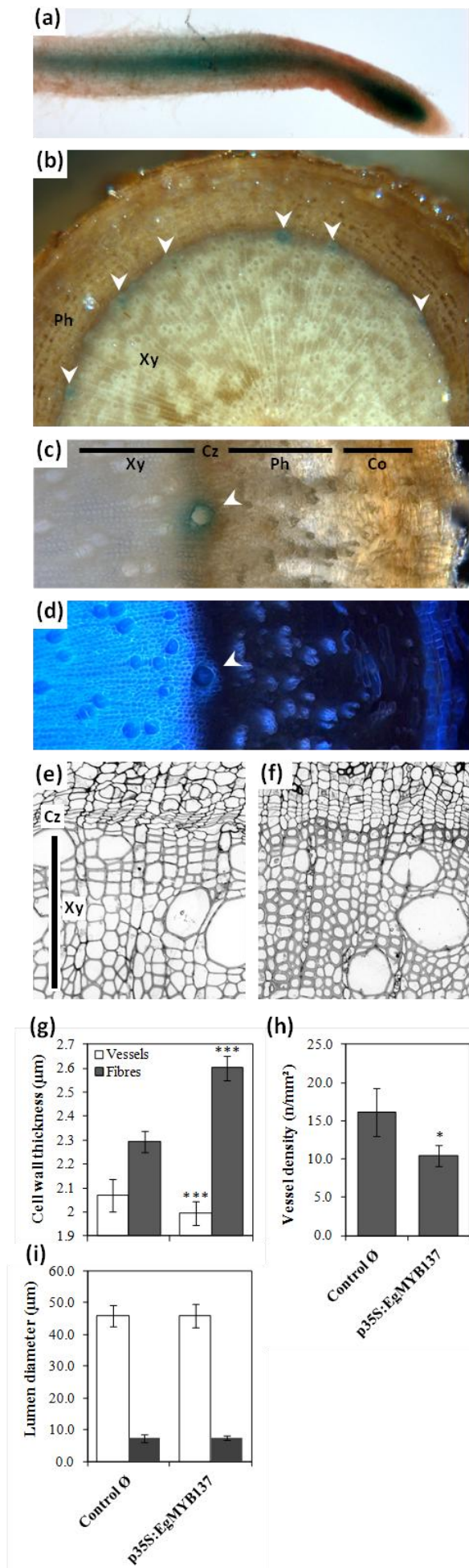


Figure 8: *EgMYB137* is involved in xylem formation in *Eucalyptus* roots. (a) *EgMYB137* promoter drives strong expression of GUS in developing vascular tissues of young roots which are ongoing primary growth. Brightfield observation on *pEgMYB137:GUS* *in vitro* roots. (b) *EgMYB137* promoter driven expression of GUS is detected in vessels (white arrows) in the developing xylem below cambial zone. Observations made in brightfield on free-hand cut sections of 5 months old *pEgMYB137:GUS* roots. Ph, phloem; Xy, xylem. (c) GUS activity is detected in axial parenchyma cells surrounding the youngest vessels which are immediately below cambium (white arrows), in 5 months old *pEgMYB137:GUS* eucalyptus roots. Co, cortex, Cz, cambial zone, Ph, phloem; Xy, xylem. (d) Five months old Eucalyptus roots observed in epifluorescence. Lower auto-fluorescence intensity is observed in CW of vessels and axial parenchyma cells immediately below cambium (white arrow). (e) Bright field observations of semi thin section of 5 months old control root (empty vector) stained with toluidine blue. Cz, cambial zone; Xy, xylem. (f) Bright field observations of semi thin section of 5 months old *p35S:EgMYB137* root, showing fibres CW thickness increase. (g) Changes in cell wall thickness of vessels and fibres in *p35S:EgMYB137* root xylem. Significant decrease of cell wall thickness of vessels measured on an average of 77 vessels in 5 lines *p35S:EgMYB137* and 4 controls (*** $P < 0.0001$; Student's T test). Significant increase of CW thickness of fibres, measured on an average of 1200 fibres per line (*** $P < 0.0001$; Student's T test). (h) Decrease of vessel density in *p35S:EgMYB137* root xylem. Measured on an average of 440 vessels in 5 lines *35S:EgMYB137* and 4 controls (* $P < 0.05$; Student's T test). (i) Vessels and fibres lumen diameter are not affected by *EgMYB137* over-expression. Measured on an average of 440 vessels and 1200 fibres, in 5 lines *p35S:EgMYB137* and 4 control (empty vector) lines.

We investigated the consequence of *EgMYB137* over-expression on CW biosynthesis by biochemical analyses of lignin content and saccharification yield on total root tissues (**Table 1**). Acetyl-bromide soluble lignin content was significantly increased in *p35S:EgMYB137* lines (18.6 ± 0.4 %, $P = 2.1\text{E-}7$) compared to control lines (16.2 ± 0.6 %). Saccharification yield performed without pre-treatment is lower in *35S::EgMYB137* lines (16.0 ± 1.8 %, $P = 3.2\text{E-}3$) compared to control lines (19.1 ± 2.2 %). We observed a drastic decrease of saccharification yield in *p35S:EgMYB137* lines (53.6 ± 5.8 %, $P = 7.7\text{E-}4$) compared to control lines (63.6 ± 6.8 %) when we induced SCW loosening by a sodium hydroxide pre-treatment.

	<i>p35S:EgMYB137</i>	Control Ø
Lignin content (% of DW)	18.6 ± 0.4 ***	16.2 ± 0.6
Saccharification yield without pretreatment (% of DW)	16.0 ± 1.8 *	19.1 ± 2.2
Saccharification yield with pretreatment (% of DW)	53.6 ± 5.8 **	63.6 ± 6.8

Table 1: Overexpression of *EgMYB137* in *Eucalyptus* roots, causes changes in CW composition.

Lignin content measured through acetyl bromide method (Pitre et al. 2007) on EXR of mixed root tissues of 9 lines *p35S:EgMYB137* and 6 lines of controls (empty vectors). Lignin content, expressed as percentage of dry weight of purified CW residues, is significantly higher in *p35S:EgMYB137* compared to controls (*** $P < 0.0001$; Student's T test). All measures were done in triplicates. Saccharification yield assessed on 9 lines *p35S:EgMYB137* and 6 lines of controls (empty vectors). Saccharification yield was assessed following a protocol adapted from Van Acker et al. (2016), on EXR without pre-treatment and also following a NaOH 0.1M pre-treatment. Given values are a percentage of dry weight (DW) of EXR. Saccharification yield is significantly lower in *p35S:EgMYB137* lines compared to controls, in both pre-treated and non-pre-treated samples (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$; Student's T test). All measures were done in triplicates.

4. Discussion

4.1. H₂O availability and K fertilization trigger interconnected regulations in xylem

Previous studies in this experimental setup showed that K fertilization greatly increased gross primary productivity (GPP) and above ground biomass production through drastic modifications in leaves physiology (Battie-Laclau et al., 2014a, b; Christina et al., 2015). In the present work, K fertilization was responsible for (i) the highest proportion of DEGs (**Figure 1**) and DAMs (**figure 3**), (ii) the highest proportion of variance explained by PLS-DA (**Figure 1, 3**) and (iii) the highest proportion of GO terms enriched (**Figure 2**). Most

of these GO terms being related to development, primary metabolism and cell wall biosynthesis. In gene co-expression network, modules M1 to M12 contain 4087 genes strongly regulated by potassium fertilization (ratio > 5 or <0.2) with no or minor impact of water exclusion (**Figure 4**).

Previous work on the same experimental plot showed that the artificial exclusion of 37% throughfall had a limited negative impact on tree physiology (Battie-Laclau et al., 2014a, b; Christina et al., 2015). In our work, GOs terms enriched specifically in response to water exclusion are mainly related to stress response and molecule transport. But even disreect, thoughfall exclusion affect tree growth when associated to potassium fertilization as described by Battie-Laclau et al. (2014a).

The authors observed that K fertilization improved water use efficiency through a better control of stomata aperture and gaz exchanges. They also showed that potassium-enhanced growth rate caused a faster decrease of soil water content and, consequently, a high water demand compared to K deficient conditions. Through analysis of leaf water relations, Battie-Laclau et al. showed that during short-term dry period (end of dry season), K-fertilized trees (both +W+K and -W+K) reached a high level of stress in comparison to K-deficient trees. In our work, if stress related genes are differentially expressed between +W and -W treatment, a high proportion are also differentially regulated by potassium supply. One third of enriched biological processes are impacted by both treatments and a large proportion of these GOs (30%) are related to abiotic stress responses (**Figure 2**). In discriminant analysis (PLS-DA) performed on transcriptomic and metabolomic datasets, separation of -W from +W treatments is highly dependent on K fertilization regime (**Figure 1, 3**), suggesting that tree adaptation to water deprivation is highly dependent on K availability. It is well known that potassium plays a critical role in plant adaptation to drought stress (for review, see Anshütz et al., 2014), as presented by previous studies in *Eucalyptus* (Battie-Laclau et al., 2014a, 2014b, 2016). In our conditions, genes in modules M8 and M11, involved in stress response, are highly up-regulated in either -W+K or +W+K treatments (**Figure 4**), reinforcing the hypothesis of a drought-induced effect of K fertilization.

We detect a smaller module related to molecule transport (M12), which is strongly induced in -W-K. This profile is in agreement with its putative function, as previous studies observed a similar induction of high affinity transporters in plants submitted to drought concomitant with nutrients starvation (Camargo et al., 2014).

Several studies performed on this rainfall exclusion system demonstrate that K fertilization may turn *E. grandis* clone more vulnerable to prolonged drought episodes. Our results

reinforce the hypothesis that increasing mineral nutrition, like K and N, leads to stress related pathways induction (Euring et al., 2014; Camargo et al., 2014). By increasing stem biomass production, potassium fertilization meets forestry sector demands (Laclau et al., 2009) but fertilized trees could suffer a stronger sensitivity to temperature elevation and water starvation, two constraints predicted by climate evolution in close future (Wu et al., 2011). Because a large majority of DEGs concerned SCW formation, our work also highlights the genetic determinants that could play key roles in *Eucalyptus* trade-off between biomass production and stress resistance.

4.2. SCW formation is at the heart of xylem response to water and nutrition

Beyond tree growth and biomass production, we observed that water exclusion and potassium fertilization modulates crucial parameters for wood end uses (**Figure 5**). Potassium fertilization impacts greatly wood structure, and notably vessel properties. Compared to K-deficient trees, K fertilized trees harbor less but wider vessels. Wood density is increased in K fertilized trees submitted to drought. Wood density and vessel properties are important parameters for wood end uses as timber for example. Our observations suggest an increase of lignin content in response to water exclusion, which seems to be a common response in case of drought (Moura et al., 2010). More surprisingly, the lignin content is also increased when trees are K fertilized, which is concomitant to a decrease of saccharification yield without biomass pretreatment, suggesting a lower accessibility or a lower amount of polysaccharides incorporated into cell walls. Saccharification potential represent the accessibility of cell wall polysaccharides to enzymatic degradation, and is a crucial parameter to evaluate for industrial applications such as second generation biofuel production (Rockwood et al., 2008).

These wood traits were nested in comprehensive networks generated by our system biology approach and correlated to a rich array of DEGs and DAMs regulated by water reduction and K fertilization. The core of the network is composed of 6 modules associated to SCW biosynthesis suggesting a tight regulation of this process in response abiotic signals as mentioned in literature (for review see Le Gall et al., 2015), but poorly studied in wood (Ployet et al., 2017).

Modules (M1 to 5) are specifically associated to the biosynthesis of lignin and hemicelluloses while modules (M2 to 4) are more generally related to carbohydrates metabolism, which have already been described in similar approaches performed in *Eucalyptus* (Dharanishanthi and Dasgupta, 2016) or poplar (Cai et al., 2014). Indeed, SCW polysaccharides and lignin represent large carbon sinks supplied by primary metabolites like

UDP-glucose and fructose as precursors (Myburg et al., 2014; Dauwe et al., 2007). These 5 CW-related modules presented abundant connections with module M6 associated to cytoskeleton organization. Both actin filaments and cortical microtubules were shown to play a key role in SCW biosynthesis, in particular cellulose biosynthesis, through a control of cellulose synthase complex trafficking, as reviewed by Bashline et al. (2014). Their high correlations with saccharification yield which reflects CW polysaccharides availability to enzymes (Van Acker et al., 2016) also strengthens the functional prediction of these modules (**Figure 5**). Consistent with our observations, in a system genetics approach performed in *Eucalyptus*, Mizrachi et al. (2016) detected a positive correlation between glucose release efficiency and SCW biosynthetic genes expression while lignin content correlated only with genes related to carbon metabolism and mitochondrial energy metabolism. Additionally, modules M1 to M5 correlate negatively with vessel diameter which raises in response to K fertilization as previously observed by Langer et al. (2002) in poplar. In this study, the authors observed a higher concentration of K in developing vessels comparatively to fibres, in K fertilized poplars and attributed this to an osmotic role of K, essential for vessel expansion (Langer et al., 2002). CW modules also correlate to vessel density which has never been reported to be modified by potassium fertilization. Besides an increased transport efficiency, wider vessels generally cause a higher vulnerability to xylem cavitation, making trees more sensitive to drought episodes, but other parameters like vessel CW composition and structure should be taken into account (Hacke et al., 2001).

Genes and metabolites of M1 to M6, but also saccharification yield, are drastically down-regulated in response to K fertilization and more slightly by water exclusion in K-deficient trees, suggesting a reduction of polysaccharides deposition in CW of developing xylem cells in response to K. Modifications induced in wood composition by an increased availability of mineral nutrients such as nitrogen and phosphate, were more extensively studied, principally in poplar, *Eucalyptus* or grapevine (Fernández et al., 2016; Camargo et al., 2014; Thomas et al., 2006). For example, Camargo et al. (2014) highlighted modifications in xylem structure with thinner cell walls and a reduction of lignin biosynthesis in xylem of N-fertilized *Eucalyptus* trees. Previous studies demonstrated that prolonged episodes of drought generally lead to lower C uptake and consequently C starvation for all tree organs (Mitchell et al., 2014). On the same experimental setup, Battie-Laclau et al. (2014a) observed an increase of phloem sap sugar concentrations during drought episodes in K-fertilized trees. They hypothesized that this could results from growth inhibition of aerial organs, in favor of cell metabolism maintenance and possibly root system development (Battie-Laclau et al. 2014a).

In our conditions, trees were sampled during a dry period and harbored marked induction of stress-related genes in +K conditions. Thus, the inhibition of CW biosynthesis pathways could be a response to drought stress enhanced by K fertilization. In poplar, SCW deposition was delayed in highly K fertilized trees as a result of a stimulation of cambial activity (Langer et al., 2002). Thus we can hypothesize that potassium directly down regulate SCW deposition in xylem cells or indirectly by controlling cambium activity.

Cambial activity and xylogenesis lead to the formation of vascular system and directly affects the transport efficiency of water, mineral nutrients and photoassimilates. They are complex and dynamic processes, influenced by many exogenous and endogenous factors (Sorce et al., 2013). Here we detect two groups of modules (M8-9 and M10-11) mainly associated to cambial activity, cell activity, cell metabolism and response to stress which are induced in response to K fertilization. Their profiles, and their correlation with wood density or trunk biomass increment, point to a positive effect of K fertilization on cambial activity and xylem cell metabolism. This is in accordance with previous observations which demonstrated an enhanced cambial activity in response to K fertilization in spruce (Dünisch and Bauch, 1994; Kuhn et al., 1995, 1997a) and more recently in poplar (Langer et al., 2002). The essential role of K in cambial activity maintenance has already been proved, for review see Fromm (2010).

Up to date, most of the systems biology studies performed on woody tissues, were concentrated on SCW regulations (Yang et al., 2013; Mizrachi and Myburg, 2016; Dharanishanthi and Dasgupta, 2016; Shi et al., 2017; Cai et al., 2014), and only few studies uncovered genes involved in cambial activity (Zinkgraf et al., 2017). In a previous study, Ployet et al (2017) reported the detection of a cambium specific group of co-regulated genes in *Eucalyptus*, distinct from a xylem specific cluster. These genes, mostly TFs with no clear orthology with genes characterized in other species, were strongly regulated by cold stress and other abiotic signals. In our work, the fine sampling of immature cells between bark and old xylem, allowed the identification of 18 TFs as excellent candidates in the control of cambial activity in response to potassium fertilization and water exclusion (**Table S7**). Among these 18 TFs, the best Arabidopsis BLAST hits identified 10 TFs linked to cell differentiation and proliferation, 5 TFs related to meristematic regions activity (including 3 TFs involved in cambial activity regulation) and 3 TFs related to auxin response or transport (**Table S7**).

4.3. Key regulatory genes and metabolite markers of SCW biosynthesis highlighted by co-regulation network

In our conditions, most of the SCW related genes were strongly repressed in response to K fertilization. The detection of 95 structural genes involved in biosynthesis of cellulose, hemicelluloses and lignin, (Carocha et al., 2015; Myburg et al., 2014) within modules M1 to M6, confirmed their functional role in SCW biosynthesis. Correlation of most of these genes with saccharification yield confirmed the repression of SCW biosynthesis in response to K in our conditions. We detected 56 TFs correlated to these SCW genes and xylem properties (saccharification yield or vessel properties). Fourteen are the closest orthologs of TFs already associated to regulation of SCW biosynthesis. The 3 homeodomain leucine zipper (HD-ZIP) type TFs, *Eucgr.B02504*, *Eucgr.C00605* and *Eucgr.F03066* share the highest protein sequence similarity with *AtIFL/REV*, *AtATHB8* and *AtATHB15* respectively. The TFs *IFL/REV* and *ATHB8* are regulated by auxin and promote xylem differentiation, while *ATHB15* is thought to have the opposite action in *Arabidopsis* (Zhong et al., 1997; Baima et al., 2001; Ohashi-Ito and Fukuda, 2003; Ilegems et al., 2010; Schuetz et al., 2013).

The master switch *AtWRKY12* is thought to negatively regulate SCW master regulators such as *NST2* to avoid ectopic SCW deposition (Wang et al., 2010). In our results, its putative *Eucalyptus* ortholog, *Eucgr.D01219*, is highly correlated with SCW genes and repressed in response to K fertilization. In fully elongated immature xylem cells of *Arabidopsis*, SCW deposition is activated by either *AtSND1* and *AtNST1/2* in fibres or *AtVND6* and *AtVND7* in vessels (Mitsuda et al., 2007; Zhong et al., 2006; 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 TFs (Vascular NAC Domain). Absence of significant down-regulation of VND master switches, activators of CW biosynthesis in vessels, suggest that the deposition of SCW in vessels is moderately impacted by fertilization, possibly to preserve rigid cell wall of vessels, which is essential for water transport. In contrast, the strong down-regulation of SCW master switches strengthens the hypothesis of an inhibition of CW deposition in fibres cells in response to K fertilization. Consistent with this hypothesis, the activator of SCW deposition in *Eucalyptus* *EgMYB2*, is also correlated to CW genes and drastically repressed in K fertilized conditions. A similar profile is observed for a suite of TFs (*EgMYB31*, *EgMYB60*, *EgMYB80*, *EgMYB122*, *Eucgr.F02796* and *Eucgr.D01935*) which are the orthologs of respectively *AtMYB83*, *AtMYB103*, *AtMYB69*, *AtMYB43*, *AtC3H14* and *AtKNAT7* dedicated to the control of SCW deposition in *Arabidopsis*. Applying a comparable system biology approach on drought-stressed poplars, Zinkgraf et al. (2017) identified a key

module in which SCW biosynthesis genes were highly correlated to TFs known to regulate SCW biosynthesis. These results strengthened the hypothesis that at least a part of SCW biosynthesis regulatory pathways, mainly characterized in *Arabidopsis*, could be conserved in *Eucalyptus* and directly controlled by abiotic stress signaling as previously suggested (Ployet et al., 2017).

In addition to these known TFs, we found 109 TFs in CW modules which are likely to play a role in wood formation (**Figure 4**). We focused our attention on 32 TFs which represent the best candidates because of their co-expression with known SCW biosynthesis genes and wood properties (**Figure 7**). These TFs have no function predicted in the context of wood formation and no clear ortholog in *Arabidopsis*, but are correlated to a high number of SCW related genes. Among these candidates, we found 6 TFs which belong to gene families annotated in *E. grandis*. Among them, *EgMYB137* combines the highest number of connections to SCW genes and the highest expression across the different conditions.

By analyzing the drastic modifications in xylem provoked by *EgMYB137* over-expression in *Eucalyptus* roots, we validated its ability to regulate SCW formation. The link of *EgMYB137* with cell wall biosynthesis and vessel properties, suggested by our system biology approach is confirmed by the characterization of transgenic *Eucalyptus* hairy roots overexpressing its coding sequence. *EgMYB137* promoter showed a specific pattern of expression in vascular tissues and more specifically in developing vessels and surrounding axial parenchyma (**Figure 8**). In *p35S:EgMYB137* lines, cell wall thickness is increased and vessel density markedly decreased (**Figure 8**). *EgMYB137* over-expression led to a massive increase of saccharification yield (**Table 1**), confirming the strong correlation between both variables detected in coregulation networks. The reduction of saccharification yield even after a loosening pre-treatment of biomass, suggests drastic modifications in polysaccharides degradability in SCW in *p35S:EgMYB137* lines (Van Acker et al., 2013). Together with the increase of lignin content in *p35S:EgMYB137* lines, these results confirm that *EgMYB137* expression can induce drastic modifications of SCW structure and composition. These evidences pointing to a role of *EgMYB137* in SCW formation demonstrate the potential of system biology approaches and let expect the identification of more than 30 key regulators of wood formation in woody plants.

In highly weathered tropical and sub-tropical soils, massive K fertilization allow to reach the highest growth rates in the world. With these fertilization regimes, water availability becomes the limiting factor reducing the safety margins for tree adaptation to drought. Thus, detrimental effects of drought episodes (stress induction, sensitivity to pathogens) are

exacerbated. In a future drier climate, fertilization regimes should be revisited to improve tree growth and reduce water shortage.

5. References

- Van Acker, R., Vanholme, R., Storme, V., Mortimer, J.C., Dupree, P., and Boerjan, W.** (2013). Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Biofuels* **6**: 46.
- Almeida, A.S., Mandlate, L.J.C., and Guedes, B.S.** (2014). Biomass and Carbon Stocks of Sofala Bay Mangrove Forests. *Forests* **5**: 1967–1981.
- Anschütz, U., Becker, D., and Shabala, S.** (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J. Plant Physiol.* **171**: 670–87.
- Aoki, K., Ogata, Y., and Shibata, D.** (2007). Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant Cell Physiol.* **48**: 381–90.
- Arend, M. and Fromm, J.** (2007). Seasonal change in the drought response of wood cell development in poplar. *Tree Physiol.* **27**: 985–92.
- Arend, M., Monshausen, G., Wind, C., Weisenseel, M.H., and Fromm, J.** (2004). Effect of potassium deficiency on the plasma membrane H⁺-ATPase of the wood ray parenchyma in poplar. *Plant, Cell Environ.* **27**: 1288–1296.
- Arend, M., Weisenseel, M.H., Brummer, M., Osswald, W., and Fromm, J.H.** (2002). Seasonal changes of plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase and endogenous ion current during cambial growth in poplar plants. *Plant Physiol.* **129**: 1651–63.
- Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D.M., and Mueller-Roeber, B.** (2008). QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**: 465.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, a, Wisman, E., Altamura, M.M., Ruberti, I., and Morelli, G.** (2001). The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**: 643–55.
- Bashline, L., Li, S., and Gu, Y.** (2014). The trafficking of the cellulose synthase complex in higher plants. *Ann. Bot.* **114**: 1059–67.
- Battie-Laclau, P., Delgado-Rojas, J.S., Christina, M., Nouvellon, Y., Bouillet, J.-P., Piccolo, M. de C., Moreira, M.Z., Gonçalves, J.L. de M., Rounsard, O., and Laclau, J.-P.** (2016). Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in *Eucalyptus grandis* plantations. *For. Ecol. Manage.* **364**: 77–89.
- Battie-Laclau, P., Laclau, J.-P., Beri, C., Mietton, L., Muniz, M.R.A., Arenque, B.C., DE Cassia Piccolo, M., Jordan-Meille, L., Bouillet, J.-P., and Nouvellon, Y.** (2014a). Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. *Plant. Cell Environ.* **37**: 70–81.
- Battie-Laclau, P., Laclau, J.-P., Domec, J.-C., Christina, M., Bouillet, J.-P., de Cassia Piccolo, M., de Moraes Gonçalves, J.L., e Moreira, R.M., Krusche, A.V., Bouvet, J.-M., and Nouvellon, Y.** (2014b). Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in *Eucalyptus grandis* plantations. *New Phytol.* **203**: 401–13.
- Bonan, G.B.** (2008). Forests and Climate Change: Forcings, Feedbacks, and the Climate Benefits of Forests. *Science* (80-.). **320**: 1444–1449.
- Cai, B., Li, C.-H., Huang, J., Reuber, L., and 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. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**: 521–530.
- Camargo, E.L.O. et al.** (2014). Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and

- secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol.* **14**: 256.
- Carocha, V., Soler, M., Hefer, C., Cassan-Wang, H., Fevereiro, P., Myburg, A.A., Paiva, J.A.P., and Grima-Pettenati, J.** (2015). Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* **206**: 1297–313.
- Cassan-wang, H., Yu, H., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Ladouce, N., Savelli, B., Paiva, J.A.P., Leple, J.C., Grima-Pettenati, J., and Ame, U.R.** (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. *53*: 2101–2116.
- Christina, M., Le Maire, G., Battie-Laclau, P., Nouvellon, Y., Bouillet, J.-P., Jourdan, C., de Moraes Gonçalves, J.L., and 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. *Glob. Chang. Biol.* **21**: 2022–2039.
- Cuadros-Inostroza, Á., Caldana, C., Redestig, H., Kusano, M., Lisec, J., Peña-Cortés, H., Willmitzer, L., and Hannah, M.A.** (2009). TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. *BMC Bioinformatics* **10**: 428.
- Dauwe, R. et al.** (2007). Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant J.* **52**: 263–285.
- Demura, T. and Fukuda, H.** (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci.* **12**: 64–70.
- Dharanishanthi, V. and Dasgupta, M.G.** (2016). Construction of co-expression network based on natural expression variation of xylogenesis-related transcripts in *Eucalyptus tereticornis*. *Mol. Biol. Rep.* **43**: 1129–1146.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R.** (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21.
- Dünisch, O. and Bauch, J.** (1994). Influence of Soil Substrate and Drought on Wood Formation of Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) under Controlled Conditions. *Holzforschung* **48**: 447–457.
- Dunisch, O., Bauch, J., Muller, M., and 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, J.C.R., Goncalves, J.L.M., Ponton, S., Sette, C.R., Delgado-Rojas, J.S., Bouillet, J.-P., and Nouvellon, Y.** (2012). Do changes in carbon allocation account for the growth response to potassium and sodium applications in tropical *Eucalyptus* plantations? *Tree Physiol.* **32**: 667–679.
- Euring, D., Bai, H., Janz, D., and 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 Biol.* **14**: 391.
- Fernández, V., Guzmán-Delgado, P., Graça, J., Santos, S., and Gil, L.** (2016). Cuticle Structure in Relation to Chemical Composition: Re-assessing the Prevailing Model. *Front. Plant Sci.* **7**: 427.
- Fromm, J.** (2010). Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. *Tree Physiol.* **30**: 1140–7.
- Gall, H., Philippe, F., Domon, J., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C.** (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants* **4**: 112–166.
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N., and Grima-Pettenati, J.** (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J. cell Mol. Biol.* **43**: 553–567.
- Gonçalves, J.L.M., Barros, N.F., Nambiar, E.K.S., and R.F., N.** (1997). Soil and stand management for short-

- rotation plantations. In *Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests*, B.A.G. Nambiar E.K.S., ed (Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, Australia), pp. 379–417.
- Grima-Pettenati, J., Soler, M., Camargo, E.L.O., and Wang, H.** (2012). Transcriptional Regulation of the Lignin Biosynthetic Pathway Revisited: New Players and Insights.
- Gromski, P.S., Xu, Y., Correa, E., Ellis, D.I., Turner, M.L., and Goodacre, R.** (2014). A comparative investigation of modern feature selection and classification approaches for the analysis of mass spectrometry data. *Anal. Chim. Acta* **829**: 1–8.
- Guo, H., Wang, Y., Wang, L., Hu, P., Wang, Y., Jia, Y., Zhang, C., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, C., and Yang, C.** (2017). Expression of the MYB transcription factor gene BplMYB46 affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in *Betula platyphylla*. *Plant Biotechnol. J.* **15**: 107–121.
- Hacke, U.G., Sperry, J.S., Pockman, W.T., Davis, S.D., and McCulloh, K.A.** (2001). Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**: 457–461.
- Hawkins, E. and Sutton, R.** (2012). Time of emergence of climate signals. *Geophys. Res. Lett.* **39**: n/a–n/a.
- Hertzberg, M. et al.** (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14732–14737.
- Hinchee, M., Rottmann, W., Mullinax, L., Zhang, C., Chang, S., Cunningham, M., Pearson, L., and Nehra, N.** (2009). Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications. *Vitr. Cell. Dev. Biol.* **45**: 619–629.
- Hussey, S.G., Mizrachi, E., Creux, N.M., and Myburg, A.A.** (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* **4**: 325.
- Hussey, S.G., Saïdi, M.N., Hefer, C.A., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2015). Structural, evolutionary and functional analysis of the NAC domain protein family in *Eucalyptus*. *New Phytol.* **206**: 1337–50.
- Ilegems, M., Douet, V., Meylan-Bettex, M., Uyttewaal, M., Brand, L., Bowman, J.L., and Stieger, P.A.** (2010). Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* **137**: 975–984.
- Jansen, S., Gortan, E., Lens, F., Lo Gullo, M.A., Salleo, S., Scholz, A., Stein, A., Trifilò, P., and Nardini, A.** (2011). Do quantitative vessel and pit characters account for ion-mediated changes in the hydraulic conductance of angiosperm xylem? *New Phytol.* **189**: 218–228.
- Kuhn, A.J., Bauch, J., and Schröder, W.H.** (1995). Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* **168-169**: 135–150.
- Kuhn, A.J., Schröder, W.H., and Bauch, J.** (1997a). On the Distribution and Transport of Mineral Elements in Xylem, Cambium and Phloem of Spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Holzforschung* **51**: 487–496.
- Kuhn, C., Franceschi, V.R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W.B.** (1997b). Macromolecular Trafficking Indicated by Localization and Turnover of Sucrose Transporters in Eucleate Sieve Elements. *Science* (80-.). **275**: 1298–1300.
- Laclau, J.-P., Almeida, J.C.R., Goncalves, J.L.M., Saint-Andre, L., Ventura, M., Ranger, J., Moreira, R.M., and Nouvellon, Y.** (2009). Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in *Eucalyptus* plantations. *Tree Physiol.* **29**: 111–124.
- Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., and Hedrich, R.** (2002). Poplar potassium transporters capable of controlling K⁺ homeostasis and K⁺-dependent xylogenesis. *Plant J.* **32**: 997–1009.
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., and Hedrich, R.** (2004). The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud

- development. *Plant J.* **37**: 828–838.
- Langfelder, P. and Horvath, S.** (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**: 559.
- Lê Cao, K.-A., Costello, M.-E., Lakis, V.A., Bartolo, F., Chua, X.-Y., Brazeilles, R., and Rondeau, P.** (2016). MixMC: A Multivariate Statistical Framework to Gain Insight into Microbial Communities. *PLoS One* **11**: e0160169.
- Li, C., Ng, C.K.-Y., and Fan, L.-M.** (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ. Exp. Bot.* **114**: 80–91.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**: 550.
- Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M.** (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* **21**: 3448–3449.
- Mansfield, S.D.** (2009). Solutions for dissolution--engineering cell walls for deconstruction. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 286–94.
- Mellerowicz, E.J. and Gorshkova, T.A.** (2012). Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition. *J. Exp. Bot.* **63**: 551–565.
- Miller, G.L.** (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem* **31**: 426–428.
- Mitchell, P.J., O'Grady, A.P., Hayes, K.R., and Pinkard, E.A.** (2014). Exposure of trees to drought-induced die-off is defined by a common climatic threshold across different vegetation types. *Ecol. Evol.* **4**: 1088–101.
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., and 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**: 270–80.
- Mizrachi, E., Mansfield, S.D., and Myburg, A.A.** (2012). Cellulose factories: Advancing bioenergy production from forest trees. *New Phytol.* **194**: 54–62.
- Mizrachi, E. and Myburg, A.A.** (2016). Systems genetics of wood formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **30**: 94–100.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P.** (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360–76.
- Myburg, A.A. et al.** (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**: 356–62.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N.A., and Ohtani, M.** (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* **6**: 288.
- Nardini, A., Grego, F., Trifilo, P., and Salleo, S.** (2010). Changes of xylem sap ionic content and stem hydraulics in response to irradiance in *Laurus nobilis*. *Tree Physiol.* **30**: 628–635.
- Ohashi-Ito, K. and Fukuda, H.** (2003). HD-zip III homeobox genes that include a novel member, ZeHB-13 (*Zinnia*)/ATHB-15 (*Arabidopsis*), are involved in procambium and xylem cell differentiation. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1350–8.
- Pérez-Enciso, M. and Tenenhaus, M.** (2003). Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. *Hum. Genet.* **112**: 581–592.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 45e–45.

- Pitre, F.E., Pollet, B., Lafarguette, F., Cooke, J.E.K., MacKay, J.J., and Lapierre, C.** (2007). Effects of Increased Nitrogen Supply on the Lignification of Poplar Wood. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 10306–10314.
- Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., Lapierre, C., Franche, C., Truchet, I., and Grima-Pettenati, J.** (2015). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnol. J.*
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A.** (2001). Wood Formation in Trees Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* **127**: 1513–1523.
- Ployet, R., Soler, M., Carocha, V., Ladouce, N., Alves, A., Rodrigues, J.C., Harvengt, L., Marque, C., Teulieres, C., Grima-Pettenati, J., and Mounet, F.** (2017). Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in Eucalyptus. *Tree Physiol.* **in press**.
- Ramírez, V., Agorio, A., Coego, A., García-Andrade, J., Hernández, M.J., Balaguer, B., Ouwerkerk, P.B.F., Zarra, I., and Vera, P.** (2011). MYB46 modulates disease susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **155**: 1920–35.
- Rockwood, D.L., Rudie, A.W., Ralph, S.A., Zhu, J.Y., and Winandy, J.E.** (2008). Energy product options for eucalyptus species grown as short rotation woody crops. *Int. J. Mol. Sci.* **9**: 1361–78.
- Rossi, S., Menardi, R., and Anfodillo, T.** (2006). Trephor: A New Tool for Sampling Microcores from tree stems. *IAWA J.* **27**: 89–97.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M.** (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**.
- Ruprecht, C. and Persson, S.** (2012). Co-expression of cell wall-related genes : new tools and insights. **3**: 1–7.
- Sardans, J. and Peñuelas, J.** (2015). Potassium: a neglected nutrient in global change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **24**: 261–275.
- Schuetz, M., Smith, R., and Ellis, B.** (2013). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J. Exp. Bot.* **64**: 11–31.
- Shi, R., Wang, J.P., Lin, Y.-C., Li, Q., Sun, Y.-H., Chen, H., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L.** (2017). Tissue and cell-type co-expression networks of transcription factors and wood component genes in *Populus trichocarpa*. *Planta*: 1–12.
- Singh, A., Gautier, B., Shannon, C.P., Vacher, M., Rohart, F., Tebutt, S.J., and Le Cao, K.-A.** (2016). DIABLO - an integrative, multi-omics, multivariate method for multi-group classification. *bioRxiv*.
- Smethurst, P., Knowles, A., Churchill, K., Wilkinson, A., and Lyons, A.** (2007). Soil and foliar chemistry associated with potassium deficiency in *Pinus radiata*. *Can. J. For. Res.* **37**: 1093–1105.
- Soler, M., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Cassan-Wang, H., San Clemente, H., Savelli, B., Hefer, C.A., Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2014). The Eucalyptus grandis R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytol.*
- Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., and Anfodillo, T.** (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Rep.* **32**: 885–898.
- Southerton, S.G., Marshall, H., Mouradov, A., and Teasdale, R.D.** (1998). Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. *Plant Physiol.* **118**: 365–372.
- Stekhoven, D.J. and Buhlmann, P.** (2012). MissForest--non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* **28**: 112–118.
- Taylor-Teeple, M. et al.** (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **517**: 571–5.
- Thomas, D.S., Montagu, K.D., and Conroy, J.P.** (2006). Why does phosphorus limitation increase wood

- density in *Eucalyptus grandis* seedlings? *Tree Physiol.* **26**: 35–42.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L.** (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**: 562–578.
- Trifilò, P., Lo Gullo, M.A., Salleo, S., Callea, K., and Nardini, A.** (2008). Xylem embolism alleviated by ion-mediated increase in hydraulic conductivity of functional xylem: insights from field measurements. *Tree Physiol.* **28**: 1505–12.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**: 895–905.
- De Vos, R.C., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J., Bino, R.J., and Hall, R.D.** (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**: 778–791.
- Wang, H., Avci, U., Nakashima, J., Hahn, M.G., Chen, F., and Dixon, R.A.** (2010). Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 22338–43.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., and Guo, S.** (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 7370–90.
- Wind, C., Arend, M., and Fromm, J.** (2004). Potassium-Dependent Cambial Growth in Poplar. *Plant Biol.* **6**: 30–37.
- Wright, S.J.** (2011). The carbon sink in intact tropical forests. *Glob. Chang. Biol.* **19**: 337–339.
- Wu, Z., Huang, N.E., Wallace, J.M., Smoliak, B. V., and Chen, X.** (2011). On the time-varying trend in global-mean surface temperature. *Clim. Dyn.* **37**: 759–773.
- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., and Demura, T.** (2010). VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 1249–63.
- Yang, F., Mitra, P., Zhang, L., Prak, L., Verherbruggen, Y., Kim, J.-S., Sun, L., Zheng, K., Tang, K., Auer, M., Scheller, H. V., and Loqué, D.** (2013). Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 325–35.
- Yang, J.H. and Wang, H.** (2016). Molecular Mechanisms for Vascular Development and Secondary Cell Wall Formation. *Front. Plant Sci.* **7**: 356.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S.** (1997). The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* **89**: 413–24.
- Zhong, R., Demura, T., and 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**: 3158–70.
- Zhong, R. and Ye, Z.H.** (2015). Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* **56**: 195–214.
- Zinkgraf, M., Liu, L., Groover, A., and Filkov, V.** (2017). Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytol.*
- Zwieniecki, M.A., Melcher, P.J., and Michele Holbrook, N.M.** (2001). Hydrogel Control of Xylem Hydraulic Resistance in Plants. *Science* (80-.). **291**: 1059–1062.
- Zwieniecki, M.A. and Secchi, F.** (2015). Threats to xylem hydraulic function of trees under “new climate normal” conditions. *Plant. Cell Environ.* **38**: 1713–1724.

6. Supplemental data

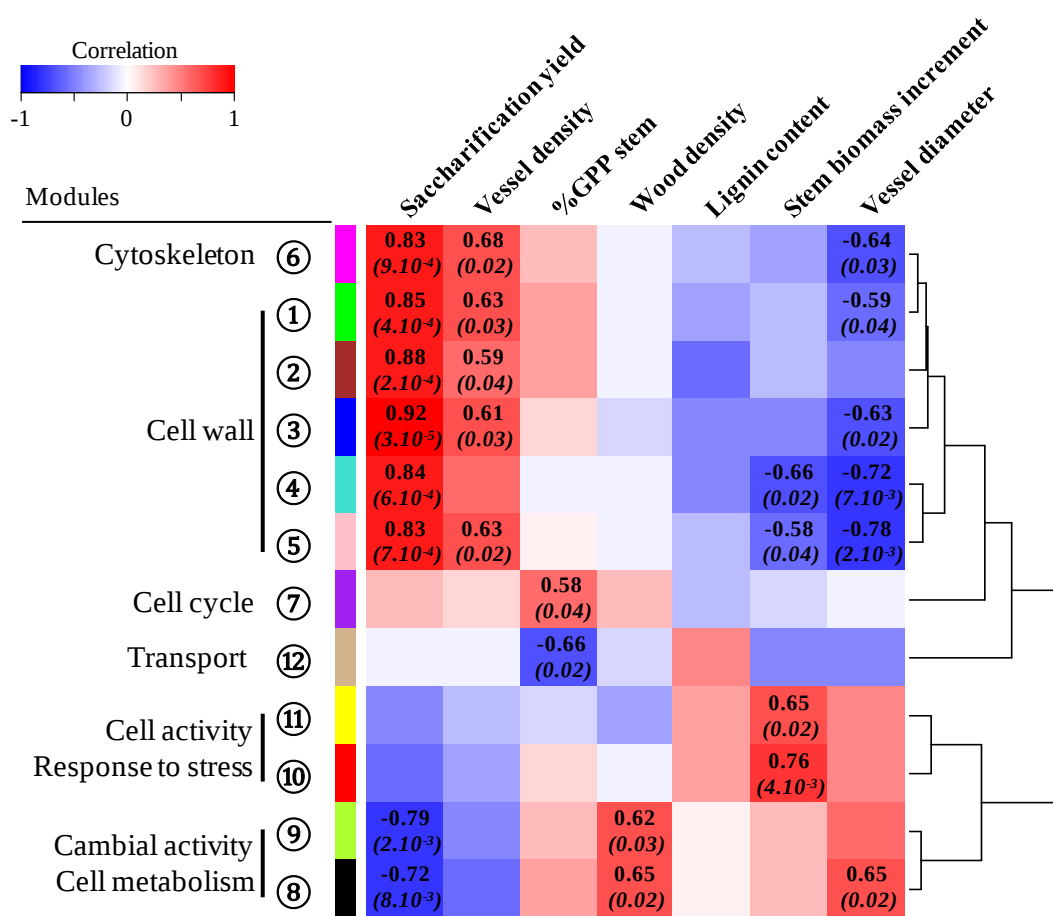


Figure S1: Phenotypic traits related to wood growth, composition and structure correlate with modules detected in the co-regulation network. The stem biomass increment (Δ stem biomass) is an average over the last 3 months preceding sampling, calculated using an allometric relation linking tree trunk diameter and trunk biomass production. The average gross primary productivity allocated to stem growth (GPP stem) was also simulated for the 3 months period preceding sampling using an already established model (Christina et al., 2015). Saccharification yield and lignin content were measured on developing xylem samples (scrapping samples). Wood density was measured on the 1 mm youngest xylem zone immediately below cambium. Vessels properties were evaluated by measuring vessels density and vessel lumen diameter in the 5 mm youngest xylem immediately below cambium. Correlations between these phenotypic traits with the average profile of each module (M1 to M6, **Figure 4**) were tested using WGCNA method. Only the significant correlations ($P < 0.05$) are represented. Positive correlations are represented in red while negative correlations are represented by blue color.

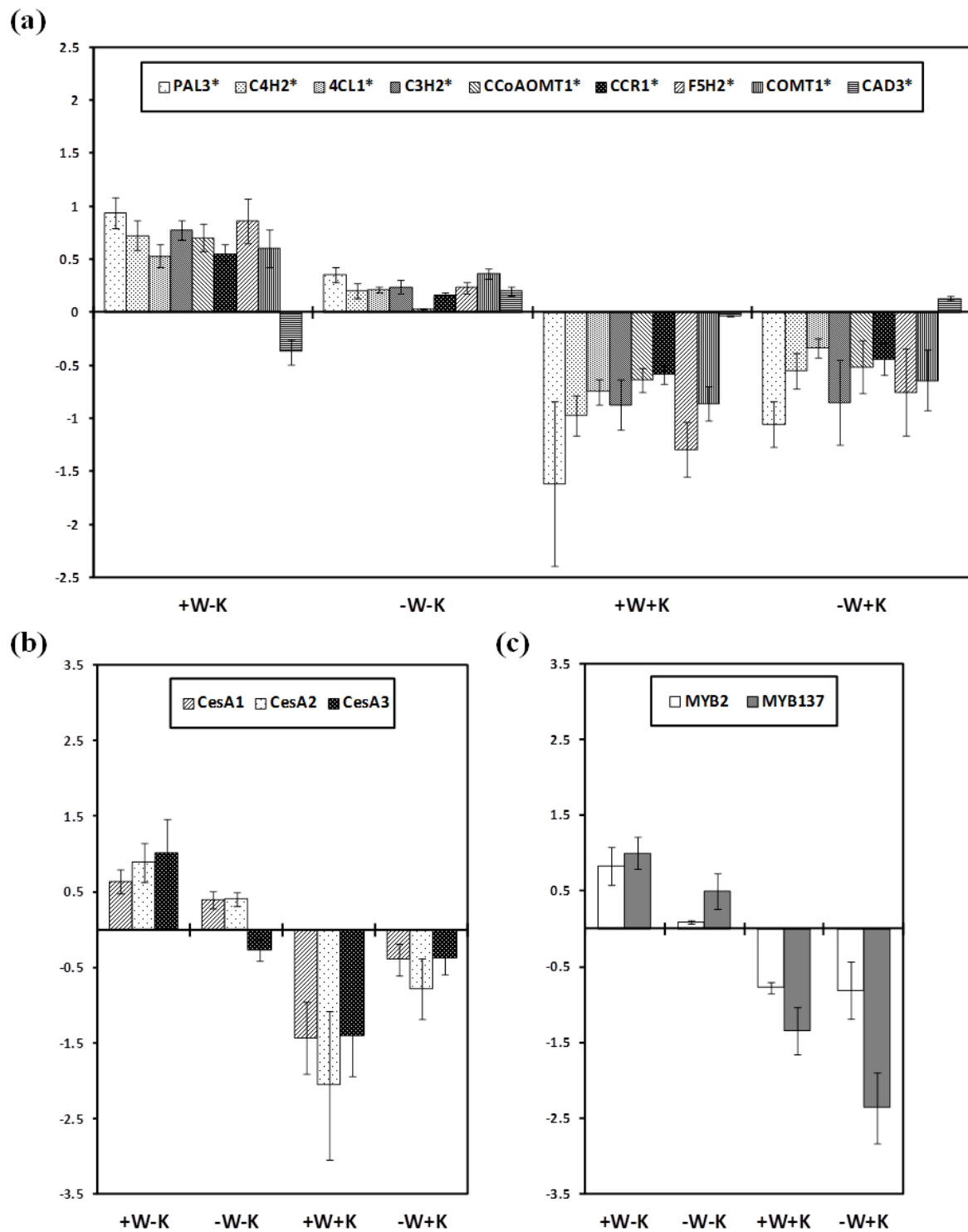


Figure S2: Expression profiles of CW related genes obtained by RT-qPCR are in agreement with those obtained by RNAseq. (a) Expression profiles of genes coding for enzymes involved in lignin biosynthesis in eucalyptus xylem (Carocha et al., 2015). **(b)** Expression profiles of genes coding for cellulose synthase subunits (CesA1, CesA2 and CesA3) involved in secondary CW biosynthesis. **(c)** Expression profiles of TFs EgMYB2 and EgMYB137. Expression assessed on 4 independent trees using specific primers.

Table S6: Transcription factors detected in the different modules.

Variable	Module	Connectivity degree	<i>E. grandis</i> annotation	Putative TF type	Arabidopsis closest ortholog related to xylem biosynthesis
Eucgr.A02074	"black"	49	EgrNAC20	NAC	-
Eucgr.A02341	"black"	3	EgrERF-003	AP2	-
Eucgr.B02480	"black"	4	ARF4	ARF	-
Eucgr.B03417	"black"	8	EgrMYB29	MYB	-
Eucgr.C02333	"black"	16	EgrAP2-06	AP2	-
Eucgr.C03986	"black"	21	-	bZIP	-
Eucgr.D00607	"black"	11	-	Dof	-
Eucgr.E01600	"black"	31	-	SBP	-
Eucgr.E03255	"black"	2	-	C3H	-
Eucgr.E03271	"black"	7	-	bHLH	-
Eucgr.F00098	"black"	2	-	AP2	-
Eucgr.F02956	"black"	2	-	MIKC_MADS	-
Eucgr.F03143	"black"	8	EgrMYB83	MYB	-
Eucgr.F03418	"black"	4	-	C2H2	-
Eucgr.F03732	"black"	14	-	bZIP	-
Eucgr.G01052	"black"	6	EgrNAC86	NAC	-
Eucgr.G01063	"black"	17	EgrNAC91	NAC	-
Eucgr.G01722	"black"	22	-	GATA	-
Eucgr.G02520	"black"	31	-	HD-ZIP	-
Eucgr.G02522	"black"	22	EgrMYB91	MYB	-
Eucgr.G03258	"black"	5	EgrGRAS54	GRAS	-
Eucgr.H01990	"black"	11	-	Dof	-
Eucgr.H04623	"black"	2	-	CAMTA	-
Eucgr.H04742	"black"	5	-	HD-ZIP	-
Eucgr.I00569	"black"	1	-	Dof	-
Eucgr.I00704	"black"	9	EgrGRAS63	GRAS	-
Eucgr.J00531	"black"	23	EgrNAC166	NAC	-
Eucgr.K02711	"black"	6	-	MIKC_MADS	-
Eucgr.K02841	"black"	25	-	Dof	-
Eucgr.K03256	"black"	11	EgrNAC178	NAC	-
Eucgr.B00373	"blue"	183	EgrMYB17	MYB	-
Eucgr.B00572	"blue"	290	-	C2H2	-
Eucgr.B00720	"blue"	7	-	ERF	-
Eucgr.B02337	"blue"	1	EgrGRAS22	GRAS	-
Eucgr.B03164	"blue"	27	-	C2H2	-
Eucgr.C00358	"blue"	3	EgrRAV-06	RAV	-
Eucgr.C00661	"blue"	9	-	C2H2	-
Eucgr.C02727	"blue"	251	-	TALE	-
Eucgr.C03807	"blue"	1	-	bHLH	-
Eucgr.D00591	"blue"	4	EgrNAC44	NAC	EgNAC44
Eucgr.D02083	"blue"	322	-	C2H2	-
Eucgr.D02498	"blue"	303	-	C2H2	-
Eucgr.E03226	"blue"	24	EgrNAC64	NAC	EgNAC64
Eucgr.F00659	"blue"	327	EgrERF-050	ERF	-
Eucgr.F01003	"blue"	1	EgrGRAS41	GRAS	-

Eucgr.F02891	"blue"	5	-	C2H2	-
Eucgr.G01548	"blue"	1	EgrNAC106	NAC	-
Eucgr.G02351	"blue"	30	-	bHLH	-
Eucgr.G02793	"blue"	132	EgrERF-080	AP2	-
Eucgr.H00748	"blue"	9	-	bHLH	-
Eucgr.H02782	"blue"	35	EgrDREB-55	ERF	-
Eucgr.I00305	"blue"	50	-	WRKY	-
Eucgr.J01083	"blue"	173	-	GATA	-
Eucgr.K01643	"blue"	5	-	bZIP	-
Eucgr.K02297	"blue"	151	EgrMYB135	MYB	EgMYB135
Eucgr.B00229	"brown"	337	EgrMYB14	MYB	-
Eucgr.B00645	"brown"	1	-	bHLH	-
Eucgr.B03392	"brown"	5	-	bHLH	-
Eucgr.B03684	"brown"	447	EgrMYB31	MYB	EgMYB31
Eucgr.B03929	"brown"	236	-	C2H2	-
Eucgr.C01876	"brown"	144	-	CO-like	-
Eucgr.D02027	"brown"	3	EgrNAC50	NAC	EgNAC50
Eucgr.D02186	"brown"	10	-	LSD	-
Eucgr.E01053	"brown"	455	EgrNAC61	NAC	EgNAC61
Eucgr.F00100	"brown"	75	-	bHLH	-
Eucgr.F02220	"brown"	49	-	bHLH	-
Eucgr.F02796	"brown"	331	-	C3H	EgC3H14
Eucgr.G01774	"brown"	8	EgrMYB1	MYB	EgMYB1
Eucgr.G02840	"brown"	524	-	GATA	-
Eucgr.G03385	"brown"	235	EgrMYB2	MYB	EgMYB2
Eucgr.H01337	"brown"	54	EgrMYB95	MYB	EgMYB95
Eucgr.I00882	"brown"	20	-	WRKY	-
Eucgr.J01601	"brown"	237	EgrMYB122	MYB	EgMYB122
Eucgr.J03101	"brown"	9	-	C2H2	-
Eucgr.A02086	"cyan"	4	-	GATA	-
Eucgr.D02360	"cyan"	6	-	MYB_related	-
Eucgr.G01458	"cyan"	15	-	B3	-
Eucgr.H02628	"cyan"	4	-	bHLH	-
Eucgr.B00048	"green"	63	-	bHLH	-
Eucgr.B00385	"green"	183	-	bHLH	-
Eucgr.C00725	"green"	118	EgrMYB40	MYB	-
Eucgr.D01671	"green"	310	EgrNAC49	NAC	EgNAC49
Eucgr.F03947	"green"	7	EgrERF-056	ERF	-
Eucgr.F03951	"green"	2	-	C2H2	-
Eucgr.G03135	"green"	426	-	bZIP	-
Eucgr.H01971	"green"	13	-	Dof	-
Eucgr.H04618	"green"	60	-	MIKC_MADS	-
Eucgr.K01061	"green"	222	EgrNAC170	NAC	EgNAC170
Eucgr.K02109	"green"	113	-	bHLH	-
Eucgr.K02806	"green"	205	EgrMYB137	MYB	-
Eucgr.A01441	"greenyellow"	1	-	Dof	-
Eucgr.B00866	"greenyellow"	1	EgrMYB20	MYB	-
Eucgr.C03151	"greenyellow"	7	EgrMYB47	MYB	-
Eucgr.C04155	"greenyellow"	19	-	G2-like	-
Eucgr.E00019	"greenyellow"	7	-	bHLH	-

Eucgr.E00234	"greenyellow"	19	-	G2-like	-
Eucgr.F04475	"greenyellow"	18	-	G2-like	-
Eucgr.G01970	"greenyellow"	3	EgrERF-077	ERF	-
Eucgr.H03387	"greenyellow"	3	EgrNAC122	NAC	EgNAC122
Eucgr.J00019	"greenyellow"	13	-	Dof	-
Eucgr.J00574	"greenyellow"	4	-	TALE	-
Eucgr.J00788	"greenyellow"	4	-	C2H2	-
Eucgr.K01476	"greenyellow"	5	-	G2-like	-
Eucgr.K03144	"greenyellow"	24	-	Dof	-
Eucgr.A00193	"magenta"	262	-	GATA	-
Eucgr.A01091	"magenta"	144	EgrERF-001	ERF	-
Eucgr.A02201	"magenta"	154	-	G2-like	-
Eucgr.D01219	"magenta"	40	-	WRKY	EgWRKY12
Eucgr.D02497	"magenta"	147	-	C2H2	-
Eucgr.E03260	"magenta"	118	-	SBP	-
Eucgr.E04231	"magenta"	106	-	G2-like	-
Eucgr.H02505	"magenta"	225	-	M-type_MADS	-
Eucgr.H04476	"magenta"	37	-	NF-YC	-
Eucgr.I02372	"magenta"	2	-	GATA	-
Eucgr.A02843	"midnightblue"	11	-	TCP	-
Eucgr.A02754	"pink"	17	EgrGRAS15	GRAS	-
Eucgr.C00348	"pink"	25	-	WRKY	-
Eucgr.D01455	"pink"	3	-	FAR1	-
Eucgr.D01819	"pink"	166	EgrMYB60	MYB	EgMYB60
Eucgr.D01935	"pink"	193	EgrKNAT7	TALE	EgrKNAT7
Eucgr.E00308	"pink"	41	-	ARR-B	-
Eucgr.F01867	"pink"	11	-	bZIP	-
Eucgr.F02756	"pink"	116	EgrMYB80	MYB	EgMYB80
Eucgr.I01293	"pink"	328	-	TALE	-
Eucgr.I02749	"pink"	28	-	bZIP	-
Eucgr.J02947	"pink"	1	-	GATA	-
Eucgr.K02085	"pink"	4	-	FAR1	-
Eucgr.F02223	"purple"	3	EgrAP2-11	AP2	-
Eucgr.A01421	"red"	28	-	HD-ZIP	-
Eucgr.B03165	"red"	19	-	WRKY	-
Eucgr.C00434	"red"	9	-	TALE	-
Eucgr.C02135	"red"	14	-	Trihelix	-
Eucgr.C02804	"red"	6	-	HB-other	-
Eucgr.E02744	"red"	22	-	C2H2	-
Eucgr.E04232	"red"	8	-	G2-like	-
Eucgr.F00433	"red"	29	-	GATA	-
Eucgr.G02539	"red"	31	-	Whirly	-
Eucgr.G03094	"red"	8	DREB2_5	ERF	-
Eucgr.H05089	"red"	16	EgrNAC123	NAC	-
Eucgr.I00057	"red"	1	EgrNAC125	NAC	-
Eucgr.I00102	"red"	3	EgrNAC136	NAC	-
Eucgr.I00191	"red"	1	EgrNAC137	NAC	-
Eucgr.I00292	"red"	1	EgrERF-096	ERF	-
Eucgr.C03457	"tan"	1	-	HSF	-
Eucgr.G00889	"tan"	20	-	B3	-

Eucgr.A00559	"turquoise"	20	-	C2H2	-
Eucgr.A00903	"turquoise"	3	EgrGRAS12	GRAS	-
Eucgr.A01544	"turquoise"	18	-	HSF	-
Eucgr.A01690	"turquoise"	169	-	MYB_related	-
Eucgr.A02384	"turquoise"	5	-	C3H	-
Eucgr.B01228	"turquoise"	27	-	SBP	-
Eucgr.B02504	"turquoise"	65	EgIFL1/REV	HD-ZIP	EgIFL1/REV
Eucgr.C00605	"turquoise"	222	EgATHB8	HD-ZIP	EgATHB8
Eucgr.C00823	"turquoise"	2	-	GRF	-
Eucgr.C03293	"turquoise"	10	ARF19A	ARF	-
Eucgr.C03434	"turquoise"	5	-	HSF	-
Eucgr.E01510	"turquoise"	50	EgrGRAS39	GRAS	-
Eucgr.F01538	"turquoise"	20	EgrNAC73	NAC	-
Eucgr.F01828	"turquoise"	6	-	SBP	-
Eucgr.F02145	"turquoise"	2	-	MIKC_MADS	-
Eucgr.F03066	"turquoise"	23	EgATHB15	HD-ZIP	EgATHB15
Eucgr.F03612	"turquoise"	4	-	bZIP	-
Eucgr.G02745	"turquoise"	47	-	C2H2	-
Eucgr.G03029	"turquoise"	43	-	MYB	-
Eucgr.I00059	"turquoise"	1	EgrNAC127	NAC	-
Eucgr.I00403	"turquoise"	3	-	B3	-
Eucgr.I00892	"turquoise"	5	EgrAP2-16	AP2	-
Eucgr.I01211	"turquoise"	19	-	B3	-
Eucgr.I01641	"turquoise"	10	-	C2H2	-
Eucgr.I02488	"turquoise"	42	-	TALE	-
Eucgr.J00250	"turquoise"	3	EgrMYB110	MYB	-
Eucgr.J02939	"turquoise"	8	-	MYB_related	-
Eucgr.K01228	"turquoise"	3	EgrNAC171	NAC	-
Eucgr.K01670	"turquoise"	139	-	G2-like	-
Eucgr.K02763	"turquoise"	4	-	C2H2	-
Eucgr.K03127	"turquoise"	25	EgrGRAS91	GRAS	-
Eucgr.B02394	"yellow"	12	-	C2H2	-
Eucgr.C00055	"yellow"	13	-	C3H	-
Eucgr.C03056	"yellow"	2	-	HSF	-
Eucgr.D00627	"yellow"	4	-	HSF	-
Eucgr.E02054	"yellow"	22	-	B3	-
Eucgr.G03275	"yellow"	8	-	bZIP	-
Eucgr.H01071	"yellow"	6	-	GATA	-
Eucgr.I00100	"yellow"	4	EgrNAC134	NAC	-
Eucgr.J00271	"yellow"	3	-	MYB_related	-
Eucgr.J00637	"yellow"	30	-	bZIP	-
Eucgr.K00238	"yellow"	1	-	HSF	-

Table S8: Transcription factors correlated to SCW biosynthesis genes.

Gene	TF type	Annotation	Connectivity degree in Network Figure 6	Expression (FPKM)				
				+W-K	-W-K	+W+K	-W+K	Mean
<i>Eucgr.G02840</i>	GATA	-	67	183.84	21.99	93.85	23.85	80.88
<i>Eucgr.G03135</i>	bZIP	-	57	15.11	3.44	8.53	4.65	7.93
<i>Eucgr.E01053</i>	NAC	<i>EgrNAC61</i>	55	164.06	30.46	67.32	33.90	73.93
<i>Eucgr.D02083</i>	C2H2	-	54	18.40	2.91	9.13	3.69	8.53
<i>Eucgr.D02498</i>	C2H2	-	54	10.29	2.58	5.46	1.92	5.06
<i>Eucgr.B03684</i>	MYB	<i>EgrMYB31</i>	54	130.55	14.59	51.90	7.47	51.13
<i>Eucgr.F02796</i>	C3H	<i>EgC3H14</i>	48	141.08	9.93	52.25	6.01	52.32
<i>Eucgr.B00229</i>	MYB	<i>EgrMYB14</i>	47	65.30	7.43	20.68	3.07	24.12
<i>Eucgr.F00659</i>	ERF	<i>EgrERF-050</i>	46	62.23	21.36	43.35	22.36	37.32
<i>Eucgr.J01601</i>	MYB	<i>EgrMYB122</i>	44	45.47	8.69	21.29	7.24	20.67
<i>Eucgr.I01293</i>	TALE	-	43	181.13	45.41	117.24	64.64	102.11
<i>Eucgr.D01671</i>	NAC	<i>EgrNAC49</i>	43	197.40	29.13	99.53	23.99	87.51
<i>Eucgr.K02806</i>	MYB	<i>EgrMYB137</i>	38	89.47	18.41	41.47	6.68	39.01
<i>Eucgr.B03929</i>	C2H2	-	35	46.95	5.28	19.28	4.95	19.12
<i>Eucgr.D01935</i>	TALE	<i>EgrKNAT7</i>	34	186.86	33.52	102.14	55.59	94.53
<i>Eucgr.C02727</i>	TALE	-	33	109.96	44.00	76.01	44.42	68.60
<i>Eucgr.G03385</i>	MYB	<i>EgrMYB2</i>	33	35.24	5.69	11.13	2.42	13.62
<i>Eucgr.A00193</i>	GATA	-	31	21.33	3.83	11.25	5.63	10.51
<i>Eucgr.J01083</i>	GATA	-	31	138.15	45.58	77.01	43.72	76.11
<i>Eucgr.H02505</i>	MADS	-	28	4.41	0.18	1.37	0.36	1.58
<i>Eucgr.F02756</i>	MYB	<i>EgrMYB80</i>	28	69.06	18.74	56.30	23.44	41.88
<i>Eucgr.B00373</i>	MYB	<i>EgrMYB17</i>	27	52.54	9.04	25.64	11.79	24.75
<i>Eucgr.C00605</i>	HD-ZIP	<i>EgATHB8</i>	27	112.75	29.49	76.89	32.63	62.94
<i>Eucgr.A02201</i>	G2-like	-	26	24.24	8.48	16.15	8.72	14.39
<i>Eucgr.G02793</i>	AP2	<i>EgrERF-080</i>	26	63.09	21.21	42.45	21.15	36.98
<i>Eucgr.D01819</i>	MYB	<i>EgrMYB60</i>	25	286.33	57.70	196.72	92.48	158.31
<i>Eucgr.A01690</i>	MYB_like	-	24	58.45	22.00	41.27	25.15	36.72
<i>Eucgr.K01670</i>	G2-like	-	21	52.94	18.10	35.83	19.41	31.57
<i>Eucgr.D02497</i>	C2H2	-	21	16.68	1.90	7.03	2.01	6.90
<i>Eucgr.F00100</i>	bHLH	-	17	9.11	2.43	4.11	2.11	4.44
<i>Eucgr.B02504</i>	HD-ZIP	<i>EgIFL1/REV</i>	14	124.25	43.53	85.50	35.98	72.32
<i>Eucgr.G02745</i>	C2H2	-	13	33.75	5.72	26.49	11.10	19.27
<i>Eucgr.K02109</i>	bHLH	-	13	16.91	1.32	5.34	1.49	6.26
<i>Eucgr.I02749</i>	bZIP	-	12	22.56	9.21	18.68	11.76	15.55
<i>Eucgr.B01228</i>	SBP	-	11	111.54	45.69	86.45	45.03	72.18
<i>Eucgr.E03260</i>	SBP	-	11	43.37	6.02	15.10	2.88	16.84
<i>Eucgr.E00308</i>	ARR-B	-	10	28.21	8.86	20.70	9.47	16.81
<i>Eucgr.E04231</i>	G2-like	-	10	19.78	9.01	13.83	9.36	13.00
<i>Eucgr.D01219</i>	WRKY	<i>EgWRKY12</i>	10	78.03	31.12	47.38	19.99	44.13
<i>Eucgr.B00048</i>	bHLH	-	9	13.69	3.09	6.39	3.49	6.66
<i>Eucgr.A02754</i>	GRAS	<i>EgrGRAS15</i>	8	95.46	31.38	84.98	32.12	60.99
<i>Eucgr.E03226</i>	NAC	<i>EgrNAC64</i>	8	261.19	72.39	172.26	113.35	154.80
<i>Eucgr.H04618</i>	MADS	-	7	2.49	0.58	1.22	0.50	1.20
<i>Eucgr.H04476</i>	NF-YC	-	7	61.22	8.32	39.78	11.24	30.14
<i>Eucgr.I02488</i>	TALE	-	7	66.11	15.88	56.90	27.12	41.50
<i>Eucgr.F03066</i>	HD-ZIP	<i>EgATHB15</i>	7	145.14	64.29	107.46	50.01	91.73

<i>Eucgr.C00348</i>	WRKY	-	6	47.94	187.36	105.79	147.93	122.26
<i>Eucgr.G03029</i>	MYB	-	4	68.83	32.32	59.89	33.99	48.76
<i>Eucgr.I01211</i>	B3	-	3	15.22	2.89	15.03	7.13	10.07
<i>Eucgr.F01538</i>	NAC	<i>EgrNAC73</i>	3	2.67	0.36	2.42	1.17	1.65
<i>Eucgr.I00403</i>	B3	-	2	1.09	5.31	2.57	5.70	3.67
<i>Eucgr.F03612</i>	bZIP	-	2	47.36	113.01	50.05	109.03	79.86
<i>Eucgr.C03434</i>	HSF	-	1	1.05	8.33	2.88	7.84	5.03
<i>Eucgr.D02186</i>	LSD	-	1	32.00	11.92	16.37	12.24	18.13
<i>Eucgr.H00748</i>	bHLH	-	1	24.55	3.24	16.36	3.68	11.96
<i>Eucgr.A02384</i>	C3H	-	1	54.38	25.47	53.06	34.12	41.76
<i>Eucgr.A00559</i>	C2H2	-	1	0.36	1.41	0.54	1.11	0.86

**CHAPITRE III : Caractérisation fonctionnelle de quatre
nouveaux facteurs MYBs potentiellement impliqués dans la
régulation de la xylogénèse chez l'*Eucalyptus***

Chapitre III : Caractérisation fonctionnelle de quatre nouveaux facteurs MYBs potentiellement impliqués dans la régulation de la xylogénèse chez l'*Eucalyptus*

Raphael Ployet¹, Marçal Soler¹, Birte Pakull², Francisco Cantón³, Nathalie Ladouce¹, Annabelle Dupas¹, Matthias Fladung², Fabien Mounet¹, Jacqueline Grima-Pettenati¹

¹ Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31326 Castanet-Tolosan, France.

² Thünen Institute of Forest Genetics, Grosshansdorf, Germany.

³ Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga, 29071 Malaga, Spain.

Abstract

Wood formation results from the expression of a complex developmental program coordinated at the whole plant scale by endogenous signals like phytohormones, and exogenous signals like abiotic stresses. During wood development, cambial activity and xylem cells differentiation involve thousands of genes whose spatio-temporal expression is tightly regulated by a complex transcription factors (TFs) network. Although some key regulators of these processes are already characterized, our knowledge of this network is incomplete and the TFs involved in the integration of environmental signals into wood developmental process remain unknown. The analysis of *Eucalyptus* MYB-R2R3 TFs family, has recently revealed several MYB TFs phylogenetic subgroups preferentially or exclusively detected in trees, in comparison to herbaceous plants. Some TFs members of these subgroups are preferentially expressed in tissues related to secondary growth and respond to environmental constraints which are known to modulate xylem formation. Thus, they represent good candidates in the regulation of wood formation. In this study, we initiated the functional characterization of four of these TFs: *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68*. The study of their promoter expression, revealed that *EgMYB64* and *EgMYB68* are expressed in cambial zone. In poplar, overexpression of *EgMYB20*, *EgMYB36* and *EgMYB68*, leads to disruptions in tree growth and secondary cell wall formation in xylem, associated to regulations of genes related to cambial activity and cell wall deposition. Overexpression of *EgMYB64* in *Eucalyptus* roots drives changes in secondary cell wall biosynthesis in xylem. Taking together, these data suggest that these regulators could be positioned at the interface between wood formation and stress response, and playing a role in the trade-off between secondary cell wall formation and growth.

Résumé

La formation du bois résulte de l'expression d'un programme développemental coordonné à l'échelle de la plante, par des signaux endogènes tels que les phytohormones et exogènes tels que les stress abiotiques. Durant la formation du bois, l'activité cambiale et la différenciation des cellules du xylème, impliquent des milliers de gènes dont l'expression spatio-temporelle est finement régulée par un réseau complexe de facteurs de transcription (FT). Bien que certains régulateurs clés de ces processus aient été caractérisés, notre connaissance de ce réseau n'est que parcellaire et les FT intégrant les signaux de l'environnement, dans le programme développemental du bois, restent inconnus. L'analyse récente de la famille de FT MYB-R2R3 de l'*Eucalyptus*, a révélé l'existence de sous-groupes phylogénétiques de facteurs MYB détectés préférentiellement ou uniquement chez des arbres. Pour certains de ces FT, leur expression préférentielle dans des tissus reliés à la croissance secondaire et leur régulation en réponse à des contraintes environnementales modulant la formation du bois, en font de bons candidats comme régulateurs de la formation du bois. Dans cette étude, nous avons entamé la caractérisation fonctionnelle de quatre de ces FT : *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68*. L'étude de l'expression tissulaire de leurs promoteurs par gène rapporteur, dans des racines d'*E. grandis*, a révélé qu'*EgMYB64* et *EgMYB68* sont exprimés dans la zone cambiale. La surexpression d'*EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB68*, dans le peuplier, entraîne des perturbations dans la croissance des arbres et dans la formation de la paroi secondaire dans le xylème, associées à des régulations dans les gènes reliés à l'activité cambiale et au dépôt de paroi. La surexpression d'*EgMYB64* dans les racines de l'*Eucalyptus* entraîne des perturbations dans le dépôt de paroi secondaire dans le xylème. L'ensemble de ces données suggèrent que ces régulateurs pourraient être positionnés à l'interface entre formation du bois et réponse aux stress, et jouer un rôle dans la balance entre formation de la paroi et croissance.

Préambule

Ce chapitre résume les premières données obtenues sur la caractérisation fonctionnelle de quatre nouveaux facteurs de transcription (FT) appartenant à des sous-groupes phylogénétiques de la famille MYB-R2R3, soit plus représentés chez les ligneux, soit préférentiellement retrouvés chez ces derniers. Ces sous-groupes ont été nommés respectivement « Woody-expanded » et « Woody-preferential » par Soler et al. (2015).

Les données présentées sont encore partielles et l'état d'avancement des travaux est différent selon le gène étudié. La plupart des gènes étudiés ont été surexprimés chez le peuplier afin de contourner les difficultés inhérentes à la transformation stable de l'*Eucalyptus* et parce que la transformation en système hétérologue chez le peuplier a été utilisée avec succès dans l'équipe pour découvrir le rôle de facteurs de transcription impliqués dans la formation du bois (Legay et al., 2010; Soler et al., 2016). Au cours de ma thèse, un système de transformation de l'*Eucalyptus* a été mis au point, permettant d'étudier l'expression de plusieurs promoteurs et la fonction de deux gènes (résultats *EgMYB137* présentés dans le Chapitre II) en système homologue dans des racines d'*E. grandis* (Plasencia et al., 2015). J'ai utilisé ce système pour étudier le profil d'expression de deux FT et pour évaluer les effets de la surexpression de l'un d'entre eux.

Pour la transformation des peupliers, la séquence codante des gènes étudiés, a été clonée par M. Soler. Les peupliers surexprimant *EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB68*, ont été générés au laboratoire Thünen Institute of Forest Genetics (Allemagne) par B. Pakull, sous la direction de M. Fladung, tandis que les peupliers surexprimant *EgMYB64* ont été générés à l'Université de Malaga (Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Espagne) par F. Cantón. A. Dupas a contribué à la production des peupliers surexprimant MYB64 à partir de matériel *in vitro* et des racines transgéniques. N. Ladouce et F. Mounet sont intervenus dans le phénotypage de l'ensemble des lignées transgéniques générées.

1. Introduction

La formation du bois est un processus complexe comprenant trois étapes principales: la production de nouvelles assises cellulaires par le cambium, l'expansion radiale et axiale de ces cellules, puis le dépôt d'une épaisse paroi secondaire, qui précède la mort programmée des cellules, finalisant le processus de maturation (Plomion et al., 2001a).

La première étape de la formation du xylème secondaire, est la prolifération de cellules cambiales pour la production de nouvelles assises cellulaires du xylème. Les mécanismes impliqués dans prolifération et le maintien du cambium partagent des traits communs avec ceux des méristèmes primaires. Ils font tous deux intervenir la perception d'un peptide par un récepteur capable de réguler l'expression de FT de type WOX (WUSCHEL HOMEODOMAIN RELATED) impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules méristématiques (Hirakawa et al., 2008; Fisher and Turner, 2007; Etchells and Turner, 2010). Chez *Arabidopsis*, le maintien de la pluripotence et la prolifération des cellules cambiales sont assurées par la voie de signalisation TDR - TDIF. Il a été démontré que cette voie de signalisation joue un rôle crucial dans la régulation de la croissance secondaire et dans l'architecture du système vasculaire. Le peptide TDIF, produit dans le phloème est perçu par le récepteur TDR/PXY, ce qui active une voie de signalisation impliquant des FT tels que *AtWOX4* (Etchells and Turner, 2010) activant la prolifération des cellules cambiales et inhibant leur différenciation. La caractérisation récente des orthologues de ces gènes chez le peuplier, a récemment démontré que cette voie de signalisation est conservée entre plantes herbacées et ligneux (Etchells et al., 2015).

La différenciation des assises cellulaires nouvellement produites dans le xylème est quant à elle induite par une forte concentration en auxine contrôlée par le transporteur de type PINFORMED (*AtPIN1*), qui induit plusieurs FT de type HD-ZIP de classe III (Donner et al., 2009). Les FT *AtHB9/PHV*, *AtHB14/PHB* et *REV/IFL1* n'ont pas un rôle spécifique au cambium primaire et sont exprimés également dans les meristèmes apicaux (Prigge et al., 2005), contrairement à *AtHB8* qui semble spécifique du cambium (Baima et al., 2001; Ilegems et al., 2010). Les orthologues putatifs d'*AtPIN1*, chez le peuplier, sont identifiés mais n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation de leur fonction dans la formation du xylème (Liu et al., 2014). Les orthologues de ces FT de type HD-ZIP ont été identifiés chez le peuplier et certaines études ont confirmé leur conservation chez cette espèce ligneuse (Zhu et al., 2013; Ko et al., 2006; Côté et al., 2010; Robischon et al., 2011; Du et al., 2011).

Une étape clé du processus de différenciation des cellules du xylème est le dépôt de la paroi secondaire dont la composition et la structure déterminent les propriétés du bois,

conditionnant ses utilisations dans l'industrie (Rockwood et al., 2008). La paroi des cellules du bois est composée d'une paroi primaire qui inclut la lamelle moyenne, et une paroi secondaire majoritaire, constituée de trois couches nommées S1 à S3. Ces couches ont des orientations des microfibrilles de cellulose différentes, mais une composition chimique similaire (Mellerowicz and Gorshkova, 2012). La paroi des cellules du xylème est composée d'approximativement 80% de polysaccharides qui constituent la cellulose et les hemicelluloses, tandis que la lignine représente la biomasse restante, soit environ 20% (Vanholme et al., 2010). La lignine est un polymère complexe, constitué de molécules phénoliques, qui représente un obstacle majeur à l'accès à la cellulose, convoitée pour la production de pâte à papier et de biocarburants (Acker et al., 2013). La lignine est composée de deux unités principales le syringyl (S) et le guaiacyl (G), avec de plus faibles quantités de p-hydroxyphenyl (H), qui sont toutes synthétisées dans la branche spécifique des monolignols de la voie des phénylpropanoïdes (Boerjan et al., 2003). La voie des phénylpropanoïdes est également le point de départ pour la synthèse d'un ensemble de métabolites secondaires solubles, incluant les flavonoïdes (flavonols, anthocyanes et proanthocyanidines), les coumarines (Vogt, 2010), ou les glycosides phénoliques (Babst et al., 2010). Ces métabolites secondaires sont principalement associés à la réponse aux contraintes environnementales biotiques et abiotiques (Vogt, 2010).

Des approches de génétique directe conduites principalement chez la plante modèle *Arabidopsis*, ont permis de caractériser certains acteurs clés de la biosynthèse des composants de la paroi secondaire (Somerville, 2006; Rennie and Scheller, 2014; Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2013). Chez le peuplier, plusieurs gènes codant pour des sous-unités des complexes de celluloses synthases, impliqués dans la biosynthèse de la cellulose, ont été identifiés (Legay et al., 2010; Kalluri and Joshi, 2004). Chez les plantes dicotylédones les hémicelluloses, ou glucuronoxylanes, correspondent à un polymère constitué d'une chaîne principale d'unités de xylose liées en β -(1,4), plus ou moins ramifiée par l'ajout d'unités d'acide glucuronique. Des membres de différentes familles de glycosyl-transférases (GT43, GT8, GT47), sont impliqués dans la biosynthèse de ces glucuronoxylanes (Rennie and Scheller, 2014). Chez le peuplier, certains des membres de ces familles ont fait l'objet d'études fonctionnelles (Zhou et al., 2006; Decker et al., 2009; Kong et al., 2009; Brown et al., 2009; Ratke et al., 2015). Des gènes impliqués dans les modifications des glucuronoxylanes, telles que l'acétylation et la méthylation ont également été caractérisés fonctionnellement chez le peuplier (Yuan et al., 2014; Ratke et al., 2015). Chez l'*Eucalyptus*, les orthologues des gènes impliqués dans ces étapes enzymatiques requises pour la synthèse de la cellulose et des

hémicelluloses ont été identifiés mais n'ont pas fait l'objet d'étude fonctionnelle (Myburg et al., 2014). Chez le peuplier et l'*Eucalyptus*, des analyses phylogénétiques comparatives combinées à des analyses d'expression ont permis d'identifier un ensemble de gènes qui codent pour 11 familles d'enzymes impliquées dans la synthèse de monolignols (Carocha et al., 2015; Shi et al., 2010). Lors du processus de développement des cellules du xylème, le dépôt des différents composants de la paroi est séquentiel, et nécessite par conséquent une régulation transcriptionnelle fine de l'ensemble de ces gènes (Hertzberg et al., 2001).

La famille de protéines de type MYB-R2R3 constitue une des plus grandes familles de facteurs de transcription (FT) chez les plantes. Les membres de cette famille sont impliqués dans la régulation d'une grande variété de processus essentiels pour le développement, le contrôle du métabolisme et la réponse aux stress (Dubos et al., 2010). Les protéines MYB-R2R3 sont caractérisées par un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal (R2R3-MYB) et une portion C-terminale variable impliquée dans l'activation ou la répression de l'expression des gènes cibles (Dubos et al., 2010). La combinaison d'analyses phylogénétiques et la détection de motifs conservés en C-terminal, a permis de définir 22 sous-groupes chez *Arabidopsis*, qui présentent une bonne conservation entre espèces (Stracke et al., 2001). Suite à de nombreuses analyses fonctionnelles, il a été constaté que les membres d'un même sous-groupe semblent avoir des fonctions biologiques similaires (Dubos et al., 2010). De nombreuses études effectuées chez *Arabidopsis*, ont révélé l'existence d'un réseau hiérarchisé de FT contrôlant la biosynthèse de la paroi, et dans lequel les FT de type MYB-R2R3 jouent un rôle essentiel (passé en revue dans: (Hussey et al., 2013; Nakano et al., 2015; Zhong and Ye, 2015). Il est couramment admis que ce réseau de FT est structuré en trois niveaux. Le premier niveau est constitué de FT de type NAC, considérés comme des masters régulateurs de la formation de la paroi dans les fibres (NST/SND pour NAC Secondary wall Thickening promoting factor/Secondary wall associated NAC Domain protein) et dans les vaisseaux (VND pour Vascular NAC Domain). En effet, ces FT sont capables à eux seuls, d'induire le processus de dépôt de paroi secondaire (Hussey et al., 2013), via l'activation de plusieurs FT se trouvant en aval. Parmi ces FT cibles des master régulateurs, le couple *AtMYB46/AtMYB83* constitue un nœud de régulation qui active directement et via des FT intermédiaires, les gènes encodant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi secondaire. Parmi les autres FT du niveau 2 participant à l'activation de la biosynthèse de paroi en parallèle d'*AtMYB46/AtMYB83*, on trouve notamment *AtMYB55/AtMYB61*, *AtMYB103* et *AtXND1*. Enfin, il est considéré qu'une dernière couche de FT, dits de niveau 3, sont les cibles, généralement de plusieurs FT se trouvant en amont et régulent directement les gènes

impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire (Hussey et al., 2013). Cela inclut notamment les FT *AtMYB42*, *AtMYB85* et le régulateur négatif du dépôt de paroi secondaire *AtKNAT7*.

Les études effectuées chez l'*Eucalyptus* ont également largement contribué à construire ce réseau, avec la caractérisation des deux régulateurs clés dans la formation de la paroi secondaire *EgMYB1* et *EgMYB2* (Goicoechea et al., 2005; Legay et al., 2007, 2010), ainsi que plus récemment avec la caractérisation d'*EgMYB137* (Soler et al., en prep; Ployet et al., en prep). Certains des orthologues de ces régulateurs ont également fait l'objet d'études fonctionnelles chez le peuplier, montrant une bonne conservation des voies de régulation du dépôt de paroi entre espèces herbacées et ligneuses (Zhang et al., 2014). Les orthologues des masters régulateurs de la formation de la paroi secondaire des fibres (*AtNST1*, *AtNST2* et *AtSND1*) et des vaisseaux (*AtVND7*), du xylème d'*Arabidopsis*, ont été identifiés et caractérisés chez le peuplier (*PtVNS7*, *PtVNS9*, *PtVNS10*, *PtVNS11*) (Hu et al., 2010; Zhong et al., 2010; Ohtani et al., 2011). En aval de ces masters régulateurs, les deux FT de peuplier *PtMYB3* et *PtMYB20* présentent la même fonction régulatrice que leurs orthologues chez *Arabidopsis* *AtMYB46/AtMYB83* (McCarthy et al., 2009, 2010). Les deux paralogues *PtMYB20* et *PtMYB21* sont également proches phylogénétiquement du couple *AtMYB46/AtMYB83*, mais n'ont pas fait l'objet d'une étude fonctionnelle. D'autres FT cibles des masters régulateurs ont été caractérisés chez le peuplier, dont les orthologues d'*AtMYB61/AtMYB55*, *AtMYB103* et *AtXND1* (*PtMYB216*, *PtMYB170*, *PtMYB10*, *PtMYB128*, *PtXND1*; Tian et al., 2013; Chai et al., 2014; Grant et al., 2010). Parmi les FT du dernier niveau, régulant directement l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi, les orthologues des régulateurs positifs *AtMYB42*, *AtMYB85* et *AtMYB43* (*PtMYB92*, *PtMYB125*, *PtMYB152*; Wang et al., 2014; Li et al., 2015), ainsi que du régulateur négatif *EgMYB1* (*PtMYB156*, *PtMYB221*; Tang et al., 2015) ont été caractérisés chez le peuplier.

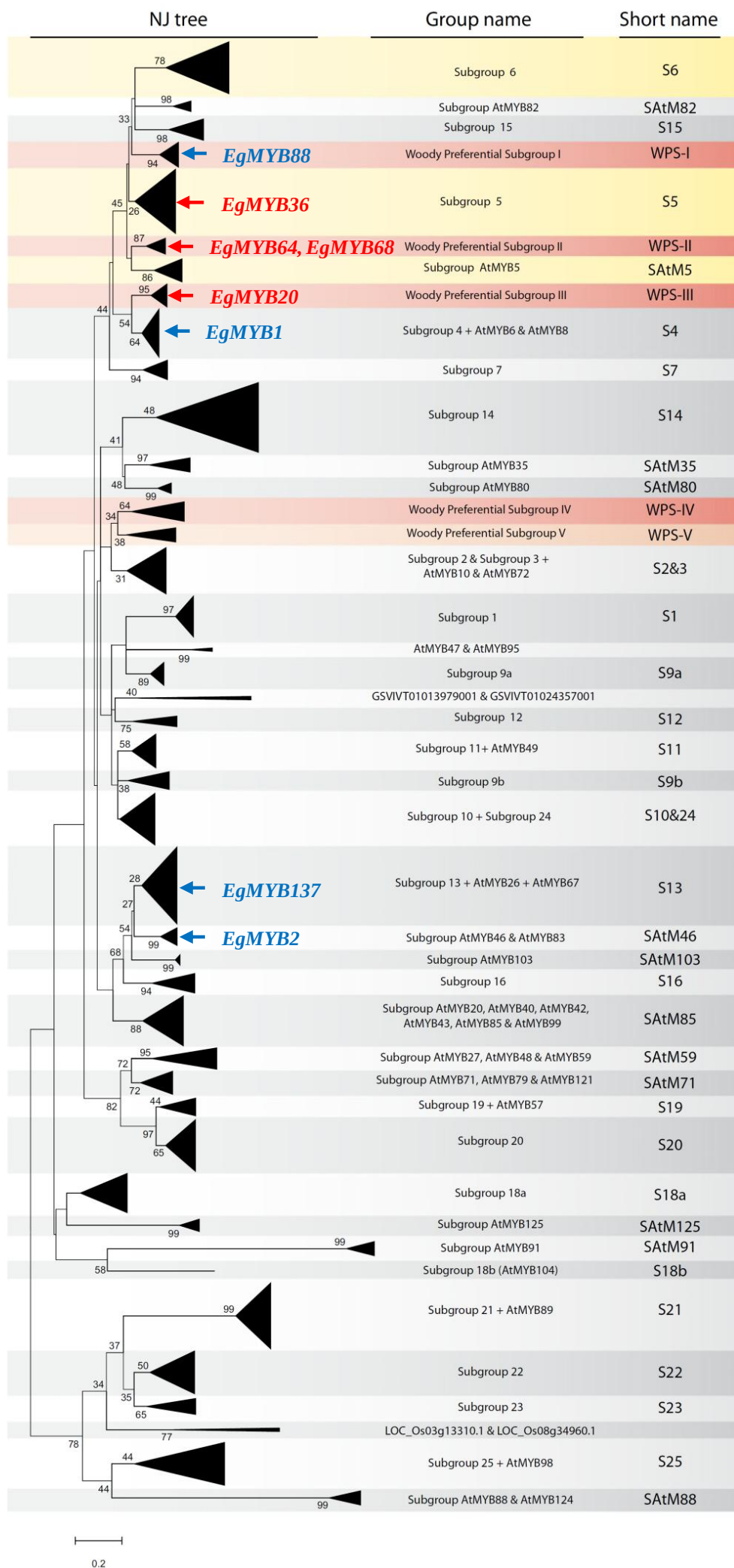


Figure 1: Arbre phylogénétique incluant l'ensemble des protéines de type MYB-R2R3 d'*Eucalyptus grandis* (Egr), *Vitis vinifera* (Vv), *Populus trichocarpa* (Ptr), *Arabidopsis thaliana* (At) et *Oryza sativa* (Os), adapté des travaux de Soler et al. (2015). Arbre construit selon la méthode « Neighbour-joining » à partir des 676 séquences protéiques des 5 espèces. Chaque triangle représente un sous-groupe de protéines MYB-R2R3, définit à partir de la topologie de l'arbre et des valeurs de bootstrap (seules les valeurs > 25 sont représentées sur les branches). Les sous groupes ayant subi une expansion chez les arbres (*E. grandis*, *V. vinifera* et *P. trichocarpa*) sont représentés en jaune, tandis que les sous-groupes détectés préférentiellement chez ces arbres sont représentés en rouge, les autres sous-groupes étant représentés en gris. Les candidats de cette étude *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68*, sont représentés en rouge pour révéler leur positionnement dans les sous-groupes WPS-III, S5 et WPS-II respectivement. Les gènes *EgMYB1*, *EgMYB2*, *EgMYB88* et *EgMYB137*, déjà caractérisés, sont représentés en bleu (Legay et al., 2010; Goicoechea et al., 2005; Soler et al., 2016; Ployet et al., en prep; Soler et al., en prep).

La disponibilité récente du génome de l'*Eucalyptus* a permis l'annotation de l'ensemble des membres de la famille des FT de type MYB-R2R3 (Soler et al., 2014). L'analyse phylogénétique comparative conduite sur cette famille de gènes, en incluant des plantes pérennes et herbacées (*E. grandis*, *P. trichocarpa*, *V. vinifera*, *A. thaliana* et *O. sativa*), a montré que les sous groupes, contenant les gènes régulateurs de la formation de la paroi, sont conservés dans ces espèces. Ceci a permis d'identifier, chez l'*Eucalyptus*, les orthologues des régulateurs caractérisés chez *Arabidopsis* et le peuplier (Ployet et al., 2017, Chapitre I). Cette approche a également révélé l'existence de sous-groupes dans lesquels les FT d'espèces pérennes (*Eucalyptus*, peuplier, vigne), sont fortement surreprésentés (**Figure 1**; S5, S6 et Sous-groupe *AtMYB5*), ou constituent l'ensemble du sous-groupe (**Figure 1**; Woody Preferential Subgroup, WPS-I à V) et n'ont donc pas d'orthologues chez les espèces herbacées (*Arabidopsis* et riz). De façon intéressante, certains membres de ces sous-groupes ont montré une expression préférentielle dans des tissus reliés à la croissance secondaire. Notamment, les gènes *EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB64* qui sont préférentiellement exprimés dans la zone cambiale, et *EgMYB68* qui est exprimé plus largement dans les tissus en croissance secondaire (**Figure 2a**; Soler et al., 2014). De plus, des travaux complémentaires ont montré que ces gènes sont régulés en réponse à des contraintes environnementales connues comme ayant un impact sur le développement du bois (**Figure 2b**; Soler et al., 2014; Camargo et al., 2014; Ployet et al., 2017, Ployet et al., en prep). Ces gènes sont tous fortement induits en réponse au froid, qui engendre une réduction de la croissance, un dépôt précoce de paroi associé à une augmentation de la teneur en lignine dans les cellules du xylème en développement (Ployet et al., 2017). Récemment, il a été montré que le gène *EgMYB88*, membre du sous-groupe WPS-I et exprimé préférentiellement dans la zone cambiale, est capable de réguler la voie des phenylpropanoïdes et notamment la biosynthèse de lignine chez

le peuplier (Soler et al., 2016). La somme de ces observations a conduit à émettre l'hypothèse que ces gènes pourraient résulter d'une évolution de mécanismes spécifiques aux ligneux, pour la régulation de leur croissance secondaire notamment. Des gènes tels qu'*EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68* sont donc des candidats de choix pour la découverte de nouveaux acteurs dans la régulation de la croissance secondaire et particulièrement dans la régulation de l'activité cambiale chez les arbres.

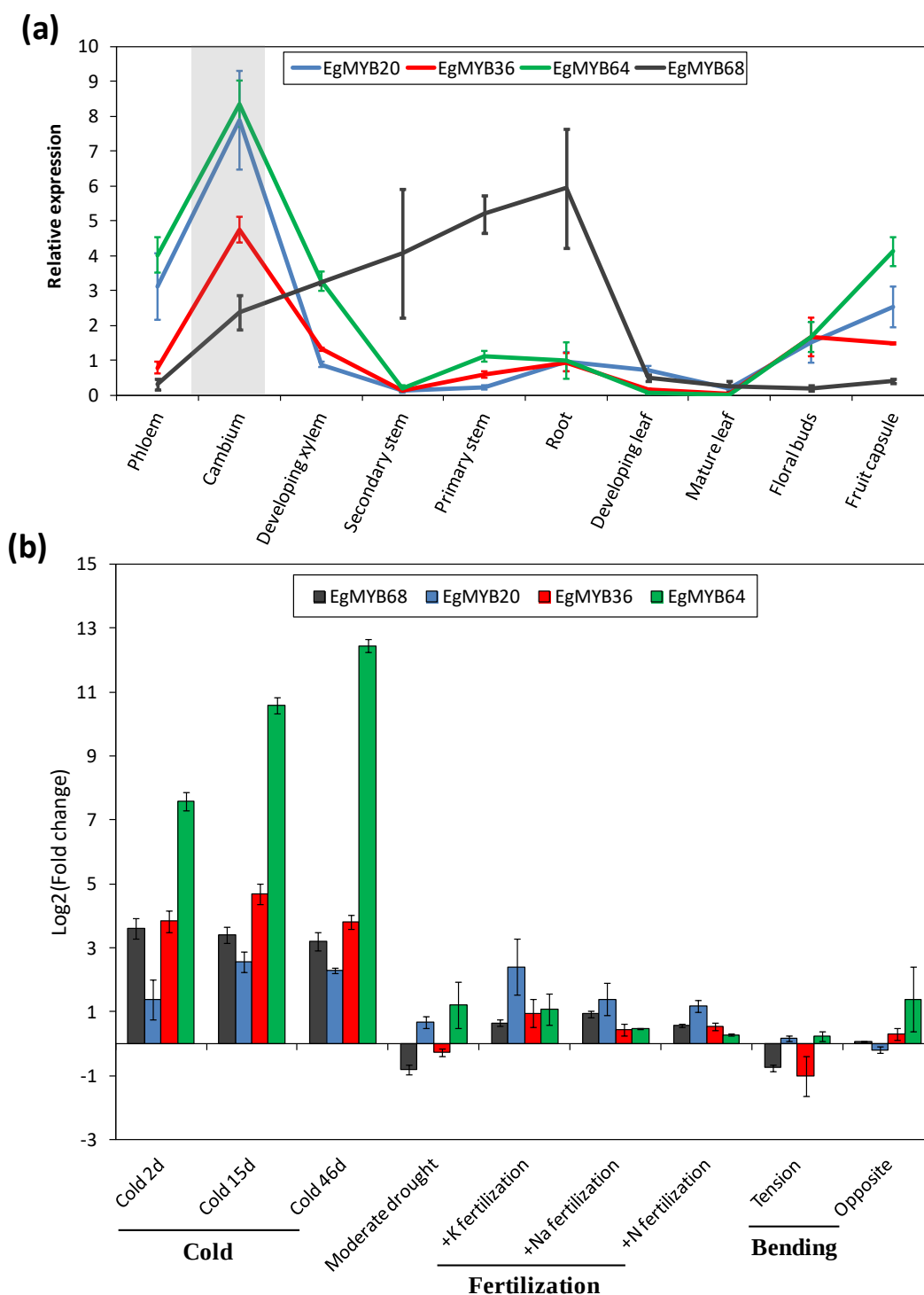


Figure 2: Profils d'expression d'EgMYB20, EgMYB36, EgMYB64 et EgMYB68 chez l'Eucalyptus. Expression des 4 gènes dans 10 tissus de l'Eucalyptus **(a)**, et en particulier dans le xylème, en réponse à différentes contraintes environnementales **(b)**. Le xylème en développement correspond à du xylème échantillonné sur arbres adultes par scrapping, la tige secondaire à un mélange des tissus de la tige la plus ancienne de jeunes plants (base de la tige avec croissance secondaire), tandis que la tige primaire correspond aux extrémités des tiges (partie en cours de croissance primaire). Pour plus de détails, voir Soler et al., 2014. La réponse au froid a été analysée dans la tige de jeunes plants d'*E. gundal*, soumis à une acclimatation de longue durée à 4°C, et comparée à une condition contrôle pour laquelle les arbres sont cultivés à 25°C (Ployet et al., 2017). Les réponses à la sécheresse (Moderate drought), à la fertilisation au potassium (+K) et au sodium (+Na), ont été analysées dans le xylème en développement d'*E. grandis* soumis au système d'exclusion d'eau décrit dans Ployet et al., en prep. Pour la fertilisation à l'azote (+N), la régulation des gènes est analysée dans le xylème de jeunes plants d'*E. grandis* fertilisés à l'azote, en comparaison à des arbres non fertilisés (Carmargo et al., 2014). Pour l'observation de la réponse à l'inclinaison de la tige principale (bending), l'expression de ces gènes a été analysée dans le xylème en développement d'eucalyptus cultivés inclinés. L'expression a été analysée dans la partie supérieure (tension) et dans la partie inférieure (opposite) de la tige, et comparée au xylème d'une tige ayant une croissance verticale. Pour plus de détails, se référer à Ployet et al., 2017. Les régulations en réponse aux stress, sont des ratios "stress / contrôles", transformés en Log2.

Pour une meilleure compréhension du rôle des FT MYB-R2R3 des sous-groupes WPS-I, WPS-III et S5, nous avons entamé la caractérisation fonctionnelle des gènes *EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68* de l'*Eucalyptus*. La surexpression d'*EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB68* chez le peuplier, a entraîné des modifications de la croissance et de la teneur en lignine du xylème secondaire, accompagnées de régulations dans le profil des gènes impliqués dans l'activité cambiale et la biosynthèse de la paroi secondaire. Une régulation marquée des gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires a également été détectée dans ces lignées. Aucune modification phénotypique claire n'a été observée chez les peupliers surexprimant *EgMYB64*. Toutefois, grâce à la mise au point d'un protocole de transformation rapide chez l'*Eucalyptus* (Plasencia et al., 2015), nous avons pu obtenir des racines transgéniques surexprimant *EgMYB64*. Ces racines présentent une réduction de la teneur en lignine et une augmentation du rendement de saccharification. L'analyse de racines transformées avec les promoteurs d'*EgMYB64* et *EgMYB68* contrôlant l'expression du gène rapporteur encodant la GUS, a révélé leur activité dans la zone cambiale des racines d'*E. grandis*. En outre, le promoteur d'*EgMYB68* est actif dans le méristème primaire des racines d'*E. grandis*, tandis que celui d'*EgMYB64* semble exprimé également dans le pro-cambium. L'ensemble de ces résultats ne permet pas d'affirmer que ces FT de type MYB régulent de façon directe le dépôt de paroi secondaire. Toutefois, les régulations observées suggèrent qu'ils jouent un rôle important dans la formation du xylème secondaire.

2. Matériel et méthodes

2.1. Analyse phylogénétique

Les protéines de type MYB-R2R3 appartenant aux sous-groupes d'*EgMYB20*, *EgMYB36*, *EgMYB64* et *EgMYB68*, tels que définis par Soler et al. (2014), ont été considérés pour la construction de l'arbre phylogénétique, en suivant la méthode employée par les auteurs. Brièvement, les séquences protéiques d'*Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* et *Vitis vinifera* ont été extraites de la base de données Phytozome v12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). Les séquences ont été alignées en utilisant l'outil en ligne MAFFT v7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) et l'algorithme FFT-NS-1 (Kato et al., 2002). L'arbre phylogénétique a été élaboré selon la méthode "neighbour-joining" (Saitou and Nei, 1987) et construit grâce au programme MEGA 7 en utilisant l'option "pairwise deletion" (Kumar et al., 2016) ainsi qu'un nombre de répliques bootstrap de 1000. Les distances d'évolution ont été calculées selon le modèle de substitution de Jones-Taylor-Thornton et en modélisant le taux de variation parmi les sites par une distribution discrète Gamma de 1 (Yang, 1994). Les représentations des séquences protéiques alignées par MAFFT v7, ont été obtenues en utilisant l'outil en ligne BoxShade v3.2 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form).

2.2. Isolement des séquences et clonage

Les séquences codantes d'*EgMYB20* (*Eucgr.B00866*), *EgMYB36* (*Eucgr.C00721*) et *EgMYB68* (*Eucgr.E01031*) ont été amplifiées d'ADN complémentaires (ADNc) d'*E. grandis*, en utilisant des amorces spécifiques (**Tableau S1**) et clonées dans le vecteur pENTR D-TOPO (Invitrogen) par recombinaison (Gateway® BP Clonase® II, Invitrogen) et ensuite transférées dans le vecteur pJCV53 (plateforme des vecteurs Gateway, Université de Ghent, Belgique) par recombinaison (Gateway® LR Clonase® II, Invitrogen). Une procédure similaire a été appliquée pour la séquence codante d'*EgMYB64* (*Eucgr.D02390*). La séquence codante épissée a été amplifiée à partir d'ADNc d'*E. grandis*, en utilisant des amorces spécifiques (**Table S1**), clonée dans le vecteur pDONR207 et transférée dans le vecteur binaire pGWAY-0 (Plasencia et al., 2016).

Pour l'isolation des promoteurs, un fragment d'environ 2 kilo bases en amont du codon "start" d'*EgMYB64* et *EgMYB68* a été amplifié en utilisant des paires d'amorces spécifiques (**Tableau S1**), et cloné dans le vecteur pDONR207 puis dans le vecteur binaire pGWAY-1 (Plasencia et al., 2016) par une série de recombinaisons.

Les séquences des promoteurs d'*EgMYB64* et *EgMYB68*, clonées dans le vecteur pGWAY-1, ainsi que la séquence codante d'*EgMYB64* clonée dans le vecteur pGWAY-1, ont été insérées dans la souche A4RS d'*Agrobacterium rhizogenes* (Jouanin et al., 1986) par électroporation (Nagel et al., 1990). Les bactéries transformées ont ensuite été sélectionnées sur milieu supplémenté par de la kanamycine à 50 mg/L. Les séquences codantes d'*EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB68* clonées dans le vecteur pJCV53, ont été insérées dans la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique.

2.3. Transformation des plantes

Les racines transgéniques ont été produites de plantules d'*E. grandis* via la transformation par *A. rhizogenes*, en suivant le protocole établi par (Plasencia et al., 2016) avec des modifications mineures. Brièvement, les hypocotyles de plantules de 14 jours post-germination, ont été blessés à l'aide d'une aiguille (0.45 mm) infectée par la souche transformée d'*A. rhizogenes*. La co-culture d'une durée de 2 semaines, a été effectuée sur un milieu MS supplémenté avec 30 g/L de sucrose et 100 mM d'acetosyringone. Les plantes ont ensuite été cultivées trois semaines sur le même milieu de culture sans acetosyringone mais supplémenté avec 300 mg/L d'augmentin (amoxicillin/clavulanic acid). Le criblage des racines co-transformées, a été effectué *in vitro*, 35 jours post infection. Les racines transformées ont été sélectionnées par la détection de la fluorescence du gène rapporteur DsRed et les racines non-transformées (non fluorescentes) ont été excisées. Les plantes présentant au moins une racine transformée, ont été cultivées pour une période additionnelle de 3 semaines *in vitro*. Elles ont été ensuite acclimatées *ex vitro* et cultivées dans un substrat spécifique (OIL DRI[®] US-Special Substrate, Type III/R; Damolin, Fur, Denmark). Ces Eucalyptus ont été cultivés en serre pendant une période d'au moins 3 mois à 25°C/22°C (jour/nuit) en photopériode de 16 heures. Lors de l'échantillonnage, seules les racines présentant une fluorescence de la protéine DsRed ont été collectées. Dans le cas des racines surexprimant *EgMYB64*, la zone apicale (3 premiers centimètres en partant de l'apex) a été échantillonnée et congelée pour l'extraction des ARN. Un fragment de la racine principale en cours de croissance secondaire (~5 mm) a été collecté dans la zone située immédiatement sous le collet et fixée dans l'éthanol 80% pour les analyses d'histologie. Les racines restantes, d'un diamètre supérieur à 2 mm, ont été collectées et congelées pour des analyses de biochimie.

Pour la localisation de l'expression des promoteurs d'*EgMYB64* et *EgMYB68*, des fragments de l'ensemble du système racinaire des plantes composites cultivées *in vitro*, ou en serre, ont

été collectées. Ces échantillons ont été et immédiatement immergés et incubés dans la solution de coloration GUS (voir plus bas).

Le peuplier (Hybride *Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717-1-B4) a été transformé avec *A. tumefaciens* comportant la séquence codante des gènes *EgMYB20*, *EgMYB36* ou *EgMYB68* clonée dans le vecteur pJCV53, selon le protocole établi par Gallardo et al., (1999). Des plantes non transformées ont été utilisées comme contrôle lors du phénotypage. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu de culture supplémenté en kanamycine (50 µg/ml) et ensuite par PCR pour confirmation de la présence du T-DNA. Les peupliers ont été cultivés pendant un an en serre. Lors de l'échantillonnage de la tige principale, la partie basale (5 premiers centimètres en partant du collet) a été fixée dans de l'éthanol 80% pour des analyses d'histologie. Les 8 centimètres suivant ont été séparés de l'écorce et congelés pour la biologie moléculaire. Le reste de la tige jusqu'au douzième entre nœud (en partant de l'apex) a été écorcé et conservé congelé pour des analyses de biochimie.

2.4. Extraction des ARN et analyses d'expression par RT-PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits des racines ou des échantillons de xylème de peuplier préalablement broyés avec un broyeur à bille (MM400, Retsch), en suivant le protocole établi par Muoki et al. (2012) avec des modifications mineures. L'ADN contaminant a été supprimé des échantillons d'ARN par dégradation, à l'aide du kit TURBO DNA-free kit (Ambion), en suivant les instructions du fabricant. La qualité et la quantité des ARN obtenus ont été vérifiées par spectrophotométrie en utilisant l'appareil DeNovix DS-11 (DeNovix), et par migration sur gel d'agarose 1%. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 0.5µg d'ARN totaux (pour les ARN extraits de racines) ou 1µg (pour les échantillons de xylème) à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem), selon les instructions du fabricant.

Pour la quantification des transcrits des gènes, des paires d'amorces spécifiques ont été conçues en utilisant le programme en ligne QuantPrime (<http://www.quantprime.de/>, Arvidsson et al., 2008). Les amorces utilisées sont listées **Tableau S1**. L'abondance des transcrits a été quantifiée par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) conventionnelle ou par qRT-PCR en microfluidique (Biomark® 96.96 Dynamic Array platform, Fluidigm). Dans le cas de la qRT-PCR conventionnelle, l'abondance des transcrits des gènes testés a été mesurée sur 1µl d'ADNc dilués par dix, en utilisant un mix contenant du Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied biosystems) et un appareil ABI 7900HT (Applied Biosystems), tel que décrit

par Cassan-Wang et al., (2012). Dans le cas de la qRT-PCR en microfluidique, les ADNc ont été dilués par 5 et le nombre de transcrits des gènes d'intérêt a été mesuré en suivant le protocole décrit par Cassan-Wang et al., (2012).

L'abondance des transcrits a été calculé par la méthode $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), en utilisant l'efficacité des amorces calculée via LinRegPCR (Ruijter et al., 2009) et une normalisation par les gènes de référence *PP2A3*, *IDH* et *EF1a* pour l'*Eucalyptus* (Cassan-Wang et al., 2012), ou *HK1*, *HK11*, et *HK17* pour le peuplier (**Tableau S1**; Sixto et al., 2016).

2.5. Analyses biochimiques de la paroi

Les racines d'*Eucalyptus* de plus de 2mm de diamètre, ou le xylème de peuplier, ont été lyophilisés et réduits en une poudre fine en utilisant un broyeur à bille Mixer Mill MM 400 (Retsch). Cette poudre ensuite été traitée par des bains successifs de solvants chauds (successivement eau, éthanol, éthanol/toluène (1:1 v/v) and acétone), pour obtenir des fragments de paroi dépourvus de composés extractibles, appelés EXR (extractive-free xylem residues). La détermination de la quantité de lignine solubilisée par le bromure d'acétyle a été effectuée en suivant le protocole établi par Pitre et al., (2007). Brièvement, 1.5 ml d'un mélange bromure d'acétyle / acide acétique glacial (1:3 v/v) a été ajouté à 10 mg d'EXR dans un tube en verre fermé par un bouchon en téflon. La réaction s'est ensuite déroulée pendant 2.5h à 55°C sous agitation (250 rpm), puis refroidie dans la glace, puis stoppée par ajout de 100µl de NaOH 2M dilués dans l'acide acétique (45:250 v/v) et 0.5 mL d'hydroxylamine aqueux 0.5M. La concentration en lignine a ensuite été calculée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Toutes les analyses ont été effectuées en triplicatas.

La saccharification a été effectuée sur des EXR ayant subi un prétraitement alcalin ou non, en suivant un protocole mis en place par Acker et al., (2016). Les échantillons prétraités ont été obtenus par incubation d'EXR dans du NaOH 0.25% à 90°C pendant 3h sous agitation à 750 rpm, et après 3 lavages à l'eau. Avant la digestion enzymatique, tous les échantillons ont été lavés 3 fois dans 1 ml d'éthanol 70% à 55°C, 1 fois dans de l'acétone et séchés sur la nuit à 60°C. La digestion a été effectuée sur 10 mg de ces échantillons lavés, par ajout de 400 µl de tampon d'acétate de sodium 0.1M pH 4.8 et 100µl de cellulase (C2730 Sigma Cellulase), à 50°C sous agitation à 750 rpm. La quantité de sucres réducteurs libérés a ensuite été mesurée 48h après le début de la réaction, par colorimétrie à l'aide du réactif DNS (acide dinitrosalicylique; Miller, 1959) en utilisant un aliquot de 10µl du mélange réactionnel centrifugé. Le rendement de saccharification a été calculé en se référant à une courbe étalon

de glucose effectuée dans les mêmes conditions. L'activité enzymatique a été testée à 0.25 FPU/ml dans nos conditions.

2.6. Analyses GUS

La localisation de l'expression des promoteurs d' *EgMYB64* et *EgMYB68* a été effectuée par la détection de l'activité GUS, sur le système racinaire de plantes composites, tel que décrit par Plasencia et al. (2016). Brièvement, des fragments de racines ont été incubés dans la solution GUS (phosphate de sodium 100 mM pH 7.0, EDTA 10 mM, $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.5 mM, $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.5 mM) contenant du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc, Euromedex) à 1 mM, pendant 12h à 37°C. Les racines colorées ont été lavées avec du phosphate de sodium (100 mM), puis fixées dans de l'éthanol à 80%.

2.7. Microscopie et histochimie

Pour les racines transgéniques, la fluorescence de la protéine DsRed a été utilisée comme marqueur de la transformation et a été détectée à l'aide d'une loupe binoculaire Axio Zoom v16 (Zeiss), équipée d'un filtre adapté pour l'observation de la RFP (red fluorescent protein; 607/80 nm). Pour l'observation de la coloration GUS dans les racines *pEgMYB64:GUS* and *pEgMYB68:GUS*, des coupes à main levée ont été observées en champ clair à l'aide d'une loupe binoculaire Axio Zoom v16 équipée d'une caméra CCD couleur (ICC, Zeiss).

L'analyse histochimique du xylème des racines *35S:EgMYB64* a été effectué sur des coupes fines de 80 μ m d'épaisseur obtenues en utilisant un vibratome VTS 1000 (Leica). Les coupes ont été colorées avec du phloroglucinol-HCl et observées en champ clair à l'aide d'un microscope inversé Leitz DMIRBE (Leica) équipé d'une caméra MC 190HD (Leica).

En parallèle, des fragments ont été inclus dans de la résine acrylique LR White (London Resin Company Ltd), par immersion dans des bains consécutifs de 24 heures, à des concentrations croissantes en résine (33%, 50%, 66% and 100%) et polymérisation à 60°C pendant 12h. Des coupes semi-fines (1 μ m) ont été obtenues à l'aide d'une lame Histo Diamond Knife (DiATOME) montée sur un ultramicrotome Reichert UltraCutE (Leica Microsystems). Les coupes ont été montées sur lame et l'ensemble a été chauffé à 60°C pendant 5 minutes. Pour l'observation de la morphologie des tissus, ces coupes ont été colorées au Bleu de Toluidine O aqueux 1% (w:v), pendant 10 minutes à température ambiante. Après rinçage, les lames ont été séchées à 60°C pendant 5 minutes puis montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage permanent (Richard-Allan Scientific). L'acquisition semi-automatique des images a été faite à l'aide d'un scanner de lame Nanozoomer C9600-12 (Hamamatsu, Japan), en champ clair et à un grossissement de 40 fois. Les images ont été exportées à l'aide du programme

NDPview 2.3.1 et traitées ensuite à l'aide du programme ImageJ (v1.5), pour déterminer le nombre de cellules, la surface totale des lumen et de la paroi, pour calculer la moyenne de la densité en cellules, le diamètre moyen des lumières et l'épaisseur de paroi moyenne. Les cellules ayant un diamètre de lumen supérieur à 24µm, ont été considérées comme des vaisseaux.

Les fragments de tige des peupliers 35S:EgMYB68 fixés dans l'éthanol, ont été coupés à l'aide d'un vibratome VTS1000 (Leica) pour obtenir des sections transversale fines de 80µm d'épaisseur, puis observées en épifluorescence à l'aide d'un microscope inversé Leitz DMIRBE (Leica) équipé d'une caméra MC 190HD (Leica).

Des coupes transversales à main levée des tiges de ces lignées ont été déshydratées dans un appareil EM CPD300 (Leica) à point critique en utilisant du dioxyde de carbone comme liquide de transition. Une fois secs, les échantillons ont été recouverts d'une couche de nickel (5nm) dans un appareil EM MED020 (Leica) et observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (ESEM Quanta 250 FEG; FEI).

3. Caractérisation fonctionnelle d'*EgMYB36*, membre du sous-groupe 5 « Woody-Expanded »

3.1. Résultats - *EgMYB36*

3.1.1. *EgMYB36* est membre du sous-groupe 5

L'analyse phylogénétique comparative effectuée par Soler et al. (2014), a révélé que le sous groupe 5 des FT de type MYB-R2R3, est fortement enrichi en gènes d'espèces pérennes ligneuses (*Eucalyptus*, peuplier, vigne) et ne contient qu'un seul gène d'*Arabidopsis*. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'expansion du nombre de gènes de ligneux dans ce sous-groupe pourrait correspondre à une diversification des gènes impliqués dans la régulation de processus spécifiques aux arbres qui sont soumis tout au long de leur vie à de nombreuses contraintes environnementale. Chez l'*Eucalyptus*, la plupart des gènes de ce sous-groupe "woody expanded" dérivent de duplication en tandem. Le sous-groupe 5 contient deux membres, *EgMYB36* et *EgMYB47*, exprimés préférentiellement dans le cambium (Soler et al., 2015, **Figure 2a**). Ce profil d'expression tissulaire et la réponse d'*EgMYB36* à des stress connus comme impactant la formation du bois (Camargo et al., 2014; Ployet et al., 2017a; Ployet et al., 2017b), en font un bon candidat comme régulateur de la formation du xylème secondaire.

Le gène *EgMYB36* (903 pb) code pour une protéine de 300 acides aminés, qui comporte une extrémité N-terminale possédant un domaine de liaison à l'ADN de type R2R3-

MYB (Dubos et al., 2010) et une extrémité C-terminale sans domaine identifié (**Figure 3a**). *EgMYB36* appartient au sous-groupe 5 qui rassemble 16 gènes d'*Eucalyptus*, 11 gènes de la vigne, 6 gènes de peuplier, ainsi que le gène *AtMYB123* d'*Arabidopsis* (*tt2*) impliqué dans la régulation de l'accumulation de proanthocyanidines dans la graine (**Figure 3b**, Soler et al., 2015). La protéine codée par *EgMYB36* présente une identité de séquence d'environ 50%, avec les protéines codées par les gènes *EgMYB47* (52%), *Potri.006G221800* (54%), *Potri.018G049200* (54%), *Potri.018G049600* (52%) et *GSVIVT01035459001* (53%). En revanche elle présente une faible homologie de séquence (35%) avec la protéine codée par *AtMYB123*.

Figure 3: Analyse de la séquence et des relations phylogénétiques d'*EgMYB36*. (a) Alignement des séquences des gènes les plus proches phylogénétiquement d'*EgMYB36* dans le sous-groupe 5 (S5). (b) Arbre phylogénétique du sous-groupe 5, des protéines MYB-R2R3 d'*A. thaliana*, *E. grandis*, *P. trichocarpa* et *V. vinifera* (adapté de Soler et al., 2014). L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode "Neighbor-Joining", en utilisant l'outil d'alignement de séquence en ligne MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La longueur des branches est proportionnelle aux distances évolutives calculées via la méthode Jones-Taylor-Thornton. Le test bootstrap a été effectué avec 1000 répliques. Deux protéines MYB-R2R3 d'*Arabidopsis* (*AtMYB58* and *AtMYB63*) ont été utilisées pour enraciner l'arbre. L'alignement des séquences protéiques est représenté grâce à l'outil en ligne BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form).

(b) AtMYB123 1 MGRATTSVRPEELNRGAWTDHEDKILRDYITTHGEGKWTLPNQAGLKRCGKSCRLRWKNYLREGIKRG
 EgMYB36 1 MGRSPCCS--KEGLNRGAWTVVEDKILTSYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG
 EgMYB47 1 MGRSPCCS--KVLNRGAWTPVEDKILITAYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG
 Potri.006G221800 1 MGRSPCCS--KEGLNRGAWTAVEDKILITAYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG
 Potri.018G049200 1 MGRSPCCS--KEGLNRGAWTAVEDKILITAYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG
 Potri.018G049600 1 MGRSPCCS--KEGLNRGAWTAVEDKILITAYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG
 GSVIVT0103545901 1 MGRSPCCS--KEGLNRGAWTAVEDKILITAYIKAHGEGKWRNLPRAGLKRCGKSCRLRWLNLYLRPDIKRG

R2 MYB domain

AtMYB123 71 NISSDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKLPKTOQKQPK-----R-----
 EgMYB36 69 NISHDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKLAKTDRSSSSPPSLKDINHPSK
 EgMYB47 69 NISHDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKAKDQPSFPSS-----RESPSTE
 Potri.006G221800 69 NISNDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKATAQASPSQK-----QNSQSFK
 Potri.018G049200 174 NISHDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKAKGESPSQK-----QSCQS-K
 Potri.018G049600 69 NISHDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKAKGESPSQK-----QSSQR-K
 GSVIVT0103545901 69 NISHDEELIIRLHNLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTTLCKKIGAQPNNQSR-----LKS---K

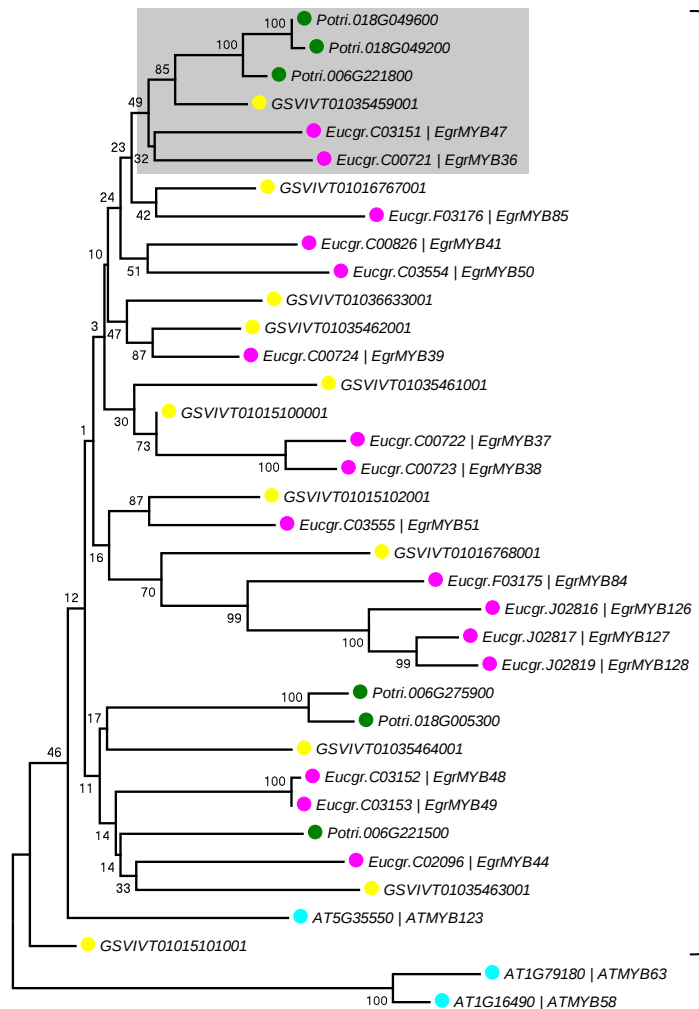
R3 MYB domain

AtMYB123 129 -----KHSNNENNVC-----VTRPKAIRCSKTLFSDLSL----QKKSS--TSPLLLK
 EgMYB36 139 SRSKRP-----SKSSCLFPPTKA-TRPRVTRKPLEGPKVHASPGSSSLPSKNQSLYSITQEYEPYLL
 EgMYB47 133 SKAKRISANNYSNIKPSSSQSPATVTRPQVTRAKPTQCTPVLAW-----EKLYELGPLLKETS
 Potri.006G221800 133 KRA-----EPMINTQSSKSTLATQVPTKATRCCTKVFLSI-----QSPPE--
 Potri.018G049200 132 SRA-----KPMISTQPSKSTQTQVTRIKATRCCTKVLLSL-----QSPPE--
 Potri.018G049600 132 SRA-----KPMISTQPSKSTQTQVTRIKATRCCTKVLLSL-----QSPPE--
 GSVIVT0103545901 130 PPI-----DHKPIAIEPEAAPAQPCVTRKATRCCTKVLPV-----TDPPPE--

AtMYB123 173 -EQEMDQGGSSL-----MGD-----EFDFDRIH-----SDFHFPDLMDFDGLDCGN-----
 EgMYB36 199 -QANYRPSGSC-----QQGDSSESPSRSHRVHCGAHDHDLQKNFVCGDFGLINFGYGDEFNAN-----
 EgMYB47 194 -DIQDPQIGEAR-----REDFPRQGVSEIRLF-----DFELDHFQAEQ--DRFMGNMLETIDN
 Potri.006G221800 174 -PILPPKTLSTAIIDPPQAPLNHQQDSDPNLH-----GHDDSD--LNFHGWNEFQSS---DGGT
 Potri.018G049200 175 TPLPPEILSTAMNDPSQASLNHQQDGPNFHCGTEEVHACHDG-SD--FNFQKWNEIQPND-IDGDT
 Potri.018G049600 175 TPLPPEILSTAMNDPSQASLNHQQDGPNFHCGTEEVHACHDG-SD--FNFQKWNEIQPND-IDGDT
 GSVIVT0103545901 170 -RLSEPRPIDTT----PQNPQAQPQQTTHSVAPWGPT-----DFTPVGTITNS--NLFNED---YSYSN

AtMYB123 214 -----VTSLSSENEILGELVPAQGNLDLNRPFTSCHHRGDDDLRLDFTC
 EgMYB36 256 VMCA--DQPLT-----VEQELLENMTASFQVEEKDTLDLE-----SHAYTLNSEEWF-----
 EgMYB47 245 LAPN-----VEEILLESMTGSVCTKED-TLDLE-----SLPFVLDPEEWF-----
 Potri.006G221800 229 IDNDCKNLSIDSYHSLALSDDLFKDMLNRCGLDDNSTLDLE-----SHAHILDSSEWF-MRH
 Potri.018G049200 241 MKSGCNRNLSRGSECSLGFDDLFKDMLNRCGLPEDNATLDLE-----SHAHILDSSEWF-----
 Potri.018G049600 241 MKSGCNRNLSRGSEYSLGFDDLFKDMLNRCGLPEDNATLDLE-----SHAHILDSSEWF-----
 GSVIVT0103545901 226 LLEN-----VTPKFEDWASNDCLENNALDLE-----SHAFILNSEEWF-----

(a)



Subgroup 5

0.2 Eucalyptus grandis Populus trichocarpa Vitis vinifera Arabidopsis thaliana

3.1.2. La surexpression d'*EgMYB36* augmente faiblement la teneur en lignine des tiges des peupliers

Dans le but de caractériser la fonction d'*EgMYB36* dans la formation du xylème, sa séquence codante a été mise sous le contrôle du promoteur 35S CaMV et transférée chez le peuplier. Sur les 3 lignées obtenues, les lignées 1 (*35S:EgMYB36-1*) et 4 (*35S:EgMYB36-4*) ont montré la plus forte expression du transgène et ont donc été sélectionnées pour la suite des analyses (**Figure S1**).

La lignée *35S:EgMYB36-1* présente une augmentation significative de la croissance primaire (22%) sans que sa croissance secondaire ne soit significativement changée (**Figure 4a,b**). La lignée *35S:EgMYB36-4* montre un profil opposé avec une croissance primaire non affectée, tandis que sa croissance secondaire est fortement réduite (29%). La teneur en lignine de la tige sans écorce a été évaluée par la technique de bromure d'acétyle (Pitre et al., 2007). Les deux lignées analysées présentent une très légère augmentation de la teneur en lignine dans le xylème secondaire de la tige principale (**Figure 4c**). Cette augmentation n'est significative que pour la lignée *35S:EgMYB36-4* (0.52%), mais la lignée *35S:EgMYB36-1* présente la même tendance (0.56%).

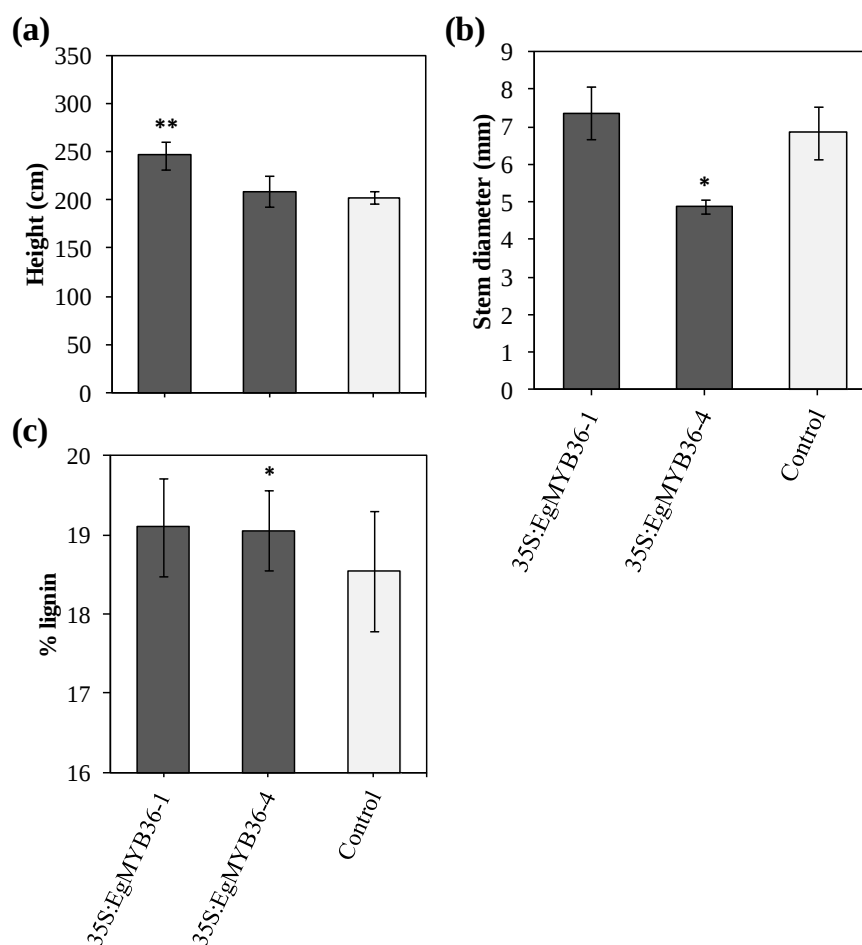


Figure 4: Modifications de la croissance et de la teneur en lignine des parois des cellules du xylème de peupliers surexprimant le facteur de transcription *EgMYB36*. Hauteur (a), diamètre (b) et contenu en lignine du xylème (c) de l'axe principal des peupliers surexprimant de façon ectopique *EgMYB36*. La hauteur des peupliers a été obtenue en mesurant l'axe principal du collet au méristème apical caulinaire. Son diamètre a été mesuré au niveau du collet. Le contenu en lignine du xylème de la tige principale sans écorce a été évalué par la méthode du bromure d'acétyle (Pitre et al., 2007). Les étoiles représentent une différence significative avec les plantes contrôles (WT). (T test de Student, n = 3 à 9, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

3.1.3. La surexpression d'*EgMYB36* chez le peuplier modifie l'expression des gènes de biosynthèse des parois et des métabolites secondaires

Dans les lignées surexprimant *EgMYB36*, nous avons analysé par RT-qPCR, l'expression de 36 gènes impliqués dans la synthèse de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine, les trois composants principaux de la paroi secondaire (**Figure 5**). La majorité des gènes de la biosynthèse de monolignols (14 sur 20) montrent une tendance à l'augmentation de leur niveau de transcrits dans les deux lignées surexprimant *EgMYB36*, en comparaison aux contrôles (**Figure 5a**). Les gènes *PtCAD1* et *PtLac17* montrent le profil le plus marqué, avec une augmentation de leurs niveaux de transcrits de 2.1 et 2.3 respectivement. Douze

gènes (*PtC4H1*, *PtC4H2*, *Pt4CL3*, *PtHCT1*, *PtC3H3*, *PtCSE2*, *PtCCoAOMT1*, *PtCCoAOMT2*, *PtCCR2*, *PtCOMT1*, *PtCOMT2*, *PtLac3*) ont un profil moins marqué, avec un niveau de transcrits qui est en moyenne entre 1.2 et 1.8 fois plus élevé dans les deux lignées surexprimant *EgMYB36* par rapport aux contrôles. Les gènes *Pt4CL17*, *PtCSE1* et *PtCAD5*, présentent un profil opposé avec une expression entre 1.3 et 1.7 fois moins élevée dans les lignées *35S:EgMYB36*. Cinq gènes (*PtPAL1*, *PtPAL2*, *PtPAL3*, *Pt4CL5* et *PtCALd5H2*) ont des profils opposés entre les lignées *35S:EgMYB36-1* et *35S:EgMYB36-4*, ou ne présentent pas de variation de leur niveau de transcrits.

Parmi les 16 gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et des hémicelluloses dont l'expression a été analysée par RT-qPCR, 14 présentent une augmentation du nombre de leurs transcrits dans les deux lignées *35S:EgMYB36-1* et *35S:EgMYB36-4*, par rapport aux peupliers non transformés (**Figure 5b**). Les gènes codant pour des sous-unités des complexes de cellulose synthases, impliqués dans la biosynthèse de la cellulose (*PtCesA7A*, *PtCesA7B*, *PtCesA8A* et *PtCesA8B*; Legay et al., 2010; Kalluri and Joshi, 2004), ont un niveau de transcrits 1.6 fois plus élevé dans les peupliers *35S:EgMYB36* par rapport aux contrôles. Excepté pour *PtGATL1.1* qui présente un profil opposé entre les deux lignées analysées, les transcrits des 11 gènes impliqués dans la synthèse des glucuronoxylanes sont en moyenne 2.5 fois plus abondants lorsqu'*EgMYB36* est surexprimé.

L'expression de 9 gènes reliés au métabolisme secondaire, principalement des dérivés de la voie des phénylpropanoïdes, a également été analysée par RT-qPCR (**Figure 5c**). La majorité de ces gènes (7 sur 9), présente une réduction du taux de transcrits dans les lignées *35S:EgMYB36*. Parmi les 5 gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes et anthocyanes dérivés du coumaroyl-CoA (*PtCHS1*, *PtCHS4*, *PtDFR1*, *PtDFR2* et *PtANR1*; Sun et al., 2011; Huang et al., 2012), seul *PtANR1* ne montre pas de régulation, les 4 autres gènes ont leur niveau de transcrits en moyenne 6.1 fois plus bas dans les lignées *35S:EgMYB36* que dans les peupliers contrôles. Un profil similaire est observé pour les 2 gènes impliqués dans la production de phénoliques glycosides (*PtSABT* et *PtBEBT*; Chedgy et al., 2015), avec une réduction du nombre de transcrits par un facteur de 4.8. Les 2 gènes impliqués dans la production d'antioxydants dérivés des monolignols (*PCBERA* et *PCBER7*; Niculaes et al., 2014) ont un profil moins marqué. *PtPCBER7* a sa quantité de transcrits diminuée de 1.4 fois en moyenne, tandis que *PtPCBERA* n'est pas régulé.

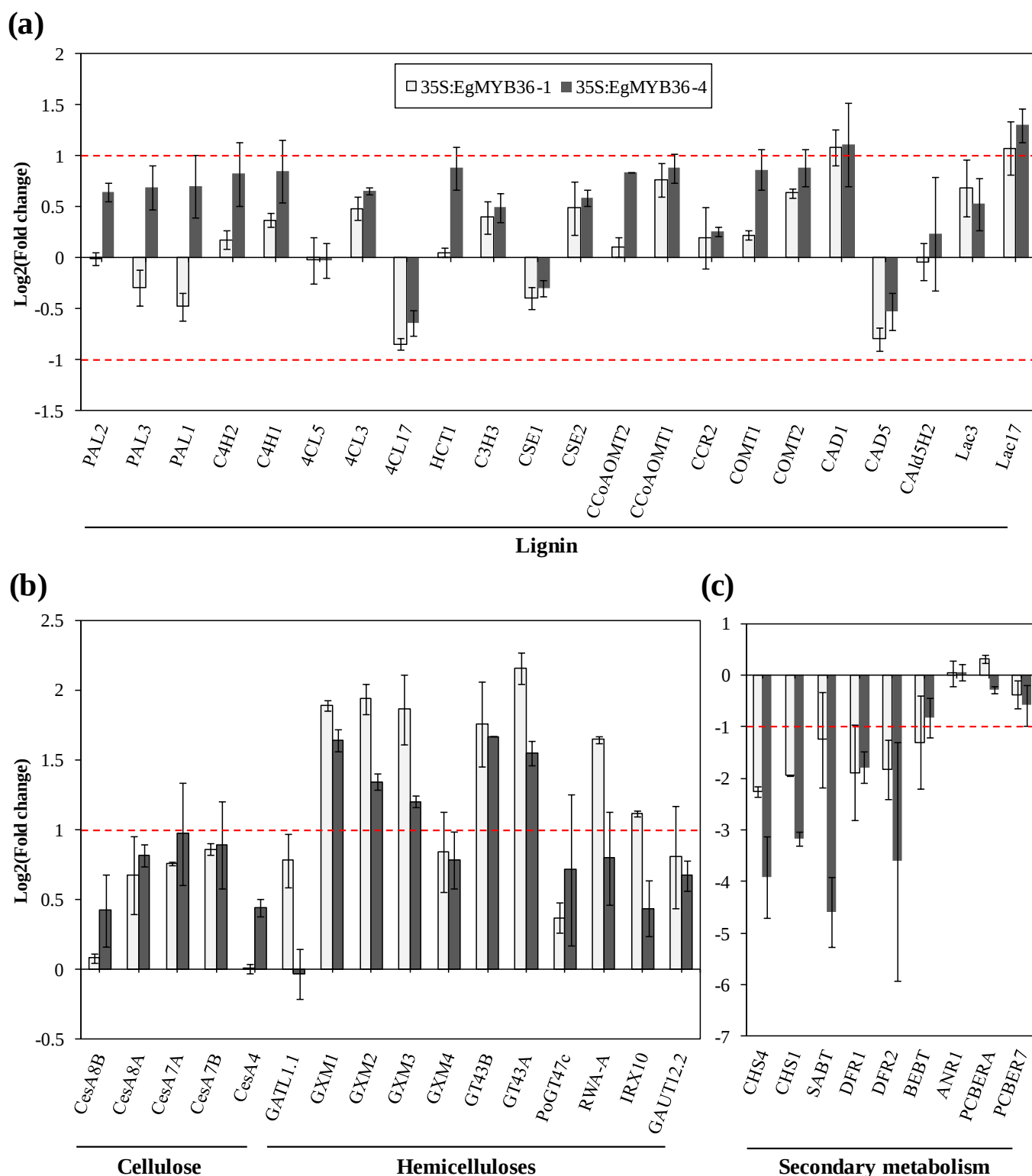


Figure 5: Changements induits dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi ainsi que dans biosynthèse de métabolites secondaires, dans la tige des peupliers surexprimant *EgMYB36*. Abondance relative des transcrits de gènes reliés à la biosynthèse de la lignine **(a)**, de la cellulose et des hémicelluloses **(b)**, et de métabolites secondaires solubles **(c)**.

L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR dans 2 à 3 plantes par lignée, et calculée selon la méthode $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001), en utilisant des amorces spécifiques listées dans le Tableau S1. L'abondance des transcrits est relative à la moyenne des plantes contrôles et transformée par un Log2. La ligne en pointillés rouges, symbolise un ratio de 2, correspondant à une augmentation ou une réduction d'un facteur 2 de l'expression par rapport aux contrôles (WT). *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; *COMT*, caffeic acid O-methyltransferase; *CAD*, cinnamyl alcohol dehydrogenase; *CSE*, Caffeoyl shikimate esterase; *CAld5H*, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase; *Lac*, laccase; *CesA*, cellulose synthase; *GATL*, galacturonosyltransferase-like; *GXM*, glucuronoxylan methyltransferases; *GT43*, glycosyltransferases family 43; *GT47*, glycosyltransferase family 47; *RWA*, reduced wall acetylation; *IRX*, irregular xylem; *GAUT*, galacturonosyltransferase; *CHS*, chalcone synthase; *SABT*, salicyl alcohol O-benzoyltransferase; *BEBT*, benzyl alcohol O-benzoyltransferase; *DFR*, dihydroflavonol 4-reductase; *ANR*, anthocyanidin reductase; *PCBER*, phenylcoumaran benzylic ether reductase.

3.1.4. Régulation des gènes impliqués dans le contrôle du développement du xylème et du dépôt de paroi dans les peupliers *35S:EgMYB36*

Chez le peuplier, des études précédentes ont révélé que la perception du peptide *PtCLE41* par le récepteur *PtPXY*, induit la prolifération des cellules du cambium via la régulation positive de *PtWOX4a* et *PtWOX4b*, mais inhibe leur différenciation en xylème (Etchells et al., 2015). Parmi ces 4 gènes, *PtPXY*, *PtWOX4a* et *PtWOX4b* ont leur niveaux de transcrits qui est réduit de 1.4 et 3.8 fois dans les lignées *35S:EgMYB36* par rapport aux peupliers non transformés. *PtCLE41* présente en revanche un profil moins marqué (**Figure 6**).

Les orthologues putatifs du gène encodant le transporteur d'auxine *AtPIN1*, essentiel pour la différenciation des cellules du xylème (Yang and Wang, 2016), ont été identifiés chez le peuplier (Liu et al., 2014). De même, la caractérisation fonctionnelle des FT *PtHB2*, *PtHB4*, *PtHB7* et *PtHB8*, a révélé que ce sont des régulateurs clés dans le processus de différenciation du xylème chez le peuplier (Zhu et al., 2013). De façon intéressante, deux des orthologues putatifs d'*AtPIN1* (*PtPINb* et *PtPINd*), ainsi que ces 4 FT (*PtHB2*, *PtHB4*, *PtHB7* et *PtHB8*), présentent en moyenne un niveau de transcrits 1.5 fois plus bas dans les peupliers *35S:EgMYB36* que dans les peupliers non transformés.

En aval de ces voies de régulation, un ensemble de 19 FT impliqués dans le réseau hiérarchique contrôlant le dépôt de paroi secondaire dans les cellules du xylème chez le peuplier ont été analysés par RT-qPCR (**Figure 6**; Tian et al., 2013; Li et al., 2015; Chai et al., 2014; Tang et al., 2015; Hu et al., 2010; Ohtani et al., 2011; Zhong et al., 2010; Grant et al., 2010; Hussey et al., 2013). Sur le total des 19 FT analysés, la majorité d'entre eux (8 FT) voient l'abondance de leurs transcrits qui augmente. En revanche, 6 ne montrent pas de régulation ou ont un profil opposé entre les deux lignées *35S:EgMYB36-1* et *35S:EgMYB36-4*.

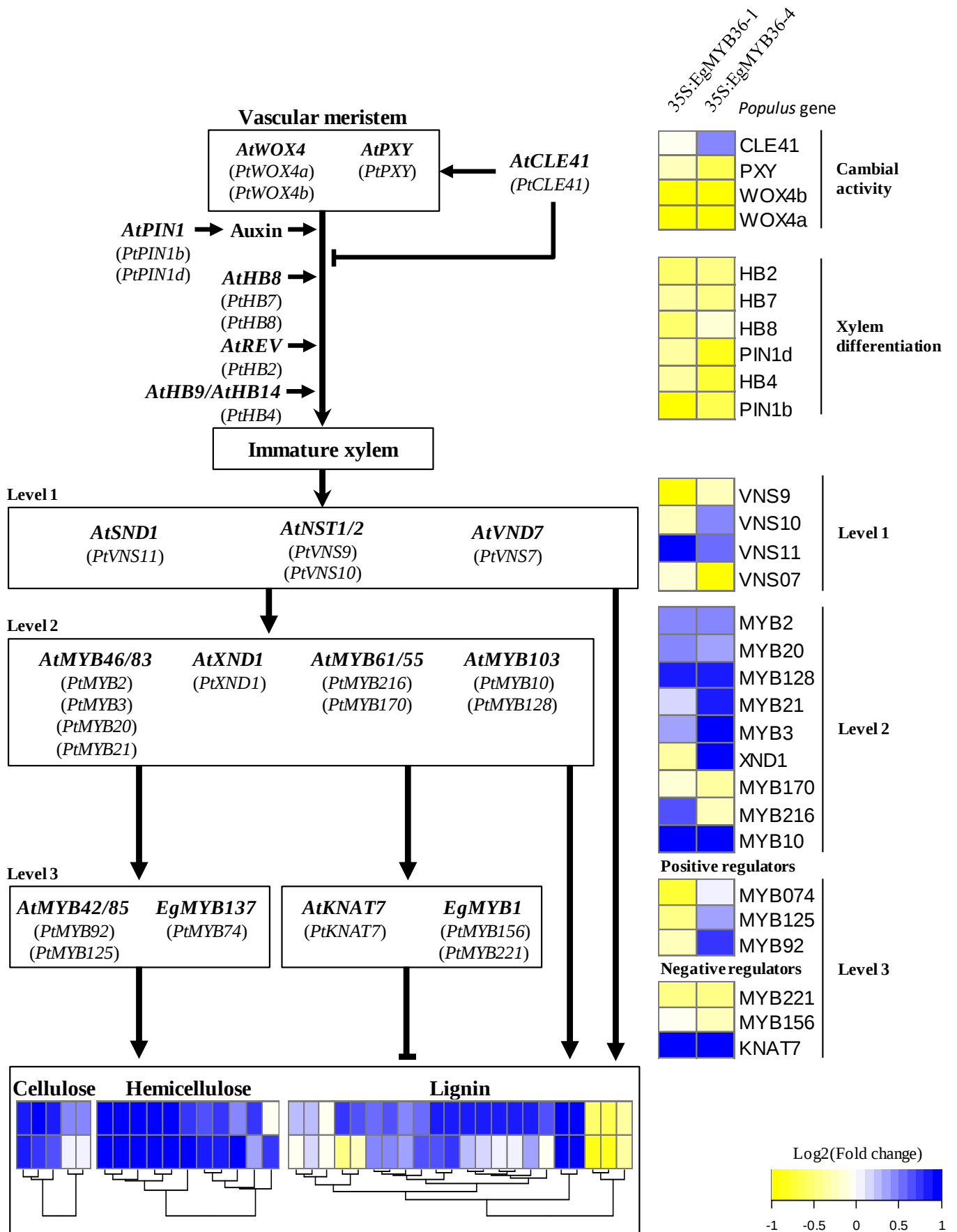


Figure 6: Effet de la surexpression d'EgMYB36 sur la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le contrôle de la différenciation du xylème et du dépôt de paroi, chez le peuplier.
Les gènes sont groupés en plusieurs niveaux, en suivant la hiérarchie du réseau de FT impliqués dans

la régulation de la différenciation des cellules du xylème et de la biosynthèse de la paroi, telle qu'elle a été définie par Hussey et al. (2013). Les noms et numéros d'accessions, ont été assignés en accord avec le réseau défini par Hussey et al. (2013) et l'annotation des MYB-R2R3 du peuplier (Wilkins et al., 2009) et de l'*Eucalyptus* (Soler et al., 2014). L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR dans 2 à 3 plantes par lignée, et calculée selon la méthode $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), à l'aide des amorces listées dans le Tableau S1. L'abondance des transcrits est relative à la moyenne des plantes contrôles et transformée par un Log2, tel que $\text{Log2}(35S:EgMYB20/WT)$. Chaque colonne représente une moyenne de ce ratio des différentes plantes d'une même lignée. Une couleur bleue représente une augmentation du nombre de transcrits, tandis qu'une couleur jaune représente une réduction.

Parmi les 4 masters régulateurs de type NAC, activant la formation de la paroi secondaire dans les fibres (*PtVNS9*, *PtVNS10* et *PtVNS11*; Hu et al., 2010; Zhong et al., 2010) ou dans les vaisseaux (*PtVNS07*; Ohtani et al., 2011), les transcrits de *PtVNS9* et *PtVNS07* sont en moyenne 2.4 fois moins abondants dans les lignées surexprimant *EgMYB36* par rapport aux contrôles. Au contraire, les transcrits de *PtVNS11* sont 1.7 fois plus abondants en moyenne dans les lignées *35S:EgMYB36* que dans les plantes contrôles, tandis que *PtVNS10* présente un profil opposé entre les deux lignées.

Dans le niveau 2 du réseau contrôlant la biosynthèse de la paroi, les 9 FT représentés sont les orthologues putatifs de régulateurs positifs de la formation de la paroi chez *Arabidopsis* (*AtMYB46/EgMYB2*, *AtMYB83/EgMYB2*, *AtMYB61*, *AtMYB55*, *AtMYB103* et *AtXND1*; Wilkins et al., 2009; Tian et al., 2013; Chai et al., 2014; Grant et al., 2010). Les transcrits de 6 d'entre eux (*PtMYB2*, *PtMYB20*, *PtMYB128*, *PtMYB21*, *PtMYB3* et *PtMYB10*) sont en moyenne 1.8 fois plus abondants dans les lignées *35S:EgMYB36*, tandis que *PtMYB170* présente une tendance opposée. Les deux gènes *PtMYB216* et *PtXND1* ont en revanche un profil opposé entre les deux lignées (**Figure 6**).

Dans le niveau 3, les orthologues chez le peuplier des régulateurs positifs *AtMYB42* et *AtMYB85* (*PtMYB92* et *PtMYB125*), présentent aussi un profil inverse entre les deux lignées (**Figure 6**). L'orthologue du gène *EgMYB137* identifié récemment comme activateur de la biosynthèse de la paroi chez l'*Eucalyptus* (Ployet et al., in prep; Soler et al., in prep), montre un profil similaire aux activateurs du niveau 3. Les orthologues du régulateur négatif *EgMYB1* (Legay et al., 2010), ont leur niveau de transcrits en moyenne 1.2 fois moins élevé dans les lignées *35S:EgMYB36*, par rapport aux contrôles. En revanche, les transcrits du régulateur négatif *PtKNAT7*, ont un niveau 2.3 fois plus élevé.

3.2. Discussion - *EgMYB36*

Les conséquences de la surexpression d'*EgMYB36* sur la croissance des peupliers transgéniques générés, ne sont pas évidentes du fait de la variabilité observée entre les deux lignées. Cependant la surexpression d'*EgMYB36* semble entraîner une légère augmentation de la teneur en lignine dans le xylème de ces peupliers.

Ces modifications de la composition de la paroi sont accompagnées de régulations marquées dans les gènes impliqués dans la biosynthèse des différents constituants de la paroi secondaire. La majorité des gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et des hemicelluloses sont fortement induits en réponse à la surexpression d'*EgMYB36*. Les gènes impliqués dans la synthèse de la lignine sont majoritairement induits, bien que certains montrent des profils moins marqués. De même, l'analyse des FT impliqués dans le contrôle de la biosynthèse des composants de la paroi secondaire chez le peuplier a révélé qu'une majorité de ces FT sont induits en réponse à la surexpression d'*EgMYB36*. Ces observations suggèrent qu'une des conséquences de la surexpression d'*EgMYB36* est l'activation du dépôt de paroi secondaire dans le xylème.

L'augmentation de la teneur en lignine qui est observée, pourrait être une conséquence de la régulation négative drastique des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires solubles dérivés du coumaroyl-CoA, tel que les flavonoïdes et les anthocyanes (Boerjan et al., 2003). En effet, la forte répression de cette voie, suggère une réduction du flux de carbone vers la production de métabolites secondaires solubles, ce qui pourrait être en faveur de la production de monolignols. De plus, l'induction de gènes codant pour les enzymes nécessaires à leur polymérisation dans la paroi secondaire telles que des laccases, est en faveur de l'hypothèse d'une augmentation de la production de monolignols à incorporer au polymère de lignine.

Certains gènes de la voie des phénylpropanoïdes sont régulés négativement, et leur expression est corrélée avec le profil des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires solubles dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (flavonoïdes, anthocyanes). Il s'agit d'un profil qui n'est pas en accord avec l'hypothèse d'une activation de la synthèse de lignine. Des études précédentes ont suggéré que certaines isoformes de la voie des phénylpropanoïdes sont impliquées dans la synthèse de lignine en conditions développementales et sont, de fait, communément appelées des isoformes "lignin toolbox" (Raes et al., 2003; Hamberger et al., 2007; Carocha et al., 2015). Tandis que, certaines

isoformes semblent être plus directement régulées en réponse aux stress, et pourraient être recrutées pour la production de métabolites secondaires solubles. Chez le peuplier, ces isoformes ne sont pas encore identifiées de manière claire. Les isoformes fortement réprimées dans les lignées 35S:*EgMYB36*, telles que *Pt4CL17*, *PtCSE1* et *PtCAD5*, pourraient faire partie des voies de régulation de la production de métabolites secondaires solubles, et donc être recrutées de façon plus spécifique pour cette fonction. De plus, parmi les 4 gènes de la voie des phénylpropanoïdes qui montrent un profil opposé dans les deux lignées transgéniques, 3 encodent des PAL. Ces enzymes se trouvent très en amont dans la voie des phénylpropanoïdes et contribuent donc à la synthèse de la paroi (lignine) mais aussi de métabolites secondaires solubles (Vogt, 2010). En considérant l'hypothèse citée précédemment, leur profil d'expression atypique pourrait être une manifestation de cette balance entre la production de monolignols pour la construction de la paroi secondaire qui semble activée et la production de composés secondaires solubles qui semble inhibée dans les peupliers surexprimant *EgMYB36*.

Par ailleurs, les gènes activant la prolifération des cellules cambiales et la différenciation des cellules du cambium sont dans leur ensemble réprimés. Cela suggère une réduction de l'activité cambiale et une réduction de la production de nouvelles assises cellulaires dans le xylème secondaire en réponse à la surexpression d'*EgMYB36*. Ce qui est en accord avec la réduction de croissance secondaire observée pour la lignée 4. Plusieurs études précédentes ont montré que l'activation du dépôt de paroi secondaire s'accompagne d'une réduction de la croissance primaire et secondaire (Goicoechea et al., 2005), ce qui est en accord avec nos observations. En effet, la paroi secondaire constitue un puits de carbone conséquent, et une redirection massive du flux de carbone vers ce puits a pour conséquence de réduire l'énergie disponible à la croissance de l'arbre (Mizrachi and Myburg, 2016). Cependant, l'hypothèse inverse, selon laquelle l'activation du dépôt de paroi serait la conséquence du ralentissement de la croissance du xylème secondaire ne peut être exclue. En effet, étant donné l'expression préférentielle d'*EgMYB36* dans la zone cambiale où la mise en place de la paroi secondaire n'intervient pas, il est tentant de suggérer que les régulations observées sur la formation de la paroi ne sont pas des régulations directes effectuées par *EgMYB36*. De même, la répression des acteurs de la prolifération des cellules cambiales, ainsi que de la différenciation des cellules du xylème, pourrait être indirecte, et le résultat de perturbations dans le métabolisme. En effet, il a été montré à plusieurs reprises, que des perturbations dans le métabolisme, induisent des modifications dans la composition et la

structure des parois (Gómez et al., 2006; Mounet-Gilbert et al., 2016). Par exemple, il a été montré récemment, que le gène *EgMYB88* est impliqué dans la régulation du métabolisme secondaire dans la zone cambiale. Cependant, sa surexpression dans le peuplier impacte également de façon indirecte la composition de la paroi des cellules du xylème secondaire, avec notamment une augmentation de la teneur en lignine (Soler et al., 2016).

Bien qu'*EgMYB36* puisse ne pas réguler de façon directe le dépôt de paroi secondaire dans les cellules du xylème, les phénotypes observés dans cette étude préliminaire, suggèrent que ce FT joue un rôle important dans la formation du xylème secondaire. Une analyse du métabolome en réponse à la surexpression d'*EgMYB36*, ainsi que l'identification des cibles de ce FT, seraient des approches qui permettraient de définir son rôle dans la régulation de la formation du bois.

4. Caractérisation fonctionnelle de trois R2R3-MYBs, membres des sous-groupes « Woody-Preferential » WPS-II et WPS-III

4.1. Résultats - *EgMYB20*

4.1.1. *EgMYB20* est un membre du sous-groupe WPS-III

Le gène *EgMYB20* (588 pb) code pour une protéine de 195 acides aminés dont l'extrémité N-terminale contient un site de liaison à l'ADN de type MYB-R2R3, tandis que l'extrémité C-terminale ne possède pas de motif identifié (**Figure 7a**). *EgMYB20* appartient au sous-groupe WPS-III qui rassemble 5 gènes de peuplier, 4 gènes d'*Eucalyptus* (*EgMYB20*, *EgMYB19*, *EgMYB26* et *EgMYB89*) et 4 gènes de la vigne (**Figure 7b**, Soler et al., 2015). La protéine *EgMYB20* présente une identité de séquence supérieure à 50% avec celles codées par les gènes *EgMYB19* (56%), *Potri.015G041100* (60%) et *GSVIVT01008401001* (57%). Ce sous groupe ne contient pas de gène d'*Arabidopsis*, mais est phylogénétiquement proche du sous groupe 4, qui contient notamment les gènes *EgMYB1*, *AtMYB3*, *AtMYB4*, *AtMYB7* et *AtMYB32*, décrits comme impliqués dans la répression de différentes branches de la voie des phénylpropanoïdes (Jin et al., 2000; Legay et al., 2010; Fornale et al., 2014).

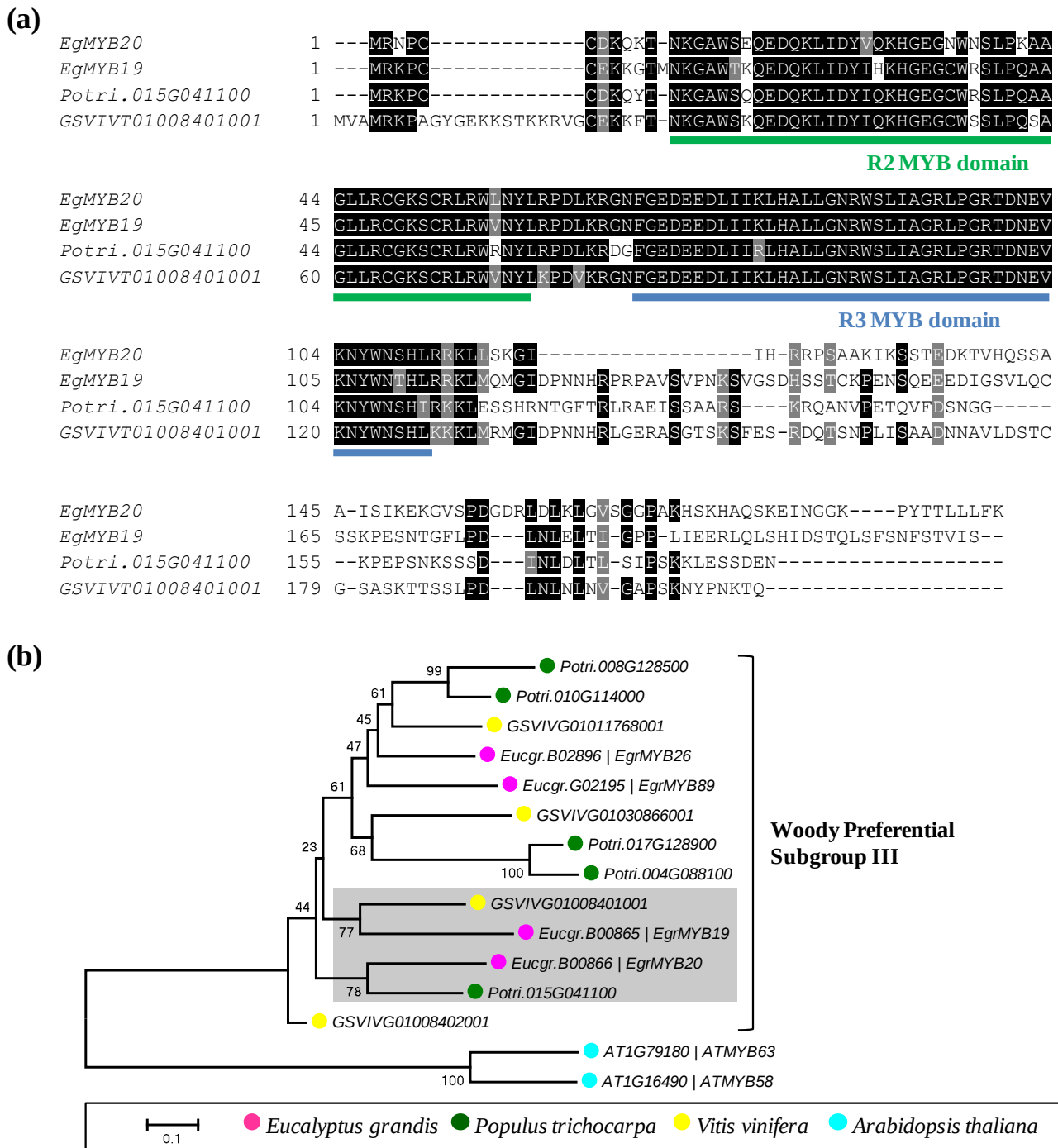


Figure 7: Analyse de la séquence et des relations phylogénétiques d'*EgMYB20*. (a) Alignement des séquences des gènes les plus proches phylogénétiquement d'*EgMYB20* dans le sous-groupe Woody Preferential Subgroup III (WPS-III). (b) Arbre phylogénétique du sous-groupe Woody Preferential Subgroup III des protéines MYB-R2R3 d'*A. thaliana*, *E. grandis*, *P. trichocarpa* et *V. vinifera* (adapté de Soler et al., 2014). L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode "Neighbor-Joining", en utilisant l'outil d'alignement de séquence en ligne MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La longueur des branches est proportionnelle aux distances évolutives calculées via la méthode Jones-Taylor-Thornton. Le test bootstrap a été effectué avec 1000 répliques. Deux protéines MYB-R2R3 d'*Arabidopsis* (*AtMYB58* and *AtMYB63*) ont été utilisées pour enraciner l'arbre. L'alignement des séquences protéiques est représenté grâce à l'outil en ligne BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form).

4.1.2. La surexpression d'*EgMYB20* chez le peuplier induit une réduction de croissance et une augmentation de la teneur en lignine

Dans le but d'étudier le rôle d'*EgMYB20* dans la formation du xylème, sa séquence codante a été mise sous le contrôle du promoteur du virus de la Mosaïque du tabac (35S) et transférée à des lignées sauvages de peuplier. Quatre lignées transgéniques indépendantes ont été régénérées puis criblées par RT-qPCR pour évaluer le niveau d'expression du transgène (*EgMYB20*). Les lignées 1 (35S:*EgMYB20-1*) et 4 (35S:*EgMYB20-4*) ont montré la plus forte expression d'*EgMYB20* et ont donc été choisies pour la suite des analyses (**Figure S1**).

Les plantes de ces deux lignées présentent une réduction significative de la croissance de l'axe principal par rapport aux plantes témoins, soit 56% et 29% respectivement pour les lignées 35S:*EgMYB20-1* et 35S:*EgMYB20-4* (**Figure 8a**). La croissance secondaire est également réduite : les tiges ont un diamètre 50% (35S:*EgMYB20-1*) et 42% (35S:*EgMYB20-4*) plus faible que celui des plantes sauvages (**Figure 8b**).

Les teneurs en lignine des deux lignées 35S:*EgMYB20-1* (20.4%) et 35S:*EgMYB20-4* (19.5%) sont significativement plus élevées que celle des plantes contrôles (18.5%) (**Figure 8c**). Ceci correspond à une augmentation de la teneur en lignine de 1.8% et 0.9% respectivement pour les lignées 35S:*EgMYB20-1* et 35S:*EgMYB20-4*.

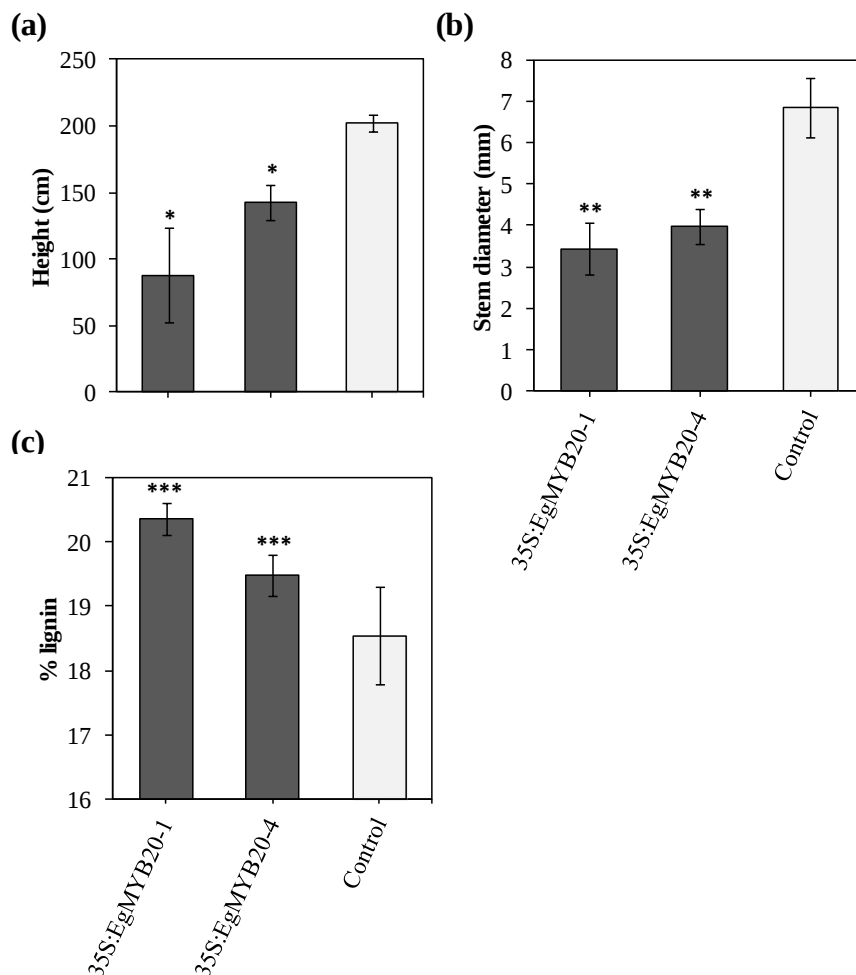


Figure 8: Modifications de la croissance et de la teneur en lignine des parois des cellules du xylème de peupliers surexprimant le facteur de transcription *EgMYB20*. Hauteur (a), diamètre (b) et contenu en lignine du xylème (c) de l'axe principal des peupliers surexprimant de façon ectopique *EgMYB20*. La hauteur des peupliers a été obtenue en mesurant l'axe principal du collet au méristème apical caulinaire. Son diamètre a été mesuré au niveau du collet. Le contenu en lignine du xylème de la tige principale sans écorce a été évalué par la méthode du bromure d'acétyle (Pitre et al., 2007). Les étoiles représentent une différence significative avec les plantes contrôles (WT). (T test de Student, $n = 2$ à 5, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

4.1.3. La surexpression d'*EgMYB20* induit une forte réduction du niveau des transcrits codant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides pariétaux.

Nous avons évalué par RT-qPCR les niveaux de transcrits de 36 gènes impliqués dans la synthèse de la paroi secondaire (**Figure 9**). Cela inclut 20 gènes codant pour des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes impliquée dans la biosynthèse des monolignols (unités monomériques des lignines) (Shi et al., 2010), ainsi que 2 gènes codants pour des laccases potentiellement impliquées dans leur polymérisation (*PtLac3* et *PtLac17*; Ranocha et al., 2002; Berthet et al., 2011; **Figure 9a**). La majorité des gènes (14/20), montrent un faible changement de leur niveau de transcrits avec un ratio d'induction ou répression inférieur à 2, et fréquemment un profil opposé entre les deux lignées *35S:EgMYB20-1* et *35S:EgMYB20-4*.

Six gènes (*PtPAL1*, *PtPAL3*, *PtC4H2*, *PtCSE1*, *PtLac3*, *PtLac17*) présentent au moins une augmentation ou une réduction d'un facteur 2 de l'abondance de leurs transcrits, dans au moins une lignée sur deux, avec toutefois une tendance similaire pour la deuxième lignée. Malgré une importante variabilité biologique entre plantes, une réduction du nombre de transcrits des gènes *PtCSE1*, *PtLac3*, et *PtLac17* est détectée (ratio < 0.5). Les gènes *PtPAL1*, *PtPAL3* et *PtC4H2*, impliqués dans les premières étapes du métabolisme général des phénylpropanoïdes, sont quant à eux régulés positivement avec une augmentation des niveaux de transcrits de 2.4 à 2.6 dans la lignée 35S:*EgMYB20-4*, et 1.2 à 1.9 dans la lignée 35S:*EgMYB20-1*.

Nous avons également mesuré l'abondance des transcrits de 16 gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et des hémicelluloses chez le peuplier (**Figure 9b**) incluant 5 gènes codant des sous unités des celluloses synthases (*PtCesA4*, *PtCesA7B*, *PtCesA8A* et *PtCesA8B*), (Kalluri and Joshi, 2004; Legay et al., 2010) et 11 gènes impliqués dans la synthèse des glucuronoxylanes (hémicelluloses). Parmi ces derniers, 6 gènes (*PtGAUT12.2*, *PtGATL1.1*, *PtIRX10*, *PtGT43A*, *PtGT43B* et *PtGT47c*) codent des glycosyl transferases (Zhou et al., 2006; Decker et al., 2009; Kong et al., 2009; Brown et al., 2009; Ratke et al., 2015), quatre (*PtGXM1*, *PtGXM2*, *PtGXM3* et *PtGXM4*; Huan et al., 2014) des méthyltransferases et un (*PtRWA-A*; Ratke et al., 2015) une acetyltransferase. Malgré une variabilité importante entre répétitions biologiques, une réduction de l'abondance des transcrits de l'ensemble de ces gènes (excepté *PtGT47c*) est observée dans les deux lignées surexprimant *EgMYB20*. En moyenne, les transcrits des gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et des hémicelluloses sont respectivement 3.7 fois et 3.3 fois moins abondants dans les lignées 35S:*EgMYB20* que dans les peupliers sauvages (**Figure 9b**).

En plus de cet ensemble de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi, nous avons analysé l'expression de neuf gènes reliés au métabolisme secondaire, conduisant à des dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (**Figure 9c**). Cela inclut 5 gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes et anthocyanes (*PtCHS1*, *PtCHS4*, *PtDFR1*, *PtDFR2* et *PtANR1*; Sun et al., 2011; Huang et al., 2012), 2 gènes impliqués dans la production d'antioxydants dérivés des monolignols (*PCBERA* et *PCBER7*; Niculaes et al., 2014), ainsi que 2 gènes impliqués dans la production de glycosides phénoliques (*PtSABT* et *PtBEBT*; Chedgy et al., 2015). Tous ces gènes à l'exception de *PtBEBT* voient leur abondance de transcrits réduite en moyenne de 5.3 fois dans les lignées 35S:*EgMYB20*, en comparaison avec les plantes sauvages.

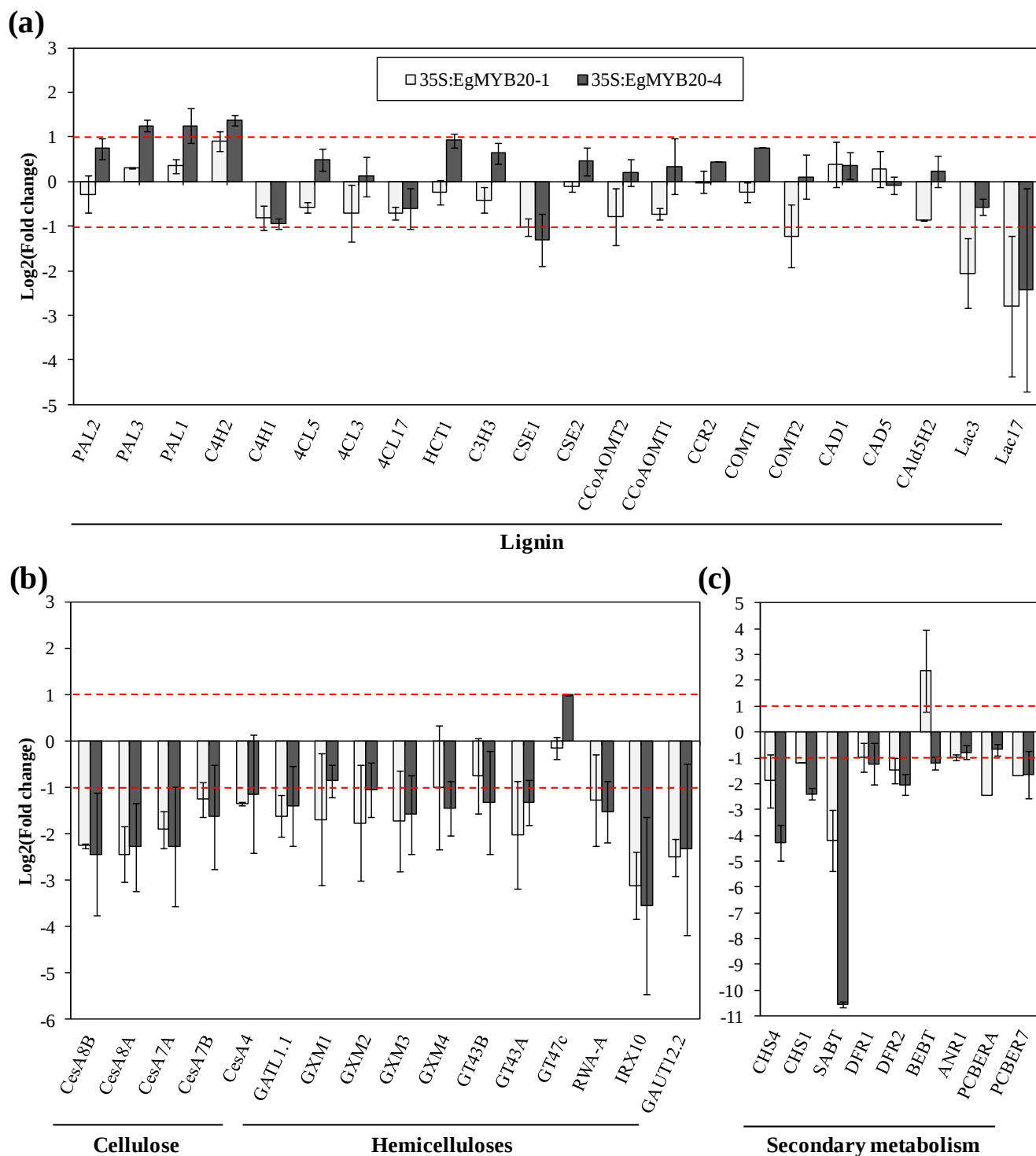


Figure 9: Changements induits dans l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi ainsi que dans biosynthèse de métabolites secondaires, dans la tige des peupliers surexprimant *EgMYB20*. Abondance relative des transcrits de gènes reliés à la biosynthèse de la lignine **(a)**, de la cellulose et des hémicelluloses **(b)**, et de métabolites secondaires solubles **(c)**. L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR dans 2 à 3 plantes par lignée, et calculée selon la méthode $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001), en utilisant des amorces spécifiques listées dans le Tableau S1. L'abondance des transcrits est relative à la moyenne des plantes contrôles et transformée par un Log2. La ligne en pointillés rouges, symbolise un ratio de 2, correspondant à une augmentation ou une réduction d'un facteur 2 de l'expression par rapport aux contrôles (WT). *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; *COMT*, caffeic acid O-methyltransferase; *CAD*, cinnamyl alcohol dehydrogenase; *CSE*, Caffeoyl shikimate esterase; *CALd5H*, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase; *Lac*, laccase; *CesA*, cellulose synthase; *GATL*, galacturonosyltransferase-like; *GXM*, glucuronoxylan methyltransferases; *GT43*, glycosyltransferases family 43; *GT47*, glycosyltransferase family 47; *RWA*, reduced wall acetylation; *IRX*, irregular xylem; *GAUT*, galacturonosyltransferase; *CHS*, chalcone synthase; *SABT*, salicyl alcohol O-benzoyltransferase; *BEBT*, benzyl alcohol O-benzoyltransferase; *DFR*, dihydroflavonol 4-reductase; *ANR*, anthocyanidin reductase; *PCBER*, phenylcoumaran benzylic ether reductase.

4.1.4. Effets de la surexpression d'*EgMYB20* sur les gènes régulateurs contrôlant le développement du xylème et le dépôt de paroi secondaire

Compte tenu des conséquences de la surexpression d'*EgMYB20* sur la croissance secondaire et sur l'expression des gènes de biosynthèse des polymères pariétaux, nous avons décidé d'évaluer ses effets plus en amont. Dans ce but, nous avons ciblé dans un premier temps des gènes impliqués dans la régulation de l'activité cambiale et des premières étapes de la différenciation du xylème et dans un second temps des facteurs de transcription connus pour réguler la biosynthèse des polymères pariétaux.

Parmi les 4 gènes connus pour réguler la prolifération des cellules des méristèmes secondaires chez le peuplier, les gènes encodant le récepteur kinase *PtPXY* ainsi que les deux facteurs de transcription *PtWOX4a* et *PtWOX4b*, présentent des niveaux de transcrits en moyenne 2.3 fois plus faibles dans les deux lignées surexprimant *EgMYB20* par rapport aux peupliers sauvages (**Figure 10**). Le gène encodant le peptide *PtCLE41*, présente un profil opposé avec un niveau de transcrits en moyenne 3.4 fois plus élevé dans les lignées *35S:EgMYB20*.

Concernant les gènes liés aux premières étapes de différenciation nous avons analysé l'expression du gène encodant le transporteur d'auxine *AtPIN1* (Yang and Wang, 2016) dont les orthologues chez le peuplier ont été identifiés (Liu et al., 2014), et des facteurs de transcription de type HD-ZIP III (homeodomain leucine zipper Class III) *PtHB2*, *PtHB4*, *PtHB7* et *PtHB8*, identifiés comme régulateurs positifs de la différenciation du xylème chez le peuplier (Zhu et al., 2013). Les niveaux de transcrits de 2 des orthologues d'*AtPIN1* chez le peuplier (*PtPIN1b* et *PtPIN1d*), sont en moyenne 2.3 fois plus faibles dans les lignées *35S:EgMYB20* que dans les peupliers sauvages. En revanche, hormis *PtHB4* dont les transcrits sont 1.5 fois moins abondants en moyenne dans les lignées *35S:EgMYB20* que dans les plantes contrôles, les autres facteurs de transcription testés (*PtHB2*, *PtHB7* et *PtHB8*) ne présentent pas de régulation notable (**Figure 10**).

Nous avons également analysé l'expression de 19 FT appartenant au réseau hiérarchique de régulation de la paroi secondaire (**Figure 10**, Tian et al., 2013; Li et al., 2015; Chai et al., 2014; Tang et al., 2015; Hu et al., 2010; Ohtani et al., 2011; Zhong et al., 2010; Grant et al., 2010; Hussey et al., 2013). Sur le total de 19 FT analysés, 12 présentent un niveau de transcrits plus faible dans les deux lignées *35S:EgMYB20* par rapport aux contrôles et 4 FT montrent des profils opposés entre les deux lignées. Parmi les 4 masters régulateurs de type NAC, activant la formation de la paroi secondaire dans les fibres (*PtVNS9*, *PtVNS10* et *PtVNS11*; Hu et al., 2010; Zhong et al., 2010) ou dans les vaisseaux (*PtVNS07*; Ohtani et al., 2011), les profils sont assez divergents. *PtVNS10* et *PtVNS11* ont en moyenne 1.7 fois moins de transcrits dans les lignées surexprimant *EgMYB20* que dans les contrôles. Au contraire, *PtVNS9* montre une augmentation du niveau d'ARN messagers de 1.9 fois, tandis que *PtVNS07* présente un profil opposé entre les deux lignées. En aval de ces master régulateurs, 9 FT sont les orthologues putatifs de régulateurs positifs de la formation de la paroi chez *Arabidopsis* (*AtMYB46/EgMYB2*, *AtMYB83/EgMYB2*, *AtMYB61*, *AtMYB55*, *AtMYB103* et *AtXND1*; Wilkins et al., 2009; Tian et al., 2013; Chai et al., 2014; Grant et al., 2010). Six d'entre eux (*PtMYB21*, *PtMYB170*, *PtMYB216*, *PtMYB128*, *PtMYB2* et *PtMYB10*) ont en moyenne 2.6 fois moins de transcrits dans les lignées *35S:EgMYB20*, tandis que *PtXND1* voit son niveau de transcrits multiplié par 2. *PtMYB3* et *PtMYB20* ont quant à eux un profil opposé entre les deux lignées. Enfin, le dernier niveau de FT contrôlant la biosynthèse de paroi contient un groupe de régulateurs positifs (*AtMYB42*, *AtMYB85*) ainsi qu'un groupe de régulateurs négatifs (*AtKNAT7* et *EgMYB1*; Hussey et al., 2013). Les 3 orthologues putatifs chez le peuplier, d'*AtKNAT7* et d'*EgMYB1* (Li et al., 2015; Tang et al., 2015), ont en moyenne une réduction de leur niveau de transcrits par 3 dans les lignées *35S:EgMYB20* par rapport aux peupliers contrôles. Parmi les orthologues des régulateurs positifs *AtMYB42* et *AtMYB85*, le niveau de transcrits de *PtMYB92* augmente dans les lignées *35S:EgMYB20* (*ratio* > 2.1), tandis que *PtMYB125* a un profil opposé dans les deux lignées.

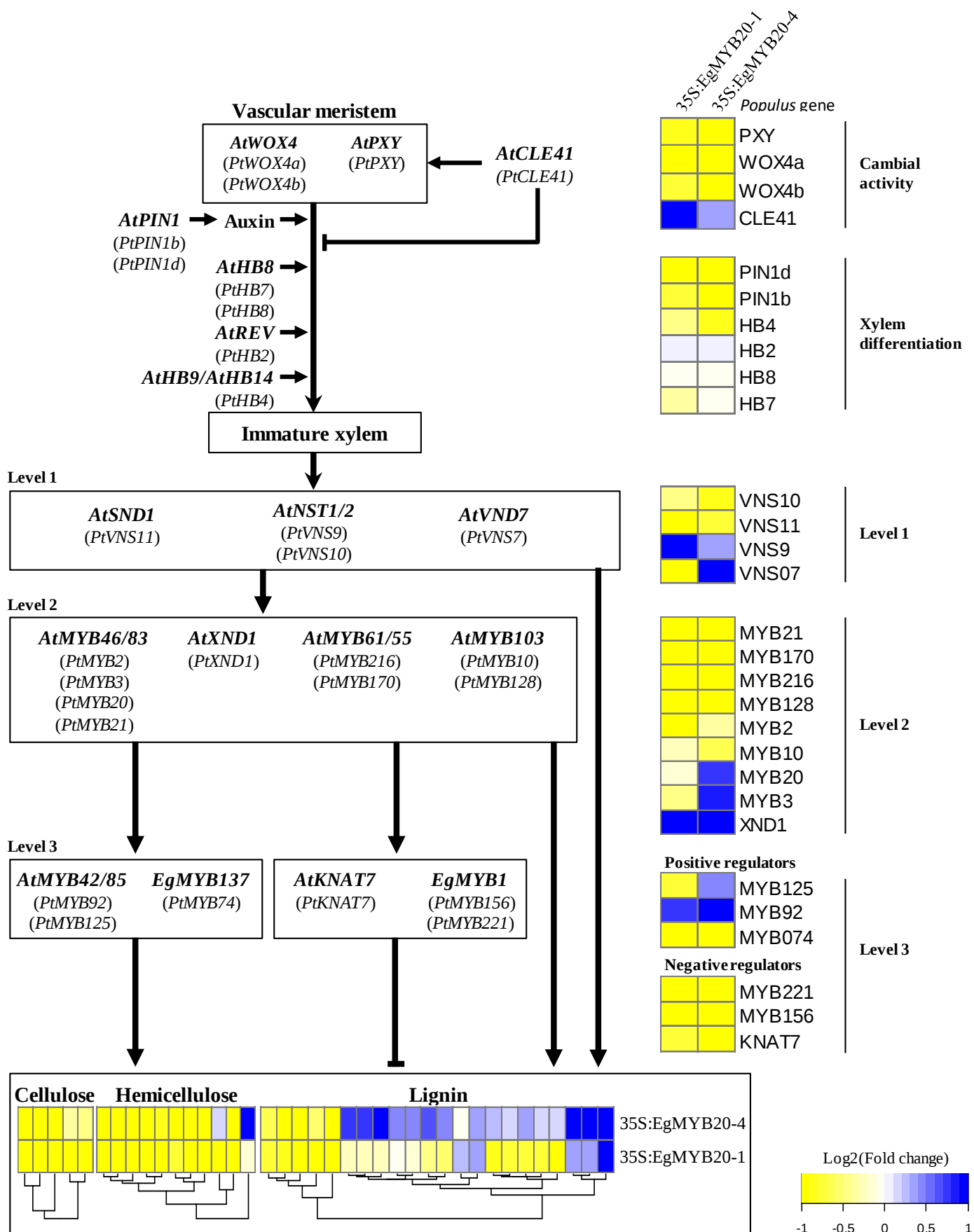


Figure 10: Effet de la surexpression d'EgMYB20 sur la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le contrôle de la différenciation du xylème et du dépôt de paroi, chez le peuplier.

Les gènes sont groupés en plusieurs niveaux, en suivant la hiérarchie du réseau de FT impliqués dans la régulation de la différenciation des cellules du xylème et de la biosynthèse de la paroi, telle qu'elle a été définie par Hussey et al. (2013). Les noms et numéros d'accessions, ont été assignés en accord avec le réseau défini par Hussey et al. (2013) et l'annotation des MYB-R2R3 du peuplier (Wilkins *et al.*, 2009) et de l'*Eucalyptus* (Soler et al., 2014). L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR dans 2 à 3 plantes par lignée, et calculée selon la méthode $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), à l'aide des amorces listées dans le Tableau S1. L'abondance des transcrits est relative à la moyenne des plantes contrôles et transformée par un Log2, tel que $\text{Log2}(35S:EgMYB20/WT)$. Chaque colonne représente une moyenne de ce ratio des différentes plantes d'une même lignée. Une couleur bleue représente une augmentation du nombre de transcrits, tandis qu'une couleur jaune représente une réduction.

4.2. Discussion - *EgMYB20*

L'effet le plus marqué de la surexpression d'*EgMYB20* est la répression d'une grande partie des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la paroi secondaire, ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse de la cellulose et des hémicelluloses. En revanche, les profils d'expression des gènes reliés à la production de lignine sont plus variables, certains gènes sont légèrement plus exprimés, d'autres réprimés. Ces données suggèrent une baisse conséquente de la synthèse des polysaccharides pariétaux, tandis que la synthèse de lignine ne semble pas réellement impactée. La régulation négative des gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires solubles dérivés de la voie des phenylpropanoïdes, suggère une redirection des flux de carbone en faveur de la production de monolignols qui sont incorporés dans le polymère de lignine. Cela contribuerait également à l'augmentation de la teneur en lignine observée. Prises dans leur ensemble, ces données pourraient expliquer l'augmentation de la teneur en lignine détectée dans le xylème des peupliers 35S:*EgMYB20*.

La forte répression des gènes impliqués dans la production de composés phénoliques solubles, atteste de l'impact de la surexpression d'*EgMYB20* sur le métabolisme secondaire et potentiellement sur le métabolisme primaire. En effet les voies de biosynthèse des composés pariétaux sont fortement connectées au métabolisme primaire (Seifert, 2004; Myburg et al., 2014). Des perturbations de la voie de biosynthèse des lignines, entraînent des modifications dans le métabolisme primaire et secondaire (Dauwe et al., 2007; Vanholme et al., 2012). Réciproquement, des perturbations dans les flux de carbone du métabolisme primaire entraînent des modifications dans la formation de la paroi (Gómez et al., 2006; Mounet-Gilbert et al., 2016). Des perturbations dans le métabolisme suite à la surexpression d'*EgMYB20* pourraient également être à l'origine des modifications observées dans la

composition de la paroi. Dans ce cas, *EgMYB20* pourrait réguler la formation de la paroi de façon indirecte, comme cela a été suggéré pour le gène *EgMYB88* (Soler et al., 2016).

La prolifération du cambium et la différenciation du xylème sont régulées par une voie de signalisation faisant intervenir le peptide CLE41 (CLAVATA3/ESR-RELATED 41). Dans le modèle établi chez *Arabidopsis*, AtCLE41 est produit dans le phloème, diffuse dans les cellules du cambium et se lie au récepteur kinase AtPXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM, Yang and Wang, 2016). Ce récepteur stimule la prolifération des cellules cambiales via l'induction de *WOX4* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4*) notamment, et inhibe leur différenciation en xylème (Yang and Wang, 2016). Chez le peuplier, il a été montré que cette voie de signalisation est conservée, avec le peptide codé par *PtCLE41* qui est spécifiquement exprimé dans le phloème et perçu par PtPXY (Etchells and Turner, 2010). Ces travaux ont également proposé l'existence d'une boucle de régulation négative dans laquelle l'expression de *PtCLE41* régule négativement la production de PtPXY. En accord avec cette hypothèse, les auteurs ont plus récemment montré que la surexpression ectopique de *PtCLE41* provoque une forte baisse de la croissance secondaire et une désorganisation des tissus conducteurs dans la tige (Etchells et al., 2015). Dans notre étude, la surexpression d'*EgMYB20* chez le peuplier, conduit à une forte réduction de la croissance en hauteur et en diamètre de l'axe principal. Cette réduction de croissance secondaire, est cohérente avec la répression des gènes *PtPXY*, *PtWOXa* et *PtWOXb*, observée dans les peupliers *35S:EgMYB20*. De façon surprenante, les transcrits de *PtCLE41*, sont détectés dans les échantillons de tige (sans écorce) des peupliers analysés et une nette induction de son expression est observée suite à la surexpression d'*EgMYB20*. Si l'on se réfère au modèle existant, cette induction de *PtCLE41* pourrait impacter négativement la production de xylème secondaire, mais aussi être responsable de la répression de *PtPXY* via une boucle de rétrocontrôle négatif (Etchells et al., 2015). Cela expliquerait la répression des gènes impliqués dans la prolifération des cellules du cambium et donc la plus faible croissance secondaire des peupliers surexprimant *EgMYB20*.

Les données de cette étude préliminaire suggèrent qu'*EgMYB20* occupe une fonction importante dans la régulation de l'activité cambiale et de la formation du bois chez l'*Eucalyptus* au cours du développement mais aussi en réponse aux stress tels que le froid, la sécheresse et la fertilisation au potassium comme le soulignent les approches intégratives indépendantes décrites dans les chapitres 1 et 2 (Ployet et al., 2017; Ployet et al., en prep.). Il reste maintenant à définir plus précisément les effets de la surexpression d'*EgMYB20* sur la structure du xylème et de la paroi secondaire, ainsi que sur la composition en polysaccharides

afin notamment de valider l'effet négatif sur la synthèse de ces derniers. Pour mieux définir son rôle et son mode d'action, il serait important d'identifier ses gènes cibles directs et son activité transcriptionnelle (répression versus activation).

4.3. Résultats - EgMYB64/EgMYB68

4.3.1. *EgMYB64* et *EgMYB68* d'*Eucalyptus* appartiennent au sous-groupe WPS-II

EgMYB64 et *EgMYB68* codent respectivement des protéines de 297 et 317 acides aminés qui présentent des structures typiques de MYB de type R2R3 avec une extrémité N-terminale contenant 2 répétitions (R2-R3), ainsi qu'une extrémité C-terminale ne contenant pas dans leur cas de motifs déjà identifiés (**Figure 11**). Elles appartiennent au « Woody Preferential Subgroup II » (WPS-II) qui ne contient aucun gène d'*Arabidopsis* ni de riz (Soler et al., 2015). Le sous-groupe WPS-II contient préférentiellement des gènes de plantes ligneuses pérennes : 5 gènes de peuplier, 3 gènes d'*Eucalyptus* (*EgMYB68*, *EgMYB64* and *EgMYB59*) ainsi qu'un gène de vigne (**Figure 12**). Les MYBs d'*Eucalyptus* appartenant au WPS-II se répartissent en deux clades : *EgMYB68* est proche d'*EgMYB59* (identité de 53%) et de 3 gènes de peuplier *Potri.003G144200.1* (52%), *Potri.003G144300.1* (51%) et *Potri.001G086700.1* (47%). *EgMYB64* est plus proche de *Potri.002G173900* (62%) et *Potri.014G100800* (61%) et d'un gène de vigne *GSVIVT01027182001* (57%).

Le sous-groupe d'*AtMYB5*, impliqué dans le développement des téguments de la graine, dans la synthèse du mucilage, et dans la morphogénèse des trichomes (Li et al., 2009) est phylogénétiquement le proche de WPS-II. Toutefois, l'homologie de séquence entre les protéines du WPS-II et *AtMYB5* est faible, de l'ordre de seulement 30%.

EgMYB68	1	MGRAPCCSKVGLRRGPWTNKEDTLLVRYIQTHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
EgMYB64	1	MGRAPCCAQVGLHRGPWTPREDSLLVNYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
Potri.002G173900	1	MGRAPCCSKVGLRRGPWTPREDAALLTEYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
Potri.014G100800	1	MGRAPCCSKVGLHRGPWTPREDTLLTKYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
GSVIVG0102718200	1	MGRAPCCSKVGLHRGSWTAREDTLLTKYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
Potri.003G144300	1	MGRAPCCSKVGLHRGPWTPREDAALLVNYIQKHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
Potri.003G144200	1	MGRAPCCSKVGLRGPWTPREDTLLINYYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
Potri.001G086700	1	MGRAPCCSKVGLRGPWTPREDTLLINYYIOAHGEGHWSRLPKKAGLLRCGKSCRLRWMNY
EgMYB59	1	MGRAPCCSKVGLHRGPWSVKEDLLLIQHIOAHGEGHWKSMKPRAGLLRCGKSCRLRWMNY
R2 MYB domain		
EgMYB68	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRVATD-
EgMYB64	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRLRN-
Potri.002G173900	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRLRSQG
Potri.014G100800	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLLVKRLRSQG
GSVIVG0102718200	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRLRSS-
Potri.003G144300	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRLQVR-
Potri.003G144200	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRVKNN-
Potri.001G086700	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNHLSKRLKNN-
EgMYB59	61	LRPDIKRGNITPDEEDLIRLHALLGNRWSLIAGRLPSRTDNEIKNYWNHLSKRVNDNN
R3 MYB domain		
EgMYB68	120	-SNENHSGLRGPKKRSNNNLITANKKKRSEKSPQEDREEEEEEVA--TTKKIKVHQP
EgMYB64	120	-QDNHPTTRPPSTKR-RKTAESTKSTKSK--HNNKKSPNRASAE-ATERPKVHL
Potri.002G173900	121	-TDPNTHKLAEPGK--REVRRRTSNSDKNTS---N-KKQSKSKAKPV-PAEKHKVHL
Potri.014G100800	121	ITDPGTHKLAEPGE--REVKKRRSNK--NTS---N-KKQNSKAKLILPAEKHKVHL
GSVIVG0102718200	120	-----KRVKISK-----DEE-----NSNHKVL
Potri.003G144300	120	-SNKNGSKCMKESADRKRNVSKLNNKKQQRK-----DDE-----D-PATRKTHAP
Potri.003G144200	120	-TAGNKSCKMGQFAG-KRSGANSKKRKRNR---ELDSEAIKSENGE-TAIIKTHL
Potri.001G086700	120	-TARNKSKCMGESAG-KRGDTKANNKRKHKE-----DNEGISSRNGE-ATTKTRIYL
EgMYB59	121	HQRNRNNRGVKGPKK--RNIVTANKVRSFTNK---Q-KQEMTNEKGET-KLTKIKVHQP
EgMYB68	177	AIRVSHIFSARN-N-SFEI-----VEVADKEVMAHDKRESNDVIINSNDLSWMMSEA
EgMYB64	174	AIRVTTSFSPRN-D-SFDC-----NTAISWSSSQG
Potri.002G173900	173	AVRFASLSARN-D-SFAS-----STTTSLSPSQG
Potri.014G100800	173	PVRFTSLSPRN-D-SFES-----NTIT-ISP
GSVIVG0102718200	140	PVRVTSLISSRN-N-SFES-----NTVSGGSGSS
Potri.003G144300	165	AIRVSPS-SV-----NIRI-----NNSMAGSSHA
Potri.003G144200	174	ATRVSPS-SVAKNINVNIIQS-----MIGSSSRH
Potri.001G086700	171	ATRVCAS-SVAKYIN-NIQS-----LIGSSSN
EgMYB59	174	PTRVS---AVARN-N-ICNSLPWGSVCVNTSNNNIL--EEQLPQQLPPYPSSGLTARSAS
EgMYB68	229	K-----EHNW-FCDDDEDYNDMVDVCGGGGG-GCGDE---MICSNDKNTSS
EgMYB64	203	G-----LLDREVAHVARSDETAGLYG--FVGDPQDRGHHEFFNGANDDSTAN
Potri.002G173900	201	RDQGYCFGTELAVDVSWSNFKDCD-----NGVAFVGDVD-----LDNGSD-----
Potri.014G100800	200	RDQGS-FGT-----GDSLVGDNDRYG---LVNGSD-----
GSVIVG0102718200	169	GGNGE-----SLPWPSFRDIRDDKIVGVGVDFIGDDQGDQD---LVASSD-----
Potri.003G144300	189	GGVGD-----HDDNW-FISDLEVKNIN-GDLAASN-RCIDD---LVH-DD-----
Potri.003G144200	201	AKIGD-----NANW-GISGLEVVSN---DGEAFNFSEEDFG---LVYDHD-----
Potri.001G086700	197	AEDGD-----HTNW-GMSGKLVANN---CGQAASNNNEEDFG-----
EgMYB59	227	DIEGV-----L-----VLDEDLINVSCECYD-----HHQET
EgMYB68	272	S--SPCHRIWLPN-NNNKKMLFKIFEEYHELIKSED---HLQ-MESFVDSLLI
EgMYB64	249	PHRLECPSEEPG-KDQNGTLENLYEEYLQLRTED--DLVQ-LDSFAESLLM
Potri.002G173900	242	---LECQSLLP-----TTDTLEKLYEEYLQVLENTNDHQDQVE-INSFAESLLV
Potri.014G100800	227	---LECQSPV-P-----TTNTLEKLYEEYLQLLEIDDRQDQVL-LDSFAESLLV
GSVIVG0102718200	212	---PESQSHMPP-----TDNSLDKLYEEYLQLLERED--TQVQ-LDSFAESLLI
Potri.003G144300	229	---LSGQNHS-P--SNIDNILEMFGEYQQLNSEN---HAQL-LDSFVDSLLA
Potri.003G144200	240	---SSCPNSLP-----NDIMLDDIFEEYQELIKPDD---HGQ-LDSLVDSLLA
Potri.001G086700	230	-----PISL-Q---KDIMLDDIFEEYQQLIKADD---HGQ-LDSFVESLLA
EgMYB59	255	T--SSREILI-PTREENDSMLOKIFEDHQLGAKD---SVQ-METEVNSLLI

Figure 11: Alignement des séquences du sous groupe Woody Preferential Subgroup II (WPS-II). Les séquences ont été alignées en utilisant l'outil d'alignement de séquence en ligne MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). L'alignement des séquences protéiques est représenté grâce à l'outil en ligne BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form).

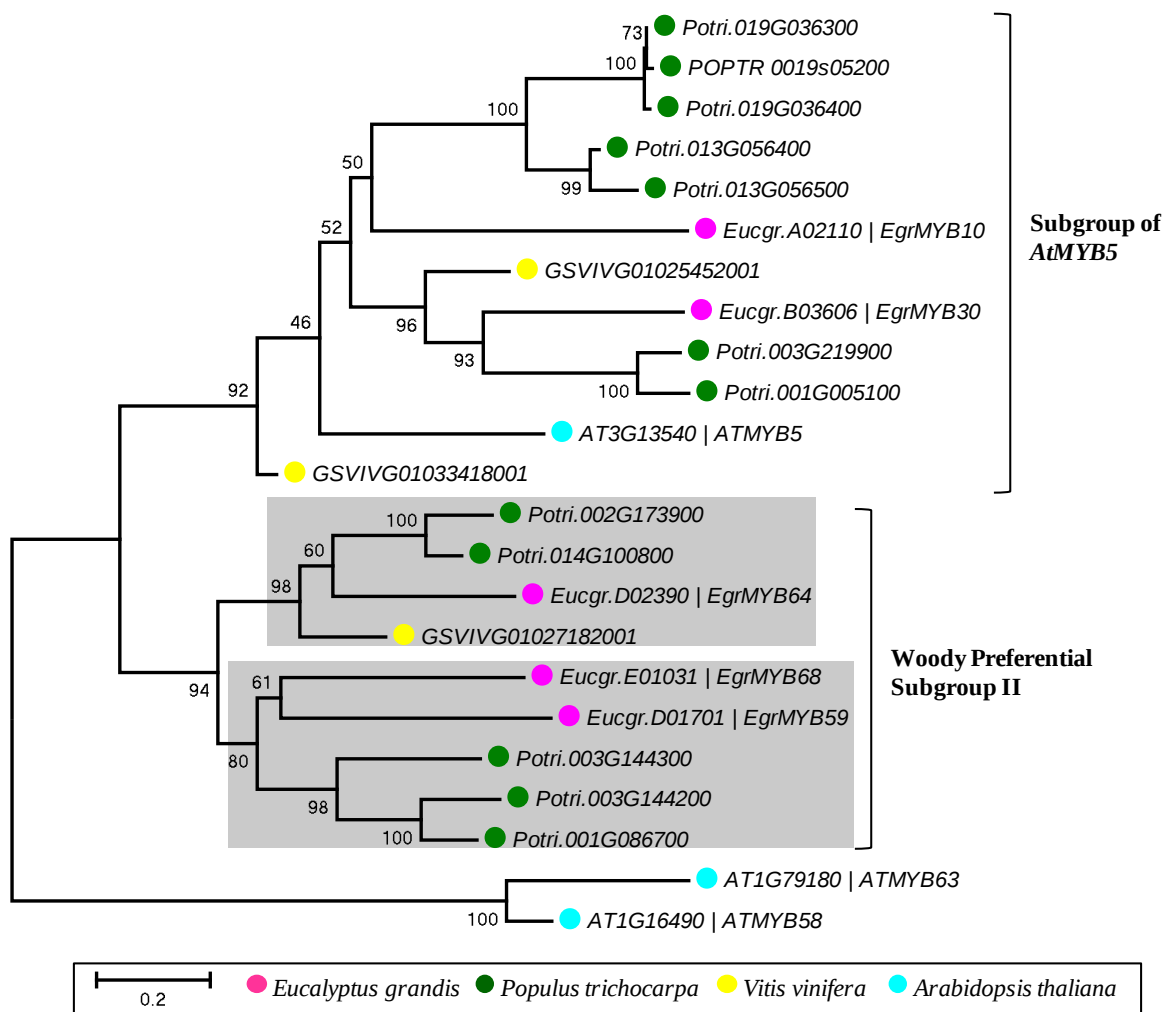


Figure 12: Analyse des relations phylogénétiques d'EgMYB64 et EgMYB68. Arbre phylogénétique du sous-groupe Woody Preferential Subgroup II et Sous-groupe d'AtMYB5, des protéines MYB-R2R3 d'A. thaliana, E. grandis, P. trichocarpa et V. vinifera (adapté de Soler et al., 2014). L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode "Neighbor-Joining", en utilisant l'outil d'alignement de séquence en ligne MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). La longueur des branches est proportionnelle aux distances évolutives calculées via la méthode Jones-Taylor-Thornton. Le test bootstrap a été effectué avec 1000 répliques. Deux protéines MYB-R2R3 d'Arabidopsis (AtMYB58 and AtMYB63) ont été utilisées pour enraciner l'arbre.

4.3.2. EgMYB64 et EgMYB68 ont des profils d'expression distincts

Les travaux précédents de Soler et al., (2015) ont montré par RT-qPCR qu'EgMYB64 et EgMYB59 étaient préférentiellement détectés dans la zone cambiale alors qu'EgMYB68 n'était pas spécifique du cambium mais était plus largement exprimé dans les tiges primaires, secondaires et dans les racines (Figure 2a).

Dans le but d'étudier plus en détail au niveau tissulaire et cellulaire l'expression d'EgMYB68 et d'EgMYB64, le gène rapporteur codant la β -glucuronidase (GUS) a été mis

sous le contrôle de leurs promoteurs respectifs (environ 2kb en amont de l'ATG). Ces constructions ont été transférées à des plantules d'*E. grandis* via un protocole de transformation par *A. rhizogenes*, permettant d'obtenir des plantes composites dont seules les racines sont transformées (Plasencia et al., 2016).

L'analyse histochimique des racines transgéniques a révélé que l'activité du promoteur *EgMYB68* se situe dans l'émergence des racines latérales (**Figure 13b**) et dans les pointes racinaires (**Figure 13c,d**). Dans ces dernières, la coloration GUS est détectée dans une zone qui inclut le méristème apical racinaire (**Figure 13d**). Dans des zones présentant une croissance secondaire, un signal plus faible est observé dans une zone située entre le xylème secondaire et le phloème secondaire, correspondant à la zone cambiale (**Figure 13e**). Aucune activité n'est détectée dans le xylème en développement.

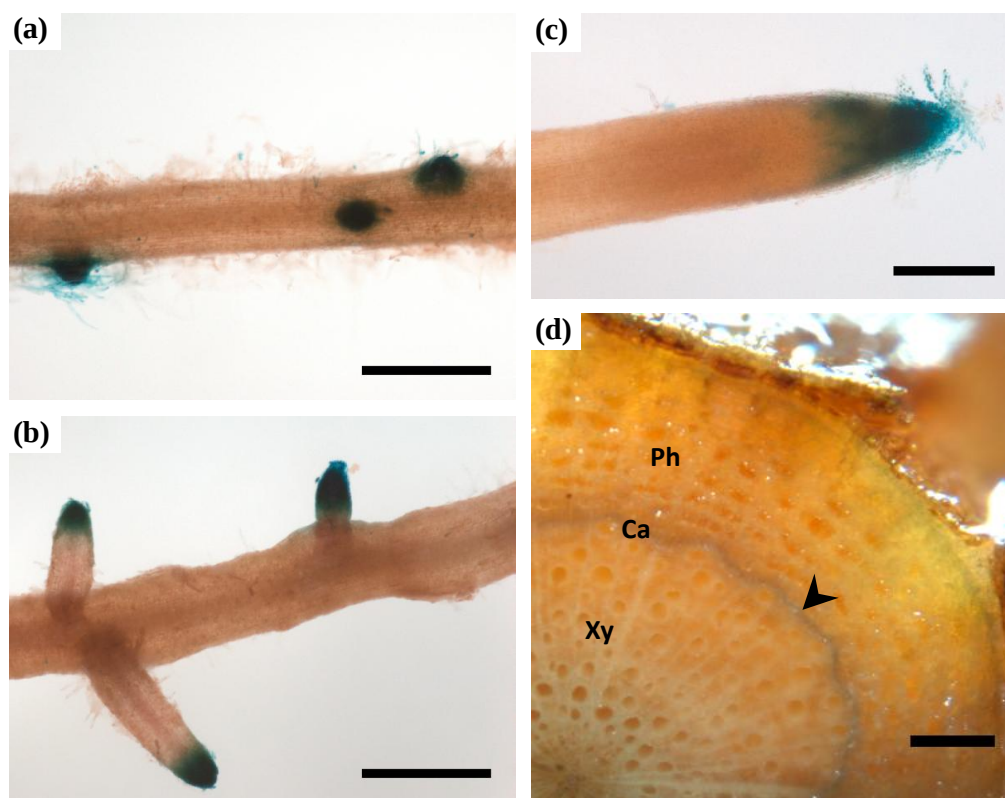


Figure 13: Localisation de l'activité du promoteur d'*EgMYB68* dans les racines d'*E. grandis*. Observation du marquage GUS dans les racines de plantes *pEgMYB68:GUS* cultivées *in vitro* (a-c), ou dans des sections transversales de racines de plantes cultivées en serre pendant 5 mois (d). Pour obtenir ce marquage, les racines de plus de 10 lignées *pEgMYB68:GUS*, ont été collectées, coupées en fragments et incubées dans la solution de coloration GUS pendant 12h. (a-c) échelle = 500 μ m, (d) échelle = 250 μ m. Ca, zone cambiale; Ph, phloème secondaire; Xy, xylème secondaire.

L'activité du promoteur d'*EgMYB64* quant à elle, est détectée au niveau des pointes des racines cultivées *in vitro*, dans une zone correspondant à l'initiation du système vasculaire (**Figure 14a,b**). Dans des racines en cours de croissance secondaire, un intense signal GUS est visualisé dans la zone cambiale sur des coupes transversales (**Figure 14c**) et sur des coupes longitudinales (**Figure 14d**).

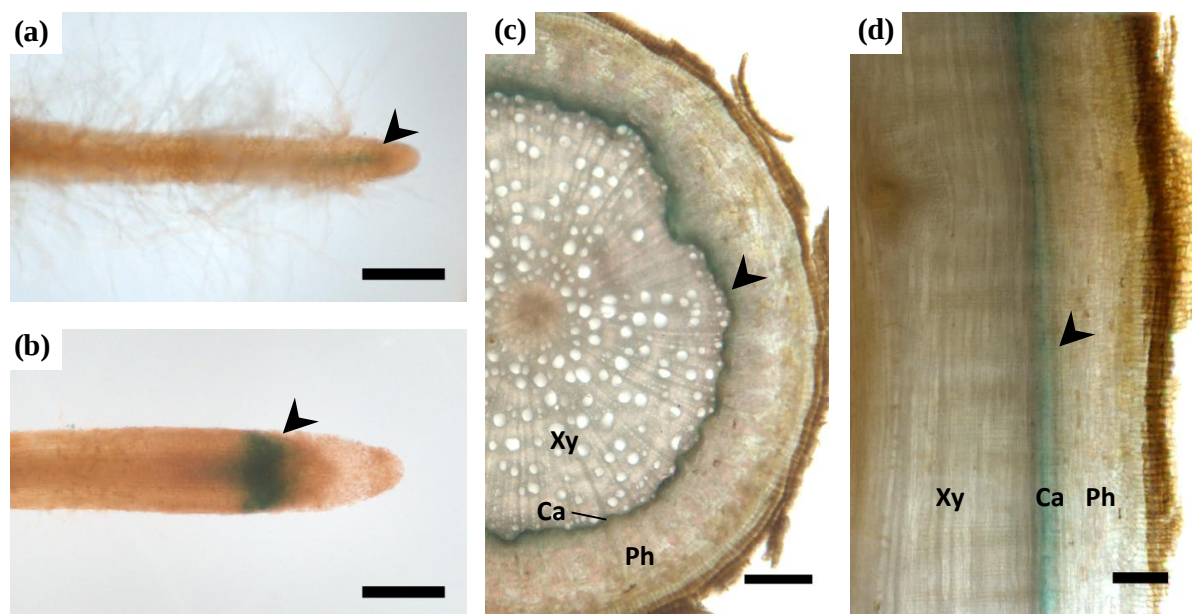


Figure 14: Localisation de l'activité du promoteur d'*EgMYB64* dans les racines d'*E. grandis*. Observation du marquage GUS dans les racines de plantes p*EgMYB64*:GUS cultivées *in vitro* (**a,b**), et dans des sections transversales (**c**) ou longitudinales (**d**) de racines de plantes cultivées en serre pendant 5 mois. Pour obtenir ce marquage, les racines de plus de 10 lignées p*EgMYB64*:GUS, ont été collectées, coupées en fragments et incubées dans la solution de coloration GUS pendant 12h. (a-d) échelle = 250 μ m. Ca, zone cambiale; Ph, phloème secondaire; Xy, xylème secondaire.

4.3.3. Chez le peuplier, la surexpression d'*EgMYB68* affecte la formation du bois tandis qu'aucun phénotype n'est détecté pour la surexpression d'*EgMYB64*

Les séquences codantes d'*EgMYB64* et d'*EgMYB68* ont été mises sous le contrôle du promoteur 35S CaMV et les constructions ont été transférées à des peupliers. Seulement deux lignées ont pu être régénérées pour *EgMYB68*. La lignée 35S:*EgMYB68-1* exprime plus fortement le transgène *EgMYB68* que la lignée 35S:*EgMYB68-3* (**Figure S1**). En ce qui concerne *EgMYB64*, 11 lignées ont pu être régénérées et un criblage par qPCR a permis de sélectionner les lignées surexprimant le plus le transgène *EgMYB64*.

Les deux lignées *35S:EgMYB68-1* et *35S:EgMYB68-3* présentent une réduction de la croissance de leur axe principal, que ce soit en hauteur (**Figure 15a**), ou en diamètre (**Figure 15b**), par rapport aux peupliers contrôles. Cette réduction de la croissance est faible et non significative dans la lignée 3, qui présente une réduction de sa croissance primaire de 5% et une réduction de sa croissance secondaire de 15%. Ce phénotype est plus marqué pour les plantes de la lignée 1, qui possèdent une tige principale en moyenne 32% moins longue et avec un diamètre 30% moins important, que les peupliers contrôles.

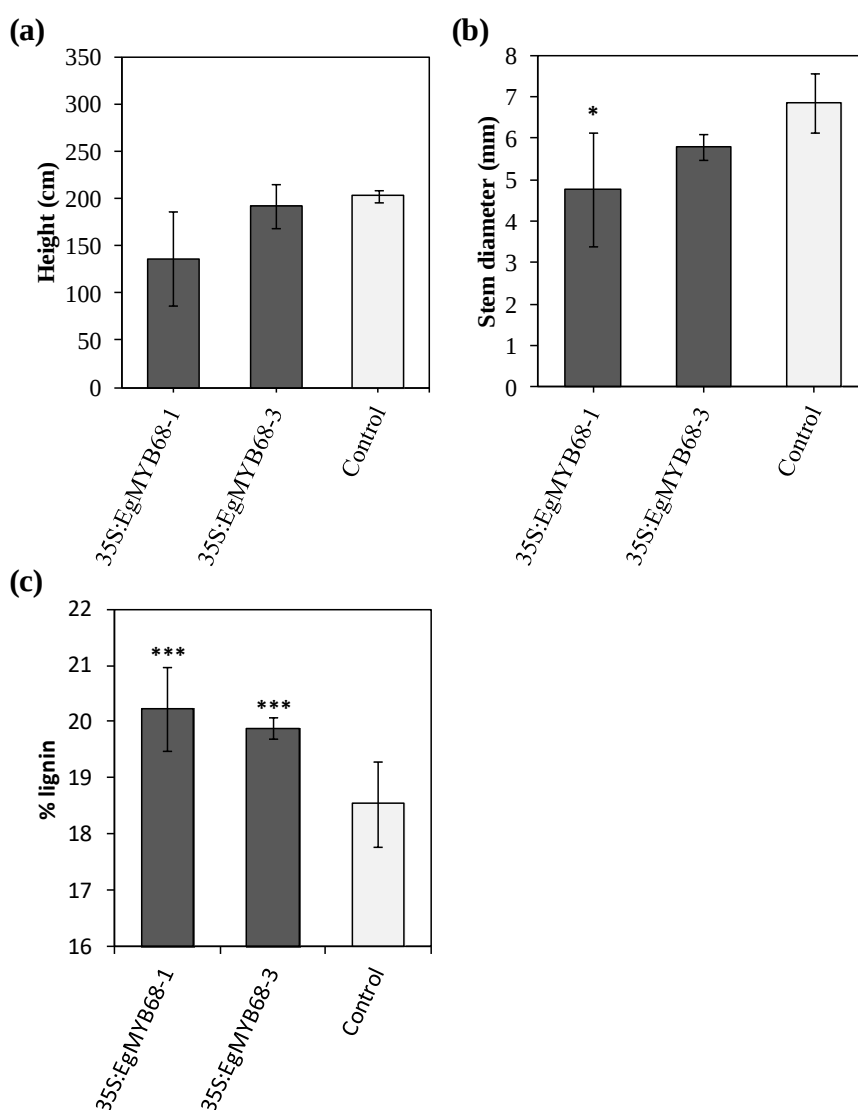


Figure 15: Modifications de la croissance et de la teneur en lignine des parois des cellules du xylème de peupliers surexprimant le facteur de transcription *EgMYB68*. Hauteur (a), diamètre (b) et contenu en lignine du xylème (c) de l'axe principal des peupliers surexprimant de façon ectopique *EgMYB68*. La hauteur des peupliers a été obtenue en mesurant l'axe principal du collet au méristème apical caulinaire. Son diamètre a été mesuré au niveau du collet. Le contenu en lignine du xylème de la tige principale sans écorce a été évalué par la méthode du bromure d'acétyle (Pitre et al., 2007). Les étoiles représentent une différence significative avec les plantes contrôles (WT). (T test de Student , n = 3 à 5, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Les teneurs en lignine des tiges (débarrassées de l'écorce) des lignées *35S:EgMYB68-1* ($20.2\% \pm 0.74$) et *35S:EgMYB68-3* ($19.9\% \pm 0.18$) sont légèrement plus élevées que celle des contrôles ($18.5\% \pm 0.76$) (**Figure 15c**). La lignée *35S:EgMYB68-1*, présente une plus forte augmentation du pourcentage de lignine dans le xylème secondaire (1.69%), que la lignée *35S:EgMYB68-3* (1.34%).

La structure du xylème des plantes contrôles (**Figure 16a**) et des plantes des deux lignées *35S:EgMYB68* ont tout d'abord été analysées en microscopie à épifluorescence (**Figure 16b**). La lignine et les composés phénoliques présentent une autofluorescence bleue sous lumière UV. Les observations des coupes transversales révèlent une altération marquée de la structure des parois secondaires des fibres qui paraît plus relâchée dans les lignées *35S:EgMYB68* (**Figure 16b**) par rapport aux contrôles (**Figure 16a**). En microscopie électronique à balayage, il semble que ce relâchement soit dû à un décollement de la sous-couche S2 (**Figure 16d, 16f vs 16c, 16e**) qui est la plus épaisse des 3 sous-couches et représente en moyenne 75 à 80% du volume total de la paroi secondaire chez les arbres (Plomion et al., 2001b) (**Figure 16c, 16e**). Sous illumination UV, la partie détachée est autofluorescente ce qui signifie qu'elle est riche en composés phénoliques et très probablement lignifiée (**Figure 16b**) et donc différente de la couche G essentiellement polysaccharidique, mise en place en réponse à un stress mécanique. Ce décollement ne semble pas concerner les vaisseaux mais seulement les fibres qui ont les parois secondaires les plus épaisses (**Figure 16d vs 16d**). Le détachement de la sous-couche S2 met au jour des structures fibreuses (**Figure 16g**, flèche blanche), d'un diamètre moyen de 20nm proche de celui des microfibrilles de cellulose (Somerville, 2006).

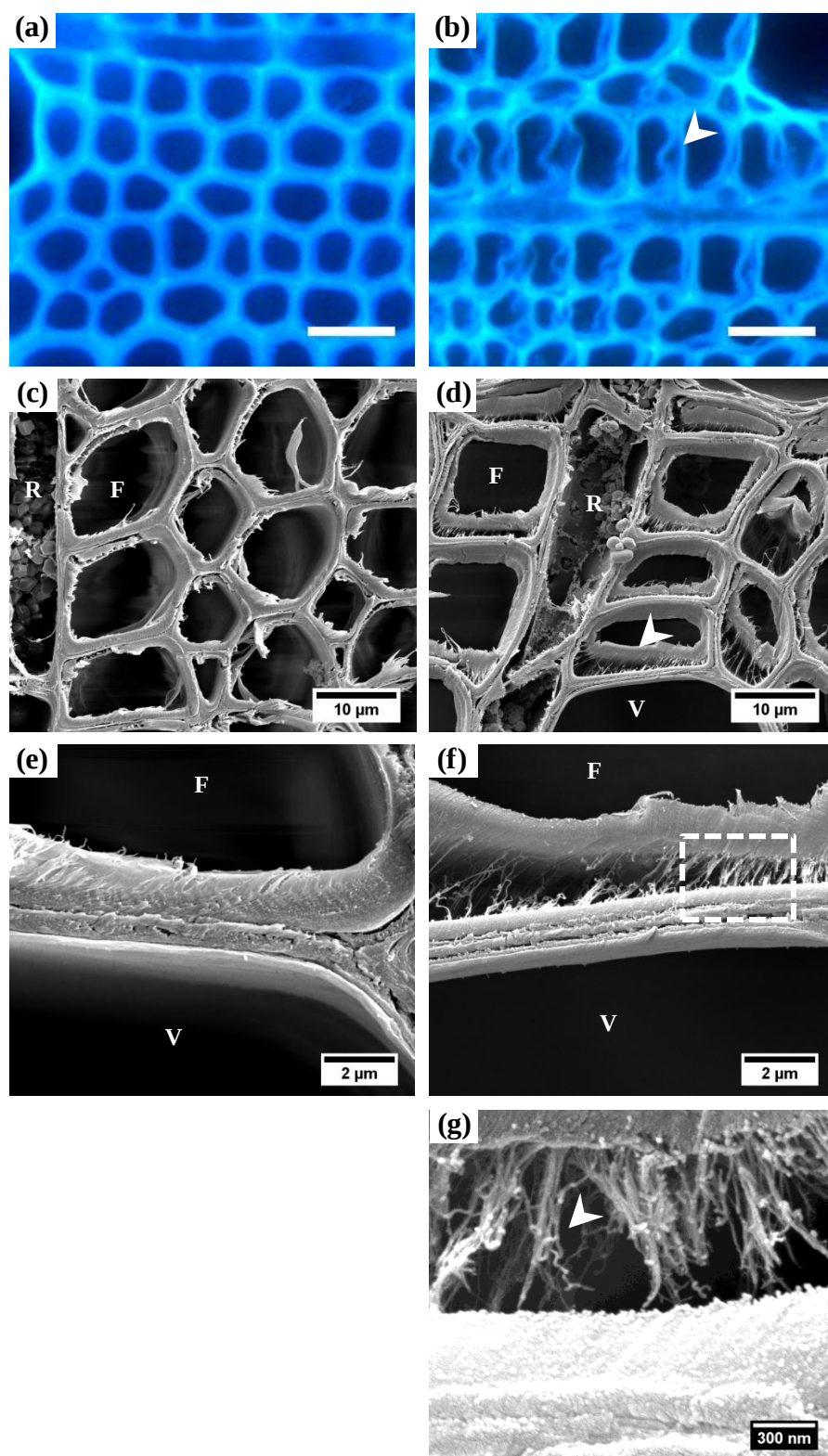


Figure 16: Observation de la structure du xylème secondaire des peupliers 35S:EgMYB68. Sections transversales du xylème secondaire de peupliers contrôles, observées en épifluorescence **(a)**, ou en microscopie électronique à balayage aux grossissements x2500 **(c)** et x11000 **(e)**. Même type d'observations des sections transversales de xylème des peupliers 35S:EgMYB68, en épifluorescence **(b)** ou en microscopie électronique à balayage aux grossissements x2500 **(d)**, x11000 **(f)** or x65000 **(g)**. Les fibres visibles dans les lignées 35S:EgMYB68 (g, flèche blanche), ont un diamètre moyen de 20nm. F, fibres; R, rayons; V, vaisseaux.

4.3.4. La surexpression d'*EgMYB68* induit une augmentation des transcrits des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire chez le peuplier

Nous avons quantifié par RT-qPCR les niveaux de transcrits de 23 gènes impliqués dans la biosynthèse des parois secondaires (**Figure 17**). Cela inclut 15 gènes codants pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la lignine. Exceptés *PtCSE1*, *PtCSE2* et *PtCAD1* qui présentent un ratio d'expression extrêmement élevé entre surexprimeurs et contrôles (ratio > 140,000), tous les autres gènes testés ont en moyenne 5.7 fois plus de transcrits dans les lignées *35S:EgMYB68* que dans les plantes contrôles. Les transcrits des gènes *PtCSE1*, *PtCSE2* et *PtCAD1* sont en très faible abondance dans les peupliers sauvages, ce qui explique la très forte induction observée dans les lignées *35S:EgMYB68*. L'ensemble des gènes impliqués dans la biosynthèse des hémicelluloses chez le peuplier, montrent en moyenne une augmentation de leur nombre de transcrits d'un facteur de 2.7 dans les lignées *35S:EgMYB68* par rapport aux contrôles. De même, les transcrits des gènes codant pour des sous unités des complexes de celluloses synthases (*PtCesA8A* and *PtCesA8B*), qui sont requis pour la biosynthèse de cellulose, sont en moyenne 2.3 fois plus abondants dans les lignées *35S:EgMYB68* par rapport aux contrôles.

Le gène *PtCHS1*, qui code une chalcone synthase, première enzyme de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, voit sa quantité de transcrits fortement augmentée (ratio > 500) dans les lignées *35S:EgMYB68* en comparaison aux contrôles (**Figure 17**).

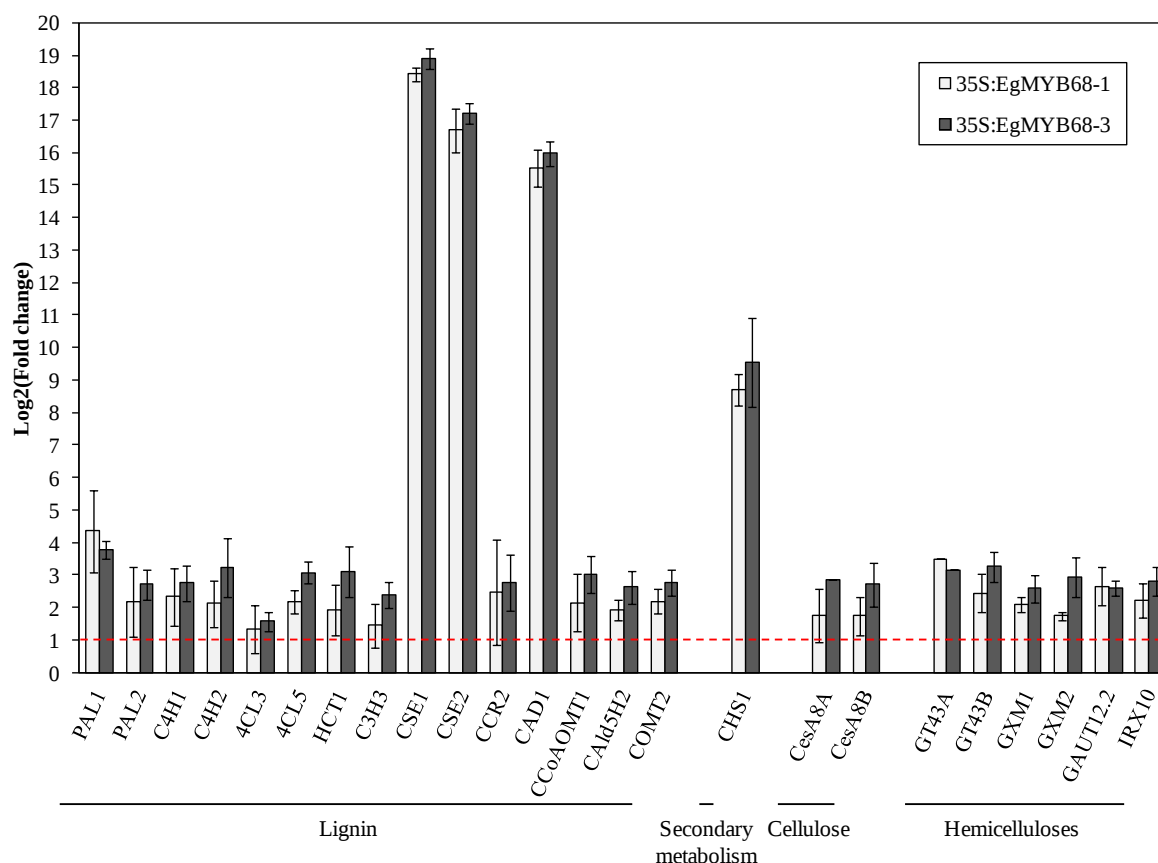


Figure 17: Profils d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi ainsi que dans biosynthèse de métabolites secondaires, dans la tige des peupliers surexprimant *EgMYB68*.

Abondance relative des transcrits de gènes reliés à la biosynthèse de la lignine, de métabolites secondaires solubles, de la cellulose et des hémicelluloses. L'expression de ces gènes a été analysée par qRT-PCR dans 2 à 3 plantes par lignée, et calculée selon la méthode $E^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), en utilisant des amorces spécifiques listées dans le Tableau S1. L'abondance des transcrits est relative à la moyenne des plantes contrôles et transformée par un Log2. La ligne en pointillés rouges, symbolise un ratio de 2, correspondant à une augmentation ou une réduction d'un facteur 2 de l'expression par rapport aux contrôles (WT). *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; *COMT*, caffeic acid O-methyltransferase; *CAD*, cinnamyl alcohol dehydrogenase; *CSE*, Caffeoyl shikimate esterase; *CAld5H*, coniferyl aldehyde 5-hydroxylase; *CesA*, cellulose synthase; *GXM*, glucuronoxylan methyltransferases; *GT43*, glycosyltransferases family 43; *IRX*, irregular xylem; *GAUT*, galacturonosyltransferase; *CHS*, chalcone synthase.

4.3.5. La surexpression d'*EgMYB64* induit des modifications dans la composition des racines d'*E. grandis*

N'ayant pas observé de phénotype chez les peupliers surexprimant *EgMYB64*, nous avons tiré parti d'un système de transformation rapide de « hairy roots » d'*E. grandis* (Plasencia et al., 2016) pour évaluer l'impact de la surexpression d'*EgMYB64* sur la formation

du xylème secondaire dans les racines. L'analyse d'un grand nombre de lignées *35S:EgMYB64* (40 lignées) ainsi que de lignées contrôles (14 lignées transformées par un vecteur vide) a mis en évidence une diminution de la teneur moyenne en lignine dans les lignées surexprimant *EgMYB64* (**Figure 18a**). Dans les racines contrôles, la lignine représente en moyenne 20.87% (± 0.83) de la masse totale de paroi, tandis que pour les lignées *35S:EgMYB64*, celle-ci ne représente en moyenne que 19.29% (± 1.31). Ce qui correspond à une réduction de 1.58% de la teneur en lignine dans les racines surexprimant *EgMYB64*, par rapport aux racines témoins. Cette réduction a été confirmée par l'analyse histochimique de coupes transversales du xylème secondaire des lignées *35S:EgMYB64*, qui en présence de phloroglucinol, montrent une coloration moins intense que les lignées contrôles (Données non présentées).

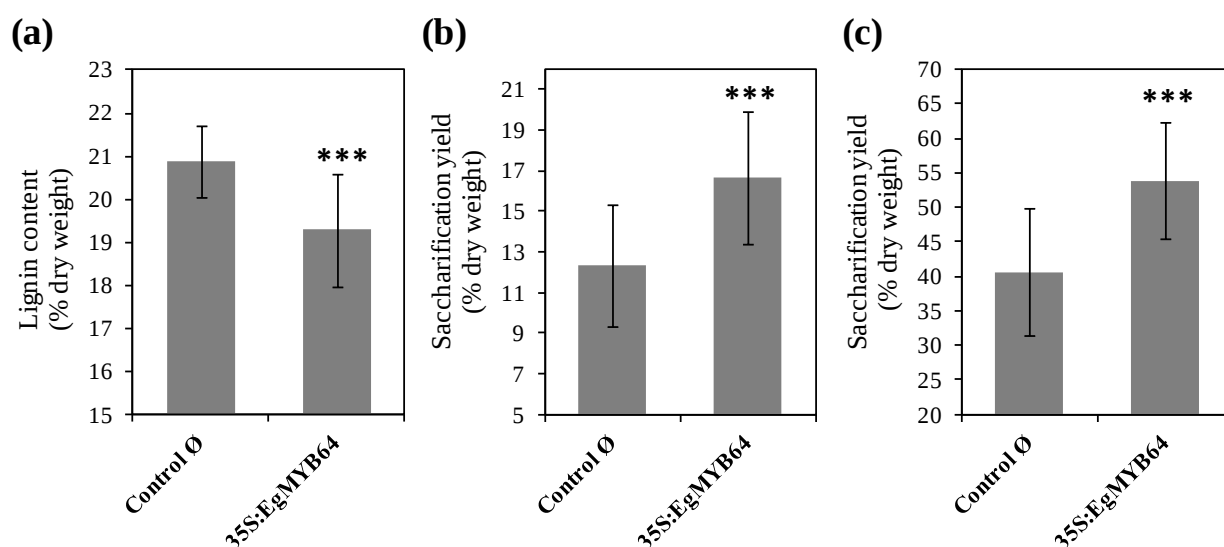


Figure 18: Impact de la surexpression d'*EgMYB64* sur la composition du xylème des racines d'*E. grandis*. Teneur en lignine (a), et rendement de saccharification sans prétraitement (b) et après prétraitement à la soude (c), d'échantillons de racines surexprimant *EgMYB64*. Le contenu en lignine a été évalué par la méthode du bromure d'acétyle (Pitre et al., 2007) sur un mélange de racines de diamètre supérieur à 2mm. Nombre de lignées indépendantes testées: 14 (vecteurs vides/contrôles), 40 (*35S:EgMYB64*). (n=14 à 40, T test de Student, *** $P < 0.001$). Le rendement de saccharification a été évalué sur les mêmes échantillons utilisés pour le bromure d'acétyle, selon le protocole mis au point par Van Acker et al. (2016). Le rendement de saccharification a été mesuré sur des échantillons traités ou non au NaOH 0.25%, et pour 48H de digestion enzymatique, sur les lignées montrant les plus fortes différences de teneur en lignine entre par rapport aux contrôles. (n=6 à 12, T test de Student, *** $P < 0.001$).

Dans le but d'évaluer les changements de composition et de structure de la paroi secondaire du xylème des racines, le potentiel de saccharification a été testé sur les lignées montrant l'augmentation de la teneur en lignine la plus marquée (**Figure 18b,c**). Dans un premier temps, le potentiel de saccharification a été évalué sur des fragments de paroi purifiés, n'ayant pas subi de prétraitement. Dans ces conditions, la quantité de sucres réducteurs libérés suite à la dégradation enzymatique de la paroi représente en moyenne 12.3% ($\pm 3\%$) de la masse de cette paroi dans les lignées contrôles et en moyenne 16.7% ($\pm 3\%$) dans les lignées 35S:EgMYB64. Lorsque les résidus de paroi purifiés subissent un prétraitement à la soude (0.25%), la quantité de sucres réducteurs libérés augmente dans les lignées contrôles 40.7% (± 9.3) de la masse de la paroi et beaucoup plus dans les lignées 35S:EgMYB64, 53.9% (± 8.3).

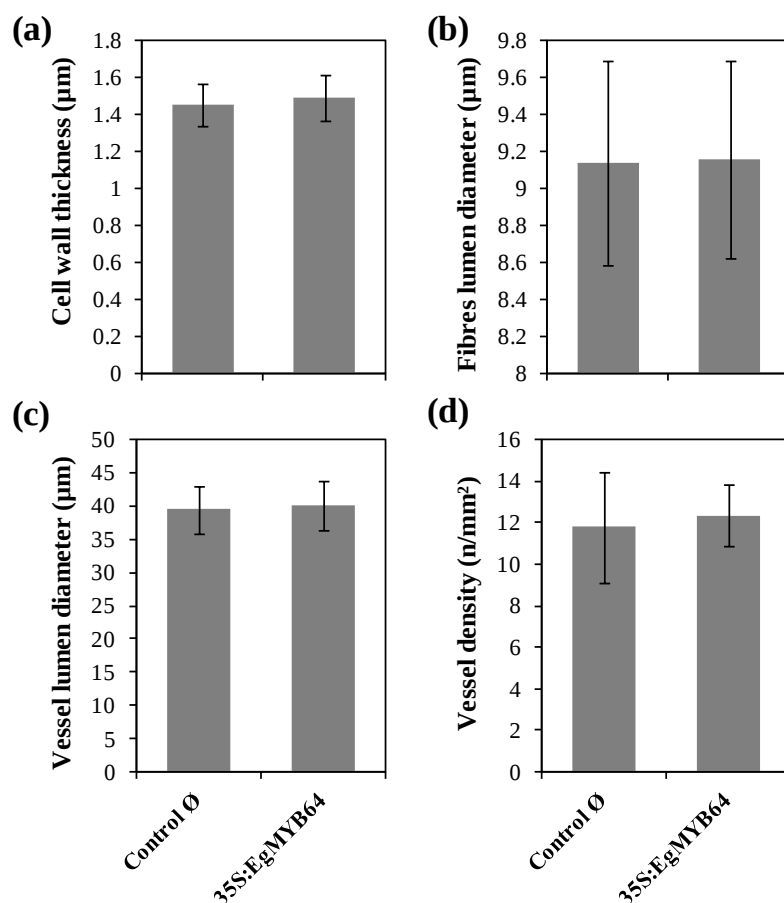


Figure 19: Impact de la surexpression d'EgMYB64, sur la structure du xylème des racines d'E. grandis. Mesures de l'épaisseur moyenne pour tous les types cellulaires (a), du diamètre moyen du lumen des fibres (b) et des vaisseaux (c), ainsi que de la densité moyenne en vaisseaux (d). Les mesures ont été effectuées sur les 5 lignées 35S:EgMYB64, et les 6 lignées contrôles (vecteurs vides), montrant les différences de teneur en lignine les plus marquées. Les mesures ont été faites de façon semie automatique, sur en moyenne 48 000 fibres et 800 vaisseaux par lignée. Aucune différence significative n'a été détectée.

Étant donné les modifications importantes observées dans la composition de la paroi, la structure du xylème secondaire a également été analysée (**Figure 19**). L'épaisseur de paroi moyenne mesurée sur un grand nombre de cellules (48 000 fibres), ne varie pas entre les lignées 35S:*EgMYB64* et les lignées contrôles (**Figure 19a**). De façon similaire, le diamètre du lumen des fibres et des vaisseaux, ainsi que la densité de ces derniers, ne sont pas significativement affectés lors de la surexpression d'*EgMYB64* (**Figure 19b-d**).

4.4. Discussion - *EgMYB68*

La surexpression d'*EgMYB68* chez le peuplier entraîne des modifications importantes de la structure et la composition du xylème secondaire. Une induction très marquée de l'ensemble des gènes impliqués dans la synthèse de la paroi secondaire (lignine, cellulose, hémicellulose) est accompagnée d'une augmentation des teneurs en lignine (1,3 à 1,7%) et semble être accompagnée également d'une augmentation de l'épaisseur des parois des fibres, qui doit être quantifiée. Ceci suggère que ce gène active le dépôt de paroi dans les cellules du xylème secondaire tout en induisant une modification de la balance entre la quantité de polysaccharides et la quantité de lignine déposées dans la paroi. Ces changements s'accompagnent d'une altération importante de la structure de la paroi secondaire dont la sous-couche S2 se détache de la S1, laissant envisager des modifications des propriétés mécaniques. Un phénotype assez similaire de défaut d'adhésion de la paroi secondaire a été obtenu chez des peupliers sous-exprimant la *laccase 3* chez lesquels les propriétés mécaniques du xylème sont altérées (Ranocha et al., 2002). Les auteurs suggèrent que *Lac3* est nécessaire à l'intégrité des parois des fibres du xylème et que certains composés phénoliques, retrouvés accumulés dans les cellules des rayons du xylème, n'auraient pas été correctement polymérisés en l'absence de cette enzyme. Pour aller plus loin dans cette comparaison des défauts d'adhésion observés entre parois secondaires de fibres de peuplier *Lac3 antisens* ou surexprimant *EgMYB68*, il serait nécessaire de mesurer le niveau de transcrits de *Lac3* dans les surexprimeurs d'*EgMYB68*, ainsi que la teneur et la composition en composés phénoliques solubles ou faiblement associés à la paroi. Une analyse fine de la composition monomérique des lignines et des types de liaisons mises en jeu serait également importante à réaliser. La très forte augmentation de l'expression du gène encodant la chalcone synthase (*CHS*) chez les surexprimeurs d'*EgMYB68*, plaide indirectement en faveur d'une augmentation du niveau des phénoliques solubles suggérant que des mécanismes communs puissent être mis en jeu dans le manque d'adhésion de la paroi secondaire entre peupliers *Lac3 antisens* et ceux surexprimant *EgMYB68*. Pour mieux caractériser les changements

responsables de ce phénotype dans les surexprimeurs *EgMYB68*, nous envisageons une analyse plus fine de l'ultrastructure des parois des fibres du xylème en microscopie électronique à transmission ainsi qu'une analyse de la topologie des composants pariétaux en immunochimie en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques de certaines hémicelluloses et des sous-unités des lignines.

Sur un plan appliqué, la résistance mécanique de la paroi secondaire est une propriété responsable de sa récalcitrance à la dégradation chimique dans les processus de fabrication de la pâte à papier (Alvira et al., 2010) et à la dégradation enzymatique lors de l'étape de saccharification préalable à l'hydrolyse des sucres simples pour la production de bioéthanol. Le profil d'individualisation des sous couches des parois des fibres du bois que l'on observe chez les peupliers surexprimant *EgMYB68* pourrait être un excellent moyen permettant de réduire les coûts de prétraitement de la biomasse lignocellulosique. C'est en effet ce qui est observé lors du traitement de fibres de bois d'*Eucalyptus* par des champignons lignivores (Yang et al., 2008) où la dégradation d'une partie de la lignine cause un relâchement de la paroi et l'individualisation des principales couches S1 et S2. L'évaluation du potentiel de saccharification des surexprimeurs *EgMYB68* sera importante à réaliser pour confirmer le potentiel impact positif du décollement de la sous couche S2.

Parallèlement aux inductions des gènes de biosynthèse de la paroi, la forte induction de la chalcone synthase, impliquée dans la production de métabolites secondaires solubles dérivés du coumaroyl-CoA, suggère qu'*EgMYB68* pourrait réguler certaines voies du métabolisme secondaire. Dans ce cas, l'augmentation de la teneur en lignine pourrait être une conséquence de cette activation du métabolisme secondaire et traduire une augmentation du flux de carbone vers la voie des phénylpropanoïdes. La production de métabolites secondaires, étant classiquement associée à la réponse au stress, cette induction de la CHS suggère une induction des voies de réponse au stress chez les peupliers surexprimant *EgMYB68*. Un tel mécanisme pourrait également expliquer la réduction de croissance, associée à une activation de la biosynthèse de paroi secondaire ainsi qu'une augmentation de la teneur en lignine dans le xylème. En effet, nous avons observé un mécanisme similaire (Ployet et al., 2017), lorsque des plants d'*Eucalyptus* sont exposés à un stress froid prolongé. Dans ces conditions de stress froid, la réduction de la croissance est accompagnée de l'activation du dépôt de paroi de façon précoce dans les cellules du xylème. Les auteurs ont également mis en évidence que cette activation du dépôt de paroi est accompagnée d'une augmentation de la teneur en lignine dans le bois. Il est intéressant de noter que dans ces

conditions de stress froid, *EgMYB68* est fortement induit dans la tige de l'*Eucalyptus*. Ce profil d'induction au stress froid, et à d'autres stress impactant la formation du xylème (Camargo et al., 2014; Ployet et al., 2017; Ployet et al., en prep), plaide en faveur de son implication dans l'adaptation de l'activité cambiale en réponse aux contraintes de l'environnement. Par conséquent, il serait pertinent de tester la résistance de ces peupliers aux principaux stress abiotiques. Des approches telles que l'analyse du métabolome et l'identification des cibles de ce FT, permettraient aussi de définir s'il peut réguler directement ou non les gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi.

4.5. Discussion - *EgMYB64*

Contrairement aux peupliers surexprimant *EgMYB68*, les analyses biochimiques et moléculaires des peupliers 35S:*EgMYB64*, n'ont pas permis de mettre en évidence un phénotype attestant d'une perturbation de la formation du bois. En effet, la teneur en lignine ainsi que le potentiel de saccharification du xylème des peupliers 35S:*EgMYB64*, ne sont pas significativement différents de celui des contrôles. De plus, les gènes impliqués dans la différenciation du xylème, ainsi que dans la biosynthèse de la paroi ne montrent pas de régulation significative. Cette absence de phénotype, pourrait résulter d'une divergence dans la structure des promoteurs des gènes cibles d'*EgMYB64* et celle de ses deux potentiels orthologues chez le peuplier. Les résultats obtenus en système homologue (racines d'*Eucalyptus*), plaident en faveur de l'hypothèse de l'absence de reconnaissance des gènes cibles par *EgMYB64* lorsqu'il est exprimé chez le peuplier. En effet, une réduction de la teneur en lignine globale, ainsi qu'une réduction du marquage de la lignine dans les parois des cellules du xylème, ont été observées dans les racines d'*E. grandis* surexprimant *EgMYB64*. Ce qui suggère qu'*EgMYB64* pourrait réguler négativement le dépôt de lignine dans le xylème secondaire. L'augmentation du rendement de saccharification est cohérente avec la réduction de la teneur en lignine. En effet, il est généralement accepté que la réduction de la quantité de lignine ou son changement de structure, augmentent l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes lytiques en réduisant l'encombrement stérique (Acker et al., 2013). Cependant, lorsque la paroi est prétraitée à la soude, le relâchement provoqué fait que le rendement de saccharification devient moins dépendant de l'arrangement spatial de la paroi mais plus de l'abondance de ses composants. Par conséquent, l'accroissement du rendement de saccharification après prétraitement à la soude, dans les lignées 35S:*EgMYB64*, suggère une augmentation de la quantité de polysaccharides contenus dans la paroi.

Cette augmentation du rendement de saccharification de plus de 30%, représente un intérêt pour la production de biocarburants par exemple (Chapple et al., 2007; McCann and Carpita, 2008). S'il est confirmé que la surexpression d'*EgMYB64* n'affecte pas la croissance, *EgMYB64* pourrait constituer un candidat d'intérêt dans des approches de génie génétique à des visées d'applications industrielles.

L'ensemble de ces données conforte l'hypothèse selon laquelle *EgMYB64* jouerait un rôle dans la formation du bois. Cependant, il serait nécessaire de passer par des approches telles qu'une analyse transcriptomique globale et l'identification de gènes cibles de ce FT pour déterminer s'il régule la formation de la paroi de façon directe ou non.

5. Discussion - Chapitre III

À notre connaissance, c'est la première fois que des facteurs MYBs absents chez *Arabidopsis* et préférentiellement ou spécifiquement exprimés dans le cambium vasculaire d'un ligneux sont caractérisés fonctionnellement. Bien que les travaux soient préliminaires et méritent d'être développés, les phénotypes pariétaux obtenus chez les peupliers ou les racines d'*Eucalyptus* surexprimant ces gènes sont prometteurs. Il sera important dans le futur de vérifier si ces gènes régulent de façon directe ou indirecte la biosynthèse de la paroi secondaire. Leur expression dans un tissu méristématique (le cambium vasculaire) pourrait laisser penser que cette régulation est très indirecte mais il faut cependant souligner que les promoteurs des gènes codant les deux dernières étapes enzymatiques de la biosynthèse des monolignols catalysées respectivement par la CCR ou la CAD (Hawkins et al., 1997; Lauvergeat et al., 2002; Lacombe et al., 2000) sont fortement exprimés dans le cambium vasculaire, qui n'est absolument pas lignifié. Il a été proposé que les monolignols synthétisés pourraient être transportés vers les cellules en voie de lignification selon un mécanisme de coopération cellulaire ou servir à la synthèse de composés dérivés des monolignols autres que les lignines tel que les lignanes (dimères de monolignols) par exemple qui peuvent avoir une activité de type cytokinine-like (Hawkins et al., 1997). Cette dernière hypothèse est particulièrement adaptée quand les promoteurs des gènes sont actifs dans les méristèmes apicaux et racinaires comme le promoteur *CAD2* et le promoteur *CCR* d'*Eucalyptus* (Lauvergeat et al., 2002, Lacombe et al., 2000), ou dans les méristèmes apicaux et axillaires des tiges comme les deux promoteurs caffeoyl coenzymeA 3-O-methyltransferase (*CCoAOMT*) de peuplier (Chen et al., 2000). Le promoteur *EgMYB68* est, comme le promoteur *CAD2* d'*Eucalyptus*, actif dans les méristèmes racinaires et dans les racines latérales émergentes.

L'analyse de l'expression tissulaire des promoteurs via un gène rapporteur, dans les racines d'*Eucalyptus*, a montré qu'*EgMYB68* et *EgMYB64* ont des profils d'expression distincts. Les deux gènes s'expriment au niveau de la zone cambiale mais beaucoup plus fortement pour *EgMYB64*. Dans les jeunes racines, *EgMYB68* est détecté dans la zone comprenant le méristème apical racinaire tandis qu'*EgMYB64* s'exprime dans une zone qui correspondrait à la position du procambium (Mähönen et al., 2000) suggérant une implication de ces gènes en amont ou dès les étapes les plus précoces de la mise en place du système vasculaire. Il faut noter toutefois que le profil spécifiquement méristématique d'*EgMYB68* n'est que partiellement en accord avec les données RT-qPCR où il était retrouvé dans le xylème au moins chez les tiges (**Figure 2b**). Ce désaccord apparent peut provenir du fait que nous avons uniquement analysé des racines transgéniques et/ou que la séquence de promoteur choisie ne reflète que partiellement le profil d'expression du gène.

En réponse à la surexpression d'*EgMYB20*, *EgMYB36* et *EgMYB68*, nous avons observé une augmentation légère (0,5%) à modérée (1,8%) de la teneur en lignine exprimée en pourcentage du résidu pariétal. Cette réponse apparemment commune n'a pas la même origine selon le gène considéré. Dans le cas d'*EgMYB36*, l'augmentation des teneurs en lignine est très légère (0,5%) et on observe une régulation positive globale de l'ensemble des gènes pariétaux plus élevée pour les gènes d'hémicelluloses, et une réduction forte de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des métabolites phénoliques solubles qui pourrait conduire à un flux de carbone plus important vers la biosynthèse des lignines. Dans le cas d'*EgMYB20*, l'augmentation des teneurs en lignine (0,9-1,8%) semble plutôt résulter d'une régulation négative de la synthèse des polysaccharides pariétaux. La synthèse des métabolites phénoliques solubles semble aussi régulée négativement et pourrait conduire à un flux de carbone plus important vers la biosynthèse des lignines. Dans le cas d'*EgMYB68* (augmentation de 1,3 à 1,6%), on assiste à une augmentation générale de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines et des polysaccharides. Le gène encodant la CHS, seul représentant de la biosynthèse des métabolites phénoliques solubles est très fortement induit.

Dans les racines d'*E. grandis* surexprimant *EgMYB64*, on observe, contrairement aux trois autres gènes, une réduction des teneurs en lignine corrélée à une augmentation du rendement de saccharification. Toutefois, la qualité médiocre des ARNs extraits n'a pas permis de mesurer les niveaux de transcrits des gènes pariétaux. Une analyse transcriptomique dans les pointes de racines est en cours.

L'analyse de l'expression des régulateurs impliqués dans les différentes étapes de la différenciation du xylème donne une image complexe et assez contrastée des régulations qui s'opèrent chez les surexprimeurs *EgMYB20* et *EgMYB36*. Les régulateurs de la paroi secondaire des niveaux 2 et 3 sont en général activés en réponse à la surexpression *d'EgMYB36* (comme le sont les gènes de biosynthèse des trois polymères pariétaux) et réprimés en réponse à la surexpression *d'EgMYB20* comme le sont surtout les gènes de biosynthèse des polysaccharides. A la lecture de ces résultats, il est possible qu'*EgMYB36* se comporte comme un activateur transcriptionnel et *EgMYB20* comme un répresseur. Ceci est bien entendu à confirmer par des approches de transactivation et par l'identification des cibles directes de ces facteurs de transcription.

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre a permis de mettre en évidence des candidats prometteurs ayant un rôle dans la formation du bois, et notamment dans le contrôle direct ou indirect de la biosynthèse des parois secondaires chez l'*Eucalyptus*. Cependant, les modifications dans la structure et/ou la composition de la paroi secondaire, demandent à être analysées plus finement au niveau microscopique. Dans le but de définir leur rôle, des approches globales de transcriptomique et métabolomique, permettraient de caractériser de manière plus exhaustive les perturbations induites par la surexpression de ces FT. Enfin, étant donné l'absence *d'a priori* quant à la fonction de ces FT, déterminer précisément leur fonction dans la régulation de la formation du bois nécessiterait d'identifier leurs gènes cibles par des approches de ChIp-Seq (immunoprécipitation de la chromatine couplée à du séquençage) par exemple.

6. Références

- Acker, R. Van, Vanholme, R., Storme, V., Mortimer, J.C., Dupree, P., and Boerjan, W. (2013). Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol. Biofuels* **6**: 46.
- Acker, R., Vanholme, R., Piens, K., and Boerjan, W. (2016). Saccharification Protocol for Small-scale Lignocellulosic Biomass Samples to Test Processing of Cellulose into Glucose. *BIO-PROTOCOL* **6**.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* **101**: 4851–4861.
- Arvidsson, S., Kwasniewski, M., Riaño-Pachón, D.M., and Mueller-Roeber, B. (2008). QuantPrime--a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR. *BMC Bioinformatics* **9**: 465.
- Babst, B.A., Harding, S.A., and Tsai, C.-J. (2010). Biosynthesis of Phenolic Glycosides from Phenylpropanoid and Benzenoid Precursors in *Populus*. *J. Chem. Ecol.* **36**: 286–297.
- Baima, S., Possenti, M., Matteucci, a, Wisman, E., Altamura, M.M., Ruberti, I., and Morelli, G. (2001). The *arabidopsis* ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**: 643–55.
- Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., Bidzinski, P., Cézard, L., Le Bris, P., Borrega, N., Hervé, J., Blondet, E., Balzergue, S., Lapierre, C., and Jouanin, L. (2011). Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* **23**: 1124–37.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Brown, D.M., Zhang, Z., Stephens, E., Dupree, P., and Turner, S.R. (2009). Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **57**: 732–746.
- Camargo, E.L.O. et al. (2014). Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol.* **14**: 256.
- Carocha, V., Soler, M., Hefer, C., Cassan-Wang, H., Fevereiro, P., Myburg, A.A., Paiva, J.A.P., and Grima-Pettenati, J. (2015). Genome-wide analysis of the lignin toolbox of *Eucalyptus grandis*. *New Phytol.* **206**: 1297–313.
- Cassan-Wang, H., Soler, M., Yu, H., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Ladouce, N., Savelli, B., Paiva, J.A.P., Leplé, J.-C., and Grima-Pettenati, J. (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.
- Chai, G., Wang, Z., Tang, X., Yu, L., Qi, G., Wang, D., Yan, X., Kong, Y., and Zhou, G. (2014). R2R3-MYB gene pairs in *Populus*: evolution and contribution to secondary wall formation and flowering time. *J. Exp. Bot.* **65**: 4255–4269.
- Chapple, C., Ladisch, M., and Meilan, R. (2007). Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nat. Biotechnol.* **25**: 746–8.
- Chedgy, R.J., Köllner, T.G., and Constabel, C.P. (2015). Functional characterization of two acyltransferases from *Populus trichocarpa* capable of synthesizing benzyl benzoate and salicyl benzoate, potential intermediates in salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* **113**: 149–159.
- Chen, C., Meyermans, H., Burggraeve, B., De Rycke, R.M., Inoue, K., De Vleeschauwer, V., Steenackers, M., Van Montagu, M.C., Engler, G.J., and Boerjan, W.A. (2000). Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar. *Plant Physiol.* **123**: 853–67.
- Côté, C.L., Boileau, F., Roy, V., Ouellet, M., Lévasseur, C., Morency, M.-J., Cooke, J.E., Séguin, A., and MacKay, J.J. (2010). Gene family structure, expression and functional analysis of HD-Zip III genes in angiosperm and gymnosperm forest trees. *BMC Plant Biol.* **10**: 273.

- Dauwe, R. et al.** (2007). Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. *Plant J.* **52**: 263–285.
- Decker, S.R. et al.** (2009). High-Throughput Screening Techniques for Biomass Conversion. *BioEnergy Res.* **2**: 179–192.
- Donner, T.J., Sherr, I., and Scarpella, E.** (2009). Regulation of preprocambial cell state acquisition by auxin signaling in *Arabidopsis* leaves. *Development* **136**: 3235–46.
- Du, J., Miura, E., Robischon, M., Martinez, C., and Groover, A.** (2011). The *Populus* Class III HD ZIP Transcription Factor POPCORONA Affects Cell Differentiation during Secondary Growth of Woody Stems. *PLoS One* **6**: e17458.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **15**: 573–581.
- Etchells, J.P., Mishra, L.S., Kumar, M., Campbell, L., and Turner, S.R.** (2015). Wood Formation in Trees Is Increased by Manipulating PXY-Regulated Cell Division.
- Etchells, J.P. and Turner, S.R.** (2010). The PXY-CLE41 receptor ligand pair defines a multifunctional pathway that controls the rate and orientation of vascular cell division. *Development* **137**.
- Fisher, K. and Turner, S.** (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. *Curr. Biol.* **17**: 1061–1066.
- Fornale, S., Lopez, E., Salazar-Henao, J.E., Fernandez-Nohales, P., Rigau, J., and Caparros-Ruiz, D.** (2014). AtMYB7, a New Player in the Regulation of UV-Sunscreens in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **55**: 507–516.
- Gallardo, F., Fu, J., Cantón, F.R., García-Gutiérrez, A., Cánovas, F.M., and Kirby, E.G.** (1999). Expression of a conifer glutamine synthetase gene in transgenic poplar. *Planta* **210**: 19–26.
- Goicoechea, M., Lacombe, E., Legay, S., Mihaljevic, S., Rech, P., Jauneau, A., Lapierre, C., Pollet, B., Verhaegen, D., Chaubet-Gigot, N., and Grima-Pettenati, J.** (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* **43**: 553–67.
- Gómez, L.D., Baud, S., Gilday, A., Li, Y., and Graham, I.A.** (2006). Delayed embryo development in the *ARABIDOPSIS* *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1* mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.* **46**: 69–84.
- Grant, E.H., Fujino, T., Beers, E.P., and Brunner, A.M.** (2010). Characterization of NAC domain transcription factors implicated in control of vascular cell differentiation in *Arabidopsis* and *Populus*. *Planta* **232**: 337–352.
- Hamberger, B., Ellis, M., Friedmann, M., de Azevedo Souza, C., Barbazuk, B., and Douglas, C.J.** (2007). Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families. This article is one of a selection of papers p. *Can. J. Bot.* **85**: 1182–1201.
- Hawkins, S., Samaj, J., Lauvergeat, V., Boudet, A., and Grima-Pettenati, J.** (1997). Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase: Identification of New Sites of Promoter Activity in Transgenic Poplar. *Plant Physiol.* **113**: 321–325.
- Hertzberg, M. et al.** (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14732–14737.
- Hirakawa, Y., Shinohara, H., Kondo, Y., Inoue, A., Nakanomyo, I., Ogawa, M., Sawa, S., Ohashi-Ito, K., Matsubayashi, Y., and Fukuda, H.** (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15208–13.
- Hu, R., Qi, G., Kong, Y., Kong, D., Gao, Q., and Zhou, G.** (2010). Comprehensive Analysis of NAC Domain Transcription Factor Gene Family in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol.* **10**: 145.

- Huang, Y., Gou, J., Jia, Z., Yang, L., Sun, Y., Xiao, X., Song, F., and Luo, K.** (2012). Molecular cloning and characterization of two genes encoding dihydroflavonol-4-reductase from *Populus trichocarpa*. *PLoS One* **7**: e30364.
- Hussey, S.G., Mizrachi, E., Creux, N.M., and Myburg, A.A.** (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* **4**: 325.
- Ilegems, M., Douet, V., Meylan-Bettex, M., Uyttewaal, M., Brand, L., Bowman, J.L., and Stieger, P.A.** (2010). Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* **137**: 975–984.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **19**: 6150–6161.
- Jouanin, L., Tourneur, J., Tourneur, C., and Casse-Delbart, F.** (1986). Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plasmid* **16**: 124–34.
- Kalluri, U.C. and Joshi, C.P.** (2004). Differential expression patterns of two cellulose synthase genes are associated with primary and secondary cell wall development in aspen trees. *Planta* **220**: 47–55.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T.** (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3059–66.
- Ko, J.-H., Prassinos, C., and Han, K.-H.** (2006). Developmental and seasonal expression of *PtaHB1*, a *Populus* gene encoding a class III HD-Zip protein, is closely associated with secondary growth and inversely correlated with the level of microRNA (*miR166*). *New Phytol.* **169**: 469–478.
- Kong, Y., Zhou, G., Avci, U., Gu, X., Jones, C., Yin, Y., Xu, Y., and Hahn, M.G.** (2009). Two Poplar Glycosyltransferase Genes, PdGATL1.1 and PdGATL1.2, Are Functional Orthologs to PARVUS/AtGATL1 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2**: 1040–1050.
- Kumar, S. et al.** (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870–1874.
- Lacombe, E., Van Doorselaere, J., Boerjan, W., Boudet, A.M., and Grima-Pettenati, J.** (2000). Characterization of cis-elements required for vascular expression of the Cinnamoyl CoA Reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J.* **23**: 663–676.
- Lauvergeat, V., Rech, P., Jauneau, A., Guez, C., Coutos-Thevenot, P., and Grima-Pettenati, J.** (2002). The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. *Plant Mol. Biol.* **50**: 497–509.
- Legay, 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**: 774–86.
- Legay, S., Lacombe, E., Goicoechea, M., Brière, C., Séguin, A., Mackay, J., and Grima-Pettenati, J.** (2007). Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci.* **173**: 542–549.
- Li, C., Wang, X., Ran, L., Tian, Q., Fan, D., and Luo, K.** (2015). PtoMYB92 is a Transcriptional Activator of the Lignin Biosynthetic Pathway During Secondary Cell Wall Formation in *Populus tomentosa*. *Plant Cell Physiol.* **56**: 2436–46.
- Liu, B., Zhang, J., Wang, L., Li, J., Zheng, H., Chen, J., and Lu, M.** (2014). A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns. *J. Exp. Bot.* **65**: 2437–2448.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* **14**: 2938–43.
- McCann, M.C. and Carpita, N.C.** (2008). Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 314–20.

- McCarthy, R.L., Zhong, R., Fowler, S., Lyskowski, D., Piyasena, H., Carleton, K., Spicer, C., and Ye, Z.-H. (2010). The Poplar MYB Transcription Factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are Involved in the Regulation of Secondary Wall Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1084–1090.
- McCarthy, R.L., Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2009). MYB83 Is a Direct Target of SND1 and Acts Redundantly with MYB46 in the Regulation of Secondary Cell Wall Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **50**: 1950–1964.
- Mellerowicz, E.J. and Gorshkova, T.A. (2012). Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition. *J. Exp. Bot.* **63**: 551–65.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem* **31**: 426–428.
- Mizrachi, E. and Myburg, A.A. (2016). Systems genetics of wood formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **30**: 94–100.
- Mounet-Gilbert, L. et al. (2016). Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* **67**: 4767–77.
- Myburg, A.A. et al. (2014). The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**: 356–62.
- Nagel, R., Elliott, A., Masel, A., Birch, R.G., and Manners, J.M. (1990). Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 325–328.
- Nakano, Y., Yamaguchi, M., Endo, H., Rejab, N.A., and Ohtani, M. (2015). NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Front. Plant Sci.* **6**: 288.
- Niculaes, C. et al. (2014). Phenylcoumaran benzylic ether reductase prevents accumulation of compounds formed under oxidative conditions in poplar xylem. *Plant Cell* **26**: 3775–91.
- Ohtani, M., Nishikubo, N., Xu, B., Yamaguchi, M., Mitsuda, N., Goué, N., Shi, F., Ohme-Takagi, M., and Demura, T. (2011). A NAC domain protein family contributing to the regulation of wood formation in poplar. *Plant J.* **67**: 499–512.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 45e–45.
- Pitre, F.E., Pollet, B., Lafarguette, F., Cooke, J.E.K., MacKay, J.J., and Lapierre, C. (2007). Effects of Increased Nitrogen Supply on the Lignification of Poplar Wood. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 10306–10314.
- Plasencia, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., Lapierre, C., Franche, C., Truchet, I., and Grima-Pettenati, J. (2015). *Eucalyptus* hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnol. J.*
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001a). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* **127**: 1513–1523.
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001b). Wood Formation in Trees Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.* **127**: 1513–1523.
- Prigge, M.J., Otsuga, D., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in Arabidopsis Development. *PLANT CELL ONLINE* **17**: 61–76.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y., and Boerjan, W. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**: 1051–71.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A.-M., and Goffner, D. (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol.* **129**: 145–55.
- Ratke, C., Pawar, P.M.-A., Balasubramanian, V.K., Naumann, M., Duncranz, M.L., Derba-Maceluch, M.,

- Gorzsás, A., Endo, S., Ezcurra, I., and Mellerowicz, E.J.** (2015). *Populus GT43* family members group into distinct sets required for primary and secondary wall xylan biosynthesis and include useful promoters for wood modification. *Plant Biotechnol. J.* **13**: 26–37.
- Rennie, E.A. and Scheller, H.V.** (2014). Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**: 100–107.
- Robischon, M., Du, J., Miura, E., and Groover, A.** (2011). The *Populus* Class III HD ZIP, popREVOLUTA, Influences Cambium Initiation and Patterning of Woody Stems. *PLANT Physiol.* **155**: 1214–1225.
- Rockwood, D.L., Rudie, A.W., Ralph, S.A., Zhu, J.Y., and Winandy, J.E.** (2008). Energy product options for eucalyptus species grown as short rotation woody crops. *Int. J. Mol. Sci.* **9**: 1361–78.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M.** (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–25.
- Seifert, G.J.** (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 277–284.
- Shi, R., Sun, Y.-H., Li, Q., Heber, S., Sederoff, R., and Chiang, V.L.** (2010). Towards a Systems Approach for Lignin Biosynthesis in *Populus trichocarpa*: Transcript Abundance and Specificity of the Monolignol Biosynthetic Genes. *Plant Cell Physiol.* **51**: 144–163.
- Sixto, H., González-González, B.D., Molina-Rueda, J.J., Garrido-Aranda, A., Sanchez, M.M., López, G., Gallardo, F., Cañellas, I., Mounet, F., Grima-Pettenati, J., and 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* **30**: 1873–1891.
- Soler, M., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Cassan-Wang, H., San Clemente, H., Savelli, B., Hefer, C.A., Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2014). The *Eucalyptus grandis* R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytol.*
- Soler, M., Plasencia, A., Lepikson-Neto, J., Camargo, E.L.O., Dupas, A., Ladouce, N., Pesquet, E., Mounet, F., Larbat, R., and Grima-Pettenati, J.** (2016). The Woody-Preferential Gene EgMYB88 Regulates the Biosynthesis of Phenylpropanoid-Derived Compounds in Wood. *Front. Plant Sci.* **7**: 1422.
- Somerville, C.** (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**: 53–78.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447–56.
- Sun, Y., Tian, Q., Yuan, L., Jiang, Y., Huang, Y., Sun, M., Tang, S., and Luo, K.** (2011). Isolation and promoter analysis of a chalcone synthase gene PtrCHS4 from *Populus trichocarpa*. *Plant Cell Rep.* **30**: 1661–1671.
- Tang, X., Zhuang, Y., Qi, G., Wang, D., Liu, H., Wang, K., Chai, G., and Zhou, G.** (2015). Poplar PdMYB221 is involved in the direct and indirect regulation of secondary wall biosynthesis during wood formation. *Sci. Rep.* **5**: 12240.
- Tian, Q., Wang, X., Li, C., Lu, W., Yang, L., Jiang, Y., and Luo, K.** (2013). Functional characterization of the poplar R2R3-MYB transcription factor PtoMYB216 involved in the regulation of lignin biosynthesis during wood formation. *PLoS One* **8**: e76369.
- Vanholme, R. et al.** (2013). Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science* **341**: 1103–6.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**: 895–905.
- Vanholme, R., Storme, V., Vanholme, B., Sundin, L., Christensen, J.H., Goeminne, G., Halpin, C., Rohde,**

- A., Morreel, K., and Boerjan, W.** (2012). A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 3506–29.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **3**: 2–20.
- Wang, S., Li, E., Porth, I., Chen, J.-G., Mansfield, S.D., and Douglas, C.J.** (2014). Regulation of secondary cell wall biosynthesis by poplar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB152 in Arabidopsis. *Sci. Rep.* **4**: 5054.
- Wilkins, O., Nahal, H., Foong, J., Provart, N.J., and Campbell, M.M.** (2009). Expansion and diversification of the Populus R2R3-MYB family of transcription factors. *Plant Physiol.* **149**: 981–93.
- Yang, J.H. and Wang, H.** (2016). Molecular Mechanisms for Vascular Development and Secondary Cell Wall Formation. *Front. Plant Sci.* **7**: 356.
- Yang, Q., Zhan, H., Wang, S., Fu, S., and Li, K.** (2008). Modification of eucalyptus CTMP fibres with white-rot fungus *Trametes hirsute* – Effects on fibre morphology and paper physical strengths. *Bioresour. Technol.* **99**: 8118–8124.
- Yang, Z.** (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evol.* **39**: 306–14.
- Yuan, Y., Teng, Q., Zhong, R., Ye, Z.-H., and Nei, M.** (2014). Identification and Biochemical Characterization of Four Wood-Associated Glucuronoxylan Methyltransferases in Populus. *PLoS One* **9**: e87370.
- Zhang, J., Nieminen, K., Serra, J.A.A., and Helariutta, Y.** (2014). The formation of wood and its control. *Curr. Opin. Plant Biol.* **17**: 56–63.
- Zhong, R., Lee, C., and Ye, Z.-H.** (2010). Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. *Plant Physiol.* **152**: 1044–55.
- Zhong, R. and Ye, Z.H.** (2015). Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol.* **56**: 195–214.
- Zhou, G.-K., Zhong, R., Richardson, E.A., Morrison, W.H., Nairn, C.J., Wood-Jones, A., and Ye, Z.-H.** (2006). The Poplar Glycosyltransferase GT47C is Functionally Conserved with Arabidopsis Fragile Fiber8. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1229–1240.
- Zhu, Y., Song, D., Sun, J., Wang, X., and Li, L.** (2013). PtrHB7, a class III HD-Zip Gene, Plays a Critical Role in Regulation of Vascular Cambium Differentiation in Populus. *Mol. Plant* **6**: 1331–1343.

7. Données supplémentaires

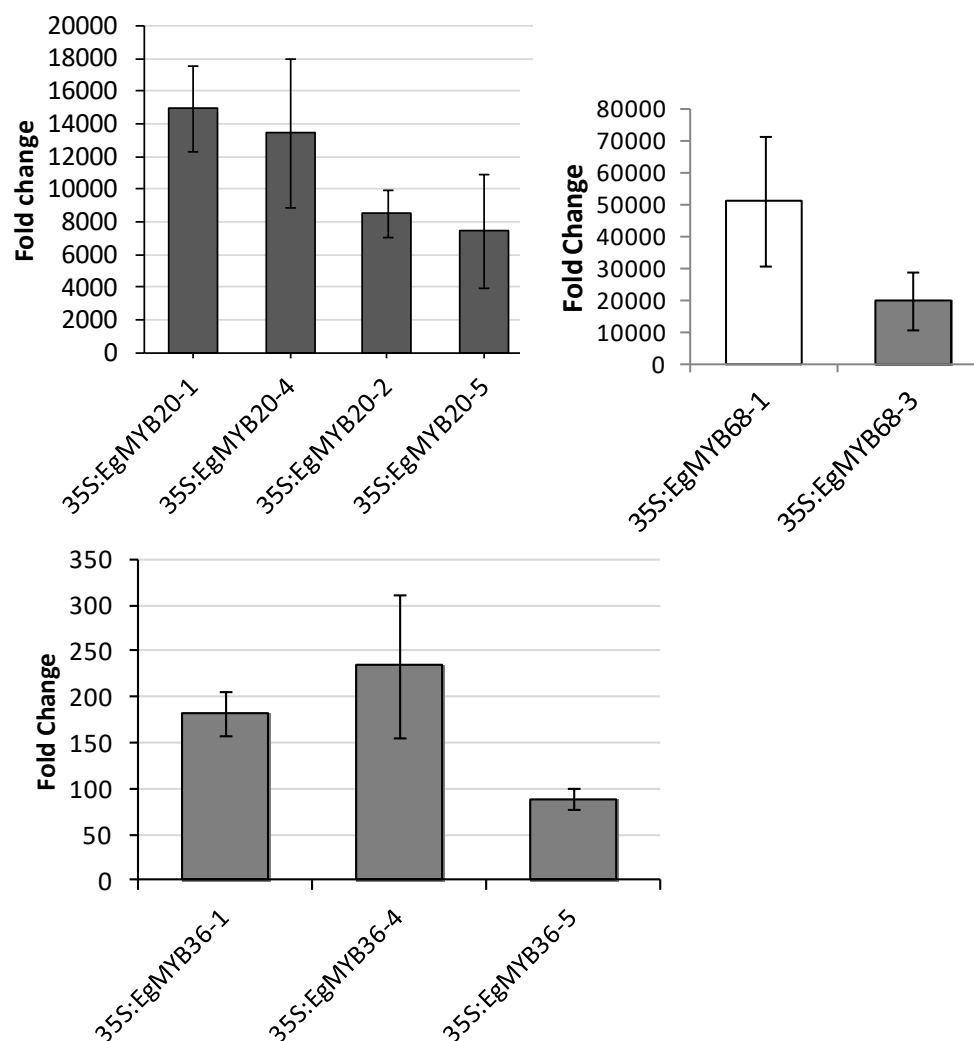


Figure S1: Surexpression du transgène dans les différentes lignées transgéniques générées.

L'expression a été testée sur 2 à 5 plantes par lignée, à l'aide d'amorces spécifiques listées dans le Tableau S1. L'expression a été calculée par la méthode $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001), en utilisant les gènes de référence *HK1*, *HK11*, and *HK17*. La valeur exprimée est un ration par rapport à l'expression moyenne dans les plantes contrôles.

Tableau S1: Séquence des amorces utilisées pour les analyses d'expression.

Gene name	primer name	sequence (5' ->3')
PtMYB2	Potri.001G258700_F	TGCCAATGAACATGGATCCGTCAC
PtMYB2	Potri.001G258700_R	GCTTGCATGGAGGTTTCCAACG
PtMYB128	Potri.003G132000_F	ACAGATGGGCTCATATTGCAAGTC
PtMYB128	Potri.003G132000_R	TTATTGTTGCAGGTGCTGAAGGC
PtMYB20	Potri.009G061500_F	TCCATGCTCAACAACCGCTATG
PtMYB20	Potri.009G061500_R	ACCCACTTGTGTCAAGCATGTAG
PtMYB21	Potri.009G053900_F	ACATGTATGGCGGTGCAAGTGG
PtMYB21	Potri.009G053900_R	AAGGACTCCAACCTTGAGCCATGC
PtMYB216	Potri.013G001000_F	TTGTGGGAAATCCAGCGACGAAG
PtMYB216	Potri.013G001000_R	GTCTTCAACCGTCTCGTTTGCG
PtMYB170	Potri.005G001600_F	AGCAACACCAATTTCTACGAGAGC
PtMYB170	Potri.005G001600_R	CGCCGGATTTCACACAATTAGC
PtMYB10	Potri.001G099800_F	ACAGATGGGCTCACATAGCAAGC
PtMYB10	Potri.001G099800_R	TCGGTTCGGTAGTTGCATTGG
PtMYB3	Potri.001G267300_F	AGGAATGCTGGCTTGCAAAGGT
PtMYB3	Potri.001G267300_R	GCCACGCTTGAGGTCAGGTC
PtMYB92	Potri.001G118800_F	GCATGGAATTGAGCGCACTTAGC
PtMYB92	Potri.001G118800_R	TCATCGCTCTAGCGTACACACG
PtMYB125	Potri.003G114100_F	TGTAGTACCGAGGATTCGCTCTTG
PtMYB125	Potri.003G114100_R	CATCAACTAGCGGAGGCTCATC
PtMYB074	Potri.015G082700_F	AATACCACAGTCTAAAGGGTTGCC
PtMYB074	Potri.015G082700_R	AAATGCTGGCTCTTGTGCAGTG
PtMYB156	Potri.009G134000_F	CCAGCCTGATCATCACCAGCCA
PtMYB156	Potri.009G134000_R	GTGCTGCCACTGCTCCCAACA
PtMYB221	Potri.004G174400_F	TGCTTGACAGTTGGGGCTACA
PtMYB221	Potri.004G174400_R	AGCCAGTTTTGGAGCCCACT
PtXND1	Potri.005G064100_F	CTGTTCCAGGAGTTTAAA
PtXND1	Potri.005G064100_R	CACATGATTCATTAACATATAAGC
PtHB7	Potri.018G045100_F	TCTCCCCTTCTCATTTTGGTTC
PtHB7	Potri.018G045100_R	AGATCCTGTAGCTTTCGCATATCC
PtHB8	Potri.006G237500_F	TAGCATTAGCACTCTCCCCTTC
PtHB8	Potri.006G237500_R	GATAGCACCTGTAGCTTTCAC
PtHB4	Potri.001G372300_F	CTCGCACTTTAGATTTAGCC
PtHB4	Potri.001G372300_R	AACAGACCCCAACAACACCAC
PtHB2	Potri.004G211300_F	GCTGGTCACTGATGAATGCG
PtHB2	Potri.004G211300_R	AAAGAATCCCTCCCAAGAAC
PtPIN1b	Potri.015G038700_F	AGAGGCACGCTCTTACACATCG
PtPIN1b	Potri.015G038700_R	TCAGCATCCCAAATATGACACCTG
PtPIN1d	Potri.016G035300_F	ATTCCAGCCTGATTGGCCTCAC
PtPIN1d	Potri.016G035300_R	GCGGGCATCATTATGTTCCACTTG
PtVNS11/ PtWND1B	Potri.001G448400_F	TGATGACAGCACCAACGACAC
PtVNS11/ PtWND1B	Potri.001G448400_R	TCCTGAACCAAGAATCTGATGAGC
PtVNS07 / PtWND6A	Potri.013G113100_F	ATGGGACATCCAAGCCAAGTGC
PtVNS07 / PtWND6A	Potri.013G113100_R	TGTTCCGGTCGGATACTTCCTATC
PtVNS10 / PtWND2B	Potri.002G178700_F	TGGCCTTAACAACCTGGGTTGCC
PtVNS10 / PtWND2B	Potri.002G178700_R	AGAGGTTTCAGCCTGGCCATTG
PtVNS9 / PtWND2A	Potri.014G104800_F	ACAACCTGGGCAACCCCTGATCG
PtVNS9 / PtWND2A	Potri.014G104800_R	GAGGTTTCAGTCTGGCCATTAAGC
PtWOX4a	Potri.002G124100_F	ATCTGCCTTGACGTGCTTTT
PtWOX4a	Potri.002G124100_R	AATCTTTTCTCAGCAAGGTTTCC
PtWOX4b	Potri.014G025300_F	TTCGAGAAAGAAGAAAGGCAAG
PtWOX4b	Potri.014G025300_R	GGTTTGTCTGAACCTCTCAACAAGT
PtPXV	Potri.003G107600_F	CGCCAGAGTATGCTTACACACTGC
PtPXV	Potri.003G107600_R	AAACTCAGCATCGACCGACCTC
PtCLE41	Potri.012G019400_F	GGTGCTGGTTCATGGATATTGC
PtCLE41	Potri.012G019400_R	GGAAATGGTGTGCTTTTGTGC
PtKNAT7	Potri.001G112200_F	CCAACCTGAAGATGACAAAGCA
PtKNAT7	Potri.001G112200_R	CTTGGAACCTCAAGGATGTCA

Ptr4CL17	Potri.012G095000_F	CATGCCTGTGTCGCCAACCATTAT
Ptr4CL17	Potri.012G095000_R	GCAACTGAACCTCCGCAATGAAC
Ptr4CL3	Potri.001G036900_F	ACTAGCCCATCCAGAGATATCCGA
Ptr4CL3	Potri.001G036900_R	TCATCTTCGGTGGCCTGAGACTTT
Ptr4CL5	Potri.003G188500_F	GTGATCATGCTCATCCTGCCAAGT
Ptr4CL5	Potri.003G188500_R	TTGGCAGCAGTAGTAATGGCACCT
PtrC4H1	Potri.013G157900_F	AGTGCGCCATAGACCATATCCTC
PtrC4H1	Potri.013G157900_R	ATTGCAGCGACGTTGATGTTCTCA
PtrC4H2	Potri.019G130700_F	GaAATGTGCAATTGATCATATTTTG
PtrC4H2	Potri.019G130700_R	ATTGCAGCAACATTGATGTTCTCC
PtrPAL1	Potri.006G126800.1_F	CCATCCAGGTCAAATTGAGGCTGCT
PtrPAL1	Potri.006G126800.1_R	ACTTCTTAGCTGCCTTCATGTAAGCT
PtrPAL2	Potri.008G038200.1_F	CCTAGAAGCCATCACCAAGTTGCTC
PtrPAL2	Potri.008G038200.1_R	GTTTCTCCATTGGGTCCCACG
PtrPAL3	Potri.016G091100_F	CATCCAGGTCAAATTGAGGCTGCA
PtrPAL3	Potri.016G091100_R	ACTTCTTAGCTGCCTTCATGTAAGC
PtrC3H3	Potri.006G033300_F	GTATGACCTTAGTGAAGACACAATCAT
PtrC3H3	Potri.006G033300_R	CCCTTGGGTTCTTGATTAGCTC
PtrHCT1	Potri.003G183900_F	ATCAGCATGTAAGGCACGCGG
PtrHCT1	Potri.003G183900_R	TGCCAAAGTAACCAGGTGGAAGCGT
PtrCAD1	Potri.009G095800_F	GGCAAGCTGATCTTGATGGGTGTT
PtrCAD1	Potri.009G095800_R	TCCCGGTGATTGACTTTCTCCCAA
PtrCAD5	Potri.009G062800_F	CTCCAGGAGGTCTACAGGAGAGAAT
PtrCAD5	Potri.009G062800_R	GTCTGAGTGACATATTCCACAAAAC
PtrCCoAOMT1	Potri.009G099800_F	CAGTAATTCAGAAAGCTGGTGTTGC
PtrCCoAOMT1	Potri.009G099800_R	GCATCCACAAAGATGAAATCAAAAC
PtrCCoAOMT2	Potri.001G304800_F	CCTTCCAACGCCAGGAAAGAGAGTA
PtrCCoAOMT2	Potri.001G304800_R	GTGGCCAACTTCTTGATGCCTTCCG
PtrCCR2	Potri.003G181400_F	CGGTGATTGAGAAAGCTGGTCTGGA
PtrCCR2	Potri.003G181400_R	GCATCCACAAAGATGAAGTCATAAG
PtrCOMT1	Potri.015G003100_F	AGCACAAATCGTCTCCAAGTACCCT
PtrCOMT1	Potri.015G003100_R	AACATTCTCCACACCAGGGAAAGC
PtrCOMT2	Potri.012G006400_F	TCTTGAAGAATTGCTATGACGCCT
PtrCOMT2	Potri.012G006400_R	GAATGCACTCAACAAGTATCACCTTG
PtrCald5H2	Potri.007G016400_F	AAGCCAATATAGGCAAGCCTGTGAATC
PtrCald5H2	Potri.007G016400_R	ATTTTATAGCCCCGAAAGCTGCTCTG
CSE1	Potri.003G059200_F	AGCGAGCCATACAAGAATTGCC
CSE1	Potri.003G059200_R	ATCGTTGCTAGTCCGCCCATTG
CSE2	Potri.001G175000_F	GGTATACGTTGCTACATGGGTGAC
CSE2	Potri.001G175000_R	TGGTAAGCCCTTGATGGTTTCGC
lac3	Potri.010G193100_F	ACATGGTGCCATTGTCATCTTTCC
lac3	Potri.010G193100_R	ACATCAGCCTTCCACCATTCACTC
lac17	Potri.001G401300_F	GTTGACATTCAAGGCTTCGAGCTG
lac17	Potri.001G401300_R	ATCAGGGCAGTTTCTGGTCTCAG
PtrCesA7B	Potri.018G103900_F	GATACATGTGCATCCTGCTTCTAA
PtrCesA7B	Potri.018G103900_R	CATCTCCATCTTAGTCAGTTTATAC
PCBER A - PCBER1	Potri.002G034400_F	TCACTTTGATCCATGGAGATGTGC
PCBER A - PCBER1	Potri.002G034400_R	ATATCACCACATCCACCTGCTTG
PCBER7	Potri.005G228700_F	TCAGATTGCGCGTGCCATTGAG
PCBER7	Potri.005G228700_R	TGCAGCAAAGCCGTTGGAAGAC
PtrCHS4	Potri.003G176700_F	CTCACTGTTGAGACTGTGGTGCT
PtrCHS4	Potri.003G176700_R	CCCCTCCTTATTGGTGCTCTCAA
PtrDFR1	Potri.002G033600_F	TACAATGTCCCTGCTAAGTTC
PtrDFR1	Potri.002G033600_R	GTGGAACAATCAGGACGCAG
PtrDFR2	Potri.005G229500_F	TACAGCTTGAGAGGAAATGTTC
PtrDFR2	Potri.005G229500_R	AAACTAAAGGGCCTCAGAATC
PdGATL1.1	Potri.014G040300.1_F	GGAGTGGATGGAACACAGA
PdGATL1.1	Potri.014G040300.1_R	GCAAGAGACTAACAGGACCA
PoGT47c	Potri.00_F9G00_F6500_F	CCACGTGGCAGGTGCTTTATG
PoGT47c	Potri.00_R9G00_R6500_R	CATGTCTCTTAGCTGGCAAAAGCG

PtrGT43A	Potri.00_F6G13100_F0	GTCGCCCTTCATCTGTCC
PtrGT43A	Potri.00_R6G13100_R0	TCCCTCATAGTTTTCTCCTGCT
PtrGT43B	Potri.016G086400_F	GTCGCCCTTCTTCAGTCCAG
PtrGT43B	Potri.016G086400_R	TTTTGTCTTCTTGATTTTCCTGA
PtrGXM1	Potri.00_F4g226800_F	ACTGCCATATTTACAGCTGGAATG
PtrGXM1	Potri.00_R4g226800_R	CTACTCTGGGCAAAAAGGTCTGTC
PtrGXM2	Potri.00_F3g00_F3800_F	AGAATGACTGCCATATATACTGCC
PtrGXM2	Potri.00_R3g00_R3800_R	CTACTCTGGGCAAAAAGGTCTGTC
PtrGXM3	Potri.013g102200_F	TGACGAGGCACCAGGGAGGATGAC
PtrGXM3	Potri.013g102200_R	CTAAGGACAAAAAAGGTCTGCCCGA
PtrGXM4	Potri.019g076300_F	TGATGAGGCTCCAGGGAGAATGAA
PtrGXM4	Potri.019g076300_R	TGGACAAAAAAGGTTTTCCCGAACT
RWA-A	Potri.00_F1G352300_F	CCCACAAAAAGACAATAAGCGG
RWA-A	Potri.00_R1G352300_R	ATGGAGGTTTTTTCTTCAACCTTG
GAUT12.2	Potri.011G132600_F	CATTTCAATGGTCGAGCA
		AAGCCTTGGC
GAUT12.2	Potri.011G132600_R	GACAGCCCGT AATGAAC TTGTCAGA
IRX10	Potri.00_F1G068100_F	GGCTCGTAAGTTGCCGCAC
IRX10	Potri.00_R1G068100_R	ACTTCTCTTACCAAGGTTTCAGGTCC
PtrCesA4	Potri.00_F2G257900_F	GGTGCATCCATGCTCCTTTT
PtrCesA4	Potri.00_R2G257900_R	GAACCCACCTTCTAGCAAAC TCA
PtrCesA7A	Potri.00_F6G181900_F	CATGTACATATTGCTTCTATGGG
PtrCesA7A	Potri.00_R6G181900_R	GCATCTCCATTTTGTGCGGTAC
PtrCesA8A	Potri.011G069600.1_F	TTCGATCCAGATTCTACTTTCTCAT
PtrCesA8A	Potri.011G069600.1_R	CATCTCGCAGTTCATGTA ACTC
PtrCesA8B	Potri.00_F4G059600_F	TTGCTGAGCTACCTCCAATAAG
PtrCesA8B	Potri.00_R4G059600_R	AGGGAAACTACAACGAGGATCA
PtSABT	Potri.013G074500_F	AATGCTATATACGGCGGGGC
PtSABT	Potri.013G074500_R	AGCTGGCCCTTCAACATACC
PtBEBT	Potri.019G043600_F	AAGGTGGGGTTGGCGCCATC
PtBEBT	Potri.019G043600_R	GGA CT TAGTTTGCGCGCTAACTG
PtrANR1	Potri.004G030700_F2	GACTTCTGAGAAACCACCCACCTG
PtrANR1	Potri.004G030700_R2	ATTTCCAGGCTGCCTTCTCAGC
PtrCHS1	Potri.014G145100_F2	AGGTGCTGATCCTGACACTTCC
PtrCHS1	Potri.014G145100_R2	TTGTGCGGCTGAAACAATCTGG

Discussion générale

Discussion générale

1. Les stress régulent-ils directement la formation de la paroi secondaire ?

Mes travaux de thèse ont montré que l'exposition de l'*Eucalyptus* à des contraintes environnementales telles que le froid ou le manque d'eau, entraîne des modifications dans la biosynthèse de la paroi secondaire des cellules du xylème, qui se traduisent, dans le cas du froid, par une augmentation du niveau d'expression de transcrits des gènes de la voie de biosynthèse des lignines ainsi que par une augmentation de l'épaisseur de paroi et des teneurs en lignines. Lors de l'exposition au froid, on observe une induction précoce des gènes impliqués dans la biosynthèse de lignine ou dans la régulation de cette voie (dès 2 jours d'exposition) et une augmentation de la teneur en lignine plus tardive. Le manque d'eau semble également induire une augmentation de la teneur en lignine dans le xylème, bien que les régulations de l'expression des gènes de biosynthèse soient moins claires que dans le cas du froid. Ces observations vont dans le même sens que les données de la littérature obtenues presque exclusivement chez des plantes annuelles et qui révèlent que l'exposition des plantes aux stress abiotiques, induit généralement des modifications dans la structure et la composition de leurs parois (Cabane et al., 2012; LeGall et al., 2015). Des données de l'équipe montrent que la surexpression d'un CBF, facteur de transcription impliqué dans la réponse aux stress et notamment au froid, modifie la structure des parois du xylème (Teulieres et al., en prep). La biosynthèse de la lignine semble affectée en réponse à la plupart des stress même si la nature des changements semble dépendante de l'espèce et de l'organe étudiés (Moura et al., 2010). La biosynthèse des hémicelluloses semble également modulée en réponse aux stress (LeGall et al., 2015; Tenhaken, 2015), tandis que la biosynthèse de la cellulose serait plus rarement affectée (Wang et al., 2016).

Des changements de la teneur en lignine ont fréquemment été corrélées avec une meilleure tolérance au froid ou au gel (Shafi et al., 2014, 2015; LeGall et al., 2015; Ji et al., 2015) mais les données de la littérature sont contradictoires. Une augmentation de la teneur en lignine a généralement été associée à une meilleure résistance, mais les mécanismes restent inconnus (Shafi et al., 2014, 2015; LeGall et al., 2015). À l'inverse, les travaux de Ji et al., (2015), associent une meilleure résistance au gel à une réduction de la teneur en lignine. Des modifications des hémicelluloses affectent également la tolérance au stress. Par exemple, la mutation du gène codant l'acétyltransférase AtESK1, impliquée dans la modification des hémicelluloses lors du dépôt de la paroi secondaire dans les cellules du xylème d'*Arabidopsis*,

engendrer une meilleure résistance à des stress abiotiques tels que le froid, la salinité (Xin et al., 2007; Lefebvre et al., 2011; Yuan et al., 2013).

L'ensemble de ces observations renforce l'hypothèse selon laquelle les propriétés physico-chimiques de la paroi constituent un paramètre important dans l'adaptation aux stress. Une augmentation de la teneur en lignine est supposée rendre les parois plus hydrophobes, plus étanches et plus rigides (Horvath et al., 2009; Vanholme et al., 2010, 2012; Al-Haddad et al., 2013; Özparpucu et al., 2017). Dans le cas du gel, cela pourrait simplement constituer une stratégie pour réduire la quantité d'eau dans l'apoplaste et ainsi limiter la formation de cristaux de glace destructeurs en cas de températures gélives. Cependant, il est considéré que pour la plupart des cellules végétales, la formation de glace dans l'apoplaste fait partie des mécanismes d'adaptation aux températures gélives (Sakai and Larcher, 1987). Dans le cas des cellules du parenchyme du xylème de certains arbres adaptés au froid extrême, ce mécanisme s'ajoute à une adaptation des propriétés de leur cytoplasme pour permettre sa surfusion lors de températures en dessous de zéro (Takata et al., 2007). Dans ces mécanismes d'adaptation visant à éviter le gel du contenu cytoplasmique, il semble que la paroi agisse comme barrière physique à la propagation de cristaux de glace extracellulaires vers l'intérieur de la cellule (Yamada et al., 2002). L'augmentation de la teneur en lignine que l'on observe pourrait traduire cette stratégie d'adaptation en vue de températures négatives.

Les modifications des propriétés de la paroi pourraient également contribuer à maintenir le transport de l'eau dans les tissus conducteurs via notamment une meilleure résistance des vaisseaux à l'implosion lors de l'embolie en cas de gel ou de sécheresse prononcée (Hacke et al., 2001). Dans le cas des *Eucalyptus* soumis au froid, il serait intéressant de mieux caractériser les changements dans l'abondance et la structure des hémicelluloses qui pourraient largement contribuer à moduler la rigidité et l'hydrophobicité des parois (Scheller and Ulvskov, 2010) en réponse à ces stress. Comparer plusieurs génotypes ayant différents niveaux de sensibilité au froid, permettrait également d'associer des modifications dans la structure de la paroi à la résistance au stress.

Les résultats de ma thèse plaident en faveur de l'hypothèse d'une régulation directe de la formation de la paroi par les contraintes environnementales, cependant on ne peut pas exclure que ces changements soient aussi la conséquence de la réduction de la croissance. En effet, la réduction de la croissance associée à des régulations de gènes potentiellement reliés à l'activité cambiale suggèrent que les stress n'impactent pas uniquement la formation de la paroi, mais également l'activité cambiale plus en amont dans le processus de formation du

bois. De façon similaire à ce qui a été observé pour la fertilisation à l'azote chez l'*Eucalyptus* (Camargo et al., 2014), lorsque les arbres sont fertilisés au potassium (Chapitre II), la croissance est stimulée et on observe une répression des voies de biosynthèse des polymères de la paroi. Ceci met en évidence un lien entre métabolisme de la paroi et croissance, et renforce l'hypothèse de l'existence d'une balance ("trade-off") entre production de paroi secondaire et croissance, comme cela a été suggéré dans certaines études (Fichot et al., 2009; Choat et al., 2011). La régulation négative de la production de paroi suite à la fertilisation, est généralement interprétée comme une redirection des flux de carbone au profit de l'activité cambiale et au détriment de ceux impliqués dans la formation de la paroi. Par homologie, on peut supposer que les stress induisent un mécanisme inverse dans lequel la réduction de la croissance augmente les flux de carbone vers la production de paroi, provoquant des changements dans sa biosynthèse comme cela a été observé dans les Chapitres I et II.

Les parois représentent un puits de carbone conséquent pour la plante. La biosynthèse des polysaccharides et de la lignine utilise des quantités importantes de sucrose et ses dérivés, qui sont également des métabolites primaires essentiels dans la physiologie et l'homéostasie cellulaire (Mizrachi and Myburg, 2016). À l'échelle de l'arbre, l'homéostasie entre séquestration du carbone (biosynthèse de la paroi) et investissement dans la croissance (activité cambiale) est modifiée lors de l'exposition aux stress. La réduction de la croissance, traduit une réduction des flux de carbone alloués à l'activité cambiale, ce qui pourrait être en faveur de la production de parois dans les cellules du xylème en différenciation. Ceci sous entend que la clé de l'adaptation aux stress serait la capacité à réguler la croissance tandis que les changements dans la biosynthèse de la paroi secondaire seraient indirects. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la majorité des FT candidats identifiés sont préférentiellement exprimés dans la zone cambiale, et semblent impacter à la fois la croissance et la biosynthèse de la paroi lorsqu'ils sont surexprimés chez le peuplier (Chapitre III).

Nous avons également observé une nette augmentation de la quantité de composés phénoliques solubles en réponse au froid, suggérant une activation des voies métaboliques secondaires. Or il est connu que les phénylpropanoïdes et leurs dérivés font partie des mécanismes mis en place par la plante pour lutter contre le stress oxydatif via leurs propriétés antioxydantes (Boerjan et al., 2003; Vogt, 2010). On peut supposer que la lignification observée en réponse au froid serait une conséquence de la surproduction de ces composés en réponse au stress oxydatif et non le résultat de régulation directe de la formation de la paroi. Des études précédentes ont mis en évidence que l'expression ectopique de gènes encodant des peroxydases, induit une plus forte lignification et une tolérance au froid plus élevée (Shafi et

al., 2014, 2015). Pour ces résultats, il reste cependant à déterminer si la résistance au froid est causée par une plus grande capacité des plantes à détoxifier les espèces réactives de l'oxygène, ou par le dépôt de lignine ectopique ou si ces deux paramètres agissent en synergie comme ce qui est suggéré par les auteurs. De façon intéressante, de nombreux gènes candidats en cours de caractérisation dans l'équipe, semblent être à l'interface entre synthèse de métabolites secondaires solubles et synthèse de la paroi. C'est le cas par exemple du FT "woody preferential" *EgMYB88*, qui a pour fonction de réguler le métabolisme secondaire dans la zone cambiale, et qui semble également contribuer à produire les précurseurs de la lignine (Soler et al., 2016). Les régulations que j'ai observé pourraient donc être plus complexes et la modification des propriétés de la paroi pourrait aller de pair avec la régulation de la croissance ainsi que d'autres mécanismes tels que la résistance au stress oxydatif.

2. Qu'apportent les approches d'intégration de données ?

A l'heure actuelle, les données "omiques" constituent le cœur des approches de biologie des systèmes et permettent la compréhension globale de systèmes biologiques complexes. Le principal défi de ces approches, est de trouver un sens biologique à partir de plusieurs milliers de variables mesurées, pouvant être de natures différentes (abondance de transcrits ou de métabolites, paramètres physiologiques). L'une des stratégies les plus utilisées se base sur l'hypothèse selon laquelle des variables ayant des profils d'évolution similaires dans plusieurs conditions, partagent probablement une relation fonctionnelle (même processus biologique, même voie de biosynthèse, même voie de régulation...). L'intégration de données, reposent généralement sur le calcul des corrélations entre ces profils, par des méthodes supervisées (MixOmics par exemple, González et al., 2012) ou non (WGCNA par exemple, Langfelder and Horvath, 2008). Les corrélations obtenues peuvent être représentées sous forme de réseaux permettant de visualiser les relations entre variables ou groupes de variables. Certains outils ont été développés pour analyser la structure de ces réseaux et facilitent la détection de groupes de variables fortement corrélées, ou modules, pouvant faire partie d'un même processus biologique (WGCNA).

La formation du bois inclut des processus très variés de l'activité cambiale aux différentes étapes de la différenciation des cellules du xylème, qui font intervenir des milliers de gènes et des régulations qui s'opèrent à de multiples niveaux (métaboliques, hormonales, transcriptionnelles, épigénétiques) (Plomion et al., 2001; Hussey et al., 2013). Des espèces pérennes telles que l'*Eucalyptus* ou le peuplier sont d'excellents modèles pour l'étude de la

formation du bois, mais ne disposent pas de ressources génétiques facilitant les études fonctionnelles (collection de mutants, transformation génétique stable rapide). Par conséquent, les approches d'intégration de données par les réseaux de corrélation, représentent une excellente alternative pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la croissance secondaire chez les arbres. Elles se sont avérées particulièrement puissantes pour l'identification de nouveaux régulateurs de la formation de la paroi chez *Arabidopsis* en réponse aux stress (Taylor-Teeples et al., 2015) et sont utilisées dans un nombre croissant d'études ciblant la formation du bois chez les espèces pérennes (Cai et al., 2014; Dharanishanthi and Dasgupta, 2016; Mizrachi et al., 2017; Shi et al., 2017; Zinkgraf et al., 2017).

Dans le cadre de ma thèse, l'utilisation des réseaux de corrélation dans l'analyse de l'effet du froid, de la sécheresse et de la fertilisation au potassium, sur la formation du bois, a permis de révéler un ensemble de gènes potentiellement impliqués dans l'activité cambiale chez *Eucalyptus* (Chapitres I et II). En effet, bien qu'*Arabidopsis* représente un bon modèle pour l'étude de la formation de la paroi secondaire, sa croissance secondaire réduite limite l'identification des acteurs de l'activité cambiale. Les résultats de mon travail concernant l'analyse des effets du manque d'eau et de la fertilisation au potassium, ont permis d'identifier plusieurs centaines de gènes reliés à la formation de la paroi secondaire. Beaucoup d'entre eux ont déjà été caractérisés chez *Arabidopsis*, ce sont orthologues de gènes qui codent pour des FT régulant la formation de la paroi secondaire ou des enzymes nécessaires à la synthèse des composés de la paroi (Zhong et al., 2011; Hussey et al., 2013). Cependant, plus d'une trentaine de FT identifiés n'ont pas de fonction prédite, et constituent de bon candidats pouvant assurer la régulation de la formation du bois, potentiellement de façon spécifique chez les arbres en réponse à des contraintes particulières de l'environnement. L'identification de ces gènes encore non caractérisés représente une avancée importante et propose de nombreux candidats pour des approches de caractérisation fonctionnelle.

3. Pourquoi la caractérisation de nouveaux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la formation du bois en réponse au stress est un défi ?

Parmi les FT candidats identifiés par les approches de biologie des systèmes décrites précédemment, la plupart des FT de type MYB-R2R3, appartiennent à des sous groupes phylogénétiques qui sont, soit plus représentés chez les ligneux, soit préférentiellement retrouvés chez ces derniers (Soler et al., 2014). Ceci laisse supposer l'existence de

mécanismes de contrôle de la croissance secondaire, propres aux espèces ligneuses. De façon intéressante, ces FT semblent être exprimés préférentiellement dans la zone cambiale et être régulés par plusieurs stress, suggérant qu'ils pourraient constituer un carrefour d'intégration des stress dans la régulation de la mise en place du xylème secondaire. Ils seraient alors impliqués dans la balance entre croissance et production de paroi secondaire en réponse aux stress.

Les données préliminaires de caractérisation fonctionnelle de ces FT, suggèrent qu'ils pourraient être impliqués à la fois dans le contrôle de l'activité cambiale et contribuer directement ou indirectement à la biosynthèse de la paroi secondaire chez *Eucalyptus* (Chapitre III). Dans le but d'évaluer plus précisément leur contribution dans la formation de la paroi secondaire, ces premiers résultats doivent être complétés par une analyse fine de la structure et de la composition des parois, au niveau biochimique (quantification des polysaccharides, composition monomérique des lignines et type de liaisons mises en jeu, rendement de saccharification...) et au niveau histochimique. Si l'on considère l'hypothèse selon laquelle ces FT pourraient réguler la biosynthèse de la paroi directement lors de l'exposition aux stress, il paraît judicieux de caractériser plus précisément les modifications dans la lignine et dans les hémicelluloses, qui semblent fréquemment affectés en cas de stress (Moura et al., 2010; LeGall et al., 2015). Des études immunochimiques pourraient permettre de localiser la distribution des monomères de lignine et des épitopes caractéristiques de différents polymères d'hémicelluloses, dans les sous couches de la paroi secondaire de lignées affectées dans l'expression de ces FT.

Compte tenu de la puissance des approches de biologie des systèmes (Chapitre II), l'intégration de données transcriptomiques, métabolomiques, ainsi que des données quantitatives relatives aux propriétés des parois, générées sur des lignées surexprimant ces gènes, permettraient d'obtenir une image plus complète des interactions complexes entre les gènes, les métabolites, et les propriétés pariétales, et ainsi d'affiner notre compréhension du rôle de ces FT.

Par ailleurs, les approches de surexpression sont les plus couramment utilisées pour caractériser fonctionnellement les facteurs de transcription pour lesquels la redondance fonctionnelle empêche souvent d'observer un phénotype. Cependant, elles ne sont pas totalement satisfaisantes puisque la surexpression ectopique entraîne généralement une expression du transgène dans des tissus ou cellules où il n'est pas présent habituellement, conduisant à des effets pléiotropiques. L'utilisation de promoteurs tissu-spécifiques ou inductibles est une alternative assez difficile à mettre en œuvre pour des gènes reliés à la

croissance secondaire et peut ne pas conduire à l'observation de phénotype. En revanche, des technologies émergentes chez les ligneux telles que le « genome editing » par la technologie CRISPR-cas9 (Tsai and Xue, 2015; Xue et al., 2015; Zhou et al., 2015) permettent d'éteindre simultanément un ou plusieurs paralogues et seraient particulièrement adaptées à la création de racines transgéniques mutées par exemple.

Étant donné la complexité des processus dans lesquels ces FT semblent impliqués (activité cambiale, formation de la paroi, réponse aux stress), l'identification de leurs gènes cibles s'avère une étape incontournable pour la compréhension de leur rôle. La technique la plus utilisée à présent est l'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage (ChiP-Seq; Landt et al., 2012). L'utilisation d'anticorps commerciaux dirigés contre une étiquette (de type GFP, MYC) fusionnée au FT, serait une alternative à la production d'anticorps spécifiques longue et coûteuse. Le système homologue que constituent les racines transgéniques d'*Eucalyptus* semble être un bon modèle pour développer ce type d'approche.

Ces gènes ayant potentiellement un rôle clé dans la plasticité de la formation du bois face aux contraintes de l'environnement, le phénotypage des lignées transgéniques pour leur résistance à différents stress abiotiques, permettrait de relier les modifications du phénotype à la résistance aux stress, offrant alors la possibilité d'éclaircir les stratégies adoptées par l'*Eucalyptus* pour résister aux stress et le rôle des tissus conducteur de la tige et des racines dans ces stratégies.

Jusqu'à présent, dans la sélection de nouveaux génotypes, la productivité et la qualité du bois étaient parmi les traits principaux que les sélectionneurs cherchaient à améliorer. Face au changement climatique et aux contraintes environnementales associées, qui affectent de plus en plus les plantations, il devient évident que la résistance aux stress est un trait important à prendre en compte dans le processus de sélection. En France, les sélectionneurs d'*Eucalyptus* (notamment le FCBA) s'efforcent de sélectionner des génotypes alliant, une forte productivité et une résistance au froid/gel, tout en conservant des propriétés du bois adaptées aux utilisations industrielles. Tout porte à croire que les FT identifiés au cours de ma thèse, sont des régulateurs clés intervenant précisément dans cette balance entre adaptation aux stress et croissance du bois. Avec comme objectif l'utilisation de ces connaissances dans la sélection de nouveaux génotypes, il serait pertinent de déterminer si le polymorphisme de ces gènes explique des caractères différents de croissance et/ou de résistance aux stress, et si ils constituent des eQTLs avec des gènes impliqués dans la croissance ou la résistance aux stress.

Une autre stratégie consisterait à tirer profit des analyses intégratives visant à caractériser les perturbations induites lorsque le profil d'expression des gènes candidats est affecté. Donner une valeur prédictive à ces modèles, permettrait à terme, de créer un véritable outil de sélection variétale ou de prédiction des réponses physiologiques chez l'*Eucalyptus*. Ce qui implique de replacer ces régulations dans un schéma plus global de l'adaptation de l'arbre aux stress, qui intégrerait des données génétiques (SNP, eQTL) tel que cela a récemment été développé chez l'*Eucalyptus* (Mizrachi and Myburg, 2016; Mizrachi et al., 2017) ou encore des marques de régulation épigénétique dont l'importance dans la réponse aux stress chez les arbres ne cesse de croître (Bräutigam et al., 2013). Le développement de ce type d'approche sur certains gènes candidats de l'équipe, ainsi que l'analyse des marques épigénétiques lors de l'adaptation de la formation du bois en réponse au froid, sont en cours dans le cadre de projets qui s'inscrivent dans la continuité de mon travail au sein de l'équipe.

4. Références

- Al-Haddad, J.M., Kang, K.-Y., Mansfield, S.D., Telewski, F.W., W, B., F, L., C, L., and K, R.** (2013). Chemical responses to modified lignin composition in tension wood of hybrid poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*). *Tree Physiol.* **33**: 365–373.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Bräutigam, K. et al.** (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecol. Evol.* **3**: 399–415.
- Cabane, M., Afif, D., and Hawkins, S.** (2012). Chapter 7 – Lignins and Abiotic Stresses. In *Advances in Botanical Research*, pp. 219–262.
- Cai, B., Li, C.-H., Huang, J., Reuber, L., and 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.
- Camargo, E.L.O. et al.** (2014). Contrasting nitrogen fertilization treatments impact xylem gene expression and secondary cell wall lignification in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biol.* **14**: 256.
- Choat, B., Medek, D.E., Stuart, S.A., Pasquet-Kok, J., Egerton, J.J.G., Salari, H., Sack, L., and Ball, M.C.** (2011). Xylem traits mediate a trade-off between resistance to freeze-thaw-induced embolism and photosynthetic capacity in overwintering evergreens. *New Phytol.* **191**: 996–1005.
- Dharanishanthi, V. and Dasgupta, M.G.** (2016). Construction of co-expression network based on natural expression variation of xylogenesis-related transcripts in *Eucalyptus tereticornis*. *Mol. Biol. Rep.* **43**: 1129–1146.
- Fichot, R., Laurans, F., Monclus, R., Moreau, A., Pilate, G., and Brignolas, F.** (2009). Xylem anatomy correlates with gas exchange, water-use efficiency and growth performance under contrasting water regimes: evidence from *Populus deltoides* x *Populus nigra* hybrids. *Tree Physiol.* **29**: 1537–1549.
- González, I., Cao, K.-A.L., Davis, M.J., and Déjean, S.** (2012). Visualising associations between paired “omics” data sets. *BioData Min.* **5**: 19.
- Hacke, U.G., Sperry, J.S., Pockman, W.T., Davis, S.D., and McCulloh, K.A.** (2001). Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* **126**: 457–461.
- Horvath, L., Peszlen, I., Perry, P., Bohumil, K., and Laigeng, L.** (2009). *Wood and fiber science : journal of the Society of Wood Science and Technology.* (The Society).
- Hussey, S.G., Mizrachi, E., Creux, N.M., and Myburg, A.A.** (2013). Navigating the transcriptional roadmap regulating plant secondary cell wall deposition. *Front. Plant Sci.* **4**: 325.
- Ji, H., Wang, Y., Cloix, C., Li, K., Jenkins, G.I., Wang, S., Shang, Z., Shi, Y., Yang, S., and Li, X.** (2015). The Arabidopsis RCC1 Family Protein TCF1 Regulates Freezing Tolerance and Cold Acclimation through Modulating Lignin Biosynthesis. *PLoS Genet.* **11**: e1005471.
- Landt, S.G. et al.** (2012). ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res.* **22**: 1813–31.
- Langfelder, P. and Horvath, S.** (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**: 559.
- Lefebvre, V., Fortabat, M.-N., Ducamp, A., North, H.M., Maia-Grondard, A., Trouverie, J., Boursiac, Y., Mouille, G., and Durand-Tardif, M.** (2011). ESKIMO1 disruption in *Arabidopsis* alters vascular tissue and impairs water transport. *PLoS One* **6**: e16645.
- LeGall, H., Philippe, F., Domon, J., Gillet, F., Pelloux, J., and Rayon, C.** (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress.: 112–166.
- Mizrachi, E. and Myburg, A.A.** (2016). Systems genetics of wood formation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **30**: 94–

- Mizrachi, E., Verbeke, L., Christie, N., Fierro, A.C., Mansfield, S.D., Davis, M.F., Gjersing, E., Tuskan, G.A., Van Montagu, M., Van de Peer, Y., Marchal, K., and Myburg, A.A.** (2017). Network-based integration of systems genetics data reveals pathways associated with lignocellulosic biomass accumulation and processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: 1195–1200.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P.** (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360–76.
- Özparpucu, M., Rüggeberg, M., Gierlinger, N., Cesarino, I., Vanholme, R., Boerjan, W., and Burgert, I.** (2017). Unravelling the impact of lignin on cell wall mechanics - a comprehensive study on young poplar trees downregulated for CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD). *Plant J.*
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A.** (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* **127**: 1513–1523.
- Sakai, A. and Larcher, W.** (1987). *Frost Survival of Plants : Responses and Adaptation to Freezing Stress* (Springer Berlin Heidelberg).
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P.** (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 263–289.
- Shafi, A., Chauhan, R., Gill, T., Swarnkar, M.K., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Kumar, N., Shankar, R., Ahuja, P.S., and Singh, A.K.** (2015). Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress. *Plant Mol. Biol.* **87**: 615–31.
- Shafi, A., Dogra, V., Gill, T., Ahuja, P.S., and Sreenivasulu, Y.** (2014). Simultaneous Over-Expression of PaSOD and RaAPX in Transgenic Arabidopsis thaliana Confers Cold Stress Tolerance through Increase in Vascular Lignifications. *PLoS One* **9**: e110302.
- Shi, R., Wang, J.P., Lin, Y.-C., Li, Q., Sun, Y.-H., Chen, H., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L.** (2017). Tissue and cell-type co-expression networks of transcription factors and wood component genes in Populus trichocarpa. *Planta*: 1–12.
- Soler, M., Camargo, E.L.O., Carocha, V., Cassan-Wang, H., San Clemente, H., Savelli, B., Hefer, C.A., Paiva, J.A.P., Myburg, A.A., and Grima-Pettenati, J.** (2014). The Eucalyptus grandis R2R3-MYB transcription factor family: evidence for woody growth-related evolution and function. *New Phytol.*
- Soler, M., Plasencia, A., Lepikson-Neto, J., Camargo, E.L.O., Dupas, A., Ladouce, N., Pesquet, E., Mounet, F., Larbat, R., and Grima-Pettenati, J.** (2016). The Woody-Preferential Gene EgMYB88 Regulates the Biosynthesis of Phenylpropanoid-Derived Compounds in Wood. *Front. Plant Sci.* **7**: 1422.
- Takata, N., Kasuga, J., Takezawa, D., Arakawa, K., and Fujikawa, S.** (2007). Gene expression associated with increased supercooling capability in xylem parenchyma cells of larch (Larix kaempferi). *J. Exp. Bot.* **58**: 3731–42.
- Taylor-Teeple, M. et al.** (2015). An Arabidopsis gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature* **517**: 571–5.
- Tenhaken, R.** (2015). Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* **5**: 771.
- Tsai, C.-J. and Xue, L.-J.** (2015). CRISPRing into the woods. *GM Crops Food* **6**: 206–215.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153**: 895–905.
- Vanholme, R., Morreel, K., Darrah, C., Oyarce, P., Grabber, J.H., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2012). Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. *New Phytol.* **196**: 978–1000.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **3**: 2–20.
- Wang, T., McFarlane, H.E., and Persson, S.** (2016). The impact of abiotic factors on cellulose synthesis. *J.*

Exp. Bot. **67**: 543–552.

- Xin, Z., Mandaokar, A., Chen, J., Last, R.L., and Browse, J.** (2007). Arabidopsis ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance. *Plant J.* **49**: 786–99.
- Xue, L.-J., Alabady, M.S., Mohebbi, M., and Tsai, C.-J.** (2015). Exploiting genome variation to improve next-generation sequencing data analysis and genome editing efficiency in *Populus tremula* × *alba* 717-1B4. *Tree Genet. Genomes* **11**: 82.
- Yamada, T., Kuroda, K., Jitsuyama, Y., Takezawa, D., Arakawa, K., and Fujikawa, S.** (2002). Roles of the plasma membrane and the cell wall in the responses of plant cells to freezing. *Planta* **215**: 770–778.
- Yuan, Y., Teng, Q., Zhong, R., and Ye, Z.-H.** (2013). The Arabidopsis DUF231 Domain-Containing Protein ESK1 Mediates 2-O- and 3-O-Acetylation of Xylosyl Residues in Xylan. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1186–1199.
- Zhong, R., McCarthy, R.L., Lee, C., and Ye, Z.-H.** (2011). Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Plant Physiol.* **157**: 1452–68.
- Zhou, X., Jacobs, T.B., Xue, L.-J., Harding, S.A., and Tsai, C.-J.** (2015). Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol.* **208**: 298–301.
- Zinkgraf, M., Liu, L., Groover, A., and Filkov, V.** (2017). Identifying gene coexpression networks underlying the dynamic regulation of wood-forming tissues in *Populus* under diverse environmental conditions. *New Phytol.*

Abstract

Due to its outstanding growth combined to superior wood properties, *Eucalyptus* genus has become the most planted hardwood on earth and emerged as the most appealing sources of renewable biomass feedstock for paper and second-generation biofuels. Wood is composed of lignified secondary cell walls (SCWs) and its formation is tightly regulated by a complex, partially unknown, transcription factors (TFs) network. SCWs are composed by 80% of polysaccharides targeted for most of value-added bioproducts, whereas lignin (20%) is responsible for biomass recalcitrance to enzymatic degradation but increase wood energetic potential for combustion.

Despite its remarkable adaptability to various soils and climate environment *Eucalyptus* growth varies strongly according to these factors. *Eucalyptus* is extensively grown in highly weathered soils in tropical and subtropical regions where plantations are facing more frequent drought episodes in combination to nutrient starvation, requiring high amounts of expensive fertilizers. In temperate regions such as North of Europe, the main limitation for the expansion of this non-dormant tree is cold exposure, which reduces dramatically its growth. The effects of these stresses are emphasized in the actual context of climate change which induces sharp contrasting periods, and their impacts on wood formation and quality remain unknown. Scarce data from literature suggest that these stresses affect secondary cell wall (SCW) deposition as well as xylem cell patterning. However these results are highly heterogeneous among different species and mainly focused on non-woody tissues. The selection of adapted clones and the development of more sustainable cultural practices are crucial to improve wood productivity and quality, which require a better understanding of tree response to cold and water stress in interaction with nutrition.

In order to unravel the regulation of xylem differentiation by low temperature, we performed a targeted approach on cold-acclimated *Eucalyptus* trees. By biochemical, histochemical and transcriptomic analyses, we revealed that low temperature trigger a precocious SCW deposition in developing xylem cells, characterized by a strong lignin deposition. In parallel, we aimed to characterize the effect of water stress combined to different mineral nutrition regimes, on wood formation and quality. To this end, we took advantage of an experimental design set up on field with a highly productive *Eucalyptus* commercial clone submitted to both rainfall exclusion combined to potassium fertilization. We combined large scale analyses of transcriptome and metabolome, with wood structural and biochemical properties analyses. The integrative approach with these datasets revealed that potassium fertilization induces a repression of SCW biosynthesis, together with regulation of cambial activity and modifications in wood properties, with a strong interaction with water exclusion.

Both approaches allowed to point out several uncharacterized yet TFs which are highly promising candidates in the control of cambial activity and SCW deposition in a woody perennial. Characterization of their function in poplar and *Eucalyptus* revealed a new key regulator of SCW biosynthesis in wood, and several MYB TFs potentially involved in the trade-off between SCW biosynthesis and growth.