

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :

CAO Phi Bang

Le 30 septembre 2013

Titre :

Rôle des facteurs de transcription CBF dans le contrôle du développement de l'Eucalyptus en condition de stress

ED SEVAB : Développement des plantes

Unité de recherche :

Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales (LRSV) UMR 5546 UPS/CNRS

Directeur(s) de Thèse :

Chantal TEULIERES et Christiane MARQUE

Rapporteurs :

David MACHEREL, Professeur Université d'Angers
Pascal MONTORO, Chargé de Recherche, CIRAD, Montpellier

Autre(s) membre(s) du jury :

Vincent BURLAT, Professeur Université Paul Sabatier
Pascal GANTET, Professeur Université Montpellier 2
Chantal TEULIERES, Professeur Université Paul Sabatier
Christiane MARQUE, Maître de conférences Université Paul Sabatier

Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu mes directrices de thèse, Chantal TEULIERES et Christiane MARQUE, pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe. Je leur suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'elles m'ont accordé, leurs qualités pédagogiques et scientifiques, leur franchise, leur soutien et leur patience, leurs paroles encourageantes, leur sympathie et leur aide dans la vie au laboratoire et la vie personnelle. J'ai beaucoup appris à leur côté et je leur adresse ma gratitude pour tout cela.

Un grand merci également au Gouvernement vietnamien pour son financement de ma thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury, Vincent BURLAT, Pascal GANTET, Pascal MONTORO et David MACHEREL, qui ont accepté d'évaluer cette thèse.

J'adresse les remerciements à tous les gens de l'équipe pour leur soutien, leurs conseils et leur participation directe ou indirecte à mon travail. Une mention particulière à Annabelle DUPAS pour son gros travail de la culture *in vitro*, à Hong Chien NGUYEN pour ses travaux, à Fabien MOUNET pour la qualité de ses conseils, à Nathalie LADOUCE pour son support technique. Merci à Marçal SOLER, Anna PLASENCIA pour les instants partagés du bureau...

Je tiens également à remercier Philippe RANOCHA de l'UMR 5546 pour leur amitié et leur soutien dans les moments difficiles et les longues discussions pendant les repas. J'adresse les remerciements à Christophe DUNAND, Hélène SAN CLEMENTE de m'avoir formé en bio-informatique, à Yves MARTINEZ de m'avoir formé en imagerie, pour leur disponibilité et leur implication dans mes travaux.

Je désire remercier les personnels du service commun, des plateformes d'imagerie, de génomique, et de bio-informatique ainsi que le service de production de matériel végétal pour leur support technique.

Enfin, je remercie tous les membres de ma famille pour leur soutien moral à savoir, mes parents, ma femme, mon fils, ma sœur, ... et bien d'autres personnes.

Liste des abréviations

ABA	Abscissic Acid
ABRE	ABA Responsive Element
AMY	Amylase
AP2	Apetala 2
BA	6-Benzylaminopurine
bHLH	basic helix-loop-helix
C3H	<i>p</i> -Coumarate 3-Hydroxylase
C4H	Cinnamate 4-Hydroxylase
CAD	Cinnamyl-alcohol-dehydrogenase
CAMTA	Calmodulin binding transcription activator
CBF	C-repeat Binding Factor
CCoAMT	Caffeoyl-CoA-O Methyl transferase
CCR	Cinnamoyl-CoA Reductase
cDNA	complementary DNA
CesA	Cellulose synthase
CM2	Conserved DNA motif 2
COMT	Caffeic Acid- <i>O</i> -Methyl transferase
COR	Cold Regulated
CRT	C-RepeaT
DDF	Dwarf and Delayed-Flowering
DHN	Dehydrin
DRE	Dehydration Responsive Element
DREB	Dehydration Responsive Element Binding transcription factor
ELIP	Early Light-Inducible Protein
ERF	Ethylene Responsive element binding Factor
EST	Expressed Sequence Tag
F5H	Ferrulate 5-Hydroxylase
GAI	Gibberellic-Acid Insensitive
GalTase	Galactosyltransferase
GAUT	Galacturonosyltransferase
GalS	Galactinol Synthase
GRAS	Gibberellic-Acid Insensitive (<u>GAI</u>), Repressor of GA1 (<u>RGA</u>), and Scarecrow (<u>SCR</u>)
GT	Glycosyltransferase
HAM	Hairy Meristem
HCT	<i>p</i> -Hydroxy-Cinnamoyl Transferase
HSE	Heat Shock <i>cis</i> Element
HSF	Heat Shock transcription Factor
HSP	Heat Shock Protein
IBA	Indole-3-butyric acid
ICE	Inducer of CBF Expression
KNOX	KNOTTED-like homeobox
LEA	Late Embryogenesis Abundant

LISCL	<i>Lilium longiflorum</i> scarecrow-like
LTRE	Low Temperature Responsive Element
MT	Metallothioneine
MYB	MYeloBlastosis oncogene
MYC	MYeloCytomatosis oncogene
NAC	NAM/ATAF1/CUC2
PAL	Phenylalanine Amonia Lyase
PAT1	Phytochrome a signal transduction 1
RAV	Related to ABI3/VP1
RFOs	Raffinose family oligosaccharides
RGA	Repressor of GA1-3
RNA	Ribonucleic acid
RS	Raffinose Synthase
SCL3	Scarecrow-Like 3
SCR	Scarecrow
SHR	Short-root
SORLIP	Sequences Over-Represented in Light-Induced Promoter
STRE	Stress response element
UV	Ultra Violet
XET	Xyloglucan endotransferase
ZFs	Cys2 (C2) His (H2)-type zinc fingers

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. <i>Eucalyptus</i>, arbre modèle pour la recherche des interactions « plante-environnement » et espèce d'intérêt économique	2
1.1. Description botanique générale.....	2
1.2. Description des espèces étudiées.....	3
1.2.1. <i>Eucalyptus grandis</i> et hybride <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	3
1.2.2. <i>Eucalyptus gunnii</i>	4
1.3. Intérêt économique.....	4
1.4. Intérêt de l'étude du contrôle du développement en condition de stress chez l'eucalyptus...5	5
2. Stress abiotiques et développement des plantes	6
2.1. Impact de différents stress abiotiques.....	6
2.1.1. Perte de productivité causée par les stress abiotiques	6
2.1.2. Dommages causés par les stress abiotiques sur les plantes	7
2.1.3. Adaptation et modifications morphologiques	9
2.2. Principales voies de réponse aux stress abiotiques	10
3. Objectifs du travail de thèse.....	11
Chapitre I. Etude des facteurs de transcription DREBs.....	13
1. Caractéristiques des facteurs DREB.....	14
2. Identification et étude phylogénétique des groupes CBF et DREB2 chez les ligneux.....	15
3. Etude de la régulation des <i>DREB1</i> et <i>DREB2</i>	17
3.1. Analyse <i>in silico</i> des séquences promotrices	17
3.2. Etude de l'expression des DREBs en réponse aux stress abiotiques	18
4. Conclusions et discussion.....	19
Chapitre II. Caractérisation des gènes de réponse au froid.....	21
1. Les gènes codant les protéines effectrices de la réponse au froid	22
2. Analyse globale du transcriptome froid.....	23
3. Prédiction <i>in silico</i> des gènes cibles des DREB chez <i>Eucalyptus grandis</i>	25
4. Annotation des familles de gènes potentiellement impliqués dans la réponse au froid	25
4.1. Les familles multigéniques Galactinol synthases (<i>GolS</i>) et Raffinose synthases (<i>RS</i>).....	25

4.2.	<i>La famille des β-amylases</i>	27
4.3.	<i>Les familles des Heat Shock Protein (HSP)</i>	27
4.3.1.	<i>La famille des petites protéines de choc thermique (sHSP)</i>	28
4.3.2.	<i>La famille DNAj/HSP40</i>	29
4.3.3.	<i>La famille HSP60</i>	30
4.3.4.	<i>La famille HSP70</i>	31
4.3.5.	<i>La famille HSP90</i>	32
4.3.6.	<i>La famille HSP100</i>	32
4.4.	<i>La famille Elip</i>	33
4.5.	<i>La famille LEA (Late Embryogenesis Abundant)</i>	35
4.6.	<i>La famille Méthallothionéine</i>	36
4.7.	<i>La famille GRAS</i>	37
5.	Conclusions et discussion	38

Chapitre III. Analyse fonctionnelle des DREB1/CBF via des lignées d'*E. urophylla* x *E. grandis* sur-exprimant *EguCBF1a* ou *EguCBF1b* 40

1.	Acclimatation ex vitro de lignées transgéniques d'<i>Eucalyptus</i>	41
1.1.	<i>Mise au point des conditions d'allongement des tiges</i>	41
1.2.	<i>Mise au point des conditions d'induction racinaire</i>	42
1.3.	<i>Acclimatation ex vitro des explants enracinés et production de différents lots de lignées transgéniques utilisées pour l'analyse phénotypique</i>	44
2.	Phénotypage des lignées transformantes <i>CBF1a</i>/<i>CBF1b</i>	45
2.1.	<i>Caractéristiques générales des lignées étudiées</i>	45
2.2.	<i>Tolérance au froid et à la chaleur des lignées sur-exprimant <i>CBF1a</i> ou <i>CBF1b</i></i>	46
2.3.	<i>Morphologie des lignées sur-exprimant <i>CBF1a</i>/<i>CBF1b</i></i>	46
2.4.	<i>Anatomie foliaire</i>	47
2.5.	<i>Composition des feuilles des lignées sur-exprimant <i>CBF1a</i>/<i>CBF1b</i></i>	48
2.6.	<i>Anatomie des tiges</i>	49
3.	Analyse de l'expression des gènes cibles potentiels de DREB/CBF sur les lignées transgéniques	51
3.1.	<i>Gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques (froid et chaleur)</i>	51
3.2.	<i>Gènes impliqués dans le développement</i>	52
3.3.	<i>Gènes impliqués dans la formation de la paroi</i>	53
4.	Conclusions et discussion	54

Conclusion générale	58
Matériels et Méthodes	61
1. Matériel (origine et conditions de culture).....	62
1.1. Lignées d'<i>E. gunnii</i>	62
1.2. Lignées d'<i>E. grandis</i>	62
1.3. Lignées transgéniques de l'hybride <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	62
1.4. Conditions d'application des stress.....	63
1.4.1. Acclimatation d' <i>E. gunnii</i>	63
1.4.2. Traitement sur feuille détachée.....	63
2. Méthodes.....	64
2.1. Production des matériels ex vitro	64
2.1.1. Etape d'allongement de tige	64
2.1.2. Etape d'enracinement	64
2.1.3. Etape d'acclimatation ex vitro	64
2.2. Phénotypage des transformants.....	65
2.2.1. Estimation de la tolérance aux stress abiotiques (froid, chaleur)	65
2.2.2. Evaluation de la croissance	66
2.2.3. Analyse anatomique par microscopie	66
2.2.4. Dosage des chlorophylles	69
2.2.5. Vitesse d'extraction des chlorophylles.....	69
2.3. Analyse d'expression.....	69
2.3.1. Extraction des ARN totaux.....	69
2.3.2. Analyse par PCR en temps réel.....	70
2.4. Analyse statistique	71
2.5. Analyse in silico.....	72
2.5.1. Source des séquences	72
2.5.2. Prédiction des protéines chez <i>E. grandis</i>	72
2.5.3. Recherche des CBF/DREB1 et des DREB2 sur le génome d' <i>Eucalyptus</i>	73
2.5.4. Prédiction des gènes cibles potentiels des CBF et DREB2.....	73
2.5.5. Prédiction de la localisation sous-cellulaire des protéines	74
Références	75

Annexes.....	87
Annexe II-1 Caractérisation des GolS chez <i>Eucalyptus grandis</i>	88
Annexe II-2 Caractérisation des RS chez <i>Eucalyptus grandis</i>.....	89
Annexe II-3 Caractérisation des β-AMY chez <i>Eucalyptus grandis</i>.....	90
Annexe II-4 Caractérisation des sHSP chez <i>Eucalyptus grandis</i>	91
Annexe II-5 Caractérisation des DNAj/HSP40 chez <i>Eucalyptus grandis</i>	93
Annexe II-6 Caractérisation des HSP60 chez <i>Eucalyptus grandis</i>	96
Annexe II-7 Caractérisation des HSP70 chez <i>Eucalyptus grandis</i>	97
Annexe II-8 Caractérisation des HSP90 chez <i>Eucalyptus grandis</i>	98
Annexe II-9 Caractérisation des HSP100 chez <i>Eucalyptus grandis</i>	100
Annexe II-10 Caractérisation des Elip chez <i>Eucalyptus grandis</i>.....	101
Annexe II-11 Caractérisation des LEA chez <i>Eucalyptus grandis</i>.....	102
Annexe II-12 Caractérisation des MT chez <i>Eucalyptus grandis</i>	105
Annexe II-13 Caractérisation des GRAS chez <i>Eucalyptus grandis</i>.....	106
Annexe III-1. Composition du milieu M (Multiplication) utilisé pour le repiquage d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	108
Annexe III-2. Composition du milieu SDM (Shoot Development Multiplication) utilisé pour le repiquage d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	108
Annexe III-3. Composition du milieu W1 pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> ..	109
Annexe III-4. Composition du milieu W2 pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> ..	109
Annexe III-5. Composition du milieu W3 pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> ..	110
Annexe III-6. Composition du milieu W4 pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> ..	110
Annexe III-7. Composition du milieu W4 + C pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	111

Annexe III-8. Composition du milieu SPM pour l'allongement de tige d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	111
Annexe III-9. Composition du milieu M1 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>.....	112
Annexe III-10. Composition du milieu M2 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>.....	112
Annexe III-11. Composition du milieu M3 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	113
Annexe III-12. Composition du milieu M4 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	113
Annexe III-13. Composition du milieu M5 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	114
Annexe III-14. Composition du milieu M6 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	114
Annexe III-15. Composition du milieu M7 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	115
Annexe III-16. Composition du milieu M8 pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	115
Annexe III-17. Composition du milieu ¼ MS modifié pour l'induction racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	116
Annexe III-18. Composition du milieu ¼ MS modifié pour l'allongement racinaire d'<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	116
Annexe III-19. Liste des amorces utilisées dans cette étude.....	117
Annexe III-20. Liste des gènes impliqués dans la tolérance (étudiés en RT-qPCR)	121
Annexe III-21. Liste des gènes impliqués dans le développement (étudiés en RT-qPCR)	122
Annexe III-22. Liste des gènes impliqués dans la formation de tige (étude Fluidigm)	123

Introduction générale

1. *Eucalyptus*, arbre modèle pour la recherche des interactions « plante-environnement » et espèce d'intérêt économique

1.1. Description botanique générale

Les *Eucalyptus* sont des angiospermes dicotylédones de la famille des Myrtacées. Le genre *Eucalyptus* comprend plus de 700 espèces réparties sur toutes les zones climatiques de l'Australie, sauf la forêt tropicale humide.

En 1792 J.H. de la Billardièrre découvre le gommier bleu au sud de la Tasmanie et le nomme *E. globulus* par rapport à la gomme résineuse que l'arbre exsude quand il est blessé et la couleur bleue caractéristique du feuillage. Charles Louis L'héritier de Brutelle a décrit et nommé le genre *Eucalyptus* par référence au sens étymologique, qui signifie « bien couvert » ou « bien coiffé ». Le bouton floral est en effet recouvert d'un opercule, constitué de pétales soudés qui tombent lorsque la fleur s'épanouit, laissant apparaître les étamines colorées. L'écorce de la plupart des espèces est lisse et tombe par lambeaux tous les ans ce qui donne au tronc une couleur souvent chamarrée.

Un *Eucalyptus* adulte peut, suivant les espèces, se présenter comme un petit buisson ou un arbre de grande taille avec un port plus ou moins étalé selon qu'il appartient à un groupe ou qu'il est isolé. Le terme anglophone « mallee » désigne les *Eucalyptus* présentant plusieurs troncs partant d'un même lignotuber, qui est un organe souterrain lignifié présent chez la plupart des espèces d'*Eucalyptus*. Il se caractérise par sa richesse en réserves énergétiques (amidon) et la présence de nombreux bourgeons végétatifs (Hignard, 1998). Lorsque la récolte, le feu ou le gel entraînent la destruction de la partie aérienne de l'arbre, le lignotuber permet de produire des rejets feuillus abondants.

Le feuillage des *Eucalyptus* présente un dimorphisme entre le feuillage juvénile et le feuillage adulte (figure i-1). Les feuilles jeunes sont rondes ou ovoïdes, opposées alors que les feuilles âgées sont plus allongées et alternes. Ces deux types de feuillage peuvent être présents sur un même arbre, en même temps. Les feuilles de l'eucalyptus résistants au stress sont recouvertes d'une cuticule épaisse, ce qui est caractéristique des plantes sclérophylles, qui sont adaptées aux conditions arides. Ces feuilles présentent des cires sous forme de plaques, de tubes ou un mélange de plaques et de tubes (Hallam, 1970). La cire est intégrée au sein de la cuticule (cire intradermique) et souvent déposée sur sa surface (cire épicuticulaire) (Martin & Juniper, 1970). Les cires permettent la réduction de la transpiration et la protection contre les dommages mécaniques, les ravageurs, les pathogènes et le rayonnement solaire (Martin & Juniper, 1970). La structure, la distribution et la composition de la cire ont été décrites chez *Eucalyptus* (Hallam, 1970; Carr et al., 1986; Knight et al., 2004). La corrélation entre la résistance aux stress abiotiques des *Eucalyptus* et la teneur significativement plus élevée d'un certain nombre de composés de la cire cuticulaire a été démontrée (Jones *et al.*, 2002).

Comme chez tous les autres végétaux appartenant à la famille des myrtacées, les feuilles d'*Eucalyptus* sont riches en huiles essentielles. Ces huiles ont de nombreuses applications pour les produits pharmaceutiques et les additifs de parfum. Elles sont accumulées dans des structures spécifiques sur les feuilles, les glandes à huile qui sont associées à des cellules spécialisées présumées être le site de la biosynthèse de l'huile (Fahn, 1979). La plupart des connaissances sur la biosynthèse des monoterpènes et les dérivés de terpène contenant des structures de sécrétion a été acquise à partir de travaux sur les trichomes. Cette autre structure, correspondant à des glandes superficielles qui accumule les huiles, peut être facilement isolée en quantités importantes ce qui facilite les analyses (Schillmiller *et al.*, 2008). En revanche, étonnamment peu de choses sont connues sur la physiologie et le métabolisme des cavités sécrétrices incorporées dans les tissus végétaux en raison de la difficulté d'isoler ces structures pour les étudier (McCaskill & Croteau, 1999). Pour *Eucalyptus*, les recherches sur les huiles, réalisées principalement chez *Eucalyptus polybractea*, concernent la composition (King *et al.*, 2006), la biosynthèse et l'accumulation (Goodger *et al.*, 2007; Goodger *et al.*, 2008; Goodger *et al.*, 2009; Goodger *et al.*, 2010). Ces productions pourraient être une protection contre les insectes et champignons, un moyen de stockage du CO₂ ou de limitation de l'évapotranspiration. Récemment, une fonction de stabilisation des membranes suite à un stress de déshydratation a été évoquée chez *Calystegia soldanella*, *Euphorbia paralias* et *Otanthus maritimus* (Ciccarelli *et al.*, 2009).

1.2. Description des espèces étudiées

1.2.1. *Eucalyptus grandis* et hybride *E. urophylla* x *E. grandis*

Originaire de la Côte Est de l'Australie, *Eucalyptus grandis* (gomme rose ou crue), est l'une des plus importantes espèces d'eucalyptus commerciaux, planté dans les zones tropicales et subtropicales comme en Afrique du Sud et au Brésil (Wrigley & Fagg, 2010). Cette espèce a été décrite pour la première fois par W. Hill en 1862 (*Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden). Récemment, il a été classé dans le sous-genre *Symphyomyrtus* (*Eucalyptus* subg. *Symphyomyrtus*), Section *Latoangulatae*, série *Transversae* (la gomme bleue d'Est) par Brooker et Kleinig (Brooker, 2000). Le nom de l'espèce se rapporte à la grande taille de cet arbre (en moyenne 50 m à maturité) et dont les plus grands individus peuvent atteindre jusqu'à 80 m de haut et 8,5 m de circonférence (Wrigley & Fagg, 2010). Le fût est droit pour 2/3 à 3/4 de la hauteur de l'arbre. L'écorce est lisse et poudrée, allant du bleu-gris au blanc avec une jupe d'écorce brunâtre rude pour la base (1-4 m du tronc de l'arbre) (Boland *et al.*, 2006). Disposées alternativement le long des branches, les feuilles (de 10 à 16 cm de long et de 2 à 3 cm de large) sont vert foncé, brillantes, lancéolées et plus pâles sur leur face inférieure. Les fleurs blanches apparaissent dès le mi-automne jusqu'à la fin de l'hiver et sont disposées par groupes de 7 à 11 capitules (Boland *et al.*, 2006). Les fleurs sont suivies par des petits « gumnuts » aiguisés sous forme de poire ou de cône (figure i-1).

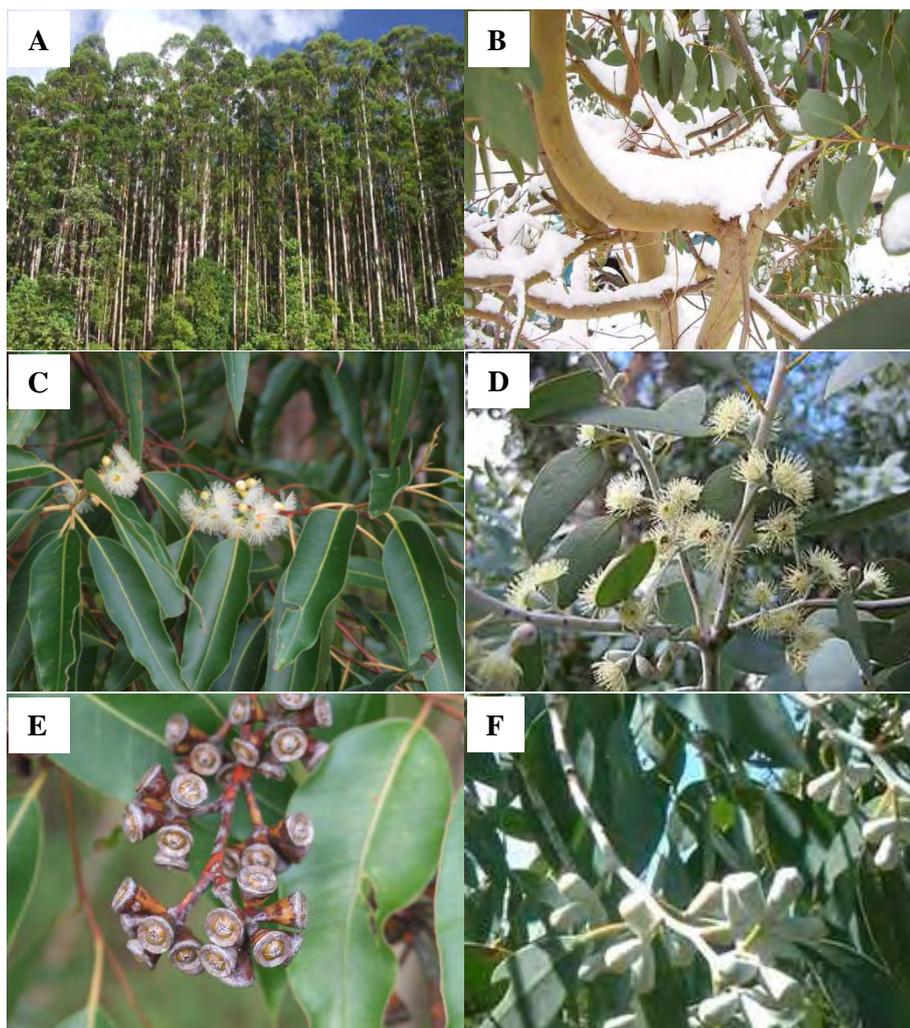


Fig i-1. Les deux espèces d'*Eucalyptus grandis* (A, C, E) et *E. gunnii* (B, D, F); arbre (A, B), fleur (C, D) et capsules (E, F).

Espèces <i>Eucalyptus</i>	Précipitation moyenne (mm/an)	Moy max temp (°C) mois chauds	Moy min temp (°C) mois froids	Min temp absolue (°C)	Rendement m ³ /ha/an	Exemples de pays pour les plantations
<i>E. grandis</i> (ref genome)	700-2500	25-34	3-18	-8	35-55	Brésil, Inde, Afrique du sud
<i>E. urophylla</i>	1100-2700	20-34	8-12	-4	30-40	Afrique, Chine, Madagascar
<i>E. gunnii</i>	800-2400	15-26	-3	-14 à -18	24-30	France, Angleterre

Tab i-1. Besoins climatiques (précipitations et températures) et rendements des plantations des espèces d'eucalyptus étudiées (extrait de Booth and Pryor, 1991)

L'hybride naturel *E. urophylla* x *E. grandis*, bien adapté aux conditions tropicales (tableau i-1), a été exploité pour des applications industrielles comme la pâte à papier en Afrique de Sud ou en Amérique (McComb et Bennett, 1986; Jones et van Staden, 1994) ou la production de métabolites secondaires tels que les huiles essentielles ou les tanins. L'hybride *E. urophylla* x *E. grandis* qui a également une bonne capacité de régénération est adapté pour la transformation génétique (Teulieres & Marque, 2007) ce qui a permis à mon équipe d'introduire les gènes *CBFs*.

1.2.2. *Eucalyptus gunnii*

L'*Eucalyptus gunnii* est une espèce endémique de Tasmanie, qui est installée dans les régions montagneuses jusqu'à environ 1100 mètres d'altitude. Elle peut tolérer jusqu'à -18°C, ce qui a permis son implantation en Europe, dans le sud-ouest de la France et en Grande Bretagne. C'est un arbre de taille moyenne (30 m), avec un tronc court et massif pour les vieux arbres et des rameaux grands et étalés. Les feuilles sont pétiolées, elliptiques à ovales, mesurant jusqu'à 8 cm de long et 3 cm de large, gris-vert et épaisses. Les fleurs blanches sont produites en milieu de l'été. Les capsules florales sont au nombre de 3 (Brooker & Kleinig, 1996). Sa croissance est bonne si les conditions sont favorables, mais c'est une espèce sensible à de longues périodes de sécheresse (tableau i-1). Son bois est utilisé pour la papeterie principalement et c'est également un arbre d'ornement dont le feuillage est utilisé toute l'année par les fleuristes.

1.3. Intérêt économique

L'eucalyptus est devenu le feuillu le plus planté dans le monde (90 pays) grâce à ses nombreuses qualités: croissance rapide, forme droite, forte productivité (taillis à courte rotation), très bonne qualité du bois et bonne adaptabilité aux conditions du sol et à des climats variés (Kirch *et al.*, 2011). La culture d'eucalyptus concerne différentes espèces pour les productions aussi diverses que le sciage, bois de mine, poteaux, pâte à papier, charbon de bois, huiles essentielles, miel et tanin ainsi que pour la construction de l'habitat et la restauration des sols. Les *Eucalyptus* sont une source importante de matériel de chauffage et de construction dans les communautés rurales dans les pays comme l'Inde, la Chine, l'Ethiopie, le Pérou et le Vietnam. Cependant, c'est la grande demande mondiale pour la pâte à fibres courtes, spécifique des feuillus, qui a conduit à l'expansion massive des plantations d'eucalyptus dans le monde entier au cours du 20^{ème} siècle. Par rapport aux autres espèces d'angiospermes, l'eucalyptus présente une densité importante de fibres qui sont de taille uniforme. Ces avantages ont provoqué une forte demande de pâte d'eucalyptus pour le papier mais aussi pour la fabrication de meubles (Kole, 2007, Vol. 7 : p 119).

Les surfaces de plantations industrielles d'eucalyptus ont beaucoup progressé, passant de 9,5 millions d'hectares en 1999 à 20 millions d'ha en 2010 (Gonzalvès, 2013). L'Inde, le Brésil et la Chine

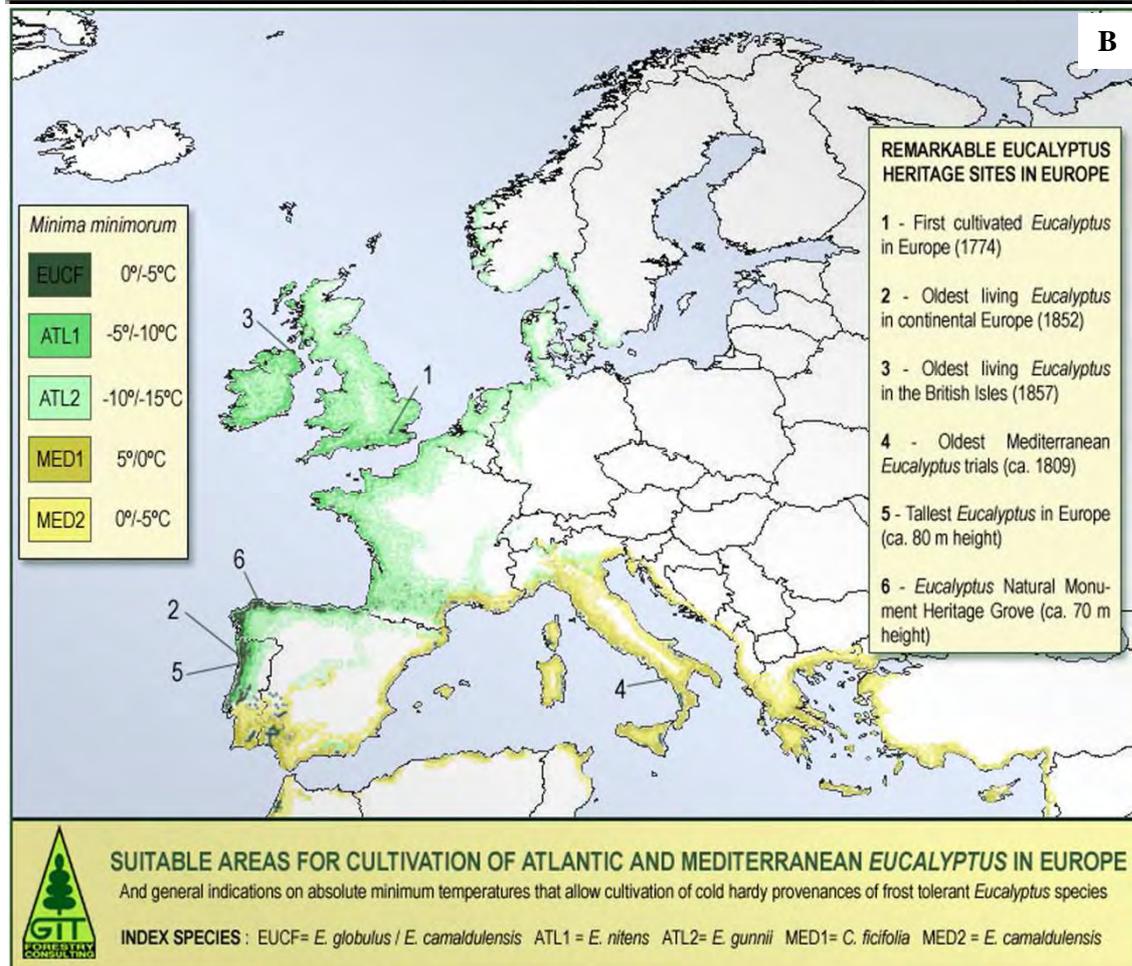
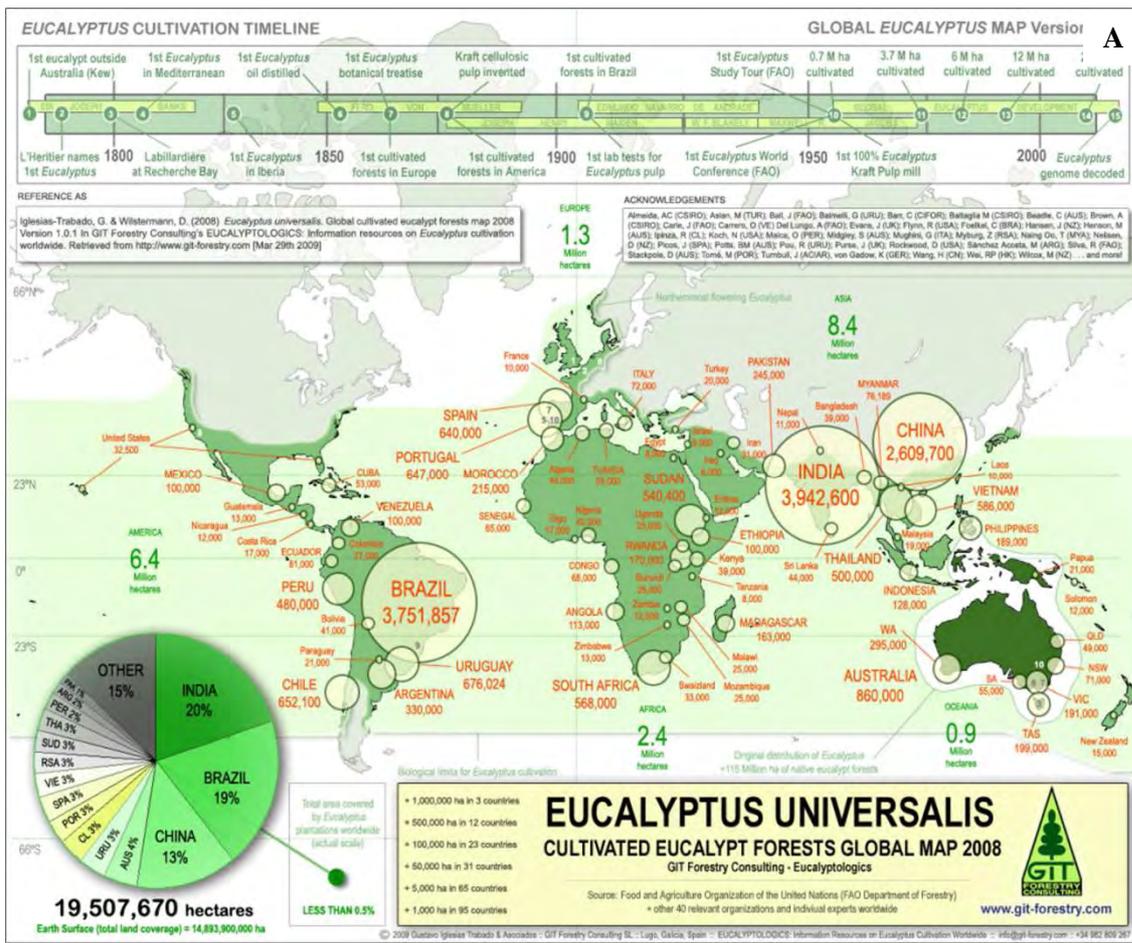


Fig i-2. Carte de plantations des *Eucalyptus* dans le monde (A) et zones appropriées pour la plantation d'eucalyptus en Europe (B) (Iglesias-Trabado & Wilstermann, 2008)

sont les principaux pays pour les surfaces de plantations d'eucalyptus (figure i-2A). Parmi les principales espèces d'eucalyptus plantées, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. camaldulensis* et leurs hybrides représentent environ 80% de la superficie de plantation; les 20% restant concernent les autres espèces comme *E. nitens*, *E. saligna*, *E. deglupta*, *E. urophylla*, *E. pilularis*, *Corymbia citriodora* et *E. teriticornis* (Waugh 2004). *E. grandis*, *E. urophylla* et leurs hybrides sont plantés dans les régions tropicales et subtropicales alors qu'*E. globulus* est cultivé plutôt dans les régions tempérées. Depuis leur introduction en Europe en 1774, les *Eucalyptus* (essentiellement *E. globulus*) ont été plantés principalement dans les pays du sud comme le Portugal et l'Espagne (1.4 millions d'ha) (figure i-2B). En France, le premier vaste programme de plantation d'*E. globulus* et d'*E. camaldulensis* a démarré en Corse dans les années 1960 après les premiers essais d'introduction de plusieurs espèces d'Eucalyptus menés par CNRF (Centre National de Recherche Forestière). Puis, les *Eucalyptus* ont été plantés au niveau industriel sur une plus grande surface (1200 hectares) en Midi-Pyrénées et Limousin à partir de 1982. Mais le programme de développement a été ralenti après la destruction d'une partie des plantations à cause d'un épisode de gel sévère (-18°C) en 1985. Cependant, grâce au programme de sélection de l'eucalyptus mené par l'AFOCEL (devenu FCBA) pour la tolérance au gel, la culture a pu reprendre en 1996 dans la région du Sud-Ouest et notamment en Midi-Pyrénées. Aujourd'hui les plantations n'atteignent pas 10000 hectares mais le développement de la culture d'eucalyptus devrait être favorisé par sa récente homologation comme espèce de reboisement par le Ministère de l'Agriculture en France.

1.4. Intérêt de l'étude du contrôle du développement en condition de stress chez l'eucalyptus

La survie de l'eucalyptus est conditionnée par le gel, puisque ses organes sont fortement exposés en raison de la persistance des feuilles et l'absence de dormance. De plus, la croissance et la productivité de cet arbre sont directement corrélées à la température et à la disponibilité en eau. En conditions de stress froid, il est probable que cet arbre utilise des stratégies particulières par rapport aux plantes herbacées annuelles (produisant des graines) ou aux plantes pérennes qui mettent en place des stratégies d'évitement comme la dormance ou la perte des feuilles avant l'hiver. Les travaux de recherche sur l'acquisition de la tolérance et le contrôle du développement chez *Eucalyptus* en condition de froid sont menés dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes adaptatifs et de faire le lien entre les deux processus. On peut par exemple émettre l'hypothèse que la régulation de la croissance et du développement par le froid est un mécanisme adaptatif permettant de mobiliser l'énergie vers la protection cellulaire. Par ailleurs, en plus de la tolérance au gel, la productivité de l'eucalyptus dans les conditions de stress est aussi un caractère très important pour les programmes de sélection.

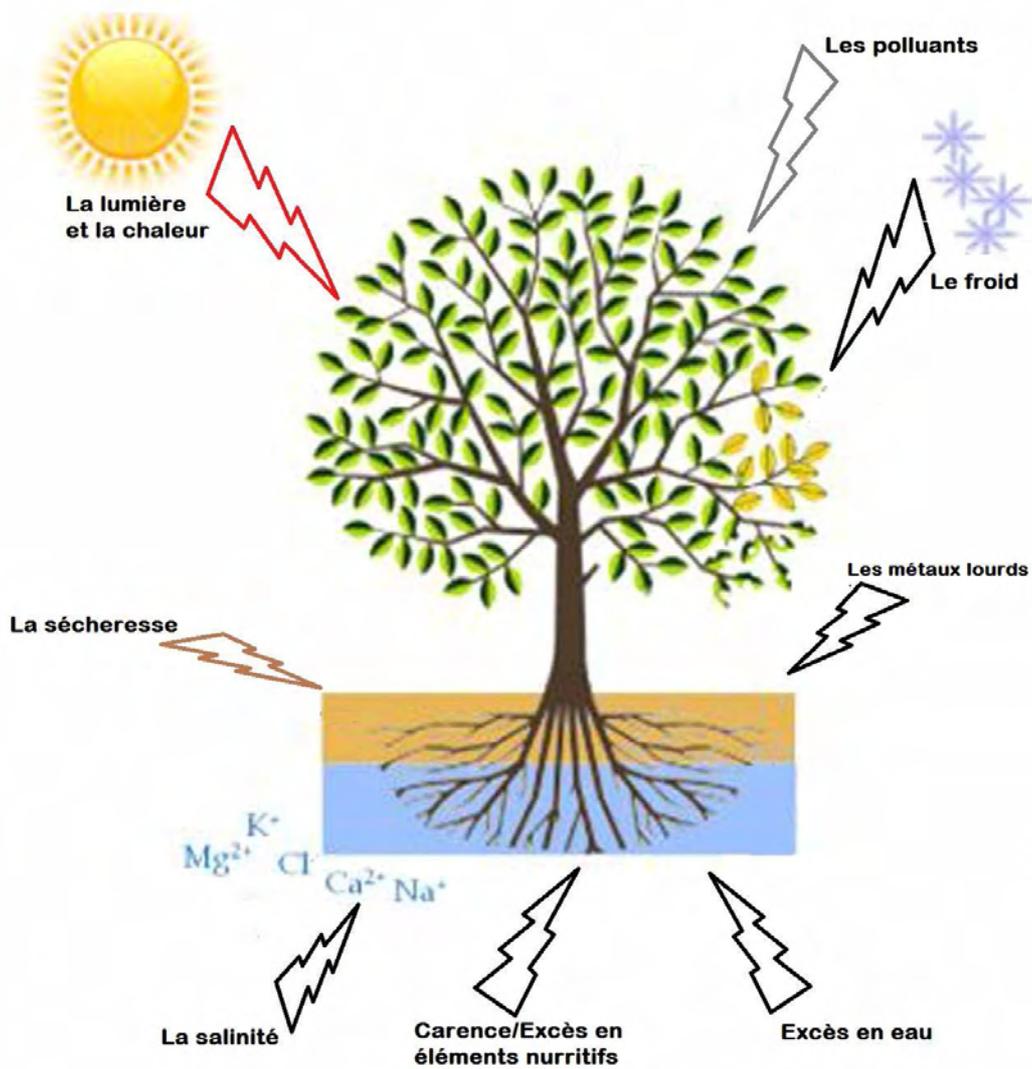


Fig i-3. Les stress abiotiques affectent la plante (adapté de Rao et al. (2006))

2. Stress abiotiques et développement des plantes

Les stress abiotiques comme la chaleur, la sécheresse, le froid et la salinité des sols ou leurs combinaisons conditionnent la distribution naturelle des espèces végétales (Repo et al., 2008). La sensibilité des plantes aux stress abiotiques dépend des espèces, des génotypes et des stades phénologiques. Dans tous les cas, la réponse des plantes aux stress abiotiques conduit à une série de changements physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affectent plus ou moins leur croissance et leur développement (figure i-3) (Boyer, 1982; Bruce *et al.*, 2002). Les différents stress abiotiques présentent des éléments communs et spécifiques à la fois pour les dommages occasionnés et pour la réponse de la plante (Ciarmiello *et al.*, 2011)

Sachant que les stress abiotiques limitent la productivité des cultures, la compréhension des mécanismes de tolérance des plantes à ces stress constitue un enjeu économique majeur.

2.1. Impact de différents stress abiotiques

2.1.1. Perte de productivité causée par les stress abiotiques

La productivité agricole et la qualité des productions végétales sont considérablement affectées lorsque les cultures sont exposées à des températures non optimales pendant leur cycle de vie (Verheul *et al.*, 1996). L'impact des stress sur la productivité dépend de l'intensité et de la durée de la période de stress, mais aussi du stade de développement des plantes (Farooq *et al.*, 2009)

Beaucoup de cultivars élités pour des espèces d'intérêt économique comme le coton, le soja, le maïs et le riz sont sensibles au froid et incapables de survivre à des températures froides (Larcher, 1995). Par exemple, les températures froides sont responsables de baisse de rendement d'environ 30-40% des cultures de riz dans les régions productrices tempérées et tropicales (Andaya & Mackill, 2003).

Les températures élevées constituent également un facteur limitant la productivité de la plupart des plantes cultivées. L'exposition au stress thermique pendant la floraison entraîne la stérilité du pollen et limite la production de grain chez les plantes légumineuses (arachide, haricot) et les céréales (riz, soja, blé) (Prasad *et al.*, 2008). La diminution de la production en grain des plantes exposées au stress thermique est causée par une mauvaise déhiscence des anthères, entraînant soit une faible efficacité de la germination des grains de pollen sur le stigmate (Jagadish *et al.*, 2007) soit une perte de viabilité du pollen (Prasad *et al.*, 2008) ou de l'ovule (Gross & Kigel, 1994). Dans une analyse globale des rendements des cultures de 1981 à 2002, la perte de rendement du blé, du maïs ou de l'orge due à des fortes températures est estimée à 5 milliards de dollars par an (Lobell & Field, 2007). Il a été montré qu'une augmentation de la température moyenne saisonnière de 1°C réduit le rendement en grains de céréales de 4% à 10% (Wang *et al.*, 2012).

La sécheresse est le plus important facteur limitant la culture agricole dans le monde pour la plupart des plantes cultivées, en particulier dans les zones arides ou semi-arides. La réduction de rendement varie de 58 à 87% chez le pois et de 24 à 92% chez le maïs ou le riz (Muhammad & Asghar, 2012).

Le sel limite aussi de façon importante la productivité des cultures dans 20% des terres cultivées et près de la moitié des zones irriguées par rapport au potentiel génétique des espèces. Il a été observé une perte allant jusqu'à 50% de productivité chez la tomate, le pois et d'autres légumes (Shahbaz *et al.*, 2012).

2.1.2. Dommages causés par les stress abiotiques sur les plantes

La réponse des plantes aux stress abiotiques affecte le métabolisme des plantes entraînant des effets négatifs sur la croissance et le développement. Les cibles communes des stress abiotiques sont les systèmes membranaires et les macromolécules, principalement les protéines.

Le froid, la chaleur, la sécheresse et l'excès de sel se traduisent par un stress osmotique qui entraîne un dérèglement de l'homéostasie et donc une fragilisation des membranes et des protéines. De plus, le gel provoque un stress mécanique (blessure) dû à la formation de cristaux de glace dans l'apoplaste qui peuvent endommager les membranes.

Le stress froid comprend le « chilling » correspondant aux températures fraîches mais positives et le gel ou « freezing » pour les températures négatives. Le froid affecte à la fois la phase végétative et reproductive du cycle de vie de la plante (Nishiyama, 1995a), réduisant la vitesse de croissance et par conséquent le rendement des cultures (Thakur *et al.*, 2010). Pendant la phase de reproduction, les basses températures induisent l'abscission des fleurs, la stérilité du pollen, la distorsion du tube pollinique, l'échec ovulaire et une réduction de la nouaison (Nishiyama, 1995b). Les plantes exposées à un stress froid présentent divers symptômes phénotypiques incluant la réduction de l'expansion des feuilles, le flétrissement et la chlorose (jaunissement des feuilles) allant jusqu'à la mort des tissus.

Au niveau cellulaire, le froid altère la fluidité des membranes biologiques ce qui perturbe leur fonctionnement et provoque la perte de leur intégrité et de leur sélectivité (Welti *et al.*, 2002). Les températures fraîches affectent surtout les membranes chloroplastiques (d'où la chlorose) alors que le gel perturbe l'ensemble du système membranaire. En plus de dommages sur les membranes, le froid réduit l'activité des protéines (membranaires ou cytoplasmiques) et peut aboutir à leur dénaturation complète. En condition de gel, des cristaux de glace se forment dans l'espace apoplastique et provoquent une tension mécanique sur la paroi cellulaire et la membrane plasmique, entraînant la rupture des cellules (Uemura & Steponkus, 1999). Ces cristaux provoquent aussi la déshydratation intracellulaire par modification de l'équilibre osmotique entre l'apoplaste et le cytoplasme. Cette déshydratation entraîne la perte de turgescence et la modification de l'élasticité de la paroi cellulaire qui inhibe l'élongation cellulaire plus que la division cellulaire. Cette déshydratation due au stress froid (ou gel) conduit comme la sécheresse à la concentration de solutés aboutissant à la perte de l'homéostasie et finalement au dysfonctionnement

métabolique (Mahajan & Tuteja, 2005; Yadav, 2010). La déshydratation endommage aussi l'appareil photosynthétique qui conduit à la réduction de l'activité photosynthétique. Dans ces conditions de stress, les chloroplastes sont exposés à un excès d'excitation énergétique qui induit la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion super-oxyde et des radicaux hydroxyle, qui endommagent les membranes et les enzymes (Chinnusamy *et al.*, 2004; Muhammad & Asghar, 2012).

Le stress hydrique se produit quand l'eau disponible dans le sol est insuffisante et que les conditions atmosphériques causent une perte progressive de l'eau par évaporation ou transpiration (Jaleel *et al.*, 2009). Le stress hydrique est caractérisé par une réduction de la teneur en eau des tissus et la diminution du potentiel hydrique des feuilles qui entraîne la fermeture des stomates (Tsukaguchi *et al.*, 2003). Elle réduit la croissance des plantes en affectant des processus physiologiques et biochimiques différents tels que la photosynthèse, la respiration, le mouvement d'ions et le métabolisme primaire (Jaleel *et al.*, 2009). Au niveau cellulaire, la sécheresse entraîne les mêmes perturbations que la déshydratation due au froid, ce qui explique qu'un certain nombre de réponses physiologiques soit communes aux deux stress.

La disponibilité en eau des plantes est affectée souvent par la combinaison de la sécheresse et de la chaleur. Les températures élevées affectent des plantes par l'augmentation de la demande d'évaporation, qui induit le déficit hydrique. La chaleur provoque des dommages spécifiques comme des brûlures sur des feuilles et des tiges pouvant conduire à la sénescence et abscission des feuilles, des branches et des tiges, la décoloration et des dommages sur les fruits (Rodríguez *et al.*, 2005). L'inhibition de la germination des graines est également observée en conditions de stress thermique (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Comme le stress froid et la sécheresse, la chaleur excessive affecte également la stabilité des protéines, des membranes, des ARN et la structure du cytosquelette. La chaleur modifie l'efficacité des réactions enzymatiques dans la cellule ce qui crée des déséquilibres métaboliques et affecte les processus physiologiques majeurs comme la germination, la croissance, le développement et la reproduction (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). L'activité du photosystème II est fortement réduite par la chaleur, en particulier parce que la structure des membranes thylakoidales est altérée par les hautes températures. De plus, le stress thermique provoque la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui induit un stress oxydatif (Potters *et al.*, 2007). A haute température, les dommages cellulaires conduisant à la mort cellulaire peuvent survenir en quelques minutes.

Le stress salin génère des effets primaires et secondaires qui affectent négativement la croissance, le développement et la survie des plantes. Les effets primaires du déséquilibre ionique lié à une forte concentration en sel dans l'apoplaste sont liés à la toxicité des ions Na et Cl qui sont des inhibiteurs d'enzymes (Botella *et al.*, 2005). En raison de perturbations dans l'équilibre ionique nécessaire pour maintenir la structure des protéines, cet effet cytotoxique des ions a donc un impact direct et négatif sur de nombreux processus biochimiques et physiologiques (Serrano *et al.*, 1996). Des concentrations élevées

de sel induisent également un choc hyper-osmotique en abaissant le potentiel d'eau qui, à son tour, cause la réduction ou la perte de turgescence (Zhu, 2002). Les principaux effets secondaires du stress salin sont liés à cette perte d'eau cellulaire qui aboutit aux mêmes effets que la déshydratation décrite pour les autres stress abiotiques (Borsani *et al.*, 2001a; Borsani *et al.*, 2001b; Zhu *et al.*, 2003).

2.1.3. Adaptation et modifications morphologiques

La tolérance aux stress abiotiques des plantes provoque des changements observables au niveau de l'organisme, des organes, des tissus, en conséquence des modifications cellulaires et moléculaires. A long terme, les espèces s'adaptent en développant des stratégies adaptatives pour faire face aux conditions défavorables et assurer leur survie (Guy, 1999). On observe que les espèces tolérantes ont des caractéristiques morphologiques communes, comme la réduction de la surface foliaire et de la hauteur de tige et une augmentation du rapport racine/tige.

Les plantes ont deux stratégies distinctes en réponse aux stress abiotiques : l'évitement et la tolérance. L'évitement consiste à protéger les tissus sensibles contre le stress et/ou à raccourcir la durée de la phase végétative. Par exemple, certaines espèces succulentes sont capables d'accumuler la chaleur résiduelle pendant la journée pour la dissiper lentement au cours de la nuit froide (Janska *et al.*, 2010). Beaucoup d'herbacées annuelles survivent à l'hiver par la protection d'organes dormants (méristème des bourgeons axillaires) ou la protection de semences par des couches de téguments (Kacperska, 1999; Hemming & Trevaskis, 2011). De la même façon, les plantes ligneuses pérennes comme les arbres peuvent adapter leur cycle de développement en fonction des conditions environnementales (Rohde & Bhalerao, 2007). Ainsi, de nombreux arbres des zones tempérées et boréales protègent les nouvelles pousses par une période d'arrêt végétatif (dormance) durant l'hiver (Campoy *et al.*, 2011).

Contrairement aux arbres à feuilles caduques, des végétaux pérennes à feuillage persistant comme l'eucalyptus sont exposés de façon permanente aux conditions climatiques et en particulier au gel pendant l'hiver. Cette espèce est dite opportuniste car elle est capable de s'adapter aux conditions (température et disponibilité en eau) en modulant sa croissance. D'autres adaptations morphologiques sont spécifiques de cette espèce comme les bourgeons de réserve isolés du froid par leur localisation sous l'écorce ou bien le lignotuber situé à la base du tronc et qui permet une régénération de l'arbre si la partie aérienne est détruite. De plus, l'épaisseur de cuticule à la surface des feuilles est une stratégie adaptative au froid et à la sécheresse chez *Eucalyptus*: les génotypes d'*E. gunnii* les plus tolérants ont des feuilles plus glauques caractérisées par une couche plus épaisse de cuticule que les génotypes sensibles (Potts & Reid, 1985; Wirthensohn *et al.*, 1999).

Les plantes évitent la sécheresse grâce aux mécanismes qui permettent de réduire la perte d'eau en contrôlant la transpiration stomatique et aussi en favorisant l'absorption d'eau par le développement d'un système racinaire vaste et prolifique. Comme pour le froid, la plante soumise à la sécheresse écourte son

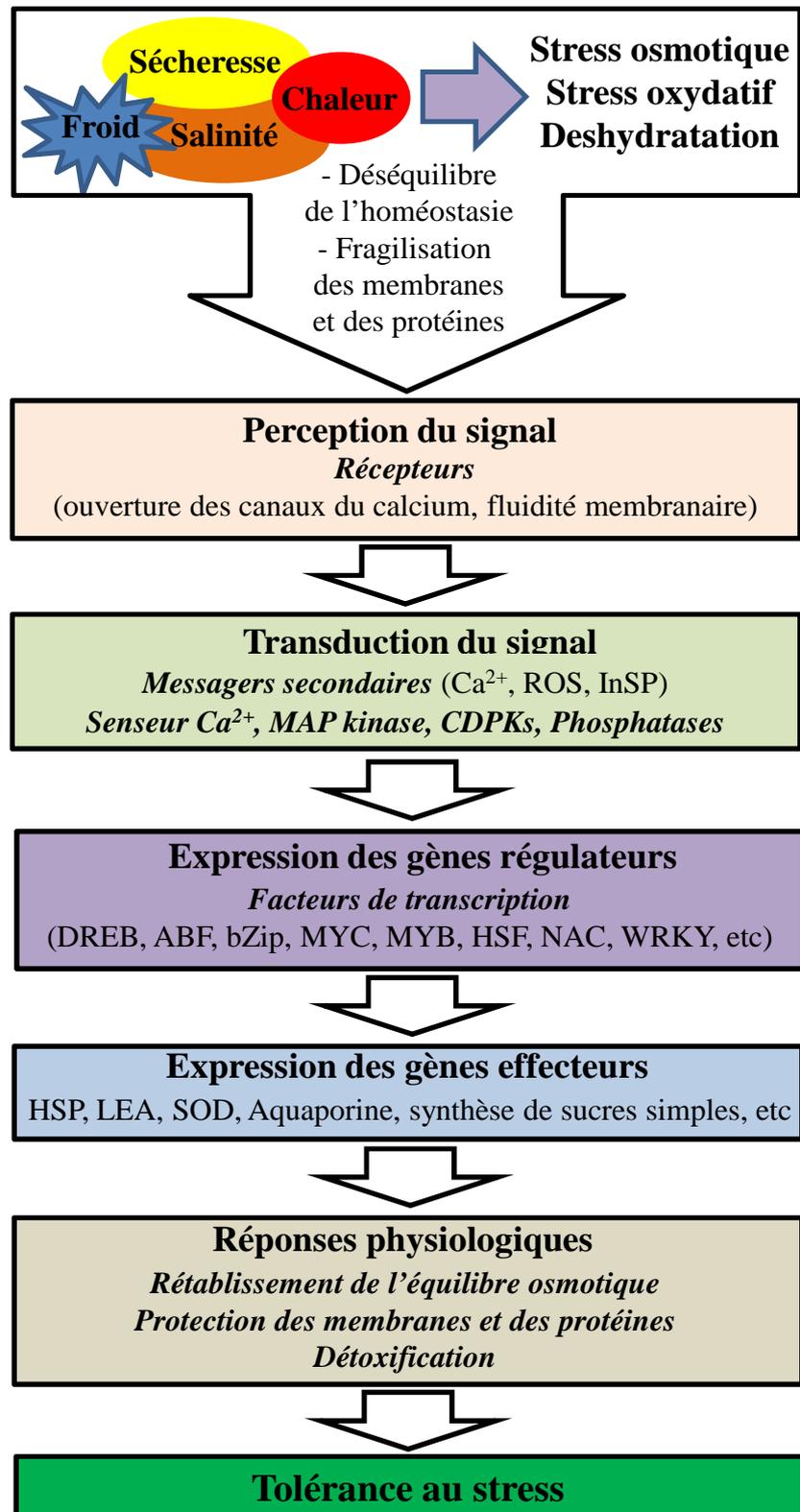


Fig i-4. Voie générale de la réponse des plantes aux stress abiotiques (adapté de Navarro (2009) et de Huang et al. (2012)).

Les différents stress abiotiques activent des voies de perception et de transduction du signal qui aboutissent à l'expression de facteurs de transcription qui activent les gènes effecteurs responsables des réponses physiologiques.

ROS : Reactive Oxygen Species, CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase, DREB: DRE Binding factor, ABF: ABRE Binding Factor, HSF: Heat Shock transcription Factor, LEA: Late Embryogenesis Abundant, HSP: Heat Shock Protein, SOD: SuperOxide Dismutase

cycle de vie pour se reproduire rapidement (Farooq *et al.*, 2009). Les adaptations morphologiques les plus courantes chez les plantes tolérant la sécheresse sont la réduction de la surface des feuilles et de la densité de stomates, l'augmentation de la succulence, l'épaisseur de la cuticule des feuilles et le dépôt de cire.

Les changements morphologiques induits par des températures élevées sont généralement similaires à ceux induits par la sécheresse. Au niveau de la plante entière, on observe une tendance générale à la réduction de la taille des cellules et par conséquent la réduction des feuilles, des racines et des tiges aboutissant à l'inhibition de la croissance des plantes. On observe également une augmentation de la densité des stomates, des trichomes et des vaisseaux du bois des racines et des tiges (Bañon *et al.*, 2004).

La plupart des plantes sont sensibles ou hypersensibles au sel (glycophytes) et se distinguent des halophytes qui présentent des adaptations anatomiques et morphologiques particulières, en plus de ceux décrits pour le stress hyper-osmotique du à la sécheresse (Flowers *et al.*, 1986). Au niveau du feuillage, on observe certains appendices comme les trichomes et les glandes à sel multicellulaires qui permettent l'excrétion de l'excès de sel (Wahid, 2003).

2.2. Principales voies de réponse aux stress abiotiques

Les plantes exposées à un stress modéré sont capables d'ajuster transitoirement leur métabolisme de manière à réduire les dommages et permettre la récupération après le stress, c'est le processus connu comme acclimatation (Janska *et al.*, 2010).

Comme mentionné plus haut, les stress abiotiques peuvent provoquer des dommages cellulaires similaires, et on observe que les réponses des plantes sont souvent interconnectées à travers l'induction de nombreux gènes (Wang *et al.*, 2003; Nakashima *et al.*, 2009). Les stress environnementaux activent des voies communes de signalisation et de réponse cellulaire conduisant à ces stratégies de protection de la cellule (figure i-4). Les signaux de stress sont souvent perçus par des récepteurs se trouvant sur les membranes cellulaires. Cependant, le froid a une action directe sur la structure des membranes dont la désorganisation (perte de fluidité membranaire) est perçue comme un signal du stress. Ce signal est ensuite transmis par l'intermédiaire de seconds messagers comme le calcium, les espèces actives d'oxygène ou bien l'inositol triphosphate. Cette modulation du niveau de Ca^{2+} cytosolique est détectée et analysée par des protéines de liaison du calcium, aussi appelée Ca^{2+} senseurs, qui provoquent une cascade de phosphorylation donnant lieu à l'activation des gènes majeurs impliqués dans la réponse au stress ou des facteurs de transcription qui contrôlent ces gènes. Ces gènes permettent la mise en place de mécanismes pour la survie de la plante : rétablissement de l'équilibre osmotique par accumulation de solutés compatibles, protection des membranes et des protéines et détoxification par élimination des espèces actives d'oxygène. Les produits de ces gènes conduisent finalement à l'augmentation de la tolérance des plantes pour assurer leur survie en conditions défavorables.

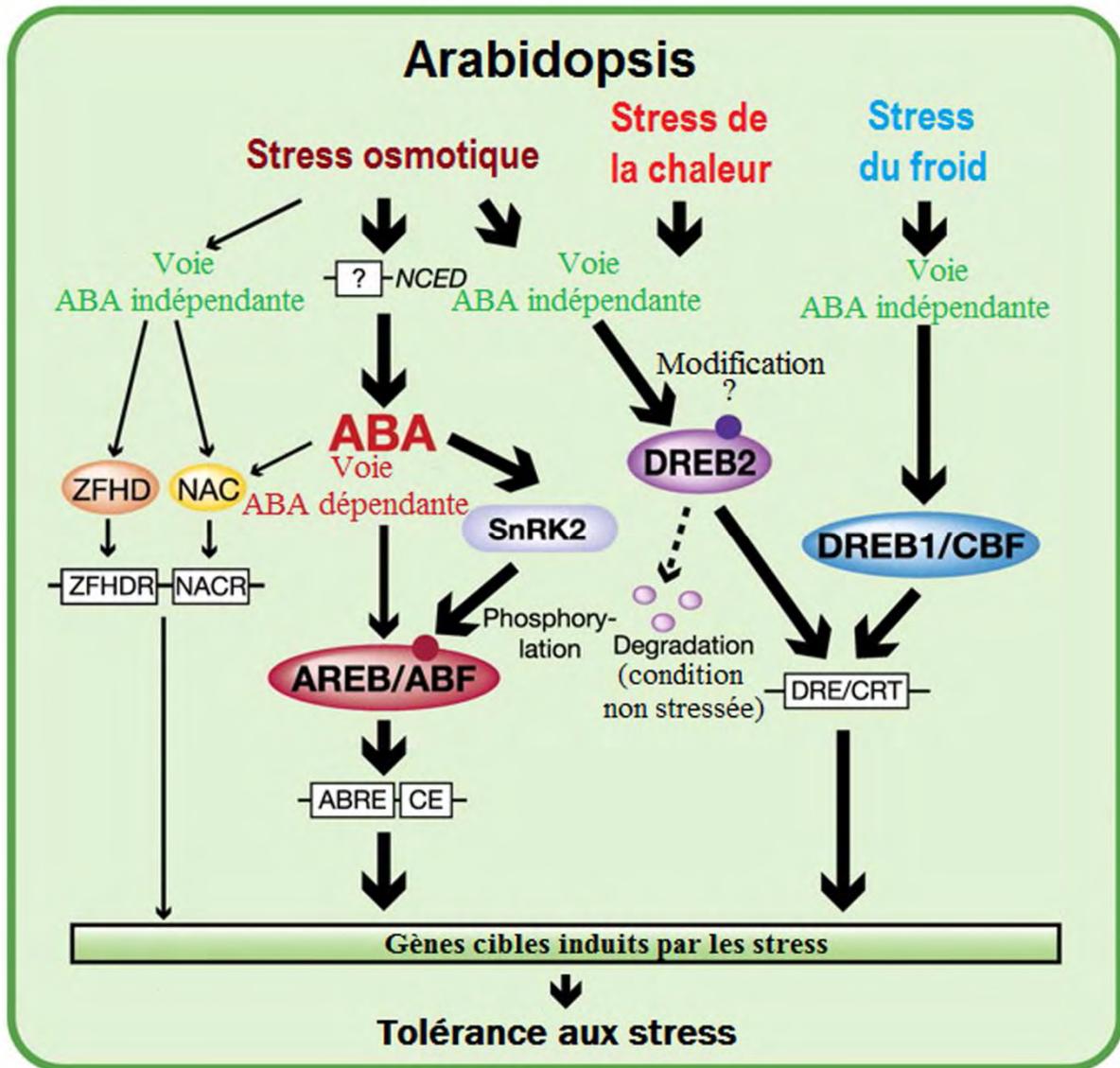


Fig i-5. Réseaux de régulation transcriptionnelle en réponse aux stress abiotiques chez *Arabidopsis* (Nakashima et al., 2009)

Facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes induits par les stress: boîtes ovales. Eléments cis liés à la transcription en réponse aux stress: boîtes blanches. Protéines kinases liées à la phosphorylation des facteurs de transcription: boîtes violet claire. Modifications post traductionnelles, exemple phosphorylation: petits cercles
 NCED: 9-cis epoxy-caroténoïde dioxygénase, SnRK2: SNF1-related protein kinase 2, ZFHD: zinc-finger homeodomain transcription factor, ZFHDR: ZFHD recognition, NACR: NAC recognition, ABA: Abscisic Acid, AREB/ABF: ABRE-binding protein/ABRE-binding factor, ABRE: ABA Responsive Element

Les analyses globales du transcriptome suggère l'existence de points de convergence entre les voies de signalisation en réponse aux stress abiotiques (Seki *et al.*, 2002; Rabbani *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2013). Des réseaux de régulation transcriptionnelle en réponse aux stress abiotiques chez *Arabidopsis* et les herbacées (figure i-5) montrent des voies dépendante et indépendante de l'ABA (Nakashima *et al.*, 2009).

Les facteurs de transcription jouent un rôle central dans l'expression des gènes en régulant l'expression des gènes en aval comme des éléments de trans-activation par la liaison spécifique sur des éléments de cis-activation dans les promoteurs des gènes cibles. Dans les génomes des plantes on estime à 7% des séquences codant des facteurs de transcription et nombre d'entre eux sont des gènes de réponse aux stress abiotiques. Ces facteurs de transcription participent à la réponse en régulant l'expression de leurs gènes cibles codant des protéines avec des fonctions spécifiques comme par exemple le renouvellement des protéines, la réponse à la déshydratation et les modifications de la paroi cellulaire. Ces facteurs de transcription font partie des principales familles de régulateurs chez les plantes: bZIP (basic leucine zipper), AP2/ERF (APETALA 2/ethylene-responsive element binding factor), NAC (NAM/ATAF1/CUC2), WRKY, MYB, ZFs (Cys2 (C2) His2 (H2)-type zinc fingers), et bHLH (basic helix-loop-helix). Le rôle de ces facteurs de transcription dans les réponses aux stress abiotiques a fait l'objet d'une revue récente (Lindemose *et al.*, 2013).

Les DREBs (**D**ehydratation **R**esponsive **E**lement **B**inding Factor) appartenant à la famille des AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive element binding Factor) sont les principaux facteurs de transcription impliqués dans les réponses aux stress abiotiques des plantes. Ils régulent l'expression des gènes via des éléments de cis-activation «Dehydration-Responsive/C-Repeat» (DRE/CRT) (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Une description plus précise des facteurs DREBs est présentée dans le Chapitre I.

3. Objectifs du travail de thèse

Le programme de recherche de l'équipe d'accueil est centré sur les réponses adaptatives au froid de l'eucalyptus, avec une approche de génomique fonctionnelle. Une analyse globale du « transcriptome froid » chez *Eucalyptus* a été réalisée par l'équipe (Keller *et al.*, 2009) avec le double objectif d'identifier les principaux mécanismes adaptatifs et de développer des outils moléculaires pour l'amélioration génétique de la tolérance aux stress abiotiques de l'espèce. Parmi les gènes régulateurs isolés, l'équipe s'est particulièrement intéressée à l'étude de la famille de facteurs de transcription DREB1/CBF (CRT-Binding Factor) qui est considérée comme une composante essentielle de la réponse au froid chez les plantes. Ces facteurs sont caractérisés par un domaine conservé appelé AP2, qui permet la liaison à l'ADN. Ce domaine est entouré de séquences conservées appelées signatures CBFs

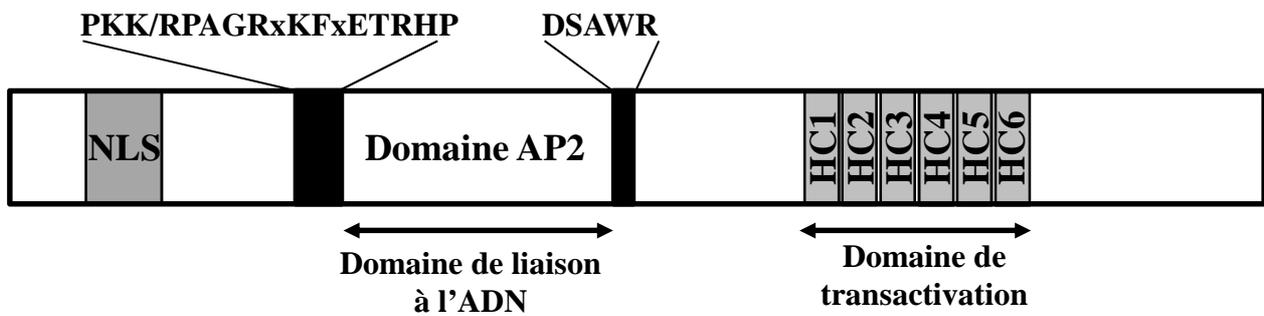


Fig i-6. Schéma structural de la protéine CBF.

NLS : Nuclear Localization Signalisation, AP2 : APETALA 2, HC: Hydrophobic Cluster, PKK/RPAGRxKFxETRHP et DSAWR : signatures CBF.

(PKK/RPAGR_xKF_xETRHP; DSAWR) qui jouent un rôle dans la spécificité de liaison à l'ADN (Jaglo et al., 2001). Les CBFs présentent un motif de la localisation nucléaire (NLS) en N-terminal et un domaine de transactivation en C-terminal (figure i-6).

La comparaison des profils de transcription des quatre premiers membres de la famille *CBF* isolés chez *Eucalyptus* révèle des différences dans le niveau d'expression constitutive, la spécificité de réponse aux stress abiotiques et surtout dans la réponse de ces gènes à différents types de traitement au froid (El Kayal et al., 2006; Navarro et al., 2009). Ce comportement différentiel laisse supposer que les *CBF* assurent des rôles complémentaires dans la réponse au stress. Chez *Eucalyptus*, pour l'étude fonctionnelle des *CBF*, l'équipe a généré des lignées d'eucalyptus transgéniques présentant une surexpression constitutive (promoteur 35S) de deux gènes choisis pour leur forte réponse aux conditions d'acclimatation (*CBF1a*) et de choc froid (*CBF1b*). Les premières analyses réalisées sur des micro-boutures *in vitro* ont révélé une augmentation de la tolérance au gel. Ces plantes transgéniques présentent aussi des modifications importantes de la croissance et du développement (Navarro et al., 2011). Certaines de ces modifications phénotypiques ont déjà été observées chez d'autres espèces (sans que les voies de régulation soient identifiées) mais d'autres semblent plus spécifiques de l'eucalyptus comme le dépôt de cire et l'augmentation du nombre des glandes à huile. Ce premier phénotypage *in vitro* a été fortement conditionné par l'état physiologique de ces plantules non enracinées et cultivées dans une atmosphère saturée en humidité sur un milieu synthétique très riche en sucre et contenant des phytohormones. Il a donc été nécessaire de réaliser le phénotypage sur des plantes développées et cultivées en terre, ce qui impose au préalable une étape d'enracinement *in vitro*, prérequis pour l'acclimatation *ex vitro*.

Au sein du programme de recherche de l'équipe, mon travail a consisté à étudier le rôle des facteurs de transcription *CBF* dans le contrôle du développement de l'eucalyptus en condition de stress. L'analyse phénotypique des lignées sur-exprimant de *CBF1a* et de *CBF1b* concerne à la fois la tolérance aux stress abiotiques et le développement des plantules *ex vitro*. Au-delà des études anatomiques, cytologiques et chimiques, les analyses visent à identifier les gènes dérégulés dans les lignées. Pour ce dernier objectif, ma participation à des travaux de l'équipe sur l'analyse globale du transcriptome d'*E. gunnii* au froid m'a permis d'identifier les familles de gènes les plus représentatives de la réponse au froid. Ensuite, grâce à la disponibilité de la séquence du génome d'*E. grandis*, j'ai réalisé l'annotation de principales familles multigéniques, mises en évidence dans l'étude globale ou connues pour leur rôle dans le contrôle du développement. Au sein de ces familles, j'ai pu prédire quels membres sont potentiellement cibles des *CBF* par la recherche *in silico* des cis-éléments CRT/DRE. Enfin, ces lignées transgéniques ont été analysées pour l'expression des transgènes et des gènes cibles des *CBF* potentiellement impliqués dans la tolérance au stress, la croissance et le développement.

Chapitre I. Etude des facteurs de transcription DREBs

Famille AP2/ERF	Groupe	<i>E. grandis</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>V. vinifera</i>	<i>P. trichocarpa</i>
Sous-famille DREB	A1	17	6	7	6
	A2	6	8	5	8
	A3	1	1	0	2
	A4	16	16	15	26
	A5	17	16	8	14
	A6	7	10	5	11
	Sous-total	61 + 3p	57	40	67
Sous-famille ERF	B1	12	15	11	19
	B2	3	5	3	6
	B3	65	18	41	35
	B4	10	7	3	7
	B5	5	8	4	8
	B6	13	12	21	26
	Sous-total	103 + 5p	65	83	101
Sous-famille AP2		21	18	20	26
Sous-famille RAV		6 + 2p	6	6	5
Sous-famille Soloist		1	1	1	1
Total		202	147	150	200

Tab I-1. Comparaison de la composition de la famille AP2/ERF (sous-familles et groupes) entre *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* et *Populus trichocarpa*. La famille de facteurs de transcription AP2/ERF d'*E. grandis* a été annotée dans cette étude. La composition de la famille AP2/ERF d'*A. thaliana*, *V. vinifera* et *P. trichocarpa* a été décrite précédemment par (Sakuma *et al.*, 2002), (Feng *et al.*, 2005), (Zhuang *et al.*, 2008) et (Licusi *et al.*, 2010). L'annotation de la sous-famille DREB de ces espèces (sauf *Arabidopsi*) a été validée manuellement dans cette étude. « p » est le nombre de pseudogènes.

1. Caractéristiques des facteurs DREB

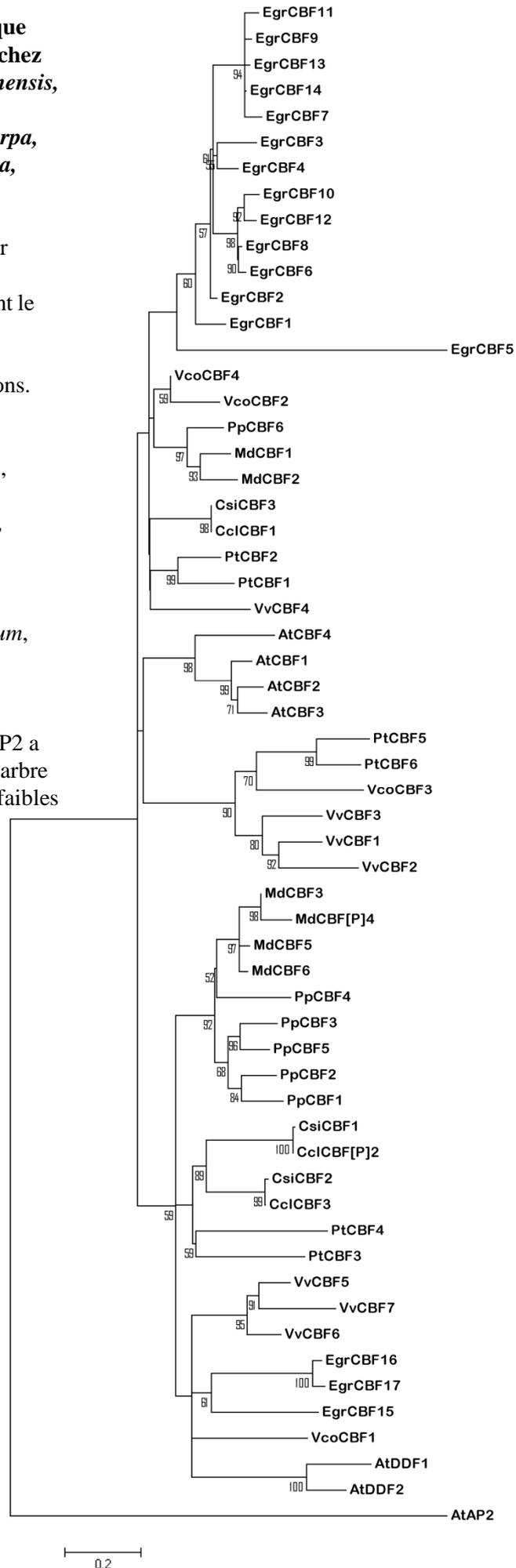
Les DREBs sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des AP2/ERF (APETALA2/Ethylene-Responsive element binding Factor) qui comprend de 193 à 200 membres selon les espèces végétales (Sharoni et al, 2011). Cette famille est caractérisée par un domaine très conservé de liaison à l'ADN, le domaine AP2 contenant de 50 à 60 acides aminés (Okamuro *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2005). Selon le nombre et le type de domaine, la famille AP2/ERF est divisée en cinq sous-familles AP2, RAV (**R**elated to **ABI3/VP1**), ERF, DREB (**D**ehydration **R**esponsive **E**lement **B**inding) (Sakuma *et al.*, 2002). Les facteurs AP2 contiennent deux domaines AP2 et sont décrits comme impliqués dans la régulation du développement (Elliott *et al.*, 1996; Chuck *et al.*, 1998; Boutilier *et al.*, 2002). Les protéines RAV possèdent deux domaines (AP2 et B3) et sont associées à la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Sohn *et al.*, 2006). Les ERF et DREB qui n'ont qu'un seul domaine AP2, sont connus pour réguler la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Les ERF sont des facteurs de transcription se liant à une GCC box (AGCCGCC) (Fujimoto *et al.*, 2000), cis-élément présent sur des gènes de réponse aux pathogènes (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995). Les facteurs DREB se fixent sur la séquence A/GCCGAC appelée CRT (**C**-Repeat) ou **D**ehydration **R**esponsive **E**lement (DRE), située sur les promoteurs des gènes de réponse aux stress abiotiques (Sakuma *et al.*, 2002). La sous-famille DREB est divisée en six groupes (A1-A6) sur la base du pourcentage de similarité du domaine AP2/ERF de ces facteurs (Sakuma *et al.*, 2002). Les groupes A1 et A2 (Agarwal *et al.*, 2010), plus connus comme DREB1/CBF et DREB2, sont décrits comme des régulateurs clés de la réponse des plantes aux stress abiotiques (Lata and Prasad, 2011). Selon la littérature, les gènes *DREB1/CBF* sont principalement induits par le froid alors que les gènes *DREB2* sont décrits comme répondant à la sécheresse ou à la chaleur; cependant, cette régulation semble très variable selon l'espèce végétale (Matsukura *et al.*, 2010; Matsukura *et al.*, 2010; Lata & Prasad, 2011; Zhao *et al.*, 2012).

Récemment, l'induction de l'expression de *DREB2* au froid a été observée chez la tomate (Guo & Wang, 2011), le chrysanthème, le haricot, le millet, le blé, et le maïs (Agarwal *et al.*, 2010). Par ailleurs, des *CBF/DREB1s* induits par la salinité ou la sécheresse ont été décrits chez *Arabidopsis*, le riz et le blé (Agarwal *et al.*, 2010).

Les facteurs de transcription DREB1/CBF et DREB2 ont été identifiés chez plusieurs plantes telles qu'*Arabidopsis*, le riz, le haricot et le pommier (Nakano *et al.*, 2006; Zhuang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2012). La surexpression de *DREB1s/CBFs* induit l'expression de gènes situés en aval dans la réponse au stress et améliore la tolérance au gel, à la sécheresse et à la salinité. Par contre, les *DREB2A* et *DREB2B* ne sont pas induits par le froid mais sont induits par la déshydratation, le stress salin et le choc thermique. La surexpression d'une forme active constitutive de DREB2 induit l'expression de gènes répondant aux stress abiotiques et améliore la tolérance à la sécheresse, à la salinité et à la chaleur (Mizoi *et al.*, 2011).

Fig I-1. Arbre phylogénétique construit à partir des CBF chez *Citrus clementina*, *Citrus sinensis*, *Eucalyptus grandis*, *Malus domestica*, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *Vitis vinifera*, *Vaccinium corymbosum* et *Arabidopsis thaliana*.

L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: EgrCBF1-17 d'*E. grandis*, CclCBF1-3 de *C. clementina*, CsiCBF1-3 de *C. sinensis*, MdCBF1-6 de *M. domestica*, PtCBF1-6 de *P. trichocarpa*, PpCBF1-6 de *P. persica*, VvCBF1-7 de *V. vinifera*, VcoCBF1-4 de *V. corymbosum*, AtCBF1-4 et AtDDF1-2 d'*A. thaliana*. AtAP2 (At5G557390.1), un membre de la sous-famille AP2 a été utilisé pour la racine de l'arbre phylogénétique. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.



Notre étude est focalisée sur ces facteurs DREB1/CBF et DREB2 qui sont les mieux décrits dans la littérature pour de nombreuses espèces végétales. En effet, même chez les plantes modèles, les autres groupes de la sous-famille DREB (A 3-4-5-6) sont pour l'instant très peu étudiés. Dans la suite du manuscrit, les gènes *DREB1/CBF* sont nommés *CBF* pour simplifier le texte. Une première partie concerne l'annotation et la comparaison phylogénétique de ces deux groupes chez les espèces ligneuses dont la séquence du génome est disponible (Wisniewski et al., 2013 *in press*). La deuxième partie concerne l'analyse *in silico* des promoteurs de ces gènes chez *E. grandis* et enfin, l'étude quantitative de leur expression en condition de stress abiotiques (Cao *et al*, *submitted*) permet de compléter cette première vision de leur régulation.

2. Identification et étude phylogénétique des groupes CBF et DREB2 chez les ligneux

Dans l'article de revue (Wisniewski et al., 2013 *in press*) j'ai réalisé toutes les annotations manuelles et les analyses phylogénétiques pour les groupes DREB1/CBF et DREB2, ainsi que ICE pour *Eucalyptus*, *Malus*, *Prunus*, *Vitis*, *Populus*, *Vaccinium* et deux espèces de *Citrus*. Par souci de simplification, je ne décrirai pas les résultats obtenus également sur les familles ICE.

Avec 202 membres, la taille de la famille AP2/ERF chez *E. grandis* est comparable à celle du peuplier (200) et plus grande que chez la vigne (149 membres) et chez *Arabidopsis* (147), mais toutes ces familles sont composées des mêmes sous-familles de gènes, montrant la conservation de la structure de la famille. L'analyse phylogénétique qui suit ne concerne que les groupes de facteurs CBF et DREB2 qui sont analysés en comparant toutes les espèces ligneuses dont le génome est séquencé et disponible, c'est à dire le peuplier, la vigne, l'eucalyptus, le pommier, le pêcher, le clémentinier, l'oranger et la myrtille arbustive.

La séquence génomique du peuplier (*Populus trichocarpa*) a été la première disponible pour un ligneux (Tuskan et al, 2006), grâce à la collaboration internationale (USA, Canada, Suède, Belgique, France, Autriche, Finlande et Allemagne). Pour la vigne, deux séquences génomiques ont été mises à disposition en 2007, à partir de deux génotypes de « Pinot noir », la première par le consortium franco-italien VIGNA (Jaillon et al, 2007) et la seconde par une équipe italienne (Velasco et al, 2007). La séquence du génome de pommier, basé sur un cultivar de « Golden Delicious » a été ensuite rendue publique (Velasco et al, 2010). Disponible depuis 2011 (<http://www.phytozome.net/>), la séquence du génome d'eucalyptus (*E. grandis*) a été obtenue grâce au consortium international EUCAGENE et l'appui de « US Department of Energy ». Enfin, ont été rendus publics en 2012 les génomes du pêcher, basé sur un haploïde doublé « Lovell » (Arùs et al, 2012), et du clémentinier (*C. clementina*) (Gmitter et al, 2012). Sont également disponibles pour l'oranger, la séquence génomique de *C. sinensis* (<http://www.citrusgenomebd.org>) et une collection d'ESTs. Enfin, notre étude comparative a pu bénéficier de la disponibilité de données génomiques non publiques concernant *Vaccinium corymbosum*

Espèce	Feuillage	CBF	DREB2
<i>Eucalyptus grandis</i>	persistant	17	6
<i>Eucalyptus gunnii</i>	persistant	≥16	6
<i>Malus domestica</i>	caduque	6	13
<i>Populus trichocarpa</i>	caduque	6	8
<i>Vitis vinifera</i>	caduque	7	5
<i>Prunus persica</i>	caduque	6	6
<i>Vaccinium corymbosum</i>	caduque	4	4
<i>Citrus clementina</i>	persistant	3	4
<i>Citrus sinensis</i>	persistant	3	4

Tab I-2. Comparaison de la taille des groupes *DREB1-CBF* et *DREB2* d'*Eucalyptus* et d'autres ligneux. Les groupes *DREB1/CBF* et *DREB2* chez *E. grandis*, *E. gunnii*, *P. persica* et 2 *Citrus* ont été annotés dans cette étude. Les *DREB1/CBF* et *DREB2* des autres espèces ont été décrites par (Zhuang *et al.*, 2008; 2011) et (Licausi *et al.*, 2010) mais l'annotation de ces groupes a été validée manuellement dans cette étude.

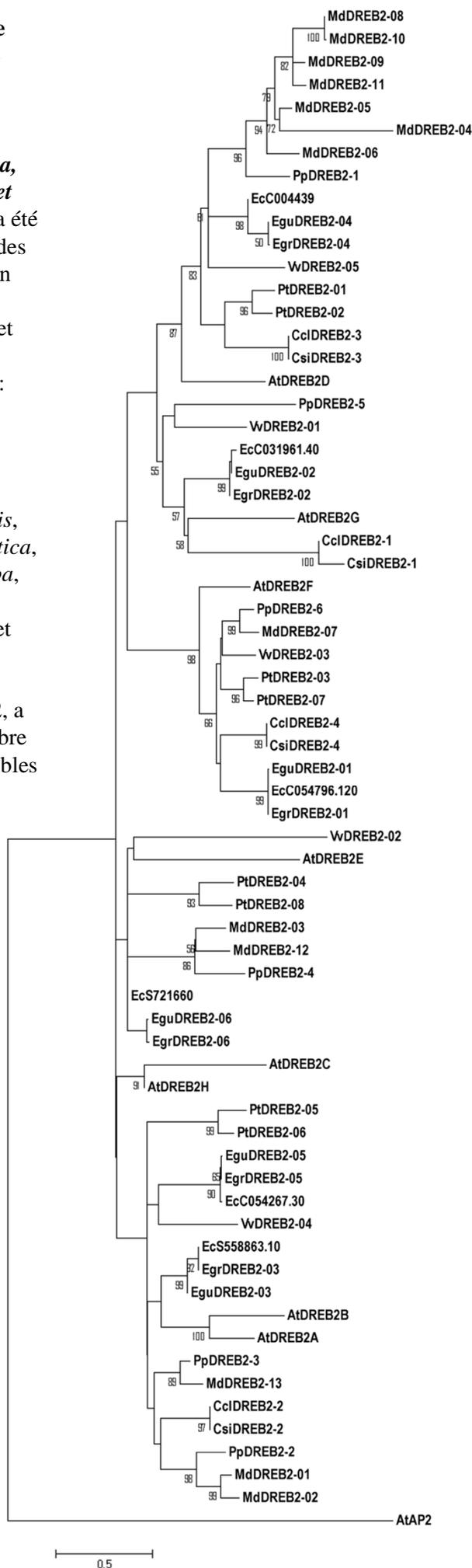
(<http://www.vaccinium.org/>) provenant du consortium conduit par A. Brown (North Carolina State University) et d'une base de données transcriptomiques (<http://bioinformatics.towson.edu/BBGD454/>) (Rowland *et al.*, 2012).

L'utilisation de ces ressources pour l'analyse phylogénétique de ces facteurs chez les espèces ligneuses étudiées a nécessité de définir les critères stricts d'annotation basés sur les éléments conservés décrits dans la littérature et de procéder à un contrôle manuel des annotations après alignement des séquences. En utilisant les données génomiques disponibles, nous avons pu identifier 17 *CBF* chez *Eucalyptus*, six chez le pêcher, quatre chez la myrtille et trois chez *Citrus*. Concernant les *DREB2*, nous avons identifié six gènes chez *E. grandis*. Dans certains cas, notre analyse nous a conduits à proposer des corrections pour des groupes de gènes dont l'annotation avait déjà été publiée. La famille DREB du pommier a été décrite comme étant composée de trois *CBF* et de 16 *DREB2* (Zhuang *et al.*, 2011). Cependant notre analyse a permis d'identifier six *CBFs* et seulement 13 *DREB2s*, les autres séquences étant incomplètes ou en doublons. Lorsque les 18 séquences identifiées comme *DREB2* chez le peuplier (Zhuang *et al.*, 2008), sont alignées avec les *DREB2* d'eucalyptus, de vigne et d'*Arabidopsis*, l'analyse manuelle valide seulement huit de ces séquences comme étant effectivement des *DREB2*, les 10 autres étant proches des gènes du groupe B6, qui appartient à la sous-famille *ERF*. Pour la vigne, un gène *DREB2* a été identifié en plus des quatre déjà décrits dans la littérature (Zhuang *et al.*, 2009).

En première analyse, le nombre de gènes *CBF* est très variable selon les espèces végétales (tableau I-1 & I-2). Si comme *Arabidopsis* la plupart des espèces ligneuses possèdent six à sept copies du gène *CBF*, certaines ont seulement trois ou quatre copies, mais à l'inverse on en compte 17 pour *E. grandis*. Parmi ces 17 copies, 14 sont localisées en cluster sur le chromosome 1, et deux sur le chromosome 5. La situation de tandem de gènes dupliqués, déjà décrite chez *Arabidopsis* (3 *CBFs* en tandem sur le chromosome 4 et 2 *DDFs* sur le chromosome 1) est aussi observée chez *Prunus* (6 *CBFs* sur le scaffold 5), *Malus* (2 *CBFs* sur les chromosomes 4 et 6), *Populus* (2 *CBFs* sur chromosome 1), et chez *Vitis* (2 *CBFs* sur le chromosome 6). Pour chaque espèce étudiée, l'analyse phylogénétique (figure I-1) montre que les paralogues fortement apparentés se distribuent en deux groupes pour *Eucalyptus* et *Arabidopsis*, et trois pour *Vitis*, *Populus* et *Malus*. Cela suggère que l'évènement de duplication conduisant à la séparation des *CBFs* et *DDFs* s'est produit chez *Arabidopsis* avant la divergence avec les espèces ligneuses. Par contre, des duplications plus récentes, qui semblent spécifiques de chaque espèce végétale, ont conduit à des copies paralogues fortement conservées.

La même démarche, conduite pour comparer les *DREB2* de ces espèces ligneuses, montre que le nombre de copies est moins important pour les deux citrus (4 gènes), la vigne (5 gènes), le pêcher et l'eucalyptus (6 gènes pour chaque espèce) que pour le peuplier et *Arabidopsis* (8 gènes) ou le pommier (13 copies). L'arbre phylogénétique des *DREB2* est divisé en trois principales parties, chacune contenant des paralogues de chaque espèce (figure I-2). Comme pour la vigne, les séquences d'eucalyptus sont

Fig I-2. Arbre phylogénétique construit à partir des DREB2 chez *Citrus clementina*, *Citrus sinensis*, *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus gunnii*, *Malus domestica*, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *Vitis vinifera* et *Arabidopsis thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: six EgrDREB2 d'*E. grandis*, six EguDREB2 d'*E. gunnii*, quatre CclDREB2 de *C. clementina*, quatre CsiDREB2 de *C. sinensis*, treize MdDREB2 de *M. domestica*, huit PtDREB2 de *P. trichocarpa*, six PpDREB2 de *P. persica*, cinq VvDREB2 de *V. vinifera* et huit AtDREB2 d'*A. thaliana*. AtAP2 (At5G557390.1), un membre de la sous-famille AP2, a été utilisé pour la racine de l'arbre phylogénétique. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.



0.5

distribuées sur les différentes parties de l'arbre, ce qui semble indiquer l'absence de duplication récente chez ces espèces, caractérisées par un faible nombre de copies.

En conclusion, la comparaison des sous-groupes *CBF* et *DREB2* montre une évolution différente selon les espèces ligneuses, avec une expansion soit du groupe *DREB1/CBF* soit du groupe *DREB2*. Ainsi pour l'eucalyptus on observe un nombre important de duplications des *CBF* dont le nombre est trois fois plus élevé que pour le peuplier, alors que le nombre de *DREB2* est parmi les plus bas. La situation est exactement l'inverse pour le pommier qui présente 13 *DREB2* et seulement six *CBF*. L'étude des relations phylogénétiques permet donc de faire des hypothèses sur d'éventuels évènements de duplications au cours de l'évolution, avant ou après la divergence des espèces étudiées.

3. Etude de la régulation des *DREB1* et *DREB2*

3.1. Analyse *in silico* des séquences promotrices

Les facteurs de transcription régulent l'expression des gènes cibles, qu'ils soient effecteurs ou régulateurs, en se liant spécifiquement sur une séquence d'ADN (cis-élément) qui se trouve dans la région promotrice des gènes cibles. L'analyse *in silico* des promoteurs des gènes permet donc de prédire la présence de ces boîtes de liaison et de faire des hypothèses sur la régulation des gènes. Dans cette étude, nous avons recherché sur une longueur de 1000 pb des promoteurs des gènes *DREB1/CBF* et *DREB2* la présence de cis-éléments en lien avec les stress abiotiques. Le tableau I-3 présente la nature des cis-éléments connus pour participer à la réponse aux stress abiotiques et qui ont été recherchés dans le promoteur des *CBF* et *DREB2*.

Les résultats de l'analyse sont décrits dans le tableau I-4. Les cis-éléments en lien avec le froid sont souvent présents dans le promoteur des *CBF* : au moins un élément CRT/DRE est prédit dans la région promotrice de 8 parmi 17 *CBFs*. Par contre, si aucun promoteur de *DREB2* ne contient l'élément CRT/DRE, l'élément LTRE ne se trouve que dans trois gènes *DREB2-2*, *DREB2-5* et *DREB2-6*. Cette présence d'éléments CRT/DRE ou LTRE suggère une possibilité d'autorégulation de ces gènes *DREB*, avec une probabilité plus forte pour le *CBF* que pour les *DREB2*, puisque 8 *CBF* possèdent le cis-élément de 6 nucléotides (CRT/DRE).

La boîte CGCG est trouvée dans le promoteur de 15 *CBF* et d'un seul *DREB2*. Le cis-élément MYC est retrouvé en nombre très important dans le promoteur de tous les *CBF* et avec un effectif moins important chez les *DREB2*. Les cis-éléments associés à la réponse sécheresse, tels que les MYB et les ABRE, sont nombreux dans le promoteur des *CBF* et *DREB2*. Seul le cis-élément CM2 de réponse aux CAMTA est présent dans les promoteurs de cinq *CBF* mais jamais dans ceux de *DREB2*. En accord avec ce résultat, le nombre d'éléments MYC de réponse au froid est généralement plus élevé chez les *CBF*

Cis-élément	Séquence	Facteur de transcription	Nature du stress	Références bibliographiques
DRE/CRT LTRE	A/GCCGAC CCGAC	CBF/DREB1 et DREB2	Froid, Sécheresse	Jiang et al., 1996; Kim et al., 2002 ; Yamaguchi et al., 2006
MYC	CANNTG	ICE (bHLH)	Froid	Chinnusamy et al., 2003; Abe <i>et al.</i> , 2003
Box CGCG	ACGCGC	CaMBP	Froid, Chaleur, Salinité, UV	Yang et Poovaiah, 2002
CM2	CCGCGT	CAMTA	Froid	Doherty <i>et al.</i> , 2009
HSE	nGAA _n TTC _n	HSF	Chaleur	Koskull-Doring <i>et al.</i> , 2007
MYB	CNGTTR	MYB	Sécheresse	Urao et al., 1999
ABRE	ACGTGG/T	ABF (bZip)	Froid, Sécheresse, Salinité	Yamaguchi-Shinozaki <i>et al.</i> 2006; 1994
Boite G	CACGTG	GBF (bZip)	Lumière, UV	Jakoby <i>et al.</i> , 2002
SORLIP	GCCAC	Facteurs régulés par PhyA	Lumière	Hudson and Quail, 2003
STRE	CCCCT	Zinc-finger (MSN)	Multi-stress (Chaleur, osmotique...)	Treger <i>et al.</i> , 1998

Tab I-3. Description des cis-éléments étudiés: séquences, facteurs de transcription fixant ces séquences et signaux abiotiques contrôlant ces facteurs.

	CRT/DRE	LTRE	MYC	Boite CGCG	CM2	MYB	ABRE	HSE	Boite G	SORLIP	STRE
EgrCBF1			15			1	2	1	1	4	1
EgrCBF2	2	2	7	3	2	3	3		1		1
EgrCBF3	1	1	9	2	1	1	3		1	16	8
EgrCBF4			5	2	1	2	1		1		2
EgrCBF5	1	1	3	2	1	2	1		1	6	2
EgrCBF6			4	1		1	3		1	6	4
EgrCBF7	1	1	15	1		3	5		1	5	1
EgrCBF8			9	1		1	2	1	1	6	4
EgrCBF9			8	2		1	2	1	1	6	4
EgrCBF10	3	3	5	1		2	1			6	2
EgrCBF11		3	7	1		2	2		1	5	2
EgrCBF12		1	2	2		3		1		7	6
EgrCBF13		2	7	1			1		1	6	4
EgrCBF14	1	1	4	1		1	1	1	1	3	4
EgrCBF15	1	4	13	4	1		6	2	4	12	2
EgrCBF16			4			4	5		3	2	2
EgrCBF17	1	2	3	1		4	3	1	2	2	2
EgrDREB2-1			4	1		3		1			2
EgrDREB2-2		1	6			2	4	1	2	3	3
EgrDREB2-4			2	2		3	2			3	2
EgrDREB2-5		1	9			1	2	4	1	4	
EgrDREB2-6		2	3			1	5		2	6	

Tab I-4. Cis-éléments prédits dans le promoteur des gènes CBF et DREB2 chez *E. grandis*. La prédiction a été réalisée en utilisant le logiciel PLACE pour chercher les motifs dans la région de 1000 pb avant l'ATG du gène.

(jusqu'à 15) par rapport aux *DREB2* (jusqu'à 9). Par contre une plus forte proportion de *DREB2* présente un élément HSE (site de fixation des HSF) de réponse à la chaleur et en particulier le *DREB2-5* contient quatre copies de cet élément. Enfin, la présence des boîtes G, SORLIP et STRE se trouvent dans le promoteur de la plupart des *CBF* et *DREB2* suggère une forte régulation par la lumière.

Ces résultats montrent que les promoteurs varient selon les différents *CBF* et *DREB2*, suggérant que chaque gène pourrait avoir un profil de régulation particulier, les *CBF* et les *DREB2* étant susceptibles de répondre au froid, à la chaleur, à la sécheresse ou à la lumière. Ces résultats suggèrent aussi que tous les *CBF* sont régulés par le froid, et la plupart d'entre eux peuvent également répondre à la chaleur, à la sécheresse et à la lumière d'après la présence des cis-éléments. En parallèle, on peut émettre l'hypothèse que si tous les *DREB2* sont régulés par la sécheresse, la plupart peuvent répondre aussi au froid, à la chaleur et à la lumière, particulièrement le *DREB2-5*.

D'après cette prédiction, il n'y aurait pas de spécificité de réponse entre les deux groupes vis-à-vis d'un stress abiotique. Ces données *in silico* suggèrent cependant une plus forte régulation par le froid des *CBF* et par la chaleur des *DREB2*. Certains gènes, en particulier des *CBF* pourraient aussi faire l'objet d'une autorégulation ou être induits par d'autres DREBs. L'étude de leur profil d'expression qui suit va permettre de vérifier ces hypothèses sur la réponse aux stress de l'environnement.

3.2. Etude de l'expression des DREBs en réponse aux stress abiotiques

Ces résultats font partie de la publication « Genome wide-analysis of DREB factors » (Cao *et al.*, *submitted*), pour laquelle ma participation a été significative dans le design d'amorces spécifiques pour chacun des gènes *DREB* étudiés, très délicat étant donné le fort niveau d'homologie entre paralogues. Cette étape a été cruciale pour pouvoir différencier et quantifier les transcrits issus de la réponse aux stress abiotiques et évaluer le niveau de redondance et de spécificité dans la régulation des gènes apparentés.

La première analyse de l'expression des gènes *CBF* et *DREB2* a eu pour objectif de savoir si tous les gènes identifiés chez *E. grandis* sont régulés par des conditions variées de stress abiotiques. L'expérience a donc été conduite sur des feuilles détachées qui ont été soumises à plusieurs heures de froid (4°C), de chaud (45°C sans déshydratation) ou de dessiccation (papier Whatman). Les ARN ont été récoltés après 8 heures de traitement en vue d'une amplification par RT-PCR quantitative. Il a été possible de désigner des amorces spécifiques pour 15 séquences sur 17 *CBF*, mais pas pour les deux autres gènes à cause de la forte similarité entre les séquences; cependant, en utilisant des amorces pour PCR classique sur ADNc, il a été démontré que ces deux gènes sont induits par les traitements appliqués.

Les données de RT-PCR quantitative permettent d'une part d'évaluer l'expression constitutive en conditions standard (expression de chaque gène relativement aux deux gènes de référence) et d'autre part de mesurer la régulation due aux diverses conditions de stress (ratio entre le résultat de l'essai traité et

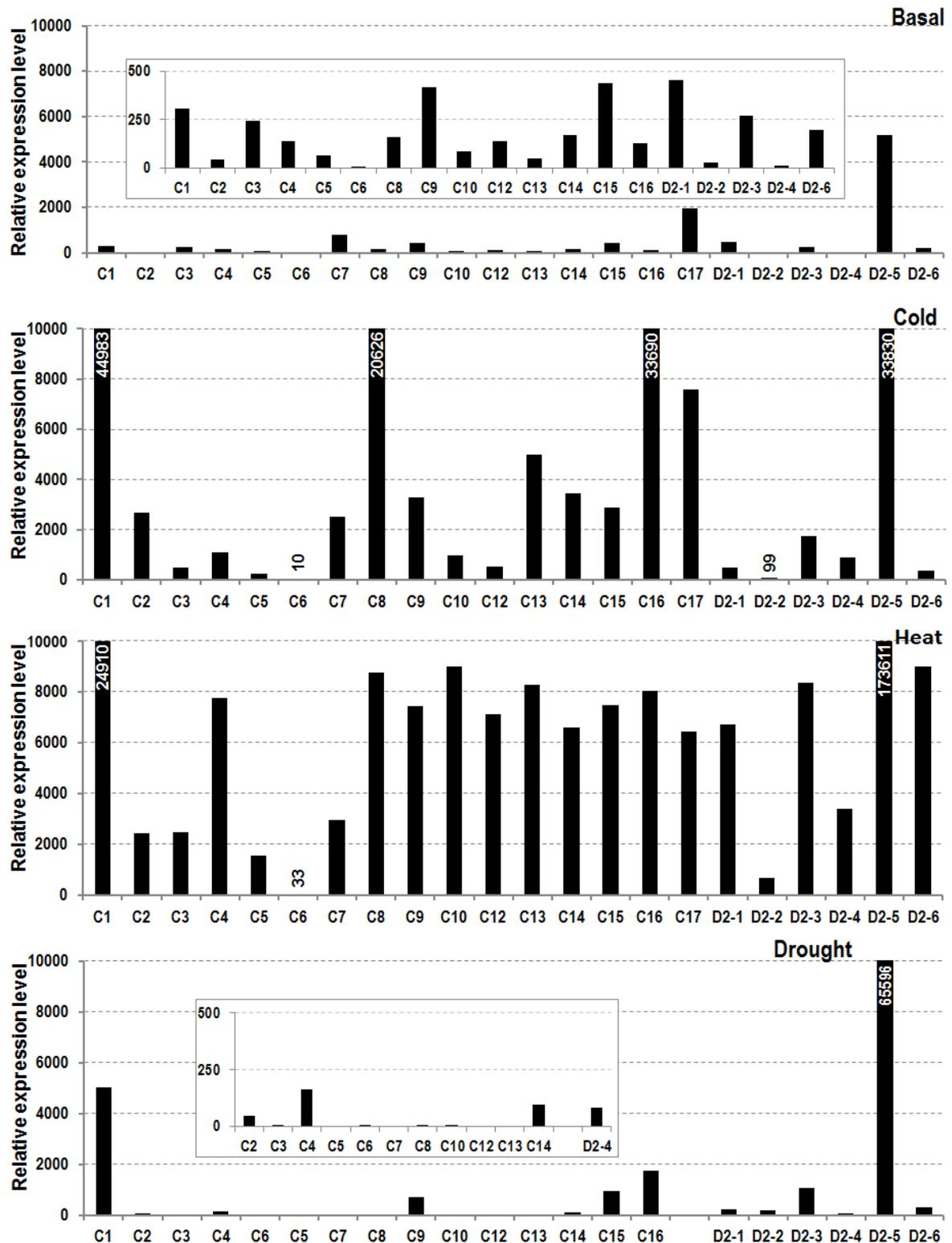


Fig I-3. Expression relative des *EgrCBF* et *EgrDREB2* en conditions de stress abiotiques pour les feuilles détachées soumises à 8 heures de froid (4°C), de chaleur (45°C) ou de sécheresse (feuilles mises sur papier Whatman sous la hotte). Les histogrammes représentent l'expression relative des gènes *EgrCBF* (C1 à C17) et *EgrDREB2* (D2-1 à D2-6) analysée par RT-qPCR (valeurs moyennes (n=3), unités arbitraires). Les données basales correspondent aux valeurs d'expression des feuilles détachées en condition standard (23°C). L'insertion présente dans une autre échelle le niveau relatif d'expression des gènes testés sauf *DREB2-5*. Les gènes de référence utilisés sont *PP2A1* et *PP2A3*.

celui de la condition standard). Les résultats obtenus (figure I-3) montrent que tous les gènes étudiés sont exprimés dans au moins une condition. Dans les conditions standard, l'expression des *CBF* et des *DREB2* est comparable, sauf *DREB2-5* qui présente un très fort niveau de transcrits. Tous les *CBF* et la plupart des *DREB2* sont régulés par le froid, et *CBF1*, *8*, *16* et *DREB2-5* présentent un très fort niveau d'expression. Le traitement à la chaleur provoque l'induction de tous les *CBF* et *DREB2* mais en particulier *DREB2-5*. Si on considère la faible induction des gènes due à la sécheresse, il est probable que les conditions appliquées ne soient pas optimales. Cependant, quelques *CBF* comme les *DREB2* sont induits, avec encore un très fort niveau pour *DREB2-5*.

Ces résultats d'expression sur *E. grandis* confirment les prédictions *in silico* de cis-éléments sur les promoteurs pour ces deux groupes de gènes par différents stress abiotiques avec des niveaux spécifiques pour chaque gène. Les *CBF* sont globalement plus régulés par le froid puisque 60% des gènes *CBF* ont un taux d'induction supérieur à 2000 contre seulement 17% des *DREB2*. En revanche, la réponse des 2 groupes au choc thermique apparaît équivalente à part la forte prédominance de l'induction de *DREB2-5* pour lequel 5 cis-éléments HSE ont été prédits.

4. Conclusions et discussion

Le premier résultat important de ce chapitre concerne l'explosion du seul groupe *CBF* au cours de l'évolution chez *Eucalyptus*, alors que le nombre des *DREB2* est relativement restreint. Si on compare *Eucalyptus* et *Citrus* (oranger et clémentinier), il semble que le nombre important de *CBF* ne soit pas lié à la persistance des feuilles. Certains ligneux (peuplier, vigne) ont le même nombre de *CBF* que chez les herbacées, suggérant aussi que cette duplication n'est pas directement corrélée au cycle de vie des plantes (annuelles ou pérennes). De plus, les différences entre espèces étant moins grandes si l'on considère le nombre total de *DREB1/CBF* + *DREB2*, on peut imaginer qu'après divergence des espèces, leur évolution spécifique dans un environnement donné aboutit à différentes compositions de ces familles. Il est donc intéressant de savoir si cette évolution aboutit à des membres dont la fonction est redondante ou bien si une spécialisation apparaît ou encore si certains membres peuvent avoir une nouvelle fonction (Duarte *et al.*, 2010).

Les deux groupes de facteurs *DREB1/CBF* et *DREB2*, qui appartiennent à la super-famille AP2/ERF, sont connus respectivement pour leur importance dans la réponse au froid et au stress hydrique/thermique (Qin *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2013). Cependant, certaines études décrivent aussi les *DREB2* comme répondant au froid chez certaines espèces (Lata and Prasad 2011) et en particulier chez *Malus* (Matsukura *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis* (Haake *et al.*, 2002), les quatre membres dupliqués correspondent à trois gènes redondants au niveau de la fonction (réponse au froid) et le *CBF4*, localisé sur un autre chromosome et qui répond à la sécheresse mais pas au froid (nouvelle fonction). Chez *Eucalyptus*, les études chez *E. gunnii* ont mis en évidence une complémentarité dans la régulation des

quatre *CBF* étudiés et d'autre part une réponse à des stress multiples pour un membre (*CBF1*), ce qui fait penser à la spécialisation de fonction (Navarro *et al.*, 2009). Mises à part les études sur *Arabidopsis*, le pommier et l'eucalyptus, aucune étude comparative de l'expression des *CBF* et des *DREB2* n'a été publiée, mais ces résultats suggèrent que la régulation est particulière pour chaque espèce.

Les résultats d'expression sur *E. grandis* confirment les prédictions *in silico* de cis-éléments sur les promoteurs pour ces deux groupes de gènes qui répondent au niveau transcriptionnel à différents stress abiotiques avec des niveaux spécifiques pour chaque gène. Les *CBF* sont globalement plus régulés par le froid puisque 60% des gènes *CBF* ont un taux d'induction supérieur à 2000 contre seulement 17% des *DREB2*. En revanche, la réponse des deux groupes au choc thermique apparaît équivalente à part la forte prédominance de l'induction de *DRE2-5* pour lequel cinq cis-éléments HSE ont été prédits. Il apparaît nettement que la régulation transcriptionnelle des gènes *DREB* étudiés chez *Eucalyptus* en réponse aux stress abiotiques, n'est pas spécifique d'un groupe (*CBF* ou *DREB2*). De plus, cette régulation n'est pas redondante au sein de chaque groupe puisque les gènes présentent des profils différents en réponse aux différentes conditions testées et dans chaque cas, un nombre limité de gènes sont impliqués dans la production de transcrits. Les résultats soulignent la part prépondérante de *CBF1* dans la réponse au froid, à la chaleur et à la déshydratation et de *CBF8* et *16* dans la réponse au froid. Dans l'autre groupe, *DREB2-5* semble être le gène le plus important au niveau transcriptionnel à cause d'un très fort niveau d'expression constitutive combiné à une forte induction en réponse aux stress appliqués. Pour l'eucalyptus on peut penser que le nombre élevé de *CBF* compense le faible nombre de *DREB2* et que l'ensemble permet des réponses variées à différents stress abiotiques.

Enfin, il pourrait être intéressant de réaliser cette étude comparative au niveau de la totalité de la sous-famille *DREB* pour avoir une idée plus complète et précise de la réponse aux stress abiotiques des plantes.

Chapitre II. Caractérisation des gènes de réponse au froid

1. Les gènes codant les protéines effectrices de la réponse au froid

Pour survivre dans les climats tempérés, les plantes pérennes sont capables de s'acclimater au froid lorsqu'elles sont exposées à des températures froides mais positives. En automne, ces conditions induisent chez ces plantes une augmentation transitoire de leur tolérance au gel, due à de nombreux changements au niveau moléculaire et cellulaire. Dans la littérature l'acclimatation au froid est décrite comme d'importants changements du métabolome associés à une forte régulation transcriptomique (Guy *et al.*, 2008; Krasensky & Jonak, 2012). Les mécanismes moléculaires de l'acclimatation au froid sont associés à la biosynthèse de molécules protectrices (osmolites, chaperones...) impliquées dans la tolérance au gel ainsi que des protéines participant à la détoxification cellulaire et au turn-over protéique (Thomashow, 1999; Ruelland *et al.*, 2009). Les stratégies d'adaptation au stress froid sont différentes selon les espèces végétales, en particulier entre herbacées et ligneux (Meng *et al.*, 2008). Alors que les processus de perception et de transduction semblent communs à de nombreuses espèces, les réponses mises en place sont différentes (Monroy *et al.*, 2007).

Chez *Arabidopsis*, il a été identifié plus de 700 gènes régulés par le froid qui codent des protéines régulatrices ou effectrices (Oono *et al.*, 2006). Chez les ligneux, les banques d'ESTs de réponse au froid ont été construites chez *Populus* (Nanjo *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008), *Vaccinium* (Dhanaraj *et al.*, 2004; Dhanaraj *et al.*, 2007), *Rhododendron* (Wei *et al.*, 2005), *Poncirus* (Sahin-Cevik & Moore, 2006 ; Meng *et al.*, 2008), *Malus* (Wisniewski *et al.*, 2008) et *Eucalyptus* (Rasmussen-Poblete *et al.*, 2008; Keller *et al.*, 2009). Les analyses globales d'expression (macro-arrays) réalisées chez *Populus*, *Picea* et *Pinus* ont apporté les premières données des modifications du transcriptome des arbres dans les conditions automnales (Holliday *et al.*, 2008). Cependant, ces études sur des espèces à feuillage caduque ne permettent pas de distinguer les mécanismes liés à la dormance de ceux associés à l'acclimatation au froid. Par contre, pour l'eucalyptus qui ne présente pas de dormance, la première collection d'ESTs (3 879 singletons) produite à partir d' *E. globulus* traité au froid, a mis en évidence un nombre significatif de gènes régulés par le froid et associés à la biosynthèse de la paroi cellulaire (Rasmussen-Poblete *et al.*, 2008). Dans notre groupe, l'annotation fonctionnelle de 11 303 gènes correspondant au transcriptome de l'acclimatation au froid de *E. gunnii* (Keller *et al.*, 2009) a permis de mettre en évidence les principales classes de protéines participant à la protection cellulaire.

Ce chapitre est consacré à l'étude des gènes régulés par le froid et supposés impliqués dans les mécanismes d'acclimatation au froid conduisant à l'augmentation de la tolérance au gel de l'eucalyptus. La première approche, sans *a priori*, correspond à l'étude globale d'expression des gènes décrits précédemment avec l'objectif de décrire les mécanismes majeurs associés aux modifications du transcriptome froid de cette espèce. La deuxième approche, (basée sur les résultats de la première et sur la disponibilité de la séquence du génome de l'eucalyptus) est d'étudier de façon exhaustive les grandes familles de protéines participant à ces mécanismes. Les familles de gènes sélectionnés ont été annotées et

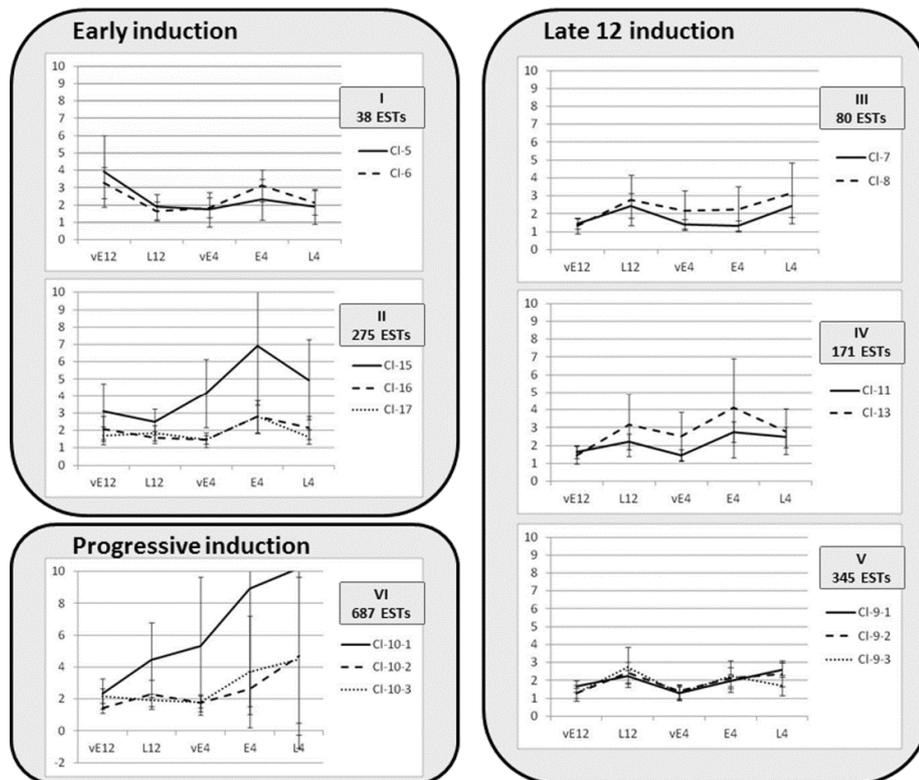


Fig II-1. Profils d'expression des gènes régulés par le froid au cours du processus de l'acclimation. 20 clusters contenant 1670 ESTs régulés par froid ont été subdivisés en trois groupes sur la base de leurs profils d'expression. Les barres verticales représentent l'étendue de l'induction des ESTs régulés par froid correspondant à l'amplitude entre les taux les plus élevés et les plus bas.

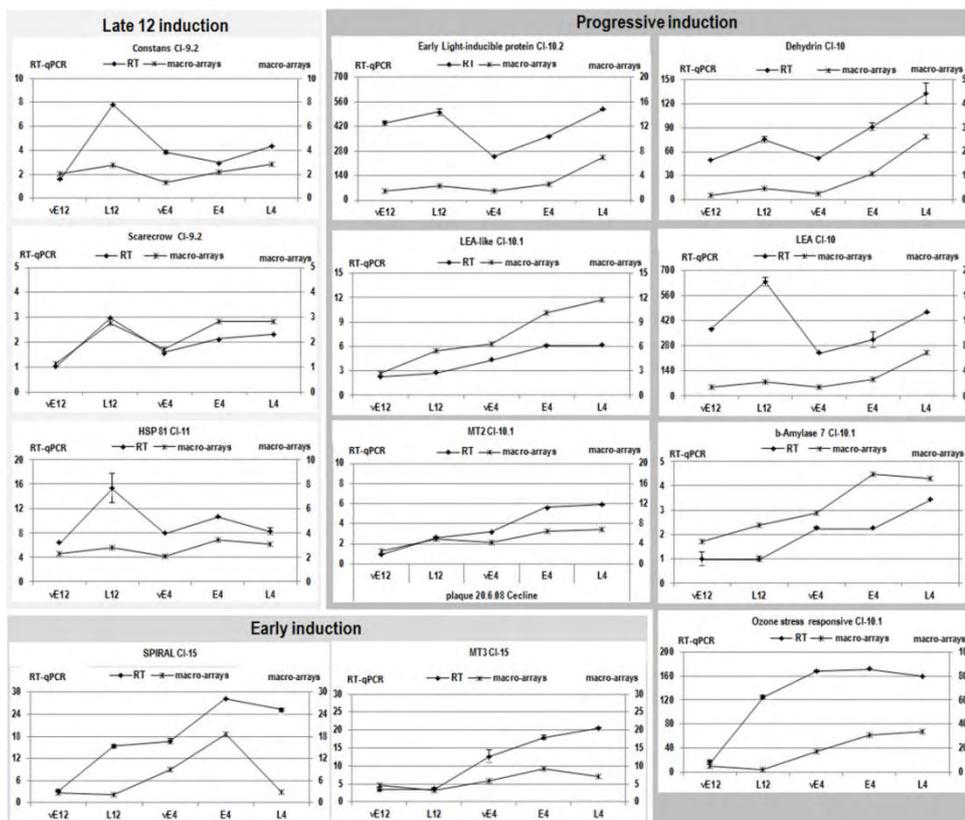


Fig II-2. Validation des données de macro-array par celles de RT-qPCR. 12 gènes des profils principaux ont été sélectionnés par rapport à leur identité, leur profil d'expression et leur abondance dans la banque d'ESTs. Pour chaque gène testé le graphe présente le profil macro-array et le profil RT-qPCR. Les données de RT-qPCR sont exprimées en abondance relative.

la présence du cis-éléments CRT/DRE/LTRE recherchée dans les séquences promotrices. L'analyse *in silico* a également permis de prédire de façon exhaustive la liste de gènes potentiellement cibles des *DREB* dans le génome d'eucalyptus. Pour évaluer l'importance de la voie DREB dans les modifications du transcriptome, l'expression de gènes sélectionnés dans chaque famille a été analysée dans les lignées transgéniques sur-exprimant les *CBF* en comparaison avec la lignée sauvage traitée ou non au froid.

2. Analyse globale du transcriptome froid

Une étude globale d'expression par macro-arrays a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire sur un sous-ensemble aléatoire de 2662 gènes appartenant à la collection d'ESTs décrite précédemment (Keller *et al.*, 2009). Dans cette analyse globale d'expression, les transcrits ont été quantifiés sur une cinétique de 5 points au cours du processus d'acclimatation au froid d'*E. gunnii*. Basés sur la cinétique d'expression des 1670 séquences régulées par le froid, 20 clusters d'expression ont été générés en utilisant l'application HCE3 (Hierarchical Clustering Explorer 3). Ces clusters ont ensuite été regroupés en profils d'expression contenant les gènes co-régulés au cours du processus d'acclimatation. Ces gènes ont été annotés et classés en catégories fonctionnelles en utilisant le système FunCat du MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences).

L'objectif de cette analyse a été de définir l'identité et la catégorie fonctionnelle des gènes co-régulés dans une même phase de l'acclimatation au froid afin de pouvoir identifier les principaux mécanismes moléculaires (Keller *et al.*, 2013). Les 11 clusters d'expression, retenus comme représentatifs parmi les 20, contiennent 1596 clones sur les 1670 clones régulés par le froid. Ces 11 clusters sont regroupés manuellement en six profils de gènes co-régulés au cours de l'acclimatation (figure II-1). Les profils I et II (19,7% des ESTs) sont caractérisés par une induction précoce (« Early induction ») et modérée avec un maximum à 12°C (PI) ou à 4°C (PII). Les profils III, IV et V (37,3% des ESTs) ont en commun une induction tardive à 12°C (« Late-12-induction ») et se différencient par leur régulation à 4°C, qui est tardive pour les profils III et V et précoce pour IV. Enfin, le profil VI (687 ESTs, 43% du total), caractérisé par une induction progressive pendant les deux phases de l'acclimatation, correspondent aux gènes dont la régulation au froid est la plus intense. Cette accumulation des transcrits est parallèle à l'augmentation de tolérance au gel mesurée au cours de l'acclimatation au froid des plantes.

La validation de ces données de macro-array a été réalisée par la quantification de l'expression (RT-qPCR) de 12 gènes appartenant aux profils caractéristiques (figure II-2). Les gènes *Constans* et *Scarecrow* (codant des facteurs de transcription) et les gènes *HSP* (codant des chaperonnes moléculaires) sont induits principalement dans la première phase d'acclimatation (« Late 12 induction »). *SPIRAL* et *MT3* (Métallothionéine) sont des gènes induits de façon précoce à chaque température (12 et 4°C). Avec une régulation différente, la Métallothionéine *MT2* est co-régulée avec le plus grand groupe d'ESTs (« Progressive induction »). Dans le même groupe, les gènes *Late Embryogenesis Abundant* (*LEA*) et

dehydrin ont été sélectionnés pour la grande redondance de leurs ESTs, le gène codant la β -amylase pour l'importance des sucres solubles dans l'acclimatation au froid et le gène *Ozone stress-responsive* pour sa très forte induction.

L'identification des catégories fonctionnelles correspondant aux gènes co-régulés (appartenant à un même profil d'expression) permet de faire des hypothèses sur les mécanismes biologiques impliqués dans les différentes phases du processus d'acclimatation. Pour chaque profil d'expression, les gènes les plus représentatifs en termes de niveau d'induction ou de redondance sont décrits et classés selon leur fonction biologique et leur rôle supposé dans l'acclimatation au froid (Keller *et al.*, 2013). Le profil de réponse précoce (I et II) comprend des protéines associées à la photosynthèse et des enzymes participant au métabolisme des sucres, comme la galactinol synthase permettant l'accumulation de raffinose (agent cryoprotecteur, osmoprotecteur et détoxifiant). Ce groupe contient également les LEA (dont des déhydrines) qui sont des protéines protégeant les molécules de la dénaturation en condition de déshydratation, comme d'autres chaperonnes moléculaires (HSP). Les gènes les plus induits dans les phases précoces (à 4 et 12°C) codent les métallothionéines (MT3) qui assurent le maintien de l'homéostasie, des enzymes de détoxification comme la catalase et la thiorédoxine et la protéine SPIRAL impliquée dans le maintien des microtubules. Parmi les gènes les plus régulés en phase tardive à 12°C (P III, IV and V), on retrouve d'autres membres des familles *LEA* et *Métallothionéine (MT2)*, ainsi que des gènes connus comme participant à la stabilisation des membranes (*SFR2*, *RCI2B* and *Lecithin cholesterol acyl transferase*). Basé sur l'observation que les gènes de ce groupe appartiennent à des catégories très diverses de réponse au stress, aucun mécanisme particulier n'est associé à ce profil d'expression.

L'intensité de la régulation est évaluée à la fois par le taux d'induction mais aussi par la redondance des ESTs. A ce titre, les gènes induits de façon progressive au cours de l'acclimatation sont les plus représentés (jusqu'à 203 fois/EST) et présentent les taux d'induction les plus élevés (jusqu'à 45.8 fois le niveau basal). L'identité de ces gènes est donc une forte indication des mécanismes les plus importants du point de vue quantitatif : les séquences les plus représentées (14 gènes, 305 ESTs) correspondent encore aux gènes de *LEA* (cryoprotection des membranes et des molécules). Avec un nombre équivalent de gènes (17) mais moins d'ESTs (124), le second mécanisme prédit correspond à la protection cellulaire par la détoxification et le maintien de l'homéostasie, qui est assuré par les *métallothionéines*. Enfin, la dégradation des protéines via le protéasome est représentée par 9 gènes (24 ESTs), l'osmoprotection par 5 gènes (18 ESTs), et la préservation de l'appareil photosynthétique par 5 gènes (28 ESTs). Concernant les gènes associés au métabolisme des sucres, la β -amylase qui catalyse la dégradation de l'amidon est spécifique du profil d'induction progressive. Enfin, les autres fonctions significativement représentées sont associées à la stabilisation des structures cellulaires comme les membranes (*RCI2B*: 29 ESTs, taux de 4.61) ou le photosystème (*ELIP*: 5 ESTs, taux de 8.49).

Gène	Taille de la famille (nombre de gènes)		Membre contenant au moins un élément	
	<i>A. thaliana</i>	<i>E. grandis</i>	CRT/DRE	LTRE
α-Amylase	10	12	1	5
β-Amylase	9	8	5	7
RS	6	14 (1)	4	9
GolS	7	17	13	16
DHN	10	14	12	13
MT	8	9	3	6
sHSP	27	46	22	30
DNAj/HSP40	115	102	23	52
HSP60	18	15	3	7
HSP70	18	21 (3)	10	13
HSP90	7	22 (12)	9	13
HSP100	7	14 (2)	9	12
ELIP	7	21 (2)	9	17
LEA (hors DHN)	83	108	43	92
Spiral	5	8	4	5
DREB2	8	6	1	4
HSF	21	43	21	29
NAC	96	152*	23	73
GRAS	34	92 (3)	36	56
MYB R2-R3	125	159*	40	77
SAUR	72	92	26	63
COBRA	12	14	6	14
Brevis Radix	5	3	2	2
SHINE	4	4	2	2
GA20ox	5	4	1	2
GA3ox	3	8	0	1
GA2ox	8	5	1	2
DELLA	5	3	1	2
KNOX	7	10	1	4
PAL	4	9	5	7
Laccase	17	84	20	38
CAD	9	48	22	30
Fragile fiber	5	7	2	5
CesA & Csl	41	59	28	35
XET	9	36	10	15
Génome entier	21189	36376	13629	21150
			37,47%	58,14%

Tab II-1. Analyse des familles de gènes cibles potentiels des facteurs CBF et/ou DREB2. Pour chaque famille, l'analyse *in silico* (en utilisant le programme PLACE et le programme Fuzznuc) permet de déterminer le nombre total de membres possédant au moins un cis-élément CRT/DRE (A/GCCGAC) ou LTRE (CCGAC) sur le promoteur du gène (1000 pb avant ATG).

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de réaliser l'approche avec *a priori* pour l'annotation exhaustive des grandes familles de protéines participant à ces mécanismes et l'étude de la régulation des principaux gènes sur les lignées sur-exprimant un gène *CBF*.

3. Prédiction *in silico* des gènes cibles des *DREB* chez *Eucalyptus grandis*

Dans cette étude, les gènes cibles potentiels des facteurs DREB ont été prédits *in silico* au niveau du génome entier en se basant sur la présence de cis-éléments décrits dans la littérature. Parmi les 36376 gènes annotés dans le génome d'*E. grandis* (Myburg *et al.*, soumis), 13629 séquences (37,47%) ont au moins un élément CRT/DRE (A/GCCGAC) dans leur promoteur (1000 pb avant ATG). Parallèlement, au moins un élément LTRE (CCGAC) a été trouvé dans la région promotrice de 21150 gènes (58,14% du génome). Chez *Arabidopsis*, la même analyse sur phytozome prédit que 8334 séquences promotrices (soit environ 25%) ont au moins un élément CRT/DRE dans 1000 pb.

Nous avons choisi d'étudier les familles multigéniques de gènes qui possèdent au moins un cis-élément CRT/DRE ou LTRE dans leur promoteur (donc potentiellement cibles des facteurs DREBs) et qui codent des protéines impliquées soit dans la tolérance au stress, le développement ou la formation du bois. Pour les 35 familles, les séquences protéiques prédites *in silico* ont été vérifiées manuellement pour éviter les erreurs d'annotation automatique avant d'analyser leurs promoteurs. Le tableau II-1 présente la comparaison de la taille des familles chez *Eucalyptus* et *Arabidopsis*. Dans certains cas, la comparaison a été basée également sur les familles du peuplier et de la vigne. Le nombre des membres contenant au moins un élément cis CRT/DRE ou LTRE est mentionné pour chaque famille.

4. Annotation des familles de gènes potentiellement impliqués dans la réponse au froid

4.1. Les familles multigéniques *Galactinol synthases (GolS)* et *Raffinose synthases (RS)*

Les oligosaccharides de la famille du raffinose (RFOs), tels que le raffinose, le stachyose, le verbascose sont des hydrates de carbone solubles, qui fonctionnent comme des osmoprotectants dans des cellules végétales. Chez de nombreuses espèces végétales, les RFOs sont accumulés au cours du processus d'acclimatation au froid et sont généralement impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (Zuther *et al.*, 2004 ; Lahuta & Górecki, 2011). Au cours de la maturation des graines, les RFOs sont accumulés en même temps que la réduction de la teneur en eau du tissu et le développement de la tolérance à la dessiccation des graines (Zuther *et al.*, 2004 ; Saito & Yoshida, 2011).

Les enzymes clés de la voie de synthèse du raffinose sont la galactinol synthase (GolS) et la raffinose synthase (RS). La galactinol synthase (GolS; EC 2.4.1.123), aussi appelée inositol-3-a-

Fig II-3. Arbre phylogénétique construit à partir des galactinol synthase (GolS) chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 17 EgrGolS01-17 d'*E. grandis* et 7 AtGolS d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

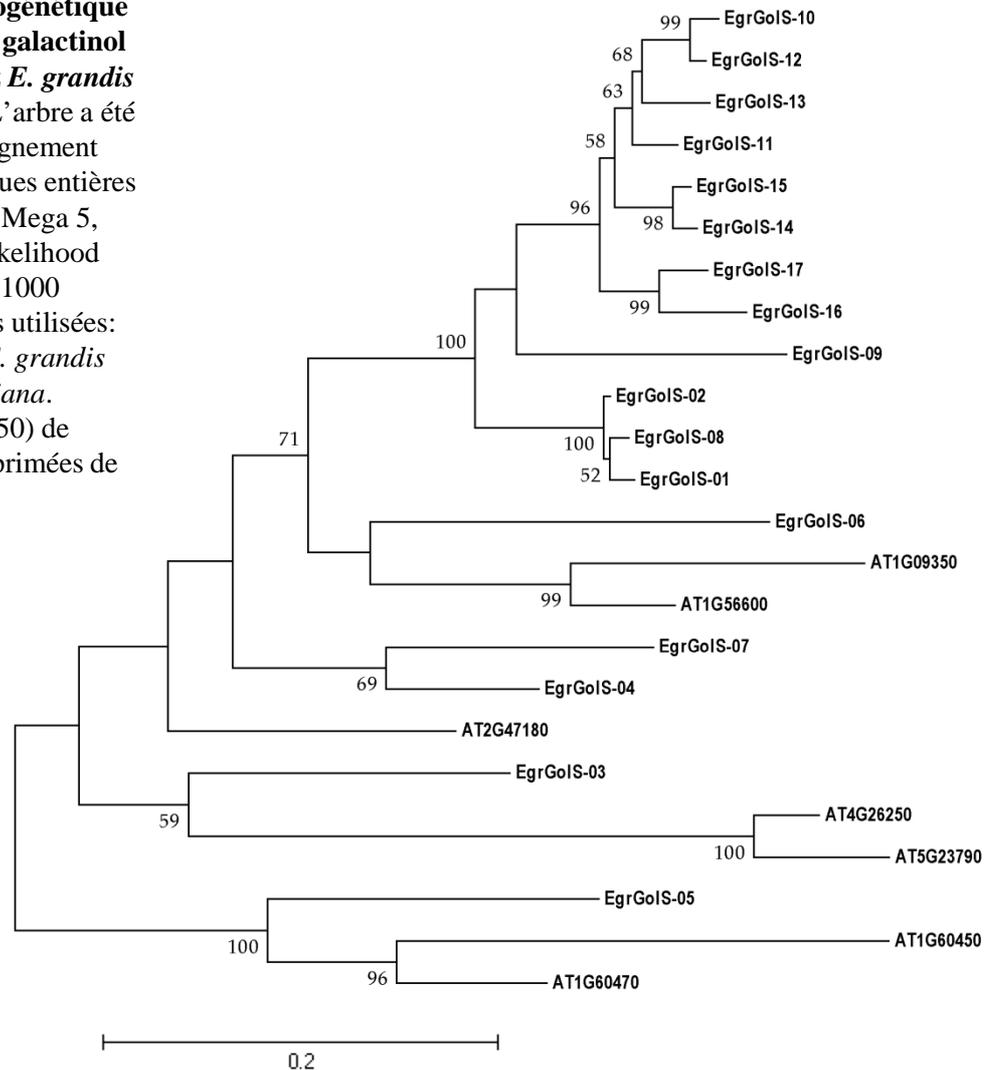
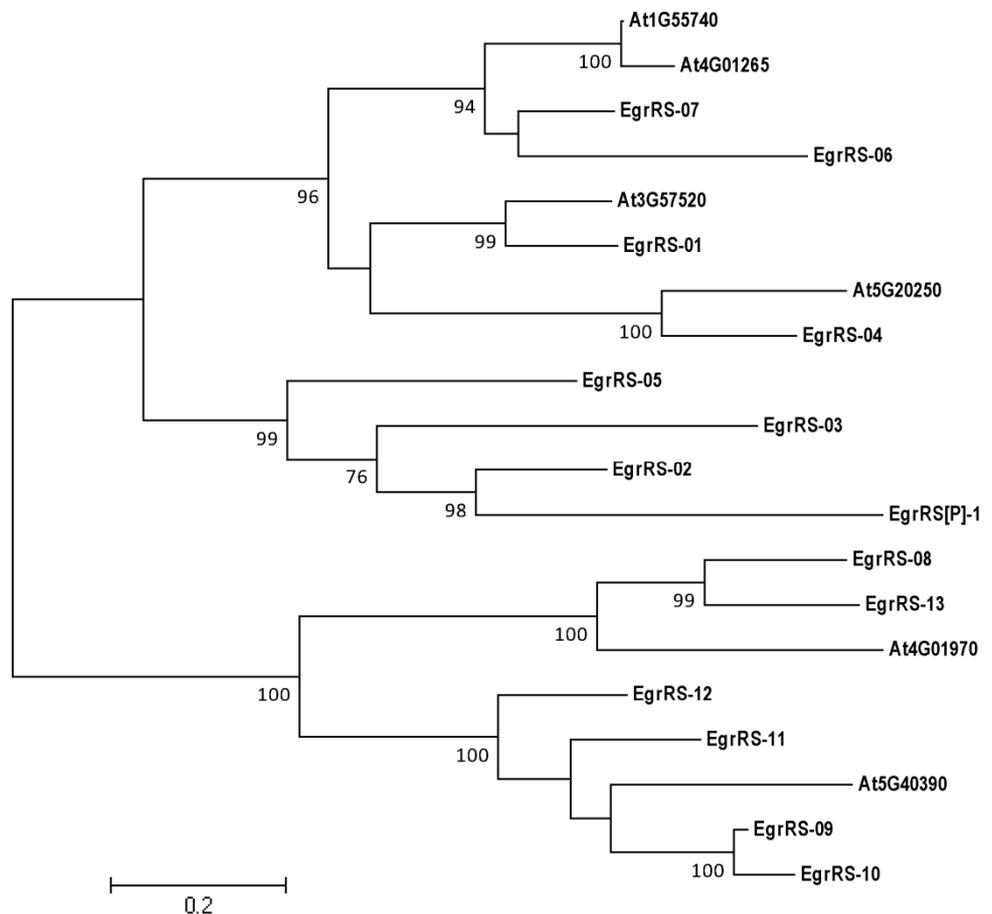


Fig II-4. Arbre phylogénétique construit à partir des raffinose synthase (RS) chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 14 EgrRS01-13, EgrRS[P]-1 d'*E. grandis* et 6 AtRS d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.



galactosyltransférase, catalyse la première étape de la biosynthèse des RFOs aboutissant à la production d'O-a-D-galactopyranosyl-[1,1]-L-myo-inositol, communément appelé galactinol. Appartenant à la famille GT8 des glycosyltransférases, les *GolS* jouent un rôle régulateur clé dans la répartition du carbone entre saccharose et RFOs (Saravitz *et al.*, 1987). La raffinose synthase (RS; EC2.4.1.82) catalyse le transfert du résidu galactosyl du galactinol [O-a-D-galactopyranosyl-(1→1)-myo-inositol] sur le saccharose pour former le raffinose (Peterbauer *et al.*, 2002). Appartenant à la famille des glycoside-hydrolases 36, les RS permettent d'acheminer le saccharose dans la voie de biosynthèse des RFOs. Chez les plantes, l'expression des *GolS* et des *RS* est régulée par les stress abiotiques tels que le froid, la chaleur, la sécheresse et la salinité (Taji *et al.*, 2002; Saito & Yoshida, 2011; dos Santos *et al.*, 2011; Pillet *et al.*, 2012).

Les *GolS* et les *RS* ont été identifiées et caractérisées chez plusieurs plantes comme *Arabidopsis*, le peuplier, le riz et le maïs (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2008; Unda *et al.*, 2012; Zhuo *et al.*, 2012). Dans le génome d'*E. grandis*, 17 séquences *GolS* ont été prédites en se basant sur la présence du domaine conservé Glyco_trans_8 (PF01501) et d'un résidu Sérine au site de phosphorylation (Sprenger and Keller, 2000). Par contre, le penta-peptide hydrophobe caractéristique (APSAA) situé en C-terminal est modifié chez *Eucalyptus* [A/G]P[P/S/T]AA. Les protéines *GolS* ont une taille similaire allant de 332 à 340 acides aminés (Annexe II-1). Avec 17 séquences, cette famille est plus grande chez *Eucalyptus* que chez *Arabidopsis* (sept séquences). L'arbre phylogénétique construit à partir des *GolS* d'*A. thaliana* et d'*E. grandis* montre que les orthologues sont présents chez les deux espèces mais avec un nombre de séquences plus important chez l'eucalyptus. On peut observer (figure II-3) que cinq gènes d'*E. grandis* sont orthologues d'*A. thaliana* mais que les 12 autres sont regroupés dans un même clade. Il est intéressant de noter que 10 gènes *GolS* sont localisés sur le scaffold 17, suggérant un évènement de duplication récent chez *Eucalyptus*. L'analyse *in silico* prédit également un à trois cis-éléments CRT/DRE et un à six LTRE dans la région promotrice de 16 gènes *GolS*, mais aucun DRE/LTRE pour *GolS-07*.

Contenant le domaine conservé Raffinose_Syn (PF05691) 14 séquences *EgrRS* ont été prédites dans le génome d'eucalyptus, dont une considérée comme pseudogène à cause de la présence d'un codon stop. Les protéines ont une longueur variant entre 591 et 906 acides aminés (Annexe II-2). Avec 13 gènes (+ 1 pseudo), la famille *RS* est plus grande chez *Eucalyptus* que chez *Arabidopsis* qui ne contient que six membres. L'arbre phylogénétique construit à partir des *RS* d'*A. thaliana* et d'*E. grandis* montre que des *RS* se divisent entre quatre sous-groupes différents, dont un contient uniquement des séquences d'eucalyptus. Dans les trois autres sous-groupes, les gènes orthologues sont présents chez les deux espèces mais avec un plus grand nombre de gènes chez *Eucalyptus* (figure II-4). L'analyse *in silico* de la région promotrice des *RS* prédit un à trois cis-éléments CRT/DRE dans cinq *RS* (04, 06, 07, 10 et 11) et un à cinq cis-éléments LTRE dans neuf *RS*.

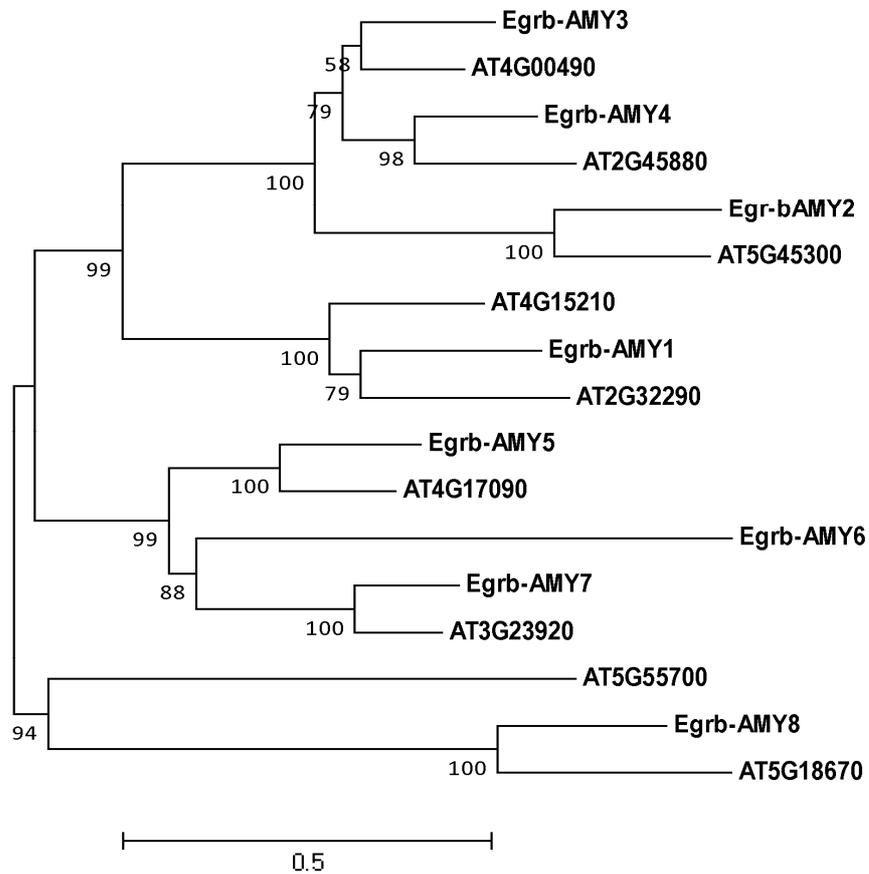


Fig II-5. Arbre phylogénétique construit à partir des β -Amylases (b-AMY) chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 8 Egrb-AMY1-8 d'*E. grandis* et 9 Atb-AMY d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

4.2. La famille des β -amylases

La β -amylase est une exoamylase qui hydrolyse la liaison α -1,4-glycosidique des chaînes de polyglucanes à extrémité non réductrice pour produire le maltose (4-O- α -D-glucopyranosyl- β -D-Glc). La fonction principale de cette enzyme est la dégradation de l'amidon chez les plantes (Kossmann & Lloyd, 2000; Scheidig *et al.*, 2002). L'expression et l'activité enzymatique des β -amylases sont régulées par la lumière, les phytohormones et les stress abiotiques (Kaplan & Guy, 2004; Lee *et al.*, 2012). Reinhold et collaborateurs ont rapporté que les β -amylases contrôlent la croissance et le développement des pousses chez *Arabidopsis* (Reinhold *et al.*, 2011). Le maltose résultant de l'activité de la β -amylase aurait un rôle de cryoprotection dans la réponse aux signaux de l'environnement et de développement.

Grâce à la présence du domaine conservé Glyco_hydro_14 (PF01373) huit séquences β -AMY ont été prédites dans le génome de l'*E. grandis*, quatre localisées sur le scaffold 5 (β AMY3-6) et deux sur le scaffold 8 (β AMY7-8). La longueur des protéines varie entre 591 et 699 acides aminés. Avec huit gènes, la taille de la famille β -AMY chez *E. grandis* est similaire à celle d'*A. thaliana*. L'arbre phylogénétique, construit à partir des β -amylases d'*Arabidopsis* et d'*Eucalyptus* révèle une forte similarité entre les orthologues, ce qui suggère une grande conservation de cette famille au cours de l'évolution de ces deux espèces végétales (figure II-5). D'après les prédictions (ProtComp 9.0 et SignalP 4.1), les différents membres β -AMY peuvent être localisés dans les différents compartiments cellulaires. Les éléments DRE sont prédits dans le promoteur de cinq β -AMY et seule la région promotrice de l' β -AMY7 ne contient aucun élément LTRE (tableau II-1).

4.3. Les familles des Heat Shock Protein (HSP)

Généralement, les stress abiotiques perturbent le fonctionnement des protéines. Le maintien des protéines dans leur conformation fonctionnelle et l'évitement de l'agrégation des protéines sont particulièrement importants pour la survie des cellules dans les conditions de stress. Les protéines de choc thermique (HSP)/chaperonnes contrôlent le repliement, l'assemblage, la translocation et la dégradation des protéines dans de nombreux processus cellulaires normaux, mais aussi la stabilisation des protéines et des membranes en conditions de stress. Ces chaperonnes jouent un rôle crucial dans la protection des cellules végétales contre le stress en rétablissant la conformation normale des protéines et l'homéostasie cellulaire (Wang, H *et al.*, 2004).

Parmi les nombreuses protéines identifiées par leur activité de chaperonne moléculaire, un grand nombre d'entre elles ayant été initialement identifiées comme des protéines de choc thermique (HSP) ont conservé leurs premières nomenclatures HSPs/chaperonnes. Six grandes familles de HSPs/chaperonnes sont identifiées : les petites HSP (sHSP), DNAj/HSP40, les GroEL/HSP60, HSP70/DNAk, HSP90 et

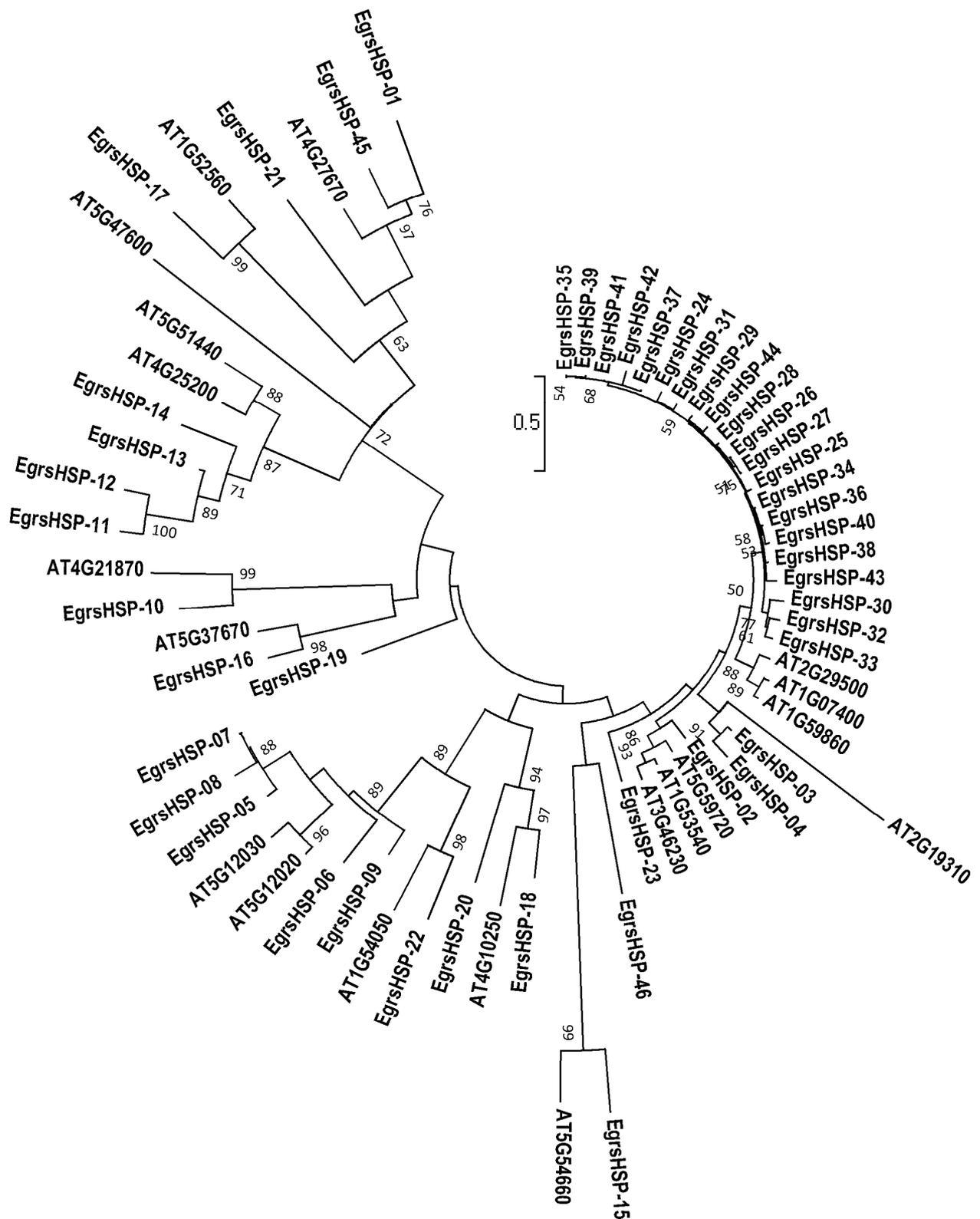


Fig II-6. Arbre phylogénétique construit à partir des sHSP chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 46 EgrsHSP (01-46) d'*E. grandis* et 27 AtsHSP d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

HSP100/Clp. En dehors de ces grandes familles, il existe d'autres protéines ayant des fonctions de chaperonne, comme la protéine disulfure isomérase et calnexine/calréticuline (Wang, H *et al.*, 2004).

4.3.1. La famille des petites protéines de choc thermique (sHSP)

Présentes chez tous les organismes, les sHSP sont une grande et ancienne famille de protéines. Leur taille varie de 12 à 42 kDa, mais comme une majorité de séquences est comprise entre 15-22 kDa, ces protéines sont aussi appelées HSP20 (Waters *et al.*, 2008). La structure primaire des sHSP comprend une région N-terminale variable et une région C-terminale hautement conservée souvent désignée comme le domaine α -crystallin ou le domaine HSP20 (de Jong *et al.*, 1998). De nombreuses études ont montré que les sHSP sont des chaperonnes moléculaires (Waters *et al.*, 2008, 2013) qui agissent en empêchant l'agrégation irréversible des protéines et en re-solubilisant des protéines déjà agrégées. En se liant à ces protéines dénaturées, les sHSP peuvent créer une réserve de protéines qui peuvent être repliées par d'autres chaperonnes (Haslbeck *et al.*, 1999). Les sHSP se distinguent des autres chaperonnes HSP par deux caractères fonctionnels: d'une part elles n'ont pas besoin d'ATP pour se lier aux protéines cibles et d'autre part, elles ont une très grande capacité pour se lier aux protéines dénaturées (Waters, 2013). Classiquement, presque toutes les sHSP végétales sont induites par la chaleur mais aussi par d'autres stress biotiques et abiotiques (Siddique *et al.*, 2008; Mittal *et al.*, 2009; Sarkar *et al.*, 2009). De plus beaucoup de sHSP sont exprimées au cours de certains processus de développement comme l'embryogenèse, la maturation des graines et des fruits (Waters, 2013). Les sHSP ont été identifiées chez certaines plantes dont le génome est séquencé comme *Arabidopsis*, le peuplier et le riz (Waters *et al.*, 2008 ; Sarkar *et al.*, 2009). La famille des sHSP se divise en 11 sous-familles chez les dicotylédones étudiées et 10 pour le riz (Waters, 2013).

Au total, 46 membres de la famille sHSP ont été prédits dans le génome d'*E. grandis*. La taille de cette famille est plus grande chez *Eucalyptus* par rapport aux autres plantes étudiées (19 chez *Arabidopsis*, 36 chez le peuplier et 23 chez le riz). Toutes les séquences prédites chez *E. grandis* contiennent le domaine conservé HSP20 (PF00011) sur la région C-terminale. Leur taille varie entre 111 et 261 acides aminés (12,52 à 29,24 kDa) (Annexe II-4). Comme décrit dans la littérature pour les dicotylédones, les sHSP d'eucalyptus se répartissent en 11 sous-familles. Parmi elles, les membres de la sous-famille CI sont les plus nombreux (24 membres, soit 52%), alors qu'au contraire les sous-familles CIII, CIV, CV, MTII et Peroxisome ne contiennent qu'une seule séquence. Le reste des séquences est regroupé dans les autres sous-familles de deux membres (CVI, ER), quatre membres (CP et MT) ou cinq membres (CII). L'arbre phylogénétique construit à partir des sHSP d'*A. thaliana* et d'*E. grandis* montre que les orthologues existent chez les deux espèces mais que les membres sont plus nombreux chez *Eucalyptus* que chez *Arabidopsis* (figure II-6). On remarque un clade de 21 séquences qui regroupe uniquement des séquences d'*E. grandis*. Ces cinq *EgrsHSP* de la sous-famille CII se trouvent sur le scaffold 3 et 22 séquences de la sous-famille CI (*EgrsHSP23-44*) sont localisées sur le scaffold 10, résultant probablement d'un événement de duplication récent.

L'analyse *in silico* de la région promotrice de tous les membres de cette famille prédit la présence d'un à trois éléments DRE sur 22 séquences *sHSP* et un à cinq éléments LTRE sur 30 séquences *sHSP* (tableau II-1). De plus les promoteurs de 23 gènes *sHSP* contiennent un à trois éléments HSE (nGAAnnTTCn), décrit comme le site de fixation des facteurs de transcription du choc thermique (von Koskull-Döring *et al.*, 2007).

4.3.2. La famille DNAj/HSP40

Les protéines DNAj aussi appelées HSP40 (40 kD), forment une grande famille présente chez de nombreux organismes incluant les plantes (Qiu *et al.*, 2006). Cette famille chez *Arabidopsis* comprend 120 membres (Rajan & D'Silva, 2009), dont seulement quelques-uns sont caractérisés (Chen, H *et al.*, 2010). Les DNAj interviennent dans différents processus de développement (Shen *et al.*, 2011) et dans la réponse aux stress (Wang, ML *et al.*, 2004). Elles participent au contrôle du repliement des structures protéiques, à leur transport et leur dégradation via l'interaction avec HSP70, une autre chaperonne moléculaire (Magrané *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2006; Li, J. *et al.*, 2009). En terme structural, toutes les DNAj possèdent un domaine très conservé de 70-acides aminés dans la partie N-terminale (J-domain), ce qui contraste avec la faible similarité des séquences de la partie C-terminale (120 - 170 résidus) (Bork *et al.*, 1992). Le J-domain comprend deux hélices séparées par une boucle contenant un tripeptide très conservé, le motif HPD (histidine, proline et acide aspartique). Basé sur cette structure, les DNAj ont été classées en quatre types (Cheetham & Caplan, 1998; Walsh *et al.*, 2004). Le type I présente une région riche en glycine (G-domain) d'environ 30 acides aminés et un motif en doigt de zinc qui comprend quatre répétitions de la séquence Cys-X-X-Cys-X-Gly-X-Gly. Le type II présente le G-domain sans motif en doigt de zinc et le type III ne possède aucun de ces deux domaines. Le Type IV (J-like proteins) présente un J-domain sans le motif HPD.

Sachant que les données de la littérature concernant la famille DNAj était très limitée, il a été nécessaire de réaliser l'annotation complète de cette famille pour les quatre espèces végétales (*Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* et *Eucalyptus*). Certaines séquences déjà publiées pour *Arabidopsis* n'ont pas été considérées car il leur manque le J-domain. Avec 99 protéines détectées, la famille DNAj d'*Eucalyptus* se situe entre celle de *Vitis* (88 membres) et celles d'*Arabidopsis* et de *Populus* (respectivement 115 et 140 membres).

L'arbre phylogénétique construit à partir des DNAj d'*A. thaliana* et d'*E. grandis* montre une distribution des DNAj en quatre groupes chez *Eucalyptus* comme chez *Arabidopsis* (figure II-7). A cause de la grande différence entre les structures des protéines, deux arbres phylogénétiques ont été construits (figure II.8), le premier pour les types I et II et le second pour les types III et IV. La grande distance phylogénétique entre les membres des familles est principalement expliquée par la présence/absence de domaines spécifiques ainsi que par la variation de leur position dans la séquence. Par exemple, le type III

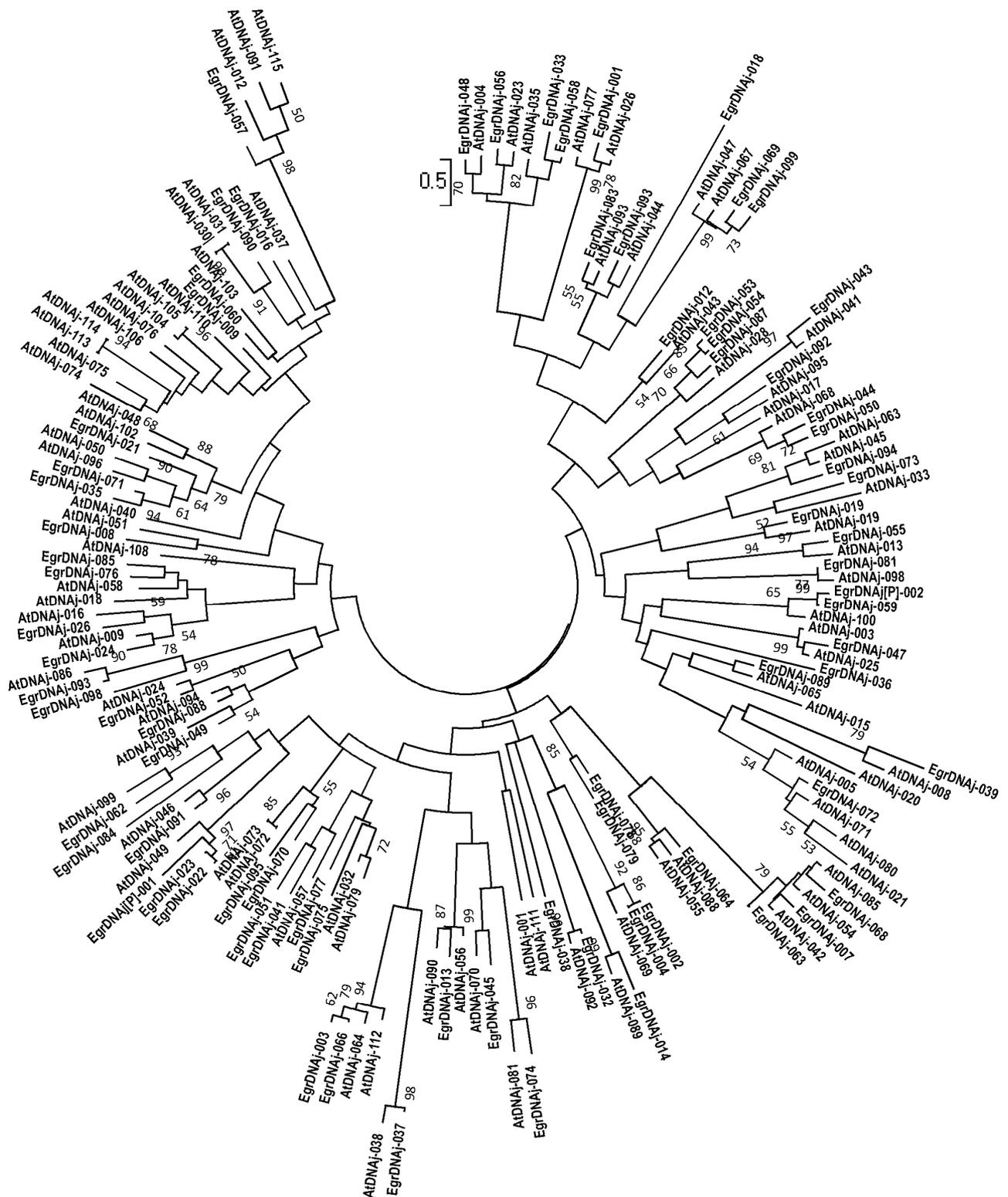


Fig II-8. Arbre phylogénétique construit à partir des DNAj groupes III et IV chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 78 EgrDNAj d'*E. grandis* et 88 AtDNAj d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

n'a pas de motif en doigt de zinc mais présente une longue région variable G/F (70-120 acides aminés). Par contre, le type I possède une plus courte région G/F (40-50 acides aminés). La position du domaine J est variable selon les types : dans la séquence N-terminale pour les types I et II mais sans préférence pour le type III. Enfin, le motif en doigt de zinc peut être différent entre les types III et I.

La forte représentation du type III chez les deux espèces pourrait être due à d'anciennes duplications puisque la plupart des orthologues sont retrouvés. Chez *Eucalyptus*, les gènes *DNAj* sont distribués sur les 11 chromosomes. Sachant qu'aucun spot de duplications n'est observé chez *Eucalyptus* pour les gènes *DNAj*, la famille semble être très conservée chez les deux espèces.

L'analyse *in silico* de la région promotrice de tous les membres de cette famille prédit la présence d'un à trois éléments DRE sur 45 séquences *DNAj* et un à quatre éléments LTRE sur 67 séquences *DNAj* (tableau II-1). De plus les promoteurs de 38 gènes *DNAj* contiennent un à deux éléments HSE.

4.3.3. La famille HSP60

Les HSP60 forment une classe de chaperonnes trouvées chez les procaryotes (GroEL) comme dans les mitochondries et les plastes des eucaryotes. Elles se divisent en deux sous-familles: les GroEL (Groupe I) se trouvent chez les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes (Cpn60), les chaperonnes CCT (contenant un t-complexe) se trouvent dans le cytosol des eucaryotes (Wang et al., 2004). Cette classe pourrait participer au repliement et à l'agrégation de protéines exportées des organites vers le cytoplasme. Ces HSP60 se lient à différents types de protéines après la fin de la traduction pour éviter leur agrégation avant leur repliement dans la conformation active (Al-Whaibi, 2011). Chez *Arabidopsis*, neuf Cpn60s et neuf CCTs sont trouvés dans le génome en plus des deux co-chaperonnes (Cpn10 et Cpn21) identifiées (Hill & Hemmingsen, 2001).

Chez *E. grandis*, l'analyse *in silico* a permis d'identifier 15 membres dans la famille HSP60. Toutes les séquences contiennent un domaine conservé Cpn60_TCP1 (PF00118). L'arbre phylogénétique, construit à partir des HSP60 d'*A. thaliana* et d'*E. grandis*, montre que les orthologues chez *Arabidopsis* sont retrouvés chez *Eucalyptus* (figure II-9). Basé sur leur structure primaire, les membres de la famille se divisent en deux groupes, Cpn60 et CCT. Le groupe CCT contient neuf séquences pour deux espèces, mais seulement six séquences du groupe Cpn60 ont été identifiées dans le génome d'*E. grandis*, contre neuf chez *A. thaliana*.

La taille de la séquence polypeptidique des HSP60 varie de 535 à 620 acides aminés, correspondant au poids de 57.6 à 66.14 kDa (Annexe II-6). Une séquence *HSP60* se trouve sur chaque scaffold 1, 4, 5, 7-11. Trois et quatre autres membres de cette famille sont localisés sur les scaffolds 2 et 6 respectivement. La prédiction *in silico* de la location sub-cellulaire montre que les différents membres *HSP60* pourraient être localisés dans tous les compartiments.

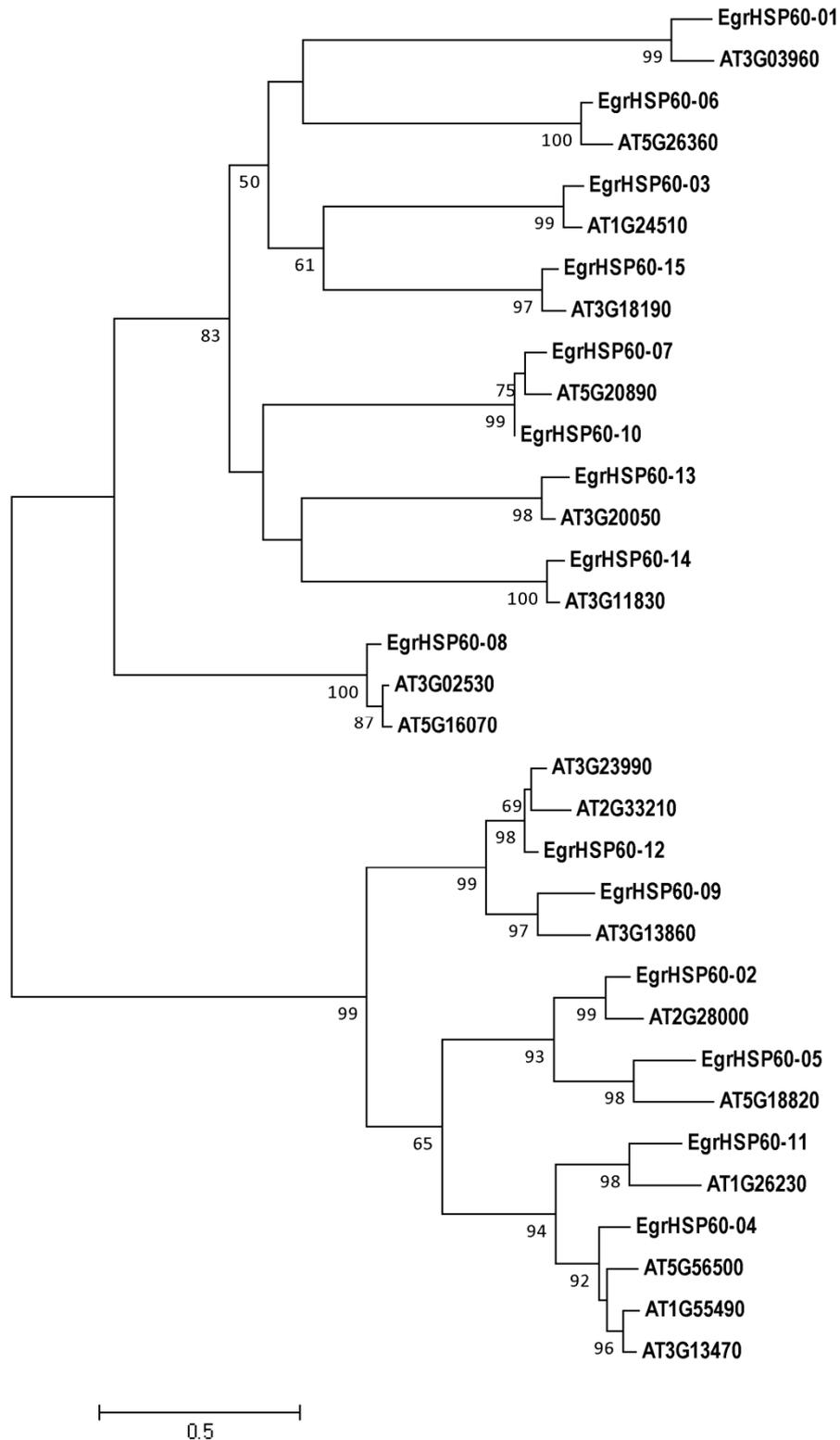


Fig II-9. Arbre phylogénétique construit à partir des HSP60 chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 15 EgrHSP60 (01-15) d'*E. grandis* et 18 AtHSP60 d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

En analysant la région promotrice des *HSP60*, un élément CRT/DRE a été prédit dans le promoteur de trois membres *HSP60-03*, *HSP60-09* et *HSP60-14*. L'élément LTRE a été trouvé dans le promoteur de sept séquences; un seul élément HSE typique est prédit dans 10 gènes *HSP60*.

4.3.4. La famille HSP70

Les HSP70 représentent une famille hautement conservée chez les procaryotes et les eucaryotes. Structuellement, HSP70 possède deux domaines très conservés, le premier en position N-terminale (ATPase de 44 kDa) et le deuxième en C-terminal, comprenant le domaine peptidique de liaison au substrat (25 kDa) (Wang, H *et al.*, 2004). Comme les autres chaperonnes, les HSP70s agissent probablement en protégeant les protéines contre l'agrégation. Elles sont également impliquées dans les processus de traduction, de translocation et associées à la fonction des récepteurs stéroïdiens. De plus, les HSP70s cytosoliques peuvent agir comme des répresseurs du facteur de choc thermique (HSF) soit directement soit en participant à un complexe de multichaperonnes (notamment avec HSP90) (Sung *et al.*, 2001). L'expression des gènes codant les HSP70 est induite par le stress thermique (chaleur, froid) et la sécheresse ce qui aboutit à une accumulation massive des protéines HSP70 dans les cellules stressées (Sung *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2003; Wang, X *et al.*, 2004; Al-Whaibi, 2011; Keller, Cao *et al.*, 2013). De plus, les *HSP70s* sont induites par des facteurs de développement et donc indispensables à la croissance en condition normale (Lin *et al.*, 2001).

Le génome d'*A. thaliana* contient au moins 18 gènes codant pour les membres de la famille HSP70, dont 14 appartiennent à la sous-famille DnaK et quatre à la sous-famille Hsp110/SSE (Lin *et al.*, 2001). Chez *E. grandis*, 18 gènes (+ 3 pseudogènes) *HSP70* ont été prédits dans le génome entier. Tous les membres de cette famille contiennent un domaine conservé HSP70 (PF00012). Chez *Eucalyptus*, la famille HSP70 se divise comme chez *Arabidopsis* en deux sous-familles (figure II-10). La première sous-famille, DnaK, contient 14 membres (+1 pseudogène) dont la séquence varie de 406 à 706 acides aminés (45.01 à 75.89 kDa). Les quatre autres membres (+2 pseudogènes) correspondant à la deuxième sous-famille (HSP110/SSE) ont des séquences allant de 774 à 939 acides aminés (86.80 à 103.16 kDa) (Annexe II-7). Cette description des familles HSP70 chez *E. grandis* et *A. thaliana* suggère que ces protéines sont globalement très conservées.

D'après la prédiction de la localisation sous-cellulaire, différentes protéines HSP70 pourraient être localisées dans tous les compartiments cellulaires et aussi dans le plasmaleme.

Des cis-éléments CRT/DRE et LTRE sont prédits dans la région promotrice de respectivement 10 et 13 gènes *HSP70*. De plus, 12 séquences possèdent un à deux éléments HSE typiques.

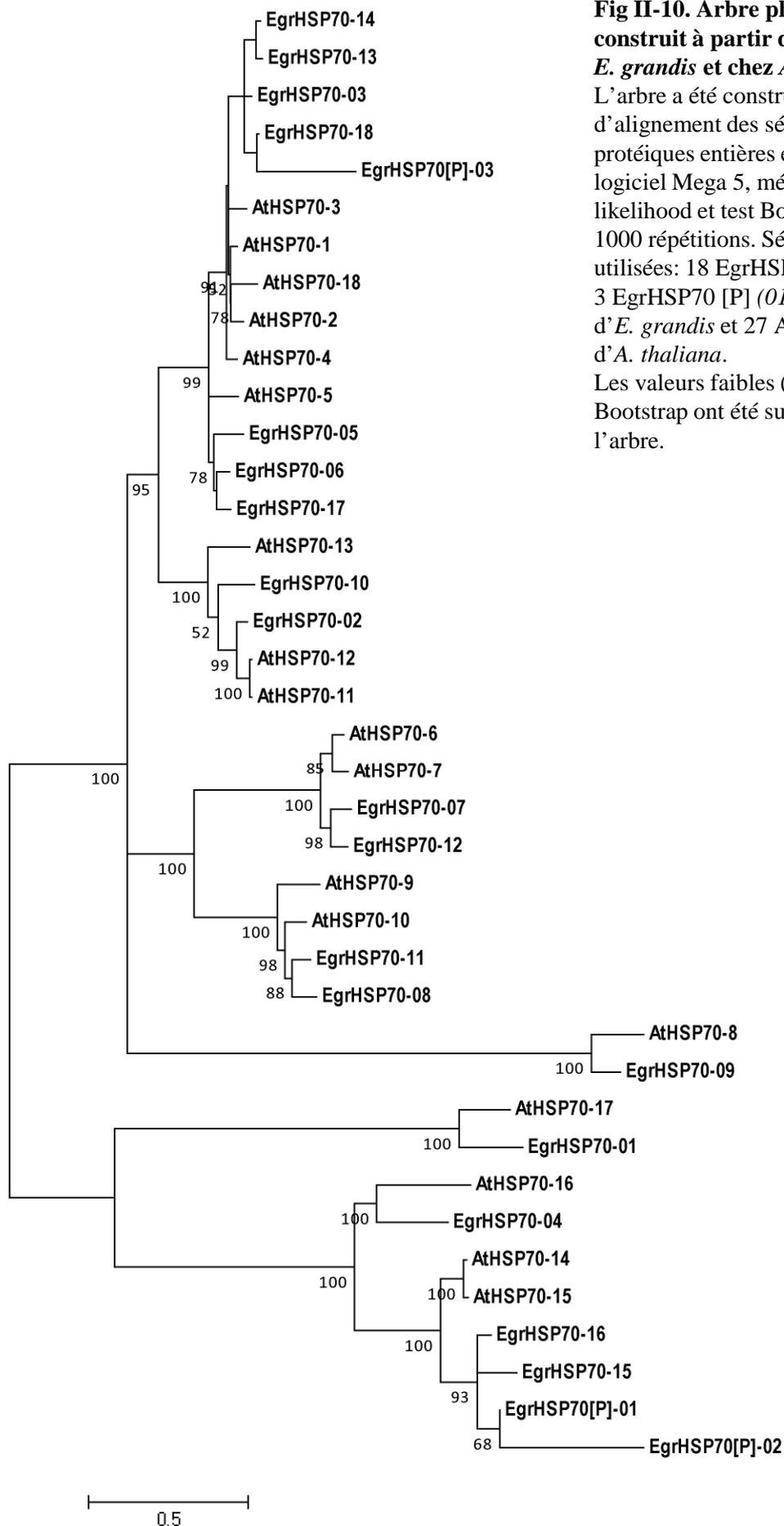


Fig II-10. Arbre phylogénétique construit à partir des HSP70 chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*.

L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 18 EgrHSP70 (01-18), 3 EgrHSP70 [P] (01-03) d'*E. grandis* et 27 AtHSP70 d'*A. thaliana*.

Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

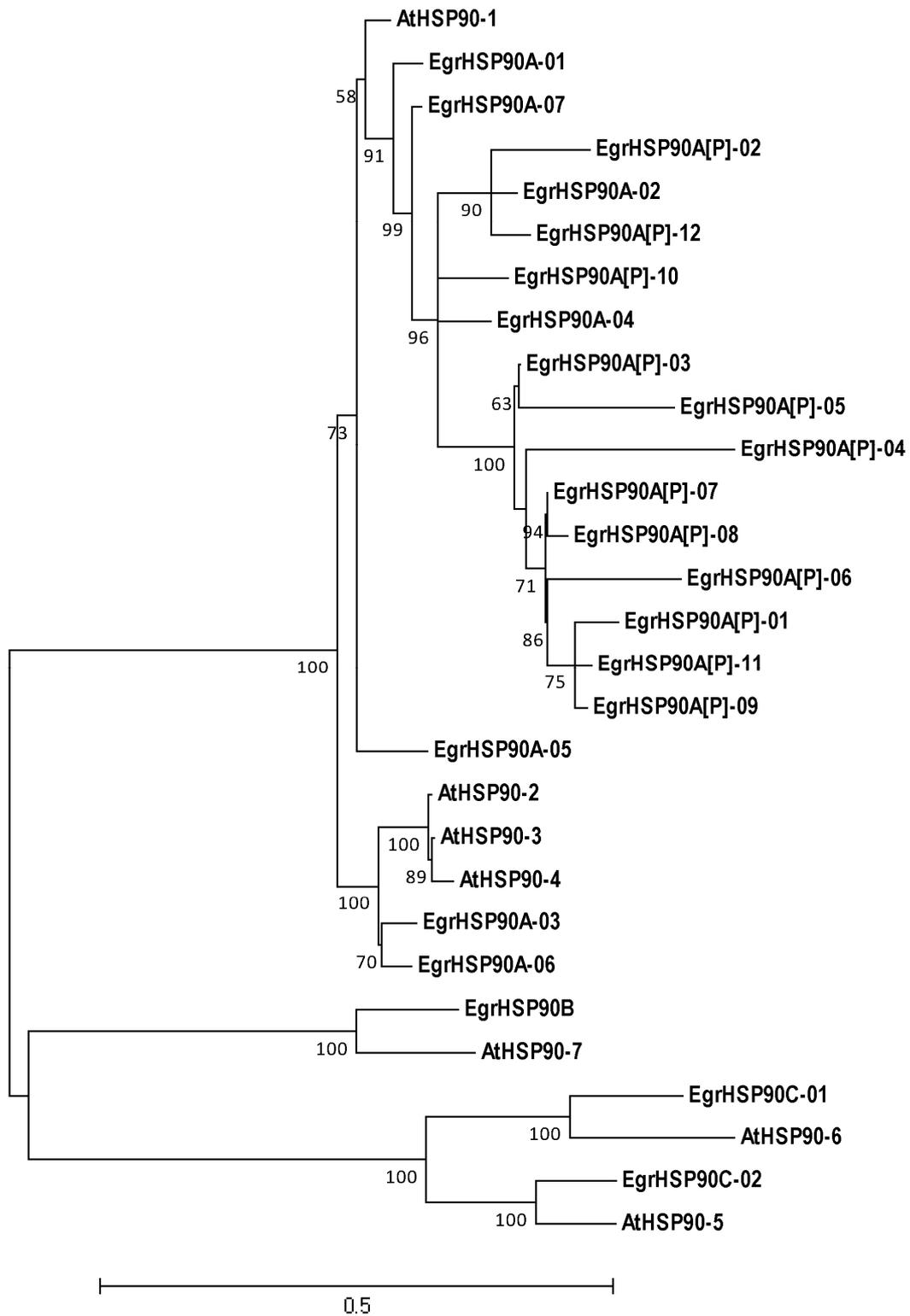


Fig II-11. Arbre phylogénétique construit à partir des HSP90 chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*: L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 10 EgrHSP90, 12 EgrHSP90 [P] d'*E. grandis* et 7 AtHSP90 d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

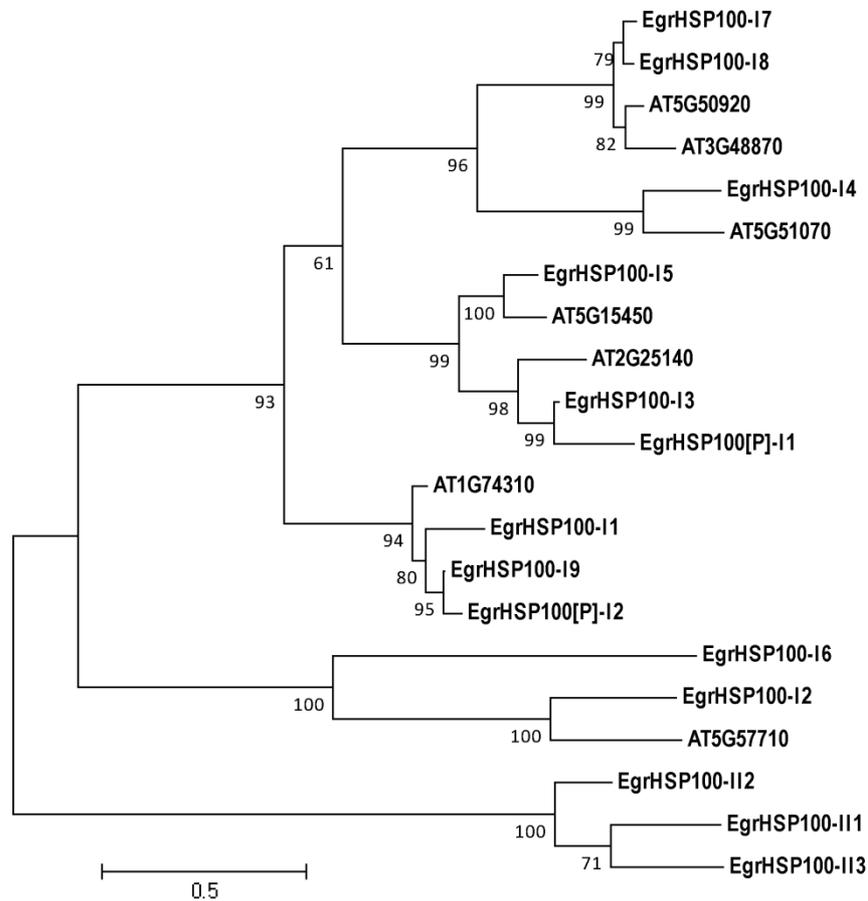


Fig II-12. Arbre phylogénétique construit à partir des HSP100 chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 12 EgrHSP100, 2 EgrHSP100 [P] d'*E. grandis* et 7 AtHSP100 d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

4.3.5. La famille HSP90

La protéine de choc thermique de 90 kDa (HSP90) est une chaperonne essentielle chez les cellules eucaryotes grâce à son rôle clé dans le repliement et l'activation des protéines impliquées dans la transduction du signal, le contrôle du cycle cellulaire, le trafic et la dégradation des protéines (Krishna & Gloor, 2001). Les HSP90s ont des domaines conservés, le premier en position N-terminale (ATPase) et C-terminale (domaine de dimérisation) qui sont reliés par une zone de liaison de longueur variable (Buchner, 1999). Ces protéines peuvent également jouer un rôle dans le développement (morphologie) et l'adaptation au stress (Wang, H *et al.*, 2004). Bien que les *HSP90* soient exprimées constitutivement dans la plupart des organismes, leur expression augmente en réponse au stress chez les procaryotes et les plantes, comme *Arabidopsis* et la vigne soumises au stress de température (chaleur et froid) ou à la sécheresse (Krishna & Gloor, 2001; Banilas *et al.*, 2012). Les HSP90s existent chez tous les organismes et se divisent en cinq sous familles (Chen *et al.*, 2006).

Chez *E. grandis*, 10 gènes HSP90 ont été prédits, ce qui est plus que chez *A. thaliana* et chez *V. vinifera* (7 membres dans les deux cas). D'autre part, les 12 pseudogènes prédits chez *E. grandis* ne sont pas retrouvés chez les deux autres espèces. Toutes les séquences prédites chez *Eucalyptus* ont un domaine conservé HSP90 (PF00183) et contiennent aussi un domaine Histidine kinase (soit HATPase_c_3 (PF13589) soit HATPase_c (PF02518)) en position N-terminale sur toutes les séquences sauf le pseudogène *EgrHSP90 [P]-12*. Ces protéines EgrHSP90 ont une longueur variable entre 666 et 882 d'acides aminés, soit de 76.88 à 93.77 kDa (Annexe II-8). En fonction de leur structure primaire, les EgrHSP90 et leurs pseudogènes sont classés en trois groupes : HSP90A (19) HSP90B (1) et HSP90C (2). L'arbre phylogénétique construit à partir des HSP90 d'*E. grandis* et d'*A. thaliana* montre que la famille se divise en trois sous- groupes, des événements de duplication étant observés chez les deux espèces, mais plus particulièrement chez *E. grandis* (figure II-11). Les sous-groupes HSP90-B et HSP90-C sont bien conservés après la spéciation entre deux espèces, alors que le sous-groupe HSP90A semble avoir plus évolué depuis la spéciation.

La prédiction *in silico* montre que les protéines EgrHSP90 sont localisées dans le cytoplasme, les organites (chloroplaste, ER), le noyau et la membrane cellulaire ou peuvent être sécrétées. L'analyse de la séquence du promoteur révèle que neuf séquences ont un cis-élément CRT/DRE, 13 séquences ont un cis-élément LTRE et six séquences ont un cis-élément HSE typique.

4.3.6. La famille HSP100

La famille HSP100 (Clp) est une autre classe de chaperonnes dépendantes de l'ATP. Le poids moléculaire des HSP100 est très variable (75 et 100 kDa) en raison de la taille de la région non conservée. Typiquement, les HSP100 sont composées de cinq domaines spécifiques: le domaine N-terminal, le domaine 1 de fixation des nucléotides (NBD1), le domaine central, le domaine NBD2 et le domaine C-

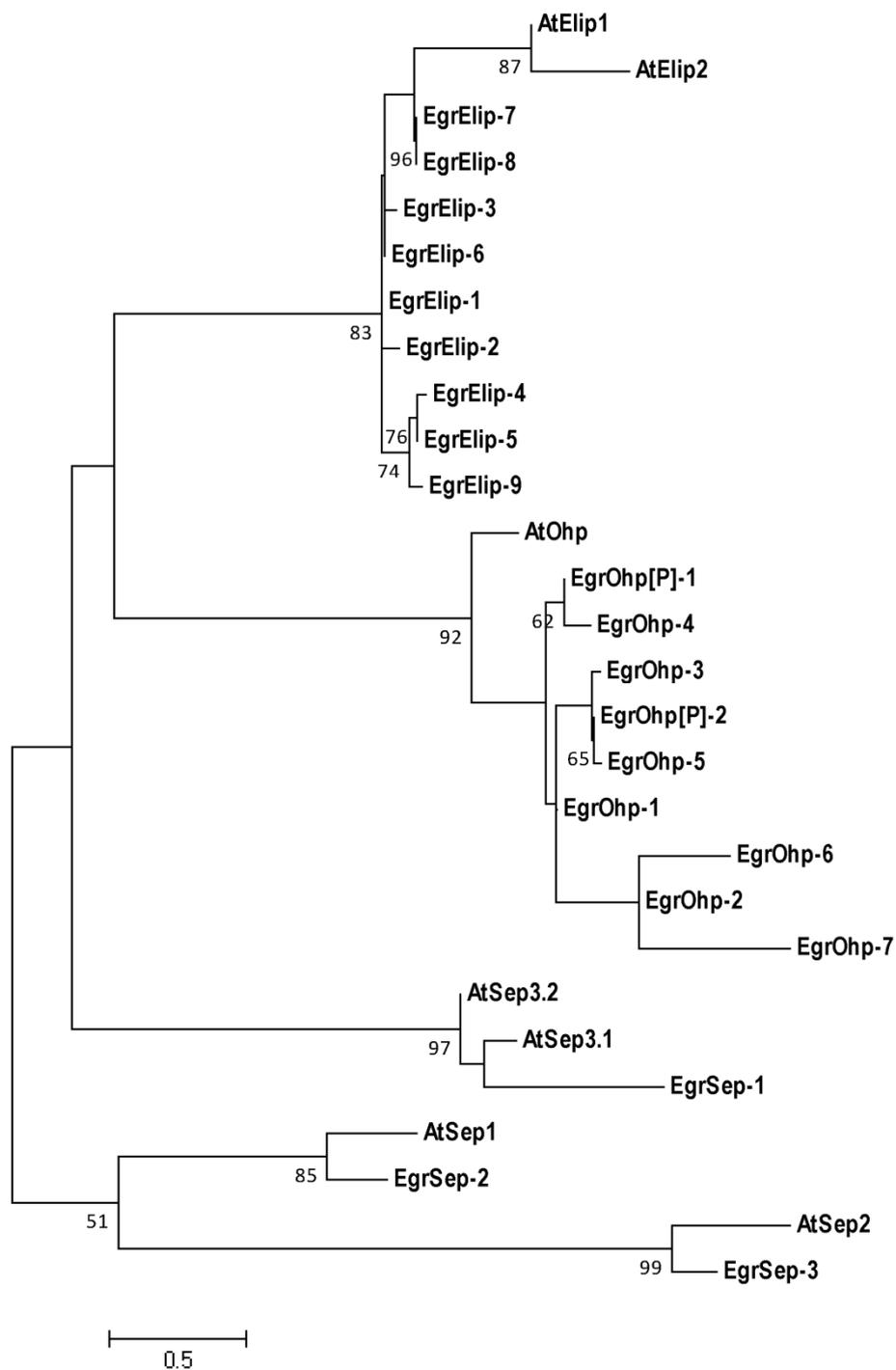


Fig II-13. Arbre phylogénétique construit à partir des Elip chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 21 Elip d'*E. grandis* et 7 d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

terminal. Les séquences conservées des cinq domaines comprennent des signatures : (i) la signature I dans le domaine N-terminal, les séquences de Walker A, de Walker B1 et de Walker B2 dans le NBD1, les deux signatures II et III dans le domaine central, les séquences de Walker A, de Walker B dans NBD2 et les deux signatures IV et V dans le domaine C-terminal. Basé sur le nombre de domaines de fixation des nucléotides (NBD), les HSP100 sont divisées en deux sous-groupes, le sous-groupe I (types A-D) contenant deux NBD et le sous-groupe II (types M, N, X et Y) contenant un seul NBD (Schirmer *et al.*, 1996). Les HSP100 jouent un rôle dans les interactions transitoires avec des protéines non natives, pour la prévention de l'agrégation et le contrôle du repliement et de l'assemblage, mais aussi dans le processus de translocation des protéines ou de leur dégradation (Wang, H *et al.*, 2004). Les *HSP100* sont souvent exprimées constitutivement chez les plantes, mais leur expression est régulée par le développement et par différents stress environnementaux comme la chaleur, le froid, la déshydratation, la salinité ou l'obscurité (Wang, H *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010).

Chez *Arabidopsis* et le riz, sept et neuf *HSP100* de type I ont été respectivement prédits (Lee *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2010). Douze gènes et deux pseudogènes appartenant aux types I et type II de la famille HSP100 ont été prédits dans le génome d'*E. grandis*, soit une famille plus grande que chez *A. thaliana*. Les HSP100 ont une longueur variant entre 594 et 1123 acides aminés (Annexe II-9). L'arbre phylogénétique construit à partir des familles d'*A. thaliana* et d'*E. grandis* montre que les HSP100 se subdivisent en deux grands groupes (figure II-12). Le groupe I (9 séquences) contient les HSP100 qui sont orthologues des AtHSP100 appartenant au type I (2 ClpA, 4 ClpB, 2 ClpC et 1 ClpD). Les 3 séquences du groupe II n'ayant pas d'orthologue chez *Arabidopsis*, elles sont classifiées comme un type ClpX.

L'analyse *in silico* des HSP100 prédit leur localisation dans le cytoplasme, la vacuole, les organites (chloroplaste, mitochondrie) ou le noyau de la cellule. L'analyse des séquences promotrices a permis la prédiction d'un à trois cis-éléments CRT/DRE pour neuf *HSP100* et seul le *HSP100-11* ne contient aucun cis-élément LTRE. De plus, un élément HSE est prédit dans le promoteur de quatre HSP100.

4.4. La famille Elip

Les protéines Elip sont localisées dans le thylakoïde. Au départ, les gènes nucléaires correspondants ont été décrits comme transitoirement induits dans les stades précoces de développement des semis étiolés de pois (Meyer & Kloppstech, 1984). Dans cette description, les protéines Elip sont importées dans les chloroplastes après leur synthèse dans le cytoplasme et sont insérées dans les membranes des thylakoïdes via la voie de cpSRP (Hutin *et al.*, 2003). Les Elip ont une relation étroite avec les protéines de liaison de la chlorophylle a/b (Cab) comme le LHC (Light-Harvesting Complex). Ensuite, des Elip codées par le génome chloroplastique ont été également décrites (Douglas & Penny, 1999). Selon leur structure secondaire prédite, la famille peut être divisée en trois sous-groupes: (i) Elip à

trois hélices et protéines associées, (ii) Sep à deux hélices (protéines de stress améliorées) également appelé Lils (light-harvesting-like) et (iii) le sous-groupe avec une seule hélice se subdivise en Hlips (high light-induced proteins), Scp (small Cab-like proteins) et Ohp (one-helix proteins). Les hélices I et III des Elip à trois hélices et les protéines associées et l'hélice I de Sep, Hlip, Scp ou Ohp contiennent un motif consensus très conservé, spécifique d'Elip (ERINGRLAMIGFVAALAVE et ELWNGRFAMLGLVALAFTE) (Adamska, 2004). Par contre, l'hélice II très polymorphe est différente entre les membres de la famille Elip. Les Elip ont un rôle potentiel comme support de la chlorophylle libérée, ou de stabilisation de l'association protéine-chlorophylle de l'appareil photosynthétique (Aro *et al.*, 1993; Bruno & Wetzel, 2004).

Les Elips ont été étudiés chez de nombreuses espèces annuelles telles que le pois, l'orge, *Arabidopsis* et la tomate (Adamska *et al.*, 1993; Pötter & Kloppstech, 1993; Adamska & Kloppstech, 1994; Hutin *et al.*, 2003; Bruno & Wetzel, 2004) ou les espèces ligneuses pérennes comme le Rhododendron, la vigne et le thé (Peng *et al.*, 2008; Berti & Pinto, 2012; Li *et al.*, 2013). Dans tous les cas, les gènes codant les protéines sont induits par la lumière (intensité et qualité) (Sävenstrand *et al.*, 2004), seule ou en combinaison avec d'autres signaux comme la température, la sécheresse et la salinité (Adamska & Kloppstech, 1991; Adamska & Kloppstech, 1994; Zeng *et al.*, 2002). De plus des signaux de développement comme l'action hormonale peuvent aussi réguler les gènes *Elip* (Wierstra & Kloppstech, 2000; Binyamin *et al.*, 2001; Norén *et al.*, 2003; Heddad *et al.*, 2006). Sur la base des résultats de la littérature, il est admis que les Elip jouent un rôle photoprotecteur particulièrement lors d'événements où les photosystèmes subissent des changements structurels majeurs, comme au cours de la photoinhibition, la floraison et la sénescence. En se liant avec les caroténoïdes et les chlorophylles libérés des photosystèmes endommagés, les protéines Elip permettent une dissipation thermique efficace en éliminant l'énergie d'excitation. Le nombre de gènes de la sous-famille *Elip* identifiées chez les plantes supérieures étudiées ne dépasse pas trois (Peng *et al.*, 2008).

Avec 19 gènes (+2 pseudogènes) prédits dans le génome entier, la famille *Elip* est plus grande chez *Eucalyptus* que chez *Arabidopsis* (7 gènes). Cette famille contient 9 protéines à trois hélices (Elip), 3 protéines à deux hélices (Sep) et 7 protéines à une hélice (Ohp). La longueur de la séquence varie entre 115 et 251 d'acides aminés correspondant au poids moléculaire de 12.61 à 28 kDa (Annexe II-10). L'arbre phylogénétique construit à partir des protéines Elip d'*Arabidopsis* et d'*Eucalyptus* présenté dans la figure II-13, montre que les quatre sous-groupes existent chez les deux espèces, avec un plus grand nombre d'orthologues chez *Eucalyptus*. Les sous-familles les plus représentées chez *Eucalyptus* sont Elip et Ohp avec respectivement neuf et sept membres; les gènes correspondants sont localisés sur les scaffolds 2 et 11, suggérant des événements récents de duplication ayant eu lieu après la divergence des deux espèces. L'analyse *in silico* de la région promotrice de tous les membres de la famille *Elip* prédit la présence d'un à trois cis-éléments CRT/DRE sur neuf gènes et 81% des gènes de cette famille contiennent au moins un cis-élément LTRE dans leur promoteur.

famille	<i>E. grandis</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>V. vinifera</i>
DHN	14	10	7	4
LEA1	2	3	5 (1)	5
LEA2	2	3	4	4
LEA3	7	4	5	1
LEA4	7	18	27	7
LEA5	8 (3)	2	1	3
LEA6	3	3	2	2
SMP	7	6	2	3
M	0	2	0	0
LEA-like	73	43	56	19

Tab II-2. Comparaison de la composition de la superfamille LEA (sous-familles) entre *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* et *Populus trichocarpa*. Les familles LEA d'*E. grandis* et de *V. vinifera* ont été annotées pour cette étude, alors que les LEA d'*A. thaliana*, et de *P. trichocarpa* avaient déjà été décrites par (Hundertmack & Hinch, 2008) et (Lan *et al.*, 2013). « p » est le nombre de pseudogènes.

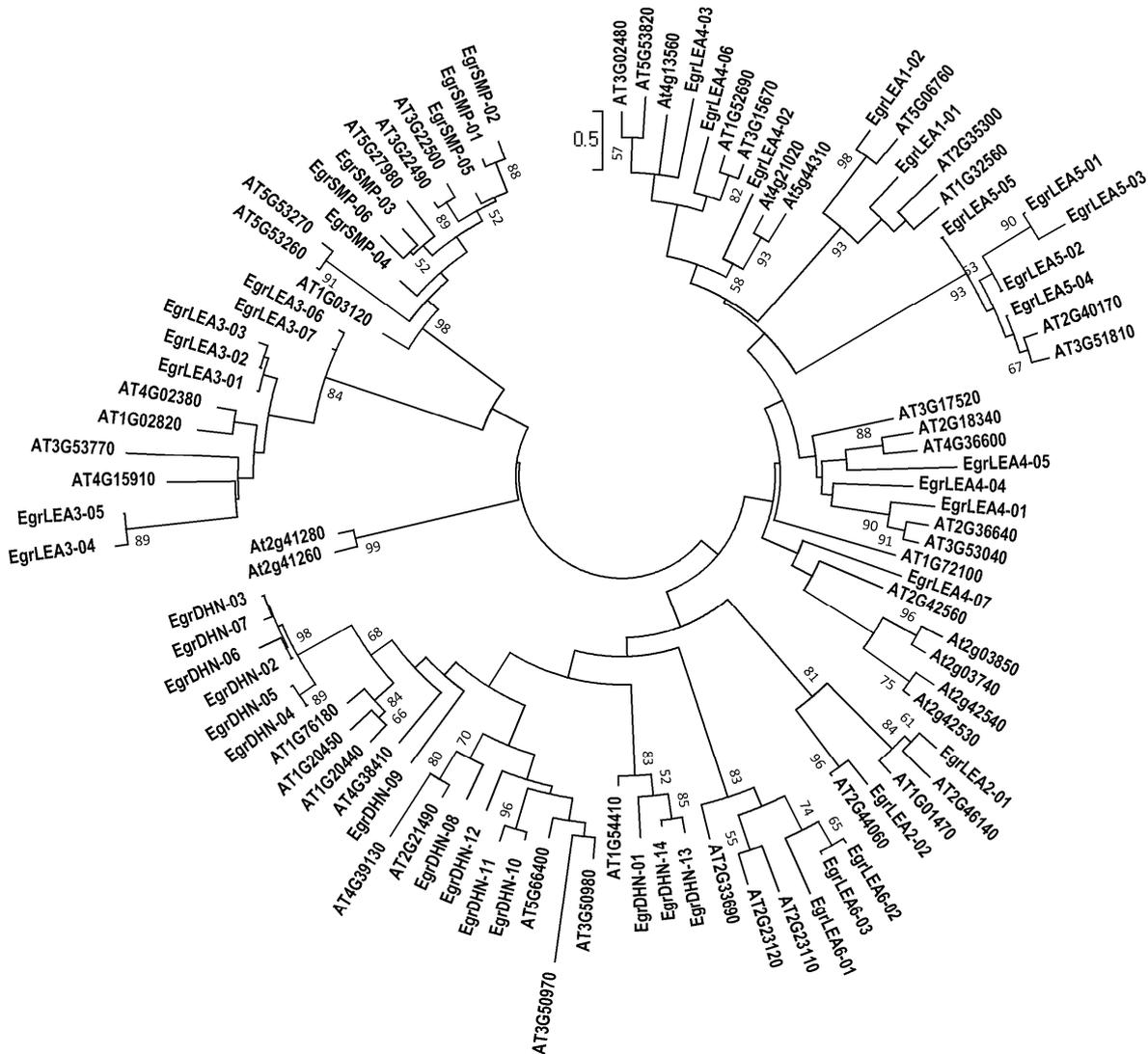


Fig II-14. Arbre phylogénétique construit à partir des LEA chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 50 EgrLEA d'*E. grandis* et 51 AtLEA d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

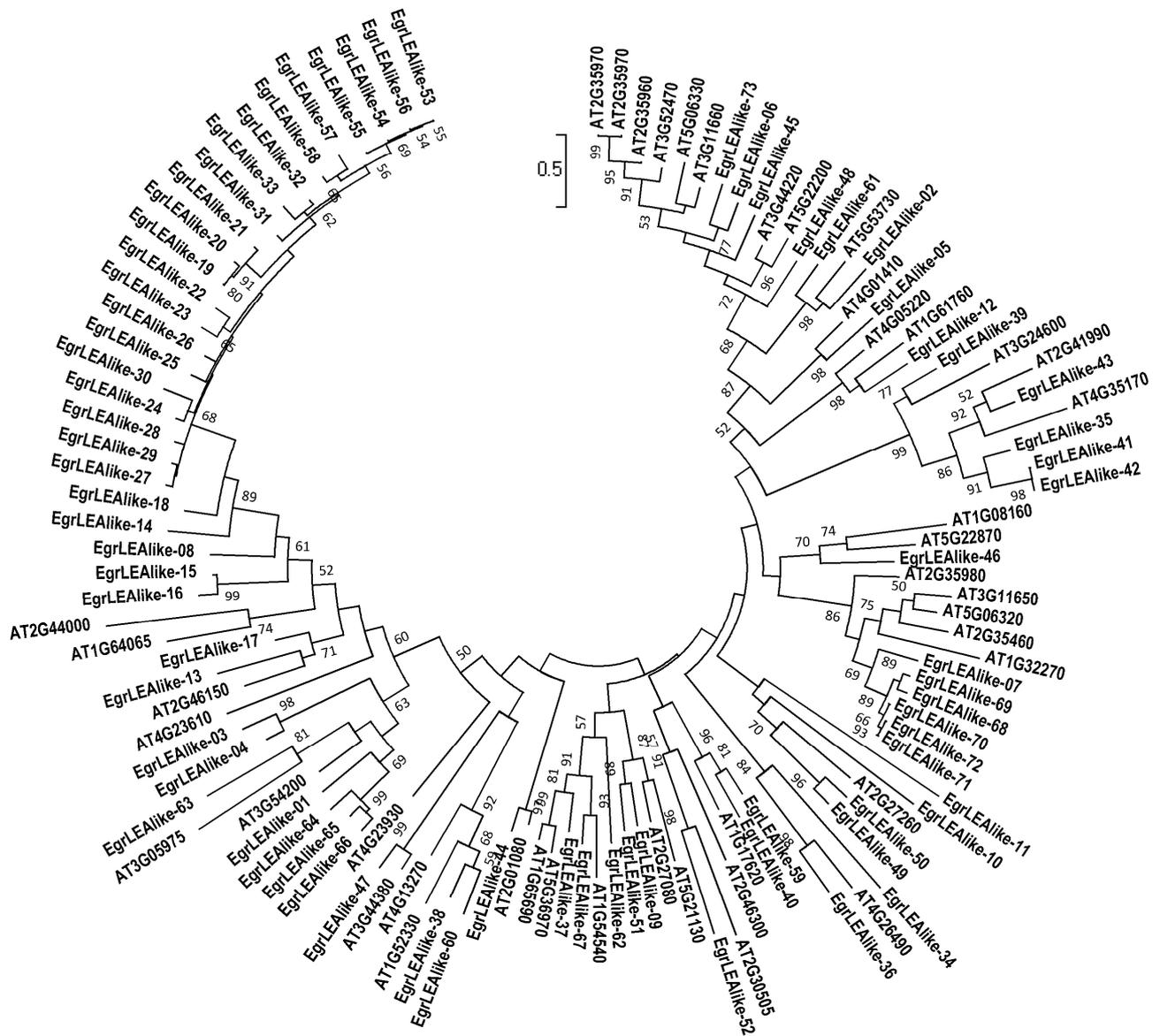


Fig II-15. Arbre phylogénétique construit à partir des LEA-like chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 73 EgrLEA-like d'*E. grandis* et 43 AtLEA-like d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

4.5. La famille LEA (Late Embryogenesis Abundant)

Les LEA sont présentes dans le règne végétal mais aussi chez les invertébrés, les champignons, les protistes et les procaryotes (Reardon *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). La comparaison phylogénétique des LEA de ces différents organismes montre que cette famille a connu une rapide expansion après la colonisation terrestre des espèces végétales (Lan *et al.*, 2013). Chez les plantes, les LEA s'accumulent pendant les dernières phases de l'embryogenèse et dans les tissus végétatifs exposés aux stress de déshydratation (froid, sécheresse ou sel) ou soumis à un traitement ABA (Yakovlev *et al.*, 2008). Ces protéines fortement hydrophiles sont riches en glycine et autres petits résidus qui favorisent la flexibilité de la conformation. Elles participent au maintien des fonctions cellulaires contre les effets néfastes de la déshydratation. Les LEA se lient aux protéines pour éviter leurs changements de conformation et leur agrégation dus à la limitation en eau (Olvera-Carrillo *et al.*, 2011). Contrairement à d'autres protéines, les LEA présentent une structure aléatoire qui, en condition de stress hydrique, forme une structure en hélice α polarisée capable de former des liaisons hydrogènes avec les protéines pour éviter leur agrégation et leur dénaturation. De plus, grâce à leur caractère amphiphile, les LEA peuvent aussi se lier aux régions hydrophobes des protéines comme des membranes pour assurer leur protection en conditions de déshydratation (Kosova *et al.*, 2011).

La première classification des LEA comprenait cinq sous-familles : LEA D19, LEA D11 (dehydrines), LEA D7, D113 and D95 (Ingram & Bartels, 1996), mais plus récemment les analyses exhaustives basées sur l'homologie de séquences au niveau des génomes ont permis d'identifier neuf (Hundertmark & Hinch, 2008; Lan *et al.*, 2013) ou 12 (Jaspard *et al.*, 2012) sous-familles. L'annotation manuelle basée sur la présence de domaine conservé des LEA a permis d'identifier 119 gènes et trois pseudogènes chez *Eucalyptus* ainsi que de nouvelles séquences pour les trois autres espèces étudiées qui s'ajoutent à celles déjà publiées : 94 chez *Arabidopsis* (43 nouvelles), 109 chez *Populus* (56 nouvelles) et 48 chez *Vitis* (19 nouvelles) (Hundertmark & Hinch, 2008; Lan *et al.*, 2013). Ces nouvelles LEA contiennent le domaine conservé pour LEA2 (PF03168) mais elles ne sont pas proches phylogénétiquement par rapport aux LEA2 décrites chez *Arabidopsis* (Hundertmark & Hinch, 2008) ou chez *Populus* (Lan *et al.*, 2013). On les considère donc comme des LEA-like.

L'analyse des profils Pfam montre que les LEAs d'*Eucalyptus* sont distribuées en 9 sous-familles comme chez *Vitis* et *Populus* et *Arabidopsis*, qui possède en plus un groupe spécifique (AtM) (tab II-2). En comparaison avec d'autres espèces étudiées, les trois sous-familles DHN, LEA5 et LEA-like sont plus grandes chez *E. grandis*. Comme l'arbre phylogénétique avec tous les gènes LEA présente de trop grandes distances entre les branches des 9 sous-familles, il a été choisi de construire des arbres séparés (figure II-14, 15). L'analyse de la structure des gènes montre que tous les gènes LEA contiennent pas ou peu d'introns (3 au maximum). La localisation révèle que les gènes LEA sont répartis sur les 11 chromosomes mais ceux de la sous-famille DHN sont principalement localisés sur les chromosomes 6 et

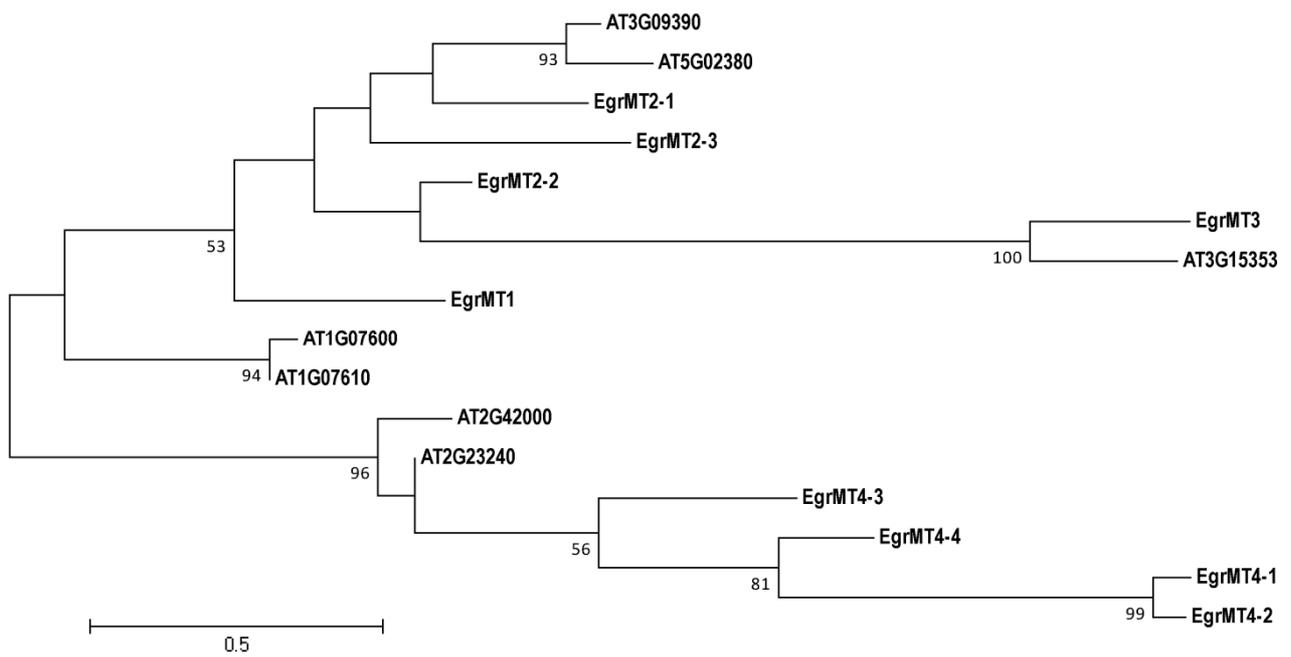


Fig II-16. Arbre phylogénétique construit à partir des métallothionéines chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 9 EgrMT d'*E. grandis* et 7 AtMT d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

9 et ceux de la sous-famille *LEA*-like surtout sur les chromosomes 5 et 10. On peut noter quelques évènements de duplications pour presque toutes les sous-familles, à l'exception de *LEA1* et *LEA4*.

L'analyse *in silico* de la région promotrice de tous les membres de la famille *LEA* prédit la présence d'un à cinq cis-éléments CRT/DRE sur 55 gènes, en particulier 86% des membres de la sous-famille *DHN* contiennent au moins 1 cis-élément CRT/DRE (tab II-1). 74 gènes de cette famille contiennent au moins un cis-élément LTRE dans leur promoteur (Annexe II-11).

4.6. La famille Métallothionéine

Découverte par Margoshes et Vallee (Margoshes & Vallee, 1957), cette protéine a été nommée "métallothionéine" afin de refléter la présence d'ions sulfure, de thiols ou d'ions métalliques. Les métallothionéines existent chez tous les organismes eucaryotes et procaryotes et sont regroupées dans une superfamille de composition assez hétérogène. Associées à des ions métalliques, ces protéines à faible poids moléculaire sont riches en cystéine. En comparaison avec des métallothionéines animales, les métallothionéines végétales contiennent deux plus petits domaines riches en cystéine (de quatre à huit cystéines chacun) et une grande région d'espaceur (30 à 50 résidus). Selon leur structure, les métallothionéines végétales se divisent en quatre types (MT1, MT2, MT3 et MT4) (Freisinger, 2011).

Plusieurs études suggèrent que les métallothionéines pourraient être impliquées dans les processus biologiques aussi divers que l'apoptose, la croissance, le développement embryonnaire, le développement des microspores, la sénescence, le développement des fruits, la maturation et la réponse au stress. Les métallothionéines jouent un rôle dans le métabolisme des métaux et la détoxification cellulaire en condition de stress en raison de leur activité de chélateurs de métaux (Lian *et al.*, 2013). En plus de leur expression ubiquitaire, les métallothionéines végétales sont induites par plusieurs stress (acide d'abscissique, salinité, stress oxydatif, ions métalliques et invasions de pathogènes) (Domenech *et al.*, 2006).

Les quatre types de métallothionéines ont été trouvés dans le génome de l'*E. grandis* avec 9 séquences au total (1 MT1, 3 MT2, 1 MT3 et 4 MT4), ce qui est assez similaire à la taille de cette famille chez *A. thaliana* (sept séquences). Chez *Eucalyptus*, les MTs sont de petites molécules, sauf MT4-1 (127 acides aminés), toutes les autres MTs ont moins de 100 acides aminés (Annexe II-12). L'arbre phylogénétique présente des orthologues entre *Arabidopsis* et *Eucalyptus* (figure II-16). Un cis-élément CRT/DRE est prédit dans le promoteur de seulement trois séquences *MT1*, *MT2-1* et *MT4-4*. Un à trois motifs LTRE sont prédits dans la région promotrice de six *MTs*.

	<i>E. grandis</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>V. vinifera</i>
DELLA	3	5	4	3
HAM	10 (1)	5	14	5
LISCL	44 (6)	6	13	8
LS	4	4	8	2
PAT1	15	6	18	6
SCL3	3	1	3	4
SCR	7	2	8	5
SHR	5	3	11	4
NEW	5		11	5
PtGRAS			12	

Tab II-3. Comparaison de la composition de la famille GRAS (groupes) entre *Eucalyptus grandis*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* et *Populus trichocarpa*. Les familles de facteurs de transcription GRAS des quatre espèces ont été annotées dans cette étude. « p » est le nombre de pseudogènes.

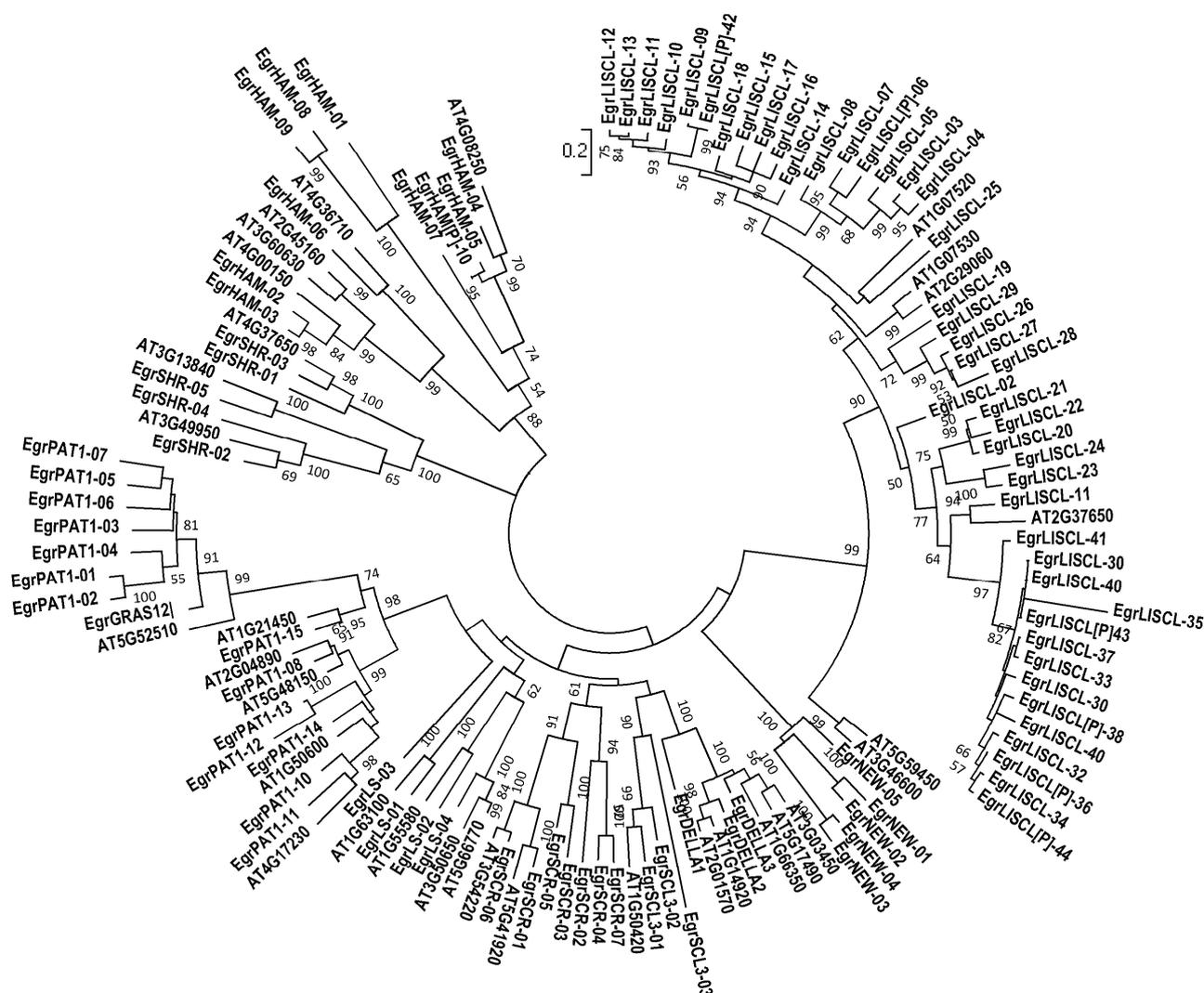


Fig II-17. Arbre phylogénétique construit à partir des GRAS chez *E. grandis* et chez *A. thaliana*. L'arbre a été construit à partir d'alignement des séquences protéiques entières en utilisant le logiciel Mega 5, méthode Maximum likelihood et test Bootstrap avec 1000 répétitions. Séquences utilisées: 96 EgrGRAS d'*E. grandis* et 33 AtGRAS d'*A. thaliana*. Les valeurs faibles (<50) de Bootstrap ont été supprimées de l'arbre.

4.7. La famille GRAS

Spécifique des plantes, la famille multigénique des GRAS correspond à des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la croissance et du développement. Le nom GRAS dérive des noms des trois premiers gènes identifiés, GAI (Gibberellic-Acid Insensitive), RGA (Repressor of GAI) and SCR (Scarecrow) (Bolle, 2004). L'existence de gènes orthologues des GRAS chez les bryophytes suggère que ces protéines ont une existence d'au moins 400 millions d'années (Tian *et al.*, 2004). Les protéines contiennent entre 400 et 700 acides aminés avec des résidus conservés dans le domaine C-terminal mais au contraire une variabilité dans leur domaine N-terminal (Hirsch & Oldroyd, 2009). Avec 33 gènes chez *Arabidopsis* et 60 chez le riz (Itoh *et al.*, 2005; Tong, H *et al.*, 2009), cette famille est divisée en huit sous-familles: DELLA, HAM, LISCL, PAT1, LS, SCR, SHR and SCL3. L'analyse fonctionnelle de 10 GRAS d'*Arabidopsis* a démontré leur participation à des processus de développement dans différents organes, comme la racine, la tige secondaire ou le méristème apical (Bolle, 2004; Sun *et al.*, 2012). Certaines protéines GRAS sont aussi impliquées dans la réponse des plantes aux stress abiotiques et dans la régulation de la nodulation chez *Medicago truncatula* (Hirsch & Oldroyd, 2009; Liu *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que les protéines DELLA sont aussi capables d'interagir avec le facteur de transcription impliqué dans la signalisation du phytochrome (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). Parallèlement, l'accumulation des DELLA chez le sur-exprimant CBF a été rapportée (Achard *et al.*, 2008). Le rôle des autres sous-familles de GRAS n'a pas encore bien décrit. Les HAM participent au maintien du méristème apical et racinaire à l'état indifférencié, elles jouent un rôle dans la perception de la gibbérelline. Les SCL3 sont la cible directe des DELLA qui en induisent l'expression (Zhand *et al.*, 2011). Elles sont réprimées par la gibbérelline et il est possible qu'elles soient des régulateurs positifs de la gibbérelline. Les LS participent à la régulation de la gibbérelline. Les SHR et les SCR ont un rôle dans le développement du système racinaire et dans son organisation. Les PAT1 participent à la transduction du signal dans le phytochrome A et ont un rôle de régulateur transcriptionnel lors de l'induction des signaux de défenses (Tian *et al.*, 2004). Les LISCL sembleraient impliquées dans la régulation transcriptionnelle de la microsporogénèse.

Dans le génome d'*E. grandis*, la famille GRAS comprend 92 membres (Annexe II-13), ce qui est comparable à *Populus* (102 membres) mais plus que chez *Arabidopsis* (33 membres) et *Vitis* (42 membres). Les GRAS d'*E. grandis* sont distribuées au sein de neuf sous-familles en comparaison avec huit chez *Arabidopsis*. On trouve un groupe spécifique pour les ligneux appelé NEW. Il y a aussi un groupe spécifique chez *P. trichocarpa* appelé *PtGRAS*. DELLA et LS sont des sous-familles contenant un nombre équivalent de proches orthologues entre *Eucalyptus* et *Arabidopsis* (figure II-17). En comparaison avec *Arabidopsis*, le grand nombre de séquences de GRAS chez *E. grandis* est principalement dû aux duplications en tandem pour les autres sous-familles comme *PAT1* et *LISCL* (41 chez *E. grandis* et six chez *A. thaliana*). Pour ces gènes, les duplications en tandem sont principalement localisées sur les chromosomes 1, 2, 10 and 11. Le groupe *LISCL*, fortement dupliqué chez *Eucalyptus* en comparaison

avec les autres espèces, sont connues pour intervenir dans des processus généraux associés au développement et la défense.

L'analyse *in silico* de la région promotrice de tous les membres de la famille *GRAS* prédit la présence d'un à quatre cis-éléments CRT/DRE sur 36 gènes et 56 gènes de cette famille contiennent au moins un cis-élément LTRE dans leur promoteur (tab II-1).

5. Conclusions et discussion

En conclusion de la première partie de ce chapitre, l'analyse du transcriptome froid chez *Eucalyptus* révèle une prédominance des mécanismes de cryoprotection (LEA) et de détoxification (métallothionéine et autres protéines antioxydantes) qui interviennent au cours des différentes phases de l'acclimatation. Ces gènes appartiennent à des familles multigéniques, dont les différents membres sont régulés de façon précoce, tardive ou progressive. Concernant l'accumulation des sucres connus comme importants pour la protection cellulaire, deux régulations distinctes sont observées : les gènes impliqués dans la synthèse de raffinose sont induits de façon précoce et ceux pour la dégradation d'amidon de façon progressive. Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que le raffinose s'accumule pendant l'acclimatation au froid en particulier chez les génotypes tolérants (Leborgne *et al.*, 1995; Travert *et al.*, 1997). Les sucres solubles synthétisés en condition de stress froid comme ceux issus de la dégradation de l'amidon, pourraient avoir un rôle dans la stabilisation des membranes (Leborgne. *et al.*, 1995). Enfin, le processus qui semble spécifique à l'eucalyptus correspond à la synthèse de cire (LTP3) et à son dépôt sur la cuticule pour la protection des tissus. Cette observation est à rapprocher des résultats de l'équipe concernant le phénotype des plantes surexprimant le *CBF* qui présentent un dépôt de cire sur la surface des feuilles (Navarro *et al.*, 2011).

L'analyse *in silico* des grandes familles de gènes codant des protéines de réponse aux stress abiotiques a été présentée dans ce chapitre. Ce travail avait pour but de choisir dans ces familles les membres potentiellement cibles des CBF/DREB pour étudier leur expression dans les lignées transgéniques sur-exprimant le *CBF* et qui font l'objet du dernier chapitre. Ces données très descriptives conduisent à trois types de situation concernant la structure de ces familles multigéniques, en comparaison avec *Arabidopsis* pour lequel le plus de données sont disponibles.

Dans la plupart des cas, et en particulier pour les familles *Elip* et *GRAS*, le nombre de membres est plus important (souvent plus du double) chez *Eucalyptus* mais la structure de la famille semble conservée, c'est-à-dire que les arbres phylogénétiques mettent en relation dans les mêmes clusters des orthologues plus nombreux chez *E. grandis* que chez *A. thaliana*. Dans trois cas (*RS*, *HSP100* et *HSP 90*), la taille plus grande de la famille est aussi justifiée par un clade supplémentaire chez *Eucalyptus*. Une autre situation correspond à une conservation de la taille et de la structure de la famille chez les 2 espèces pour

la β -amylase, les *DNAj*, *HSP60*, *HSP70* et les *métallothionéines*. Enfin, la superfamille *LEA* représente un cas un particulier puisque de nombreux gènes qui ont été identifiés aussi chez d'autres espèces par la recherche d'orthologues ont été mis à jour.

Le nombre plus important de gènes dans ces familles est cohérent avec un génome plus grand en paires de bases et nombre de gènes et aussi avec le nombre de gènes contenant un CRT/DRE dans leur promoteur.

**Chapitre III. Analyse fonctionnelle des DREB1/CBF
via des lignées d'*E. urophylla* x *E. grandis* sur-exprimant
EguCBF1a ou *EguCBF1b***

1. Acclimatation ex vitro de lignées transgéniques d'*Eucalyptus*

A mon arrivée au laboratoire, les lignées sur-exprimant de façon constitutive le gène *EguCBF1a* (13 lignées) ou *EguCBF1b* (9 lignées) étaient disponibles sous forme de microboutures *in vitro*. Les explants ont été maintenus et multipliés sur le milieu M et SDM (Annexe III-1, 2), avec une fréquence de repiquage toutes les trois semaines. Ces plantules *in vitro* ont été étudiées pour une investigation préliminaire du rôle des *CBFs* dans la tolérance au froid et le développement (Navarro et al, 2011). La caractérisation de ces lignées a montré que la tolérance au froid est améliorée par rapport au témoin. En parallèle, le phénotypage de ces lignées transgéniques a mis également en évidence un retard de croissance, la réduction de la surface et de l'épaisseur des feuilles. Un dépôt de cire épicuticulaire a aussi été observé sur les deux côtés des feuilles de la lignée la plus modifiée (A1). La densité des stomates chez les sur-exprimants est réduite par rapport au témoin et au contraire, la densité de glandes à huile a été augmentée de façon spectaculaire (lignée A1).

Pour compléter cette première étude, mes travaux correspondent au phénotypage sur lignées *ex vitro*, dans des conditions de développement plus proches de la normale. Pour cela, il a été nécessaire d'enraciner ces boutures avant de les acclimater *ex vitro* afin de générer des lots de plantes en nombre suffisant pour permettre leur analyse. En fonction des résultats préliminaires sur microboutures, les lignées A1, A19, A25, A27, B8, B9, B14 et B20 sont choisies parmi les sur-exprimants *CBF1a* ou *CBF1b*. La lignée PK7 contenant le vecteur de transformation « vide » correspond au témoin.

1.1. Mise au point des conditions d'allongement des tiges

Les essais ont été réalisés uniquement sur la lignée A1, qui a une réduction de croissance la plus forte, au cours de 3 expériences indépendantes avec huit explants ou plus.

Les tests de différentes compositions de milieu ont permis de choisir le milieu W4 (annexe III-6) qui contient les mêmes macroéléments et oligoéléments que le milieu MS, le phytigel, le BAP mais pas de charbon actif. Il se distingue des autres milieux testés comme le milieu W1 (annexe III-3) par la présence d'agar mais pas d'hormone; le milieu W2 (annexe III-4) comprend l'agar, le milieu W3 (annexe III-5) sans BAP, le charbon actif est ajouté dans le milieu W4+C (annexe III-7) ; et enfin le milieu SPM (annexe III-8) a une concentration diminuée de moitié des éléments nutritifs, contient des charbons actifs mais pas d'hormone. Les explants sont transférés du milieu de multiplication aux milieux d'allongement pour obtenir des explants avec une taille de 1.5 à 2 cm suffisante pour l'induction racinaire (Yang *et al.*, 1995; Nourissier & Monteuis, 2008).

Influence de la gélose : le phytigel a un effet positif pour l'allongement de tige d'*E. urophylla* x *E. grandis* par rapport à l'agar. Les explants A1 se sont mieux allongés sur les milieux W3 et W4 que sur les milieux W1 et W2. Cet effet observé chez la pomme de terre (Veramendi *et al.*, 1997), la rose et le glaïeul

(Neštáková *et al.*, 2000), la banane (Kaçar *et al.*, 2010) et le chlorophytum (Kumar *et al.*, 2010) peut être dû aux propriétés du phytigel: sa transparence, sa composition en glucose et en polysaccharides comme l'acide glucuronique ou le rhamnose, en cations monovalents ou divalents (Veramendi *et al.*, 1997). En comparaison avec l'agar, le phytigel semble changer la sensibilité des tissus aux cytokinines (Haderl *et al.*, 1995), et permettre une meilleure disponibilité en eau et ainsi une croissance plus forte (Owens & Wozniak, 1991). L'agar a été signalé comme étant la cause du stress hydrique dans les cultures de pommes de terre (Gopal *et al.*, 2008).

Influence du charbon actif : le charbon actif utilisé à 2 g/l a un effet négatif sur l'allongement de tige d'eucalyptus. Cette influence, connue chez le tabac, peut être causée par la capacité de l'absorption des phytohormones par le charbon actif (Constantin *et al.*, 1977).

Influence de la phytohormone : les explants peuvent s'allonger sur les milieux comprenant la cytokinine (BAP) mieux que sur les milieux sans hormone. L'effet positif de BAP sur l'élongation de tige a été observé nettement chez *E. globulus Labill* (Bennett *et al.*, 1994) et aussi chez *E. urophylla x E. grandis* (Yang *et al.*, 1995 ; Hadaji *et al.*, 2005).

Pour l'étape d'allongement de tige, le W4 (Annexe 6) semble être le meilleur parmi les milieux d'allongement. Les explants de la lignée A1 qui surexpriment de manière la plus élevée le gène *CBF1a*, et qui a le phénotype le plus marqué peuvent bien s'allonger sur ce milieu.

Après ce test sur la lignée A1, toutes les autres lignées étudiées ont été forte en culture mises sur ce milieu.

Suite à l'étape d'allongement de tige, les explants sont soumis à une phase d'induction racinaire suivie d'une phase d'allongement des racines avant de pouvoir être acclimatées *ex vitro*; les principales étapes sont illustrées dans la figure III-1.

1.2. Mise au point des conditions d'induction racinaire

Suite à l'étape d'allongement, les explants allongés sont cultivés sur différents milieux d'induction racinaire. Le nombre d'explants dans chaque expérience est variable et dépend de la quantité d'explants allongés.

La différence du taux d'enracinement des explants entre les milieux est plus souvent non significative car une grande variabilité dans les résultats est causée par l'hétérogénéité du matériel végétal. Cependant, sachant que mon objectif est de produire un nombre suffisant de plants pour les acclimater, les commentaires qui suivent ne s'appuient pas sur des résultats précis validés par des tests statistiques mais plutôt sur les grandes tendances concernant l'influence des éléments de composition du milieu.

Influence de la gélose : à cette étape d'induction racinaire, le phytigel a un effet positif pour l'induction racinaire. Aucun explant ne s'est enraciné sur les milieux comprenant l'agar. Cependant, certains ont produit des racines sur les milieux avec phytigel. Le même effet est observé chez l'anthurium

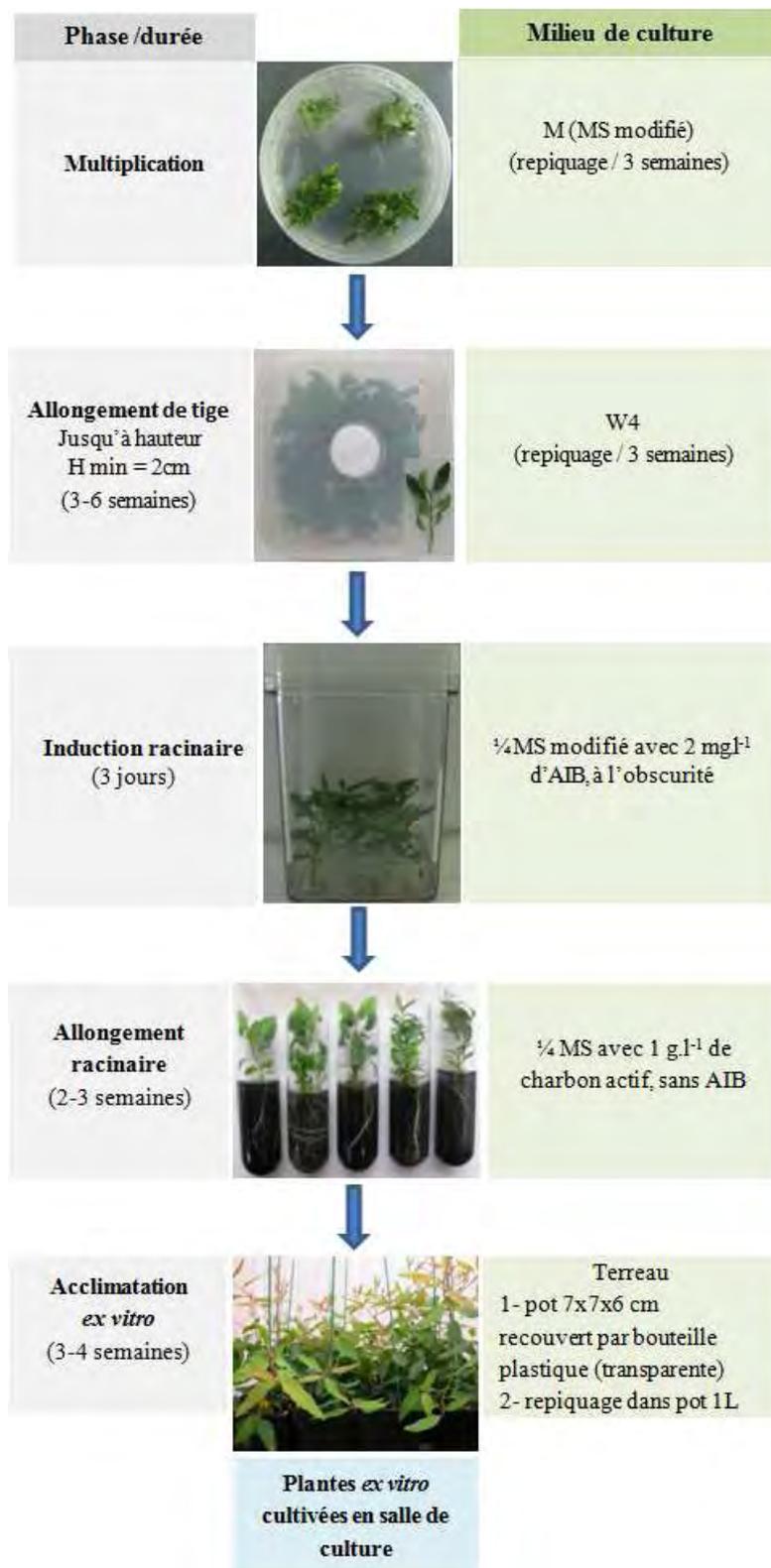


Fig III-1. Principales étapes de production des lignées transgéniques *ex vitro*. Les explants maintenus sur milieu de multiplication ont été transférés sur des milieux différents pendant un temps correspondant aux étapes d'allongement de tige, d'induction racinaire et d'allongement racinaire. Quand les racines atteignent une longueur minimum de 2 cm, les plantes sont transférées pour l'acclimatation *ex vitro*.

dont la tige s'est mieux enracinée et a plus de poils absorbants sur milieu avec le phytagel que celui avec l'agar (Keatmetha et Suksa-Ard, 2004). Des inhibiteurs de croissance peut-être présents dans l'agar (Hu, 1983) pourraient supprimer la croissance des poils absorbants.

Influence du milieu nutritif : la concentration des éléments nutritifs influence aussi l'enracinement des explants. Au même niveau de concentration d'AIB, les explants se sont enracinés plus tôt sur milieux comprenant les éléments nutritifs moins concentrés. Par exemple, les explants A1 se sont enracinés environ 40 jours après avoir été mis sur milieu M4 (annexe III-12) mais seulement 29 jours après avoir été mis sur milieu M7 (annexe III-15). Le même effet a été observé chez la lignée PK7 (les racines apparaissent après environ 18 jours sur milieu M4 mais seulement 12 jours sur milieu M7). Le rapport de Nourissier S. et Monteuis O. (2008) a présenté une différence de la capacité d'enracinement sous l'influence du milieu nutritif chez *E. urophylla* x *E. grandis* (Nourissier S. et Monteuis O., 2008). Mais la diminution de la concentration en sels n'a pas augmenté la capacité d'enracinement des explants. En réalité, les faibles concentrations en sels ont été jugés favorables à l'enracinement, respectivement, chez des hybrides d'*E. grandis* (Warrag et al. 1990) et chez *E. tereicornis* (Das et Mitra, 1990). Les sels nutritifs sont connus pour modifier la polymérisation du gel, donc la disponibilité pour les explants de tous les composants du milieu, les auxines exogènes incluses (George, 1993).

La concentration favorable d'AIB correspond à 5-10 μM . Aucun explant ne s'est enraciné sur les milieux comprenant l'AIB à 2,5 μM , sauf un seul explant Pk7. L'influence d'AIB à la même concentration pourrait ne pas avoir le même effet sur les explants Pk7 qui se distinguent des sur-exprimants *CBF1a* et *CBF1b* par le taux d'enracinement sur milieu M4. Le taux d'enracinement est de 22% pour la lignée Pk7 par rapport aux taux de 19,44%, 8,33%, 11,11% et 12,22% respectivement pour les lignées A1, B8, B9 et B14. Cette différence entre la lignée Pk7 et les autres est plus nette sur milieu M7. Sur ce milieu, le taux d'enracinement est de 60,27% pour lignée Pk7 par rapport à 2,22%, 16,67%, 11,11% et 19,05% respectivement pour les lignées A1, B8, B9 et B14. Pour des fortes concentrations d'AIB (7,5 et 10 μM), une mortalité importante des explants est observée chez les lignées Pk7, B8, B14 et les lignées A19, A25 et A27 qui ont une tige fine, mais aucun explant A1 n'est mort sur ces milieux.

Pour la formation des racines, les concentrations d'auxine plus élevées sont nécessaires au cours de la phase d'induction, alors que les phytohormones deviennent des inhibiteurs pendant la phase de formation racinaire (De Klerk et al 1999.). Donc, la concentration optimale d'AIB pour l'induction racinaire est de 5 μM .

La lumière ne semble pas être favorable à l'induction racinaire. Quelques explants des lignées B14, B9 et A1 se sont enracinés sous la lumière tamisée mais la plupart des explants se sont enracinés à l'obscurité. L'effet inhibiteur de la lumière à haute intensité sur l'enracinement des boutures pourrait être en partie dû aux changements dans des composants du milieu qui sont induits par la lumière (Stanisopoulos et Hangarter 1990). La lumière induisant les changements métaboliques chez des explants peut aussi avoir contribué à la réponse d'enracinement. Sous la lumière, les cals sont fortement

induits et les composés phénoliques synthétisés peuvent inhiber le transport de l'auxine (Jacobs & Rubery 1988), changer l'activité de la peroxydase (Kevers *et al.* 1997) ou la protection de l'auxine dans la zone blessée (De Klerk *et al.* 1999). Un composé « cytokinine-like » étant induit sous lumière intense a été associé à la récalcitrance des boutures de *Picea abies* à l'enracinement (Bollmark & Eliasson 1990). Presque tous les protocoles de production de racines se font à l'obscurité.

Il n'y a pas de différence nette dans le nombre des racines entre les lignées étudiées mais la morphologie des racines est différente, elles sont très fines pour la lignée A1 mais robustes pour les autres lignées (A19, A25, A27, B8, B9, B14 et B20). Quelquefois, des explants A1 avec une seule racine émergeant d'un cal sont observés, alors qu'une ou deux racines peuvent sortir directement de la tige ou indirectement du cal d'explant témoin ou sur-exprimant *CBF1b*. Cette observation met en évidence les différences phénotypiques concernant le développement de la lignée A1 par rapport aux autres lignées comme observé précédemment (Navarro *et al.*, 2011).

Basé sur des essais, le milieu ¼ MS modifié en ajoutant l'AIB à 10 µM (Annexe III-17) est proposé pour l'étape d'induction racinaire, puis les explants induits par auxine sont transférés sur milieu ¼ MS sans AIB (annexe III-18).

1.3. Acclimatation ex vitro des explants enracinés et production de différents lots de lignées transgéniques utilisées pour l'analyse phénotypique

Après l'étape de production des racines, les premiers essais d'acclimatation *ex vitro* des explants enracinés ont été réalisés par Luc Harvengt (FCBA) puis au laboratoire en adaptant le protocole FCBA. Chaque explant enraciné est transféré dans un pot en plastique transparent rempli par le terreau traité par le Prévicur (Propamocarbe fosetyl) à 3 ml/l. Ce pot a été bien humidifié et bien fermé par une membrane en plastique transparente pendant une semaine. Ces pots ont été ouverts progressivement pendant une période de trois semaines pour que les explants s'adaptent bien à l'humidité du milieu extérieur. En fin de programme d'acclimatation, les plantes ont été transférées dans un pot plus grand (volume d'un litre) et placées dans la salle de culture.

Huit lots de plantes *ex vitro* (200 plantes au total) ont été obtenus à partir des explants *in vitro* au laboratoire. Cependant, en raison d'une contamination importante par des champignons, le nombre de plantes obtenu par lignée pour les premiers lots a été insuffisant pour le phénotypage (tableau III.1). Cette situation a été améliorée à partir de quatrième d'essai, et les plantes des lots 6, 7 et 8 ont été utilisées pour le phénotypage.

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8
PK7	0	4	1	2	1	8	6	9
A19	0	0	1	5	1	0	3	3
A25	0	2	0	7	1	3	6	2
A27	0	1	1	3	1	9	8	4
B8	2	1	1	6	0	4	11	6
B9	0	1	1	6	1	6	4	2
B14	1	2	2	4	1	5	5	0
B20	3	3	8	3	2	9	7	1

Tab III-1 Nombre de plantes en pot obtenues par acclimatation ex vitro des lignées transgéniques.
Seuls les 3 derniers lots ont été utilisés pour le phénotypage présenté dans ce manuscrit

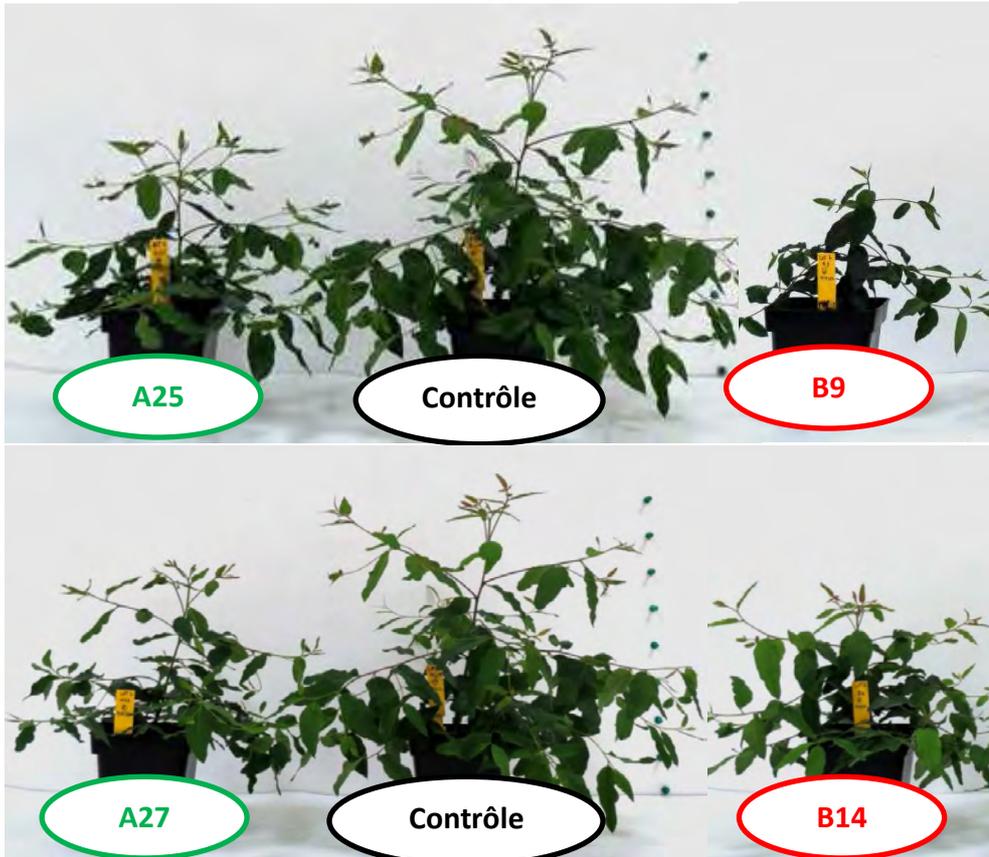


Fig III-2. Morphologie des lignées sur-exprimant *CBF1a* (A25, A27), sur-exprimant *CBF1b* (B9, B14) et de la lignée contrôle après 12 semaines de culture.

	Feuille	Mélange (Apex)	Tige secondaire (TS)
A19	8666 ^a ± 141	nd	nd
A25	18125 ^b ± 152	157644 ^h ± 28188	2447 ^j ± 23
A27	23805 ^c ± 69	nd	nd
B8	284007 ^d ± 8462	nd	nd
B9	297139 ^e ± 2131	92449 ⁱ ± 7876	11110 ^k ± 1922
B14	674126 ^f ± 1056	nd	nd
B20	171969 ^g ± 51	nd	nd

Tab III-2. Niveau relatif d'expression du transgène (*CBF1a* ou *CBF1b*) chez les lignées sur-exprimant le *CBF1a* (A19-25-27) ou *CBF1b* (8-9-14-20) par rapport au contrôle (Pk7). Les valeurs moyennes (±SD Standard Deviation) sont obtenues par rapport aux gènes de référence *18S* et *PP2A3* pour 3 répétitions techniques pour la feuille et pour 3 répétitions biologiques (3 plantes par lignée) pour le Mix et la tige. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD au niveau $p = 0,05$).

2. Phénotypage des lignées transformantes *CBF1a/CBF1b*

2.1. Caractéristiques générales des lignées étudiées

Les lignées transgéniques sont cultivées en conditions contrôlées (23°C) pendant 14 semaines et on observe déjà à ce stade des différences de croissance en particulier entre les lignées B9 et B14 par rapport au contrôle (figure III-2).

La première caractérisation a consisté à quantifier le niveau de transgène dans les lignées sur-exprimant le *CBF1a* ou *b*. L'expression des transgènes est mesurée par RT-qPCR sur plusieurs matrices extraites à partir de tissus différents, comme les feuilles matures, la tige secondaire (la base lignifiée) et le mélange (appelé Mix dans la suite du texte) correspondant à la partie apicale de la plante (5-6 cm) qui comprend la tige, le bourgeon apical et les feuilles jeunes et adultes. Le résultat dans le tableau III-2 montre le niveau d'expression relatif des transgènes dans différentes lignées transgéniques par comparaison à la lignée contrôle Pk7.

Dans tous les cas, les valeurs moyennes correspondent à la moyenne de trois répétitions techniques. Pour le Mix, la moyenne correspond à trois répétitions biologiques. Dans les feuilles matures, le niveau d'expression relatif de *CBF1a* varie selon les lignées, avec un niveau globalement plus faible pour les lignées sur-exprimant *CBF1a* (8666, 18125 et 23805) que pour les lignées sur-exprimant *CBF1b* (171969, 284007, 297139 et 674126). On peut observer que le niveau du transgène est assez similaire pour toutes les lignées A d'une part et pour toutes les lignées B d'autre part. Les lignées A25 et B9 sont sélectionnées pour les expériences sur les autres tissus. Sur la matrice extraite à partir du Mix, le niveau relatif d'expression du transgène atteint 157644 (A25) et 92449 (B9) alors qu'il est beaucoup plus faible dans la tige secondaire (2447 et 111110 pour A25 et B9 respectivement).

L'expression semble beaucoup plus faible dans les tiges ou dans le Mix que dans les feuilles ; de plus le transgène est beaucoup plus exprimé dans la lignée B9 que dans le A25 pour les feuilles et pour les tiges, alors que c'est l'inverse pour le Mix. Bien que le *CBF* soit contrôlé dans tous les cas par le promoteur constitutif CaMV-35S, la quantification de l'expression semble être dépendante du tissu (feuille/tige) et du développement (tissus jeunes dans le Mix et adulte dans les autres cas). Ces différences peuvent être dues à la présence de composés phénoliques plus importante dans les tiges que dans les feuilles, dans les tissus jeunes que dans les tissus adultes. Ces composés phénoliques sont des inhibiteurs enzymatiques et perturbent aussi l'extraction d'ARN. De plus, il peut y avoir un effet indirect de la surexpression sur la quantification du transcrite, les lignées B sont plus modifiées que les lignées A dans leur développement.

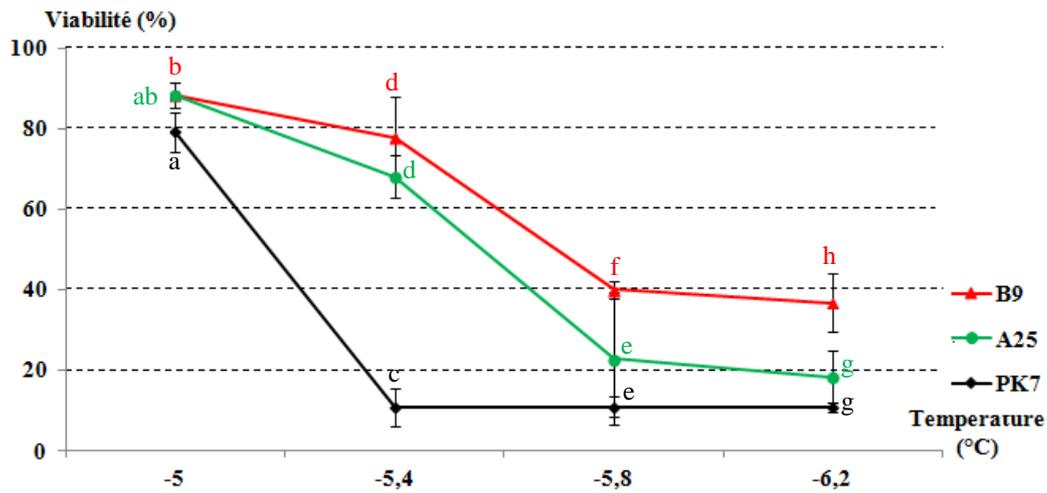


Fig III-3. Tolérance au gel des lignées B9, A25 et contrôle Pk7 (14 semaines) estimée par conductimétrie sur des disques foliaires exposés à un gel progressif (vitesse -2.5°C/h). Les valeurs d'intégrité membranaire sont les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 plantes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

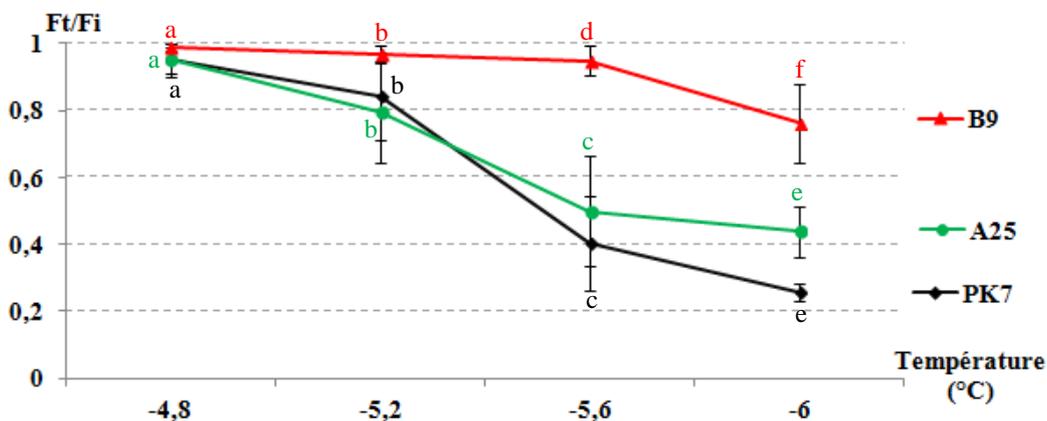


Fig III-4. Tolérance au gel des plantes (14 semaines) estimée par fluorimétrie sur les feuilles des lignées B9, A25 et contrôle Pk7 exposées à un gel progressif (vitesse -2.5°C/h). Les valeurs relatives de fluorescence de chlorophylle (F_v/F_m) des feuilles avant et après le traitement (F_t/F_i) sont les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 plantes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

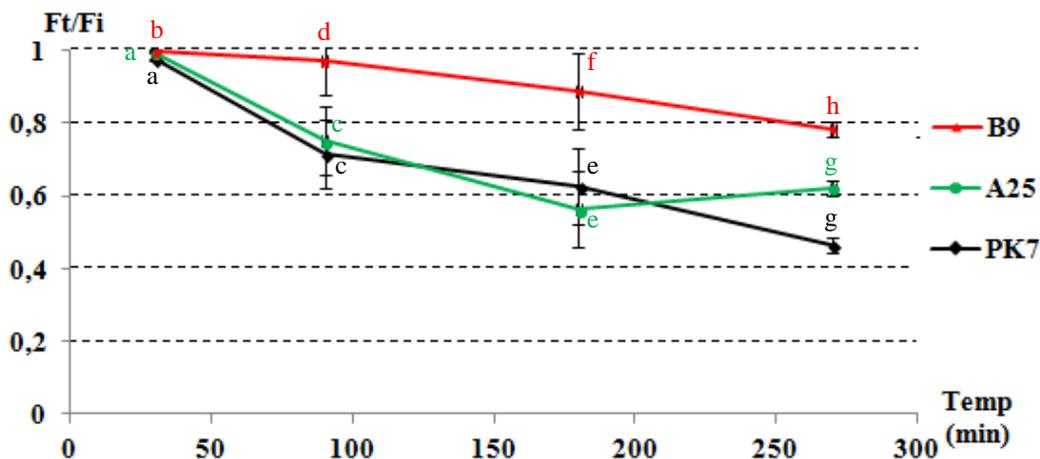


Fig III-5. Tolérance à la chaleur des plantes (14 semaines) estimée par fluorimétrie sur les feuilles des lignées B9, A25 et du contrôle Pk7 exposées à 45°C pendant un temps (0 à 300 min). Les valeurs relatives de fluorescence de chlorophylle (F_v/F_m) des feuilles avant et après le traitement (F_t/F_i) sont les valeurs moyennes des données à partir de 3 plantes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

2.2. Tolérance au froid et à la chaleur des lignées sur-exprimant *CBF1a* ou *CBF1b*

La tolérance au gel a été estimée chez les lignées sur-exprimant le *CBF* par rapport au contrôle. L'intégrité membranaire (IM) de disques foliaires soumis à un gel progressif (jusqu'à -6°C) est évaluée par conductimétrie (fuite d'ions). La valeur de LT_{50} correspond à la température à laquelle on observe 50% d'IM pour chaque échantillon. La LT_{50} qui est de -5,2°C pour le contrôle Pk7 passe à -5,6°C chez A25 et -5,7°C chez B9 (figure III-3), ce qui signifie que les lignées transgéniques sont plus tolérantes au gel. L'augmentation de tolérance des lignées transgéniques par rapport au contrôle (Pk7), paraît particulièrement évidente quand on compare la viabilité à -5,4°C : 78% et 68% chez B9 et A25 contre seulement 11% chez Pk7.

Pour confirmer le gain de tolérance chez les lignées sur-exprimant le *CBF*, une estimation par fluorimétrie a été réalisée (figure III-4). La fluorimétrie permet d'évaluer l'efficacité de l'appareil photosynthétique, qui diminue en condition de stress de façon variable selon la sensibilité/tolérance de la cellule. On observe que la lignée B9 est toujours moins affectée que celle de Pk7, ce qui permet de conclure que B9 est plus tolérante que le contrôle Pk7. Par contre, il n'y a pas de différence entre A25 et Pk7 jusqu'à -5,6°C, et c'est seulement à partir de -6°C que la lignée A25 apparaît plus tolérante que Pk7. Les résultats de tolérance obtenus par les deux méthodes (conductimétrie et fluorimétrie) sont donc cohérents.

En parallèle, la méthode de fluorimétrie a été utilisée pour mesurer la tolérance à la chaleur sur les mêmes lignées. Le résultat (figure III-5) montre que B9 est plus tolérante à la chaleur que Pk7, par contre il n'y a pas de différence significative entre A25 et Pk7 à part sur le dernier point (300 min).

En conclusion, la lignée B9 est toujours significativement plus tolérante au gel et à la chaleur que le contrôle alors que la lignée A25 présente une tolérance souvent proche du contrôle Pk7. Ce résultat est cohérent avec le niveau relatif du transgène, plus élevé dans les feuilles chez B9 que chez A25.

2.3. Morphologie des lignées sur-exprimant *CBF1a*/*CBF1b*

On observe une modification de la morphologie (en particulier la hauteur) des lignées sur-exprimant le *CBF* (A25, A27, B9 et B14) par rapport au contrôle (Pk7) (figure III-2).

La hauteur des six lignées sur-exprimant le *CBF* et le contrôle Pk7 a été mesurée sur au moins six individus par lignée toutes les deux semaines jusqu'à 14 semaines. Le graphe donne l'évolution de la hauteur relative des plantes au cours du temps, ce qui permet d'évaluer la croissance en tenant compte de la taille au départ. La croissance en hauteur (figure III-6) est assez similaire pour Pk7 et les autres lignées jusqu'à six semaines dans la salle de culture, sauf pour la lignée B20 dont la croissance est toujours plus faible. À partir de huit semaines, on peut classer les lignées en trois groupes sur la base de leur croissance,

Fig III-6. Croissance de la tige principale des lignées sur-exprimant le *CBF1a* (A19-25-27) ou *CBF1b* (8-9-14-20) et du contrôle (Pk7) en salle de culture (25/22°C pour la période 16/8h jour/nuit). La hauteur relative est calculée en faisant le rapport entre l'augmentation de hauteur à point donné et la hauteur à la fin du programme d'acclimatation. Les valeurs sont les valeurs moyennes de trois plantes différentes au moins pour chaque lignée. A partir de 8 semaines, la différence entre les B et le contrôle est significative (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

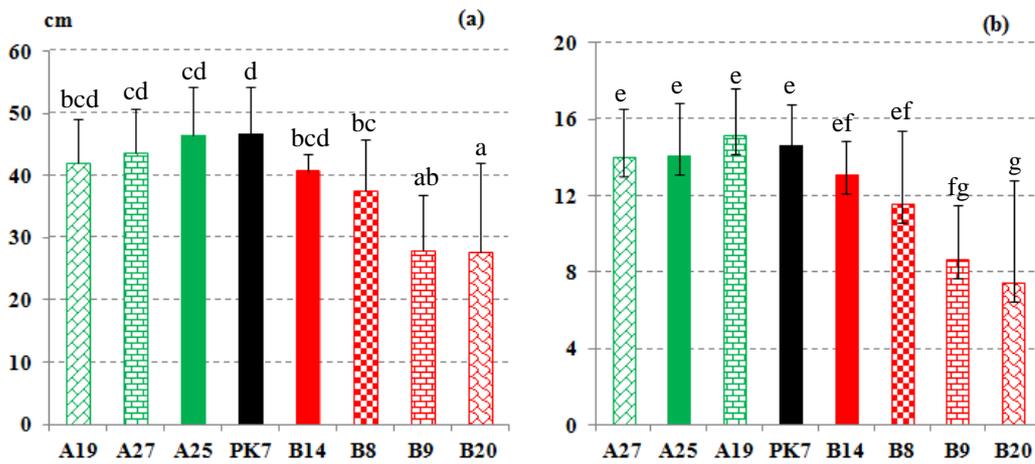
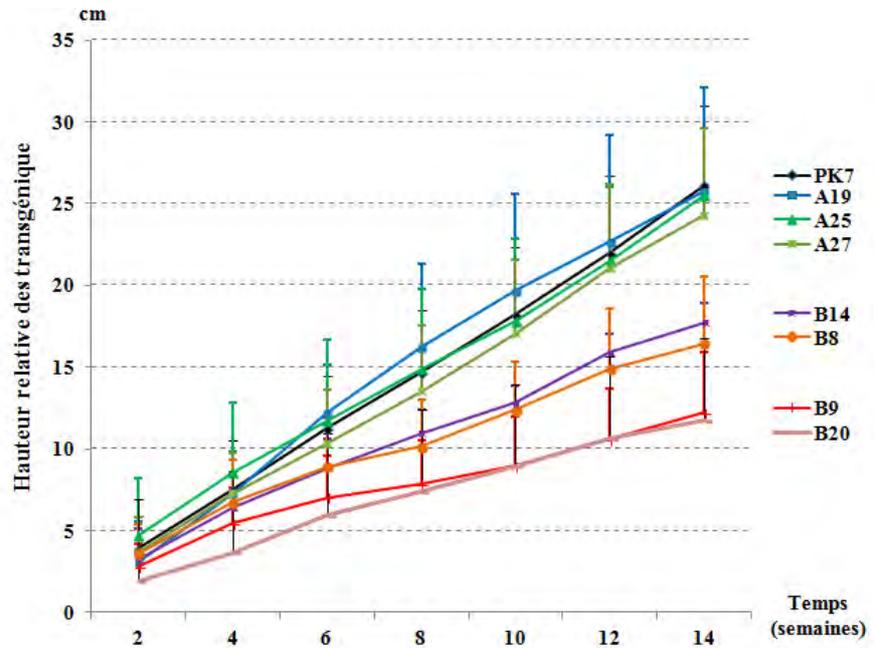


Fig III-7. Taille des lignées sur-exprimant le *CBF1a* (A19-25-27) ou *CBF1b* (8-9-14-20) et contrôle (Pk7) après 14 semaines en salle de culture. (a) Amplitude relative en cm, (b) nombre de branches (tiges secondaires). Les valeurs moyennes sont obtenues à partir des données d'au moins 3 plantes différentes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

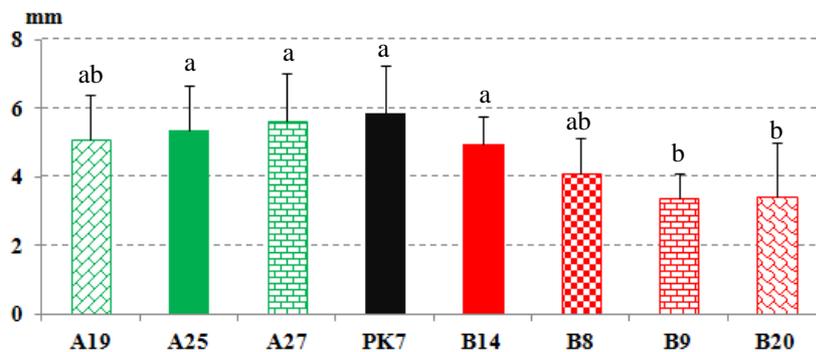


Fig III-8. Diamètre de la tige des lignées sur-exprimant le *CBF1a* (A19-25-27) ou *CBF1b* (8-9-14-20) et du contrôle (Pk7) après 14 semaines en salle de culture. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir des données d'au moins 3 plantes différentes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).



Fig III-9. Evolution de la morphologie des lignées B9, A25 et du contrôle Pk7 en fonction de l'âge. A : 6 mois en salle de culture; B : plantes âgées de 12 mois et cultivées en serre.

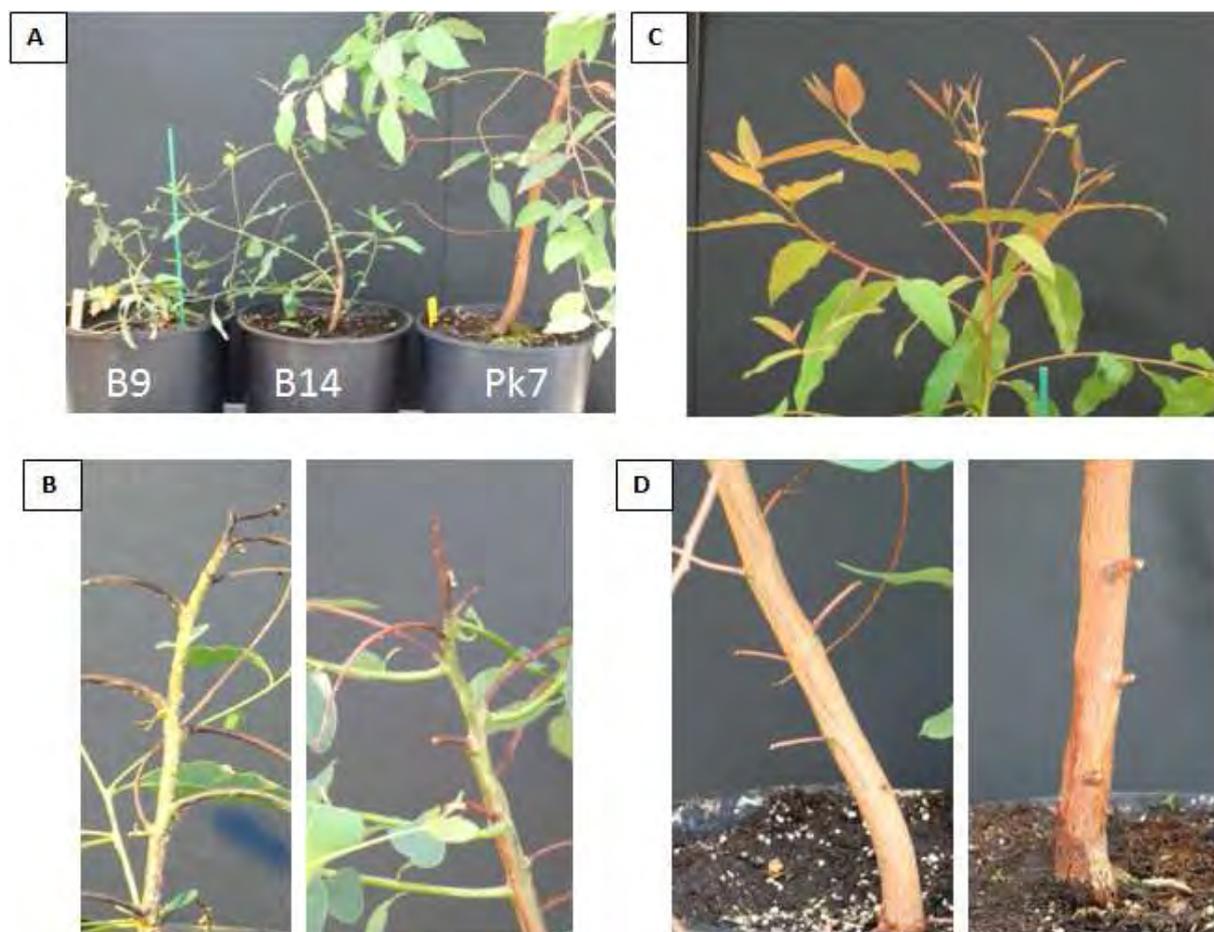


Fig III-10. Morphologie des lignées B9, B14, A25 et du contrôle Pk7 à 18 mois. A- Comparaison de la taille des lignées B9, B14 et Pk7; B- Tiges des lignées B9 (gauche) et B14 (droite) montrant l'assèchement de l'apex et le développement de tiges secondaires; C-D : Parties apicales et basales des lignées A25 (gauche) et Pk7 (droite).

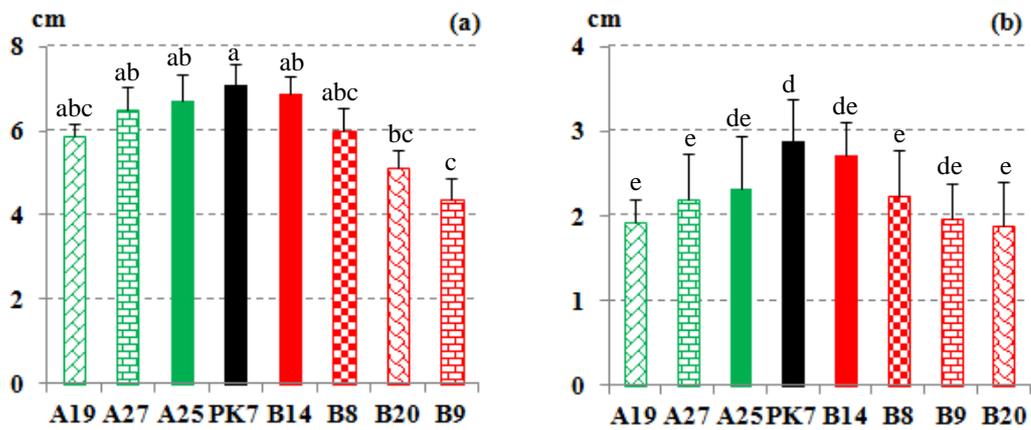


Fig III-11. Dimensions des feuilles des lignées sur-exprimant le *CBF1a* (A19-25-27) ou *CBF1b* (8-9-14-20) et du contrôle (Pk7) après 14 semaines de culture. (a) longueur en cm ; (b) largeur en cm. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir des données d'au moins 3 plantes différentes pour chaque lignée. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD, niveau $p = 0,05$).

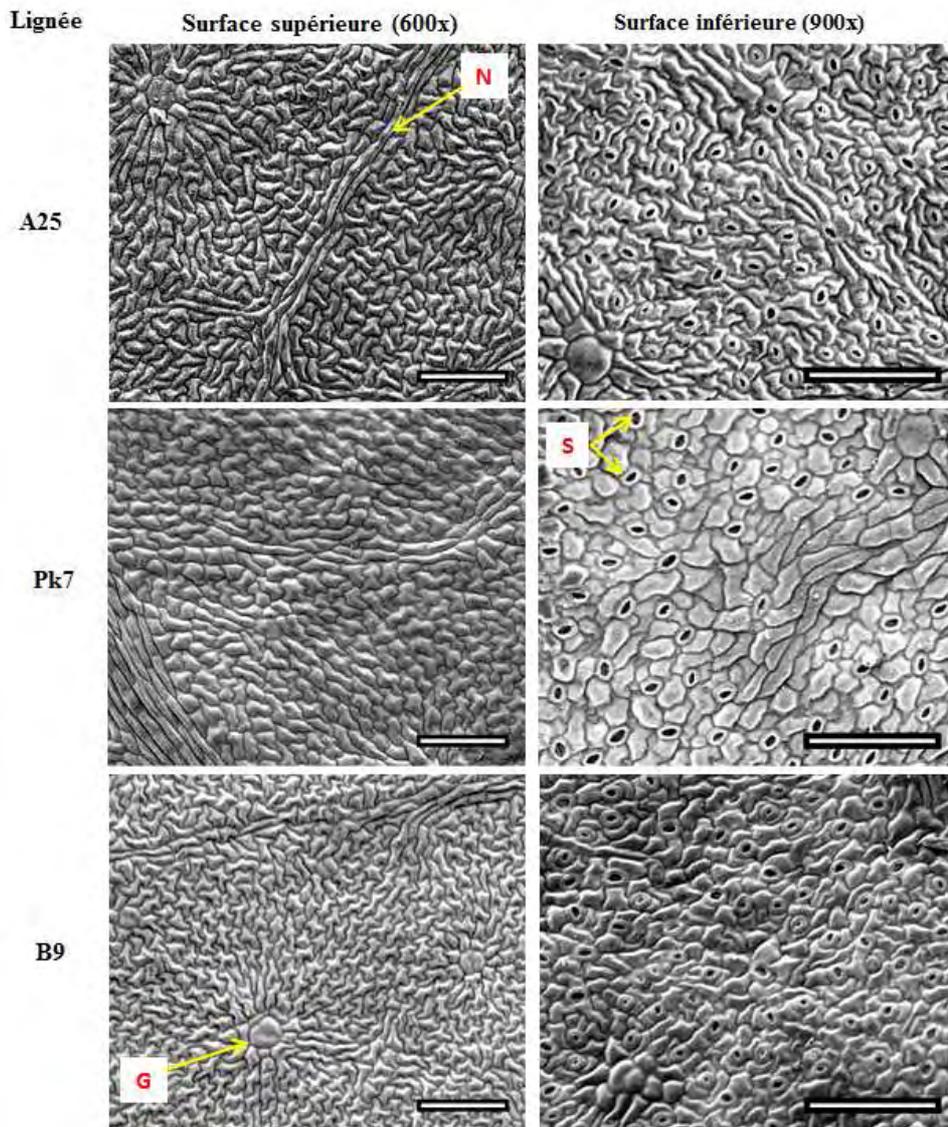


Fig III-12. Observation au microscope électronique à balayage de la surface foliaire des lignées A25, B9 et du contrôle; Face supérieure (grossissement 600X); face inférieure (grossissement 900X) des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7 S = stomate, G = glande à huile, N = nervure, Echelle 100 μ m

Pk7+A19+A25+A27, B8+B14 et enfin B9+B20 ayant les valeurs les plus faibles. L'analyse statistique montre que ces différences sont significatives au seuil de 5%.

Après 14 semaines de culture, la valeur de la hauteur relative atteint 26,12; 25,78; 25,47 et 24,29 cm chez Pk7, A19, A25, A27 respectivement, alors que les valeurs pour les lignées B sont beaucoup plus faibles 17,74, 16,45 12,21 et 11,76 cm pour respectivement B14, B8, B9 et B20.

Concernant le nombre de branches et l'amplitude des plantes, il n'y a pas de différence significative entre le contrôle et les cinq lignées A19, A25, A27, B8 et B14. Par contre, les lignées B9 et B20 sont significativement différentes (à 5%) du contrôle (figure III-7): elles ont moins de branches (8,7 et 7,5 contre 15,2) et leur amplitude est réduite (28 contre 46,8 cm).

Le diamètre de la base de la tige est aussi un critère de développement qui a été mesuré après 14 semaines de culture. On observe (figure III-8) peu de différence entre le contrôle (5.8 mm) et les lignées A25 et A27 (5 mm), alors que les lignées B9 et B20 ont un diamètre plus réduit (3,4 mm).

Au cours du temps, les plantes développent des modifications morphologiques plus nettes entre les lignées. Les deux Figures III-9 et III-10 présentent des plantes à six mois dans la salle de culture et à douze mois dans la serre. On observe peu ou pas de différence entre le contrôle Pk7 et la lignée A25, alors que les lignées sur-exprimant B14 et B9 se différencient nettement du contrôle, avec un développement très réduit : tige, amplitude, nombre de branches et de feuilles. De plus, on observe un assèchement de l'apex et de certaines tiges secondaires de toutes les plantes des lignées B9, B8 et B14 à partir de six mois en salle de culture. Cette caractéristique n'est jamais observée chez les lignées A dont le développement est similaire au contrôle. La disparition de l'apex a comme conséquence la forme caractéristique due à la perte de dominance apicale chez les lignées B avec d'une part la taille réduite et d'autre part le développement de nouvelles tiges secondaires très vigoureuses.

Comme pour la tolérance au gel, la lignée B9 est toujours significativement plus modifiée que la lignée A25 qui est morphologiquement très proche du contrôle Pk7.

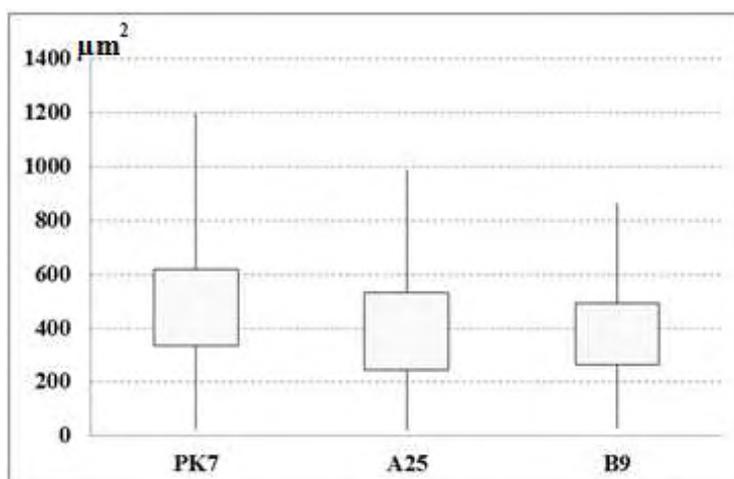
2.4. Anatomie foliaire

Au niveau de la morphologie foliaire, on observe des différences marquées entre le contrôle et les lignées sur-exprimant le *CBF* qui présentent une dimension moyenne des feuilles toujours plus petite que le contrôle (longueur/largeur 7,08/2,88 cm). Selon les lignées sur-exprimant *CBF*, la longueur de la feuille varie de 4,36 à 6.88 cm et la largeur varie de 1,89 à 2.71 cm (figure III-11). Cependant, cette différence n'est significative à 5% que pour les valeurs de Pk7 et des lignées A19 et B9.

La surface foliaire est observée en microscopie électronique à balayage à des résolutions différentes car il s'est avéré difficile d'augmenter le grossissement en raison de la présence des cires. La surface des feuilles (cellules épidermiques) a été photographiée (figure III-12). On observe des

Fig III-13. Surface des cellules (μm^2) de l'épiderme de la face supérieure des feuilles (analyse d'images de microscopie) des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7.

Représentation « boîte à moustaches » : 80% des cellules ont une surface comprise entre les valeurs inférieures et supérieures de la zone carrée. Les valeurs sont obtenues pour au moins 1700 cellules se trouvant dans trois parties différentes de la feuille.



	Surface moyenne des cellules (μm^2)	Densité cellulaire (cellules/1000 μm^2)
Pk7	480,05 ^a ± 175	2,08 ^c ± 0,11
A25	389,54 ^b ± 132,93	2,62 ^d ± 0,17
B9	374,31 ^b ± 91,79	2,70 ^d ± 0,12

Tab III-3. Surface moyenne des cellules et densité cellulaire de l'épiderme des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7, mesurée par analyse d'image de microscopie (face supérieure). Les valeurs moyennes (\pm SD Standard Deviation) sont calculées pour au moins 1700 cellules localisées sur 3 parties différentes de feuille. Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD au niveau $p = 0,05$).

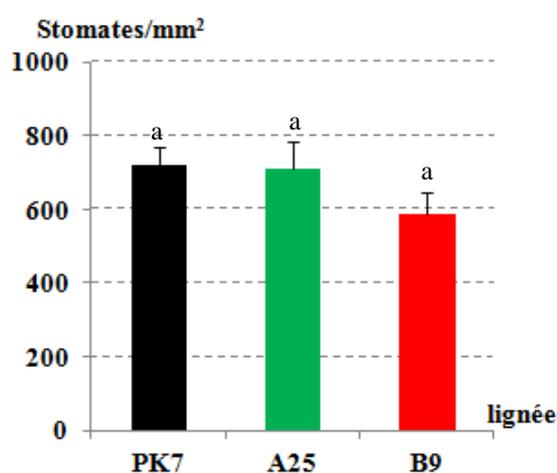


Fig III-14. Densité de stomates sur la face inférieure des feuilles, obtenue par analyse d'images de microscopie pour les lignées A25 et B9 et le contrôle Pk7. Les stomates ont été dénombrés sur trois images placées aléatoirement sur la surface inférieure de la feuille. Basé sur un test statistique Turkey SD, les moyennes significativement différentes (au niveau $p = 0,05$) portent des lettres différentes.

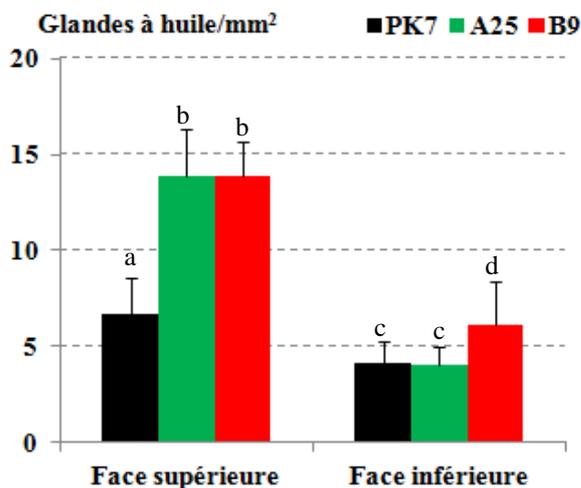


Fig III-15. Densité de glandes à huile sur la surface supérieure des feuilles, obtenue par analyse d'images de microscopie pour les lignées A25 et B9 et le contrôle Pk7. Les glandes à huile ont été dénombrées sur trois images placées aléatoirement sur les deux surfaces supérieures et inférieures de la feuille. Basé sur un test statistique Turkey SD, les moyennes significativement différentes (au niveau $p = 0,05$) portent des lettres différentes.

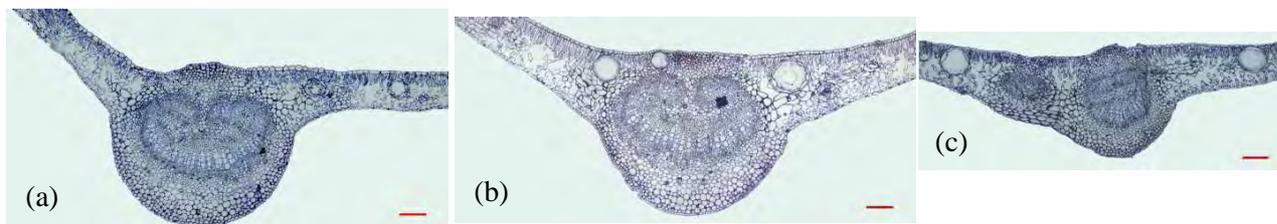


Fig III-16. Coupes transversales des feuilles des plantes (14 semaines) colorées par le bleu de toluidine 0,1%. (a)- A25, (b)- Pk7, (c)- B9. Echelle 100 μm .

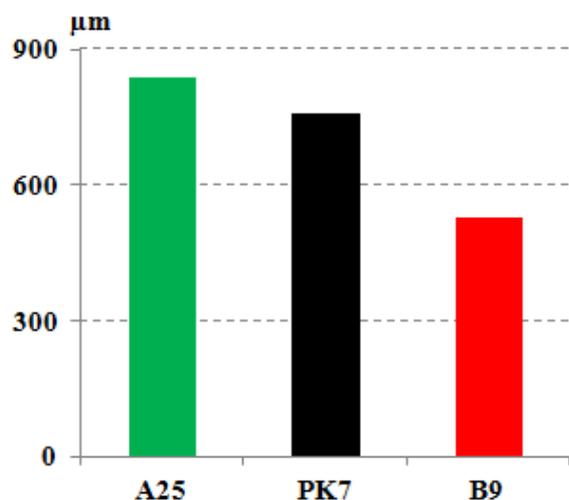


Fig III-17. Diamètre de la nervure centrale de feuilles des lignées A25 et B9 et du contrôle Pk7. La valeur correspond à une seule feuille pour chaque lignée.

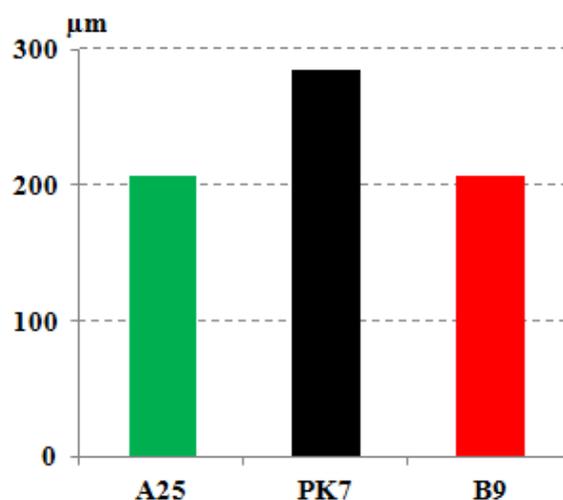


Fig III-18. Épaisseur du limbe des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7. Chaque valeur correspond à une seule feuille pour chaque lignée.

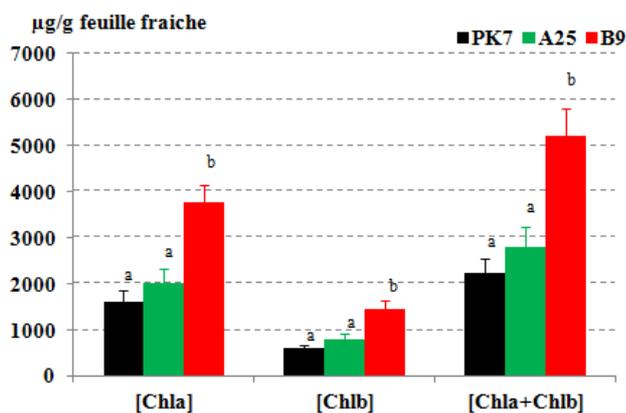


Fig III-19. Teneur en chlorophylles (chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophylle a+b) des feuilles des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 feuilles pour chaque lignée (une feuille/plante). Les données significativement différentes portent des lettres différentes (test statistique Turkey SD au niveau $p = 0,05$).

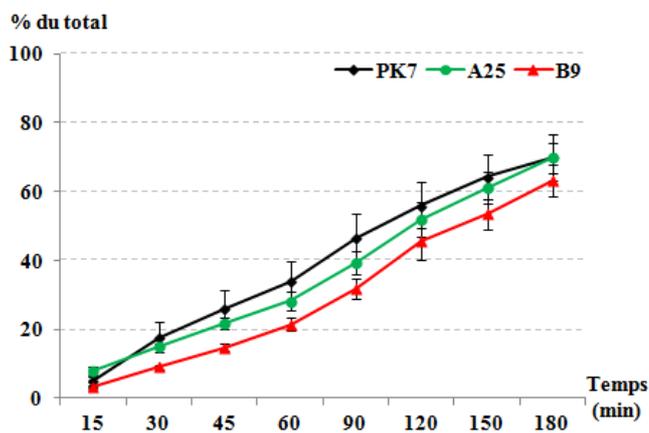


Fig III-20. Vitesse relative d'extraction des chlorophylles à partir des feuilles des lignées A25 et B9 et contrôle Pk7. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir de trois feuilles chaque lignée (une feuille/plante). Un test statistique Turkey SD est appliqué pour comparer les moyennes au niveau $p = 0,05$. La différence de la vitesse d'extraction des chlorophylles de la lignée B9 et du contrôle est significative.

différences très nettes de densité et de taille des stomates et des glandes à huile entre le contrôle et la lignée B9. Plus précisément, la taille moyenne des cellules (la moyenne de 200 cellules au moins par lignée) est déterminé grâce à l'analyse d'image (figure III-13), représentée par la proportion (centile) de cellules dans le carré. Le résultat montre que la taille des cellules est significativement plus grande chez le contrôle que chez les lignées sur-exprimant le *CBF* : la surface moyenne d'une cellule d'épiderme est de $480 \mu\text{m}^2$ chez Pk7 pour seulement 390 et $374 \mu\text{m}^2$ chez A25 et B9 (tableau III-3). En conséquence, la densité des cellules est aussi significativement différente entre le contrôle et les autres lignées. Sur une surface de $1000 \mu\text{m}^2$ on dénombre en moyenne 2,08 cellules chez Pk7, contre 2,62 et 2,70 chez A25 et B9 respectivement. La densité en cellules est plus forte chez les lignées sur-exprimant le *CBF* que chez le contrôle (tableau III-3).

Sur la surface inférieure de la feuille, on dénombre 720, 707 et 589 stomates par mm^2 respectivement chez Pk7, A25 et B9 (figure III-14). La diminution de la densité de stomates chez B9 en comparaison avec Pk7 et A25 est bien significative à 5%.

Un grand nombre de glandes à huile est observé nettement sur la face supérieure des feuilles. Par rapport au contrôle qui présente 6,6 glandes à huile par mm^2 , on en dénombre 13,8 chez les lignées A25 et B9 (figure III-15). Sur la surface inférieure, seule la lignée B9 a plus de glandes à huile (6,15 par mm^2) que le Pk7 ou la lignée A25 (respectivement 4,14 et 4,04).

En général, on observe une modification de structure anatomique de la feuille entre le contrôle et les lignées sur-exprimant le *CBF* (figure III-16) concernant le nombre de couches de cellules, la taille de la nervure principale et l'épaisseur du limbe foliaire (figure III-17 et figure III-18). Le diamètre de la nervure est très réduit ($529 \mu\text{m}$) chez B9 par rapport à A25 (839) et Pk7 (760). Par contre l'épaisseur du limbe foliaire est réduite chez les deux lignées B9 et B14 par rapport au contrôle. Mais dans tous les cas, cette différence n'est pas vérifiée par un test statistique à cause du nombre limité d'échantillons.

Comme observé pour la tolérance au gel et la morphologie des lignées, les différents paramètres permettant de décrire l'anatomie des feuilles mettent en évidence que la lignée B9 est significativement modifiée par rapport au contrôle, alors que la lignée A25 est proche de Pk7.

2.5. Composition des feuilles des lignées sur-exprimant *CBF1a/CBF1b*

Ayant observé que les plantes sur-exprimant le *CBF* ont une couleur verte plus ou moins soutenue mais différente du contrôle, la teneur en chlorophylle des feuilles a été mesurée. Pour les trois lignées étudiées; l'analyse a porté sur une feuille/plante et trois plantes/lignée. Sur ce même échantillon, la vitesse d'extraction de ce pigment a été également mesurée car la présence de cire sur les feuilles pourrait ralentir l'extraction de la chlorophylle.

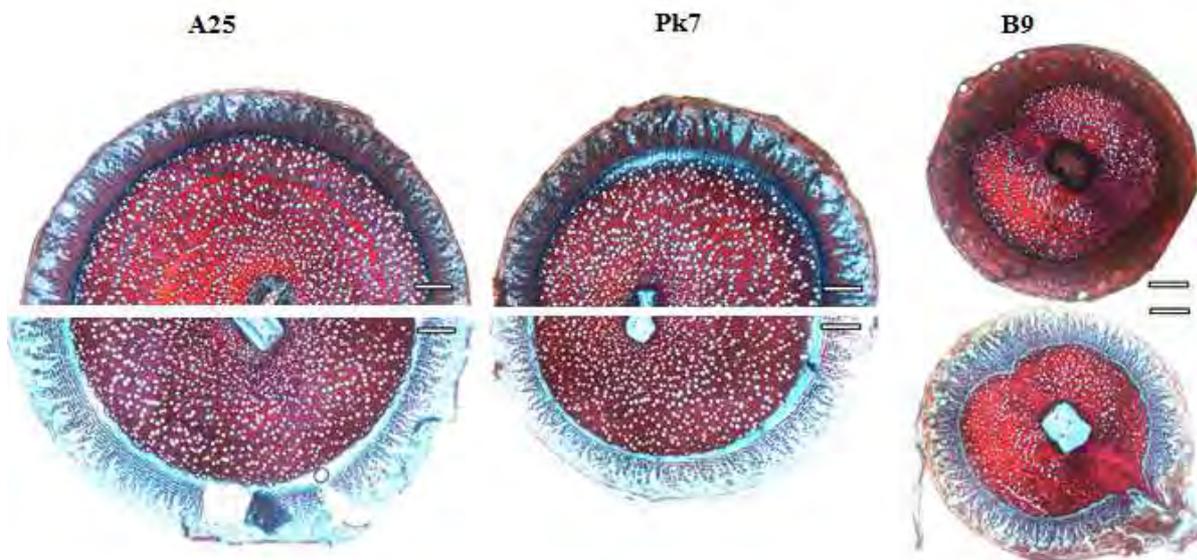


Fig III-21. Anatomie de la tige (1cm de la base) des lignées A25, B9 et du contrôle (Pk7). Coupes transversales (60 μ m) (grossissement 5X) de tiges colorées par le mélange Safranine – Bleu alcian, avant (haut) ou après (bas) un traitement à l' hypochlorite de sodium. Phénols colorés en rouge et polysaccharides en bleu.

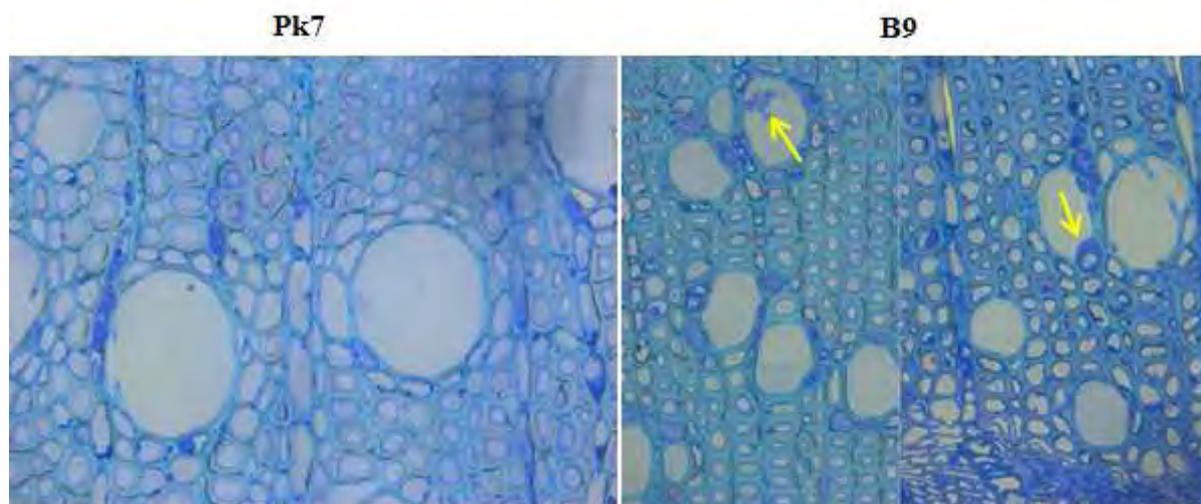


Fig III-22. Anatomie précise des tiges (1cm de la base) des lignées B9 et du contrôle (Pk7). Coupes ultrafines (1 μ m) (grossissement 63x) colorées par le bleu de toluidine. Polysaccharides colorés en bleu. La flèche indique le composé existant dans le vaisseau.

	Densité des vaisseaux	Proportion des vaisseaux obstrués	Taille moyenne des vaisseaux
PK7	102,62 ^{ab} \pm 7,02	6,27 ^c \pm 0,95	1193,44 ^e \pm 757,32
A25	89,98 ^a \pm 4,6	24,21 ^d \pm 15,71	1367,87 ^e \pm 759,87
B9	158,72 ^b \pm 30,49	52,43 ^d \pm 33,90	437,11 ^f \pm 202,96

Tab III-4. Comparaison de la densité, de la proportion de vaisseaux obstrués et de la taille des vaisseaux du xylème des lignées A25, B9 et du contrôle (Pk7) à 14 semaines de culture. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 plantes indépendantes pour chaque lignée. Un test statistique Turkey SD est appliqué pour comparer les moyennes au niveau $p = 0,05$.

Comme le montre la figure III-19, la lignée B9 contient plus de chlorophylle a ($3761 \mu\text{g.g}^{-1}$ PMF) que la lignée A25 ($2013 \mu\text{g.g}^{-1}$ PMF) et Pk7 ($1614 \mu\text{g.g}^{-1}$ PMF). Parallèlement, il y a $1436 \mu\text{g.g}^{-1}$ PMF de chlorophylle b chez B9 contre 793 et $612 \mu\text{g.g}^{-1}$ PMF chez A25 et Pk7 respectivement. La différence entre Pk7 et A25 n'est pas significative à 5%.

L'hypothèse du dépôt plus important de cire sur la surface foliaire des lignées sur-exprimant le *CBF*, proposée sur la base des observations en microscopie électronique à balayage est vérifiée par la vitesse d'extraction de la chlorophylle. Le résultat (figure III-20) montre que la chlorophylle est extraite moins rapidement chez B9 par rapport Pk7 et A25 (pas de différence entre ces deux lignées). Ce résultat suggère un dépôt de cire plus important sur la surface des feuilles de la lignée B9 par rapport à la lignée A25 et au contrôle.

2.6. Anatomie des tiges

La figure III-21 montre les coupes transversales des lignées transgéniques traitées simultanément à la safranine (qui colore en rouge les composés phénoliques) et au bleu d'Alcian (qui colore en bleu les polysaccharides). Préalablement à cette double coloration, les coupes subissent ou pas un traitement hypochlorite de sodium qui a pour but d'éliminer les composés solubles permettant d'observer plus facilement les structures pariétales.

Sur coupes sans traitement hypochlorite de sodium (partie supérieure de la Figure), on observe une augmentation assez similaire de l'intensité de coloration rouge chez le B9 dans les zones du xylème, du phloème et du cortex et de la moelle par rapport à la lignée A25 et Pk7. Après traitement hypochlorite de sodium (partie inférieure de la Figure), la couleur rouge reste toujours plus marquée dans le xylème et le périderme de la lignée B9. Pour toutes les lignées une atténuation générale de la coloration est observée en périphérie et au centre. Cela suggère que le traitement a éliminé la fraction soluble des composés phénoliques des cellules du phloème, du cortex et de la moelle.

Au niveau général, il apparaît que la proportion du xylème dans la tige semble légèrement plus faible chez B9 (68%) par rapport au contrôle Pk7 ou au A25 (respectivement 77 et 76%). Une autre différence de structure de la tige (tableau III-4) concerne la densité des vaisseaux plus forte chez le B9 ($159/\text{mm}^2$) que chez les autres lignées ($90/\text{mm}^2$ pour A25 et $103/\text{mm}^2$ pour Pk7). La taille des vaisseaux est par contre beaucoup plus petite pour la lignée B9 comme le montre le tableau III-4.

Les coupes transversales ultrafines ($1\mu\text{m}$) de tiges permettent d'observer plus précisément les structures, ce qui illustre la réduction de la taille des cellules du xylème ainsi que des vaisseaux et l'augmentation de leur densité (figure III-22). L'épaisseur des parois des fibres du xylème, mesurée sur ces images, n'est pas significativement différente entre la lignée B9 et la lignée contrôle Pk7. Cependant, l'épaisseur relative des parois par rapport à la taille moyenne des cellules est visiblement plus forte pour la lignée B9 par rapport au contrôle, car la surface de lumen des cellules est plus petite chez B9.

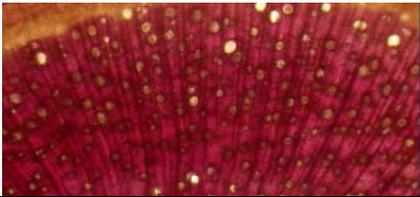
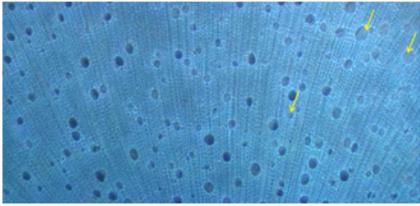
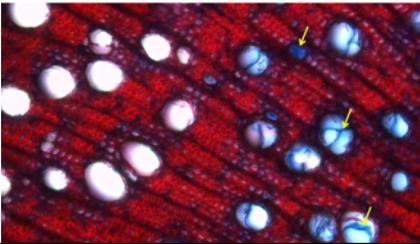
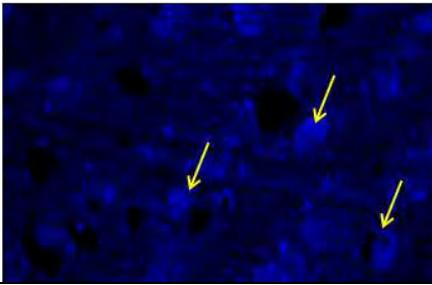
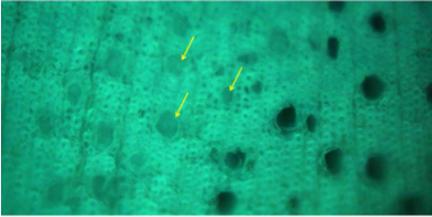
	<p>Technique mise en œuvre :</p> <p>Phloroglucinol : Coloration en rouge des lignines</p>	<p>Observations :</p> <p>Les vaisseaux bouchés apparaissent colorés en brun.</p>
	<p>Epifluorescence : Mise en évidence des composés phénoliques par autofluorescence</p>	<p>La fluorescence est visible sur la paroi des vaisseaux et aussi à l'intérieur des vaisseaux bouchés.</p>
	<p>Safranine- Bleu d'Alcian : Coloration des composés phénoliques en rouge et des polysaccharides acides en bleu</p>	<p>Les composés présents à l'intérieur des vaisseaux bouchés sont colorés en bleu.</p>
	<p>Calcofluor : Mise en évidence au confocal des β-1-4 glucanes comme la cellulose</p>	<p>Les vaisseaux non bouchés apparaissent en noir, les vaisseaux bouchés fluorescent.</p>
	<p>Bleu d'aniline : Coloration des β1-3 glucanes comme la callose</p>	<p>Les vaisseaux vides sont en noir ; le bleu d'aniline colore les vaisseaux bouchés, comme les autres types cellulaires du xylème.</p>
	<p>Rouge de ruthénium : Coloration en rose de la pectine</p>	<p>Certains vaisseaux bouchés sont colorés en rose-orangé.</p>
	<p>Lugol : Coloration de l'amidon</p>	<p>Les vaisseaux bouchés sont gris foncé. Les grains d'amidon (points noirs) sont visibles dans les rayons et les cellules autour des vaisseaux.</p>

Fig III-23. Histochimie sur coupes de tiges en vue de l'identification de la nature des composés obstruant les vaisseaux du xylème. Les photos représentent une zone de xylème au grossissement 10x ou 20x après coloration des coupes avec les différents réactifs indiqués, les flèches indiquent les vaisseaux obstrués

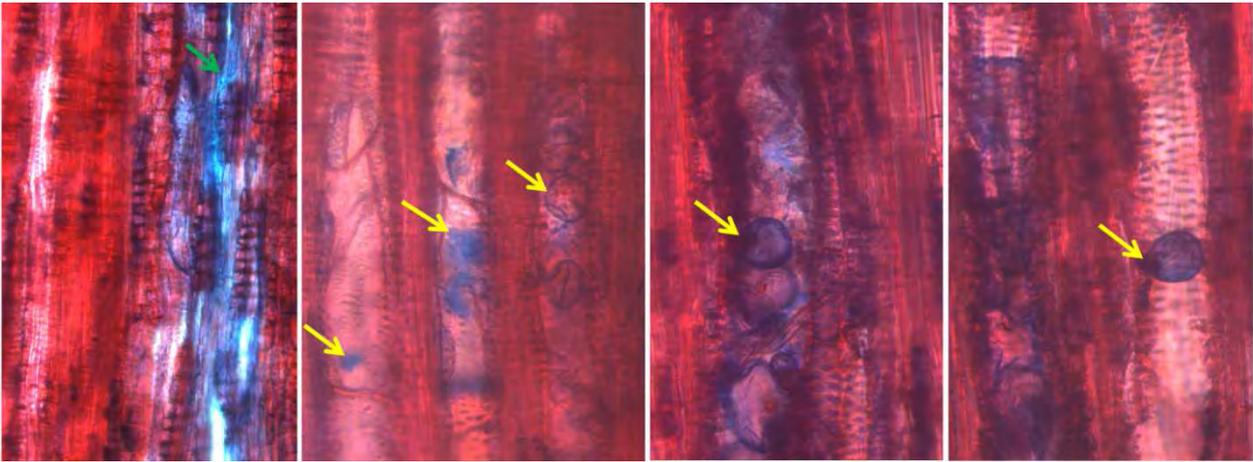


Fig III-24. Coupes longitudinales colorées à la Safranine –Bleu d'alcian de tige de la lignée B14. Les photos représentent une zone de xylème au grossissement 20x après coloration. La flèche verte indique la forme diffuse du gel et la flèche jaune indique les structures de type tylose

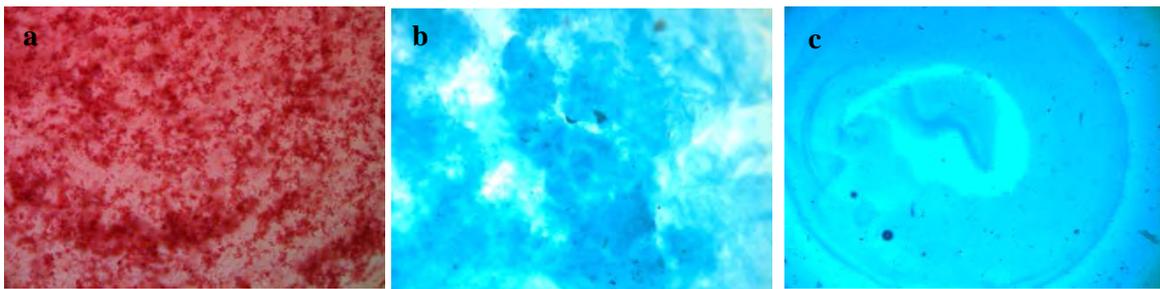


Fig III-25. Identification de la nature des composés obstruant les vaisseaux du xylème après centrifugation de la sève, coloration puis observation. Sève de B14 colorée par safranine (a), bleu alcian (b) et sève de Pk7 colorée par bleu alcian (c)

Une partie de ces vaisseaux est obstruée, avec une grande différence entre la lignée contrôle (6%) et les lignées sur-exprimant le *CBF* qui présentent 24 et 52% de vaisseaux obstrués pour A25 et B9 respectivement. Il semble que le traitement hypochlorite de sodium n'ait pas modifié ces proportions, suggérant que les composés obstruant les vaisseaux sont soit liés à la paroi, soit de nature complexe (polymères) pour ne pas être affectés par le traitement. Pour essayer d'identifier ces composés, nous avons réalisé différents tests histochimiques sur ces coupes transversales de tiges (Figures III-23). Les tests au phloroglucinol et en épifluorescence sont faiblement positifs, l'opacité d'un vaisseau bouché étant difficile à distinguer d'une coloration de composés spécifiques. On rencontre le même type de résultat ambigu pour la coloration au bleu d'aniline et au lugol. Les résultats plus nets sont apportés par la coloration en mélange de safranine – bleu d'alcian permettant d'observer nettement du bleu dans les vaisseaux, suggérant la présence de polysaccharides. Le résultat de ce test est confirmé par l'observation au confocal des coupes traitées avec le calcofluor pour lesquelles la fluorescence apparaît sans équivoque à l'intérieur des vaisseaux bouchés. L'ensemble de ces tests suggèrent que les vaisseaux bouchés contiennent au moins des composés polysaccharidiques et peut être des composés phénoliques.

En complément, des coupes longitudinales ont été réalisées et colorées à la Safranine–Bleu d'Alcian (figure III-24), ce qui permet d'observer comme dans les coupes transversales, des structures en forme de billes bleues dans les vaisseaux, en plus d'une coloration plus diffuse. Ces deux formes principales font penser à ce qui est décrit dans la littérature comme tylose et gomme. La gomme, constituée de polysaccharides et/ou de composés phénoliques est sécrétée dans le vaisseau au contraire des tyloses qui sont des protubérances cellulaires, provenant des cellules du parenchyme adjacentes au vaisseau, et qui restent liées à la paroi du vaisseau. Cette analyse est complétée par la coloration de la sève, extraite par centrifugation des branches de la lignée sur-exprimante B14 et de Pk7 (Figures III-25). La sève extraite est bien colorée indépendamment par le bleu d'aniline en bleu et en rouge par la safranine, mais utilisée indépendamment, ces colorants sont moins spécifiques. Alors que le bleu apparaît sous forme compacte, évoquant un gel dense de polysaccharides, les composés phénoliques mis en évidence en rouge sont plus diffus. A partir de ces observations, on peut proposer l'hypothèse que deux types de composés bouchent les vaisseaux, d'une part un mélange de composés phénoliques et de polysaccharides qui formeraient une sorte de gomme (et/ou mucilage) et d'autre part des structures de types tyloses, protubérances cellulaires adhérant à la paroi de vaisseau.

Dans tous les cas, l'anatomie de la tige est bien modifiée chez la lignée B9 par rapport au Pk7, alors que la lignée A25 se différencie peu du contrôle. Ce résultat est cohérent avec les modifications de morphologie et de croissance (partie 2.3) et est corrélé au niveau d'expression du transgène *CBF* dans ce tissu.

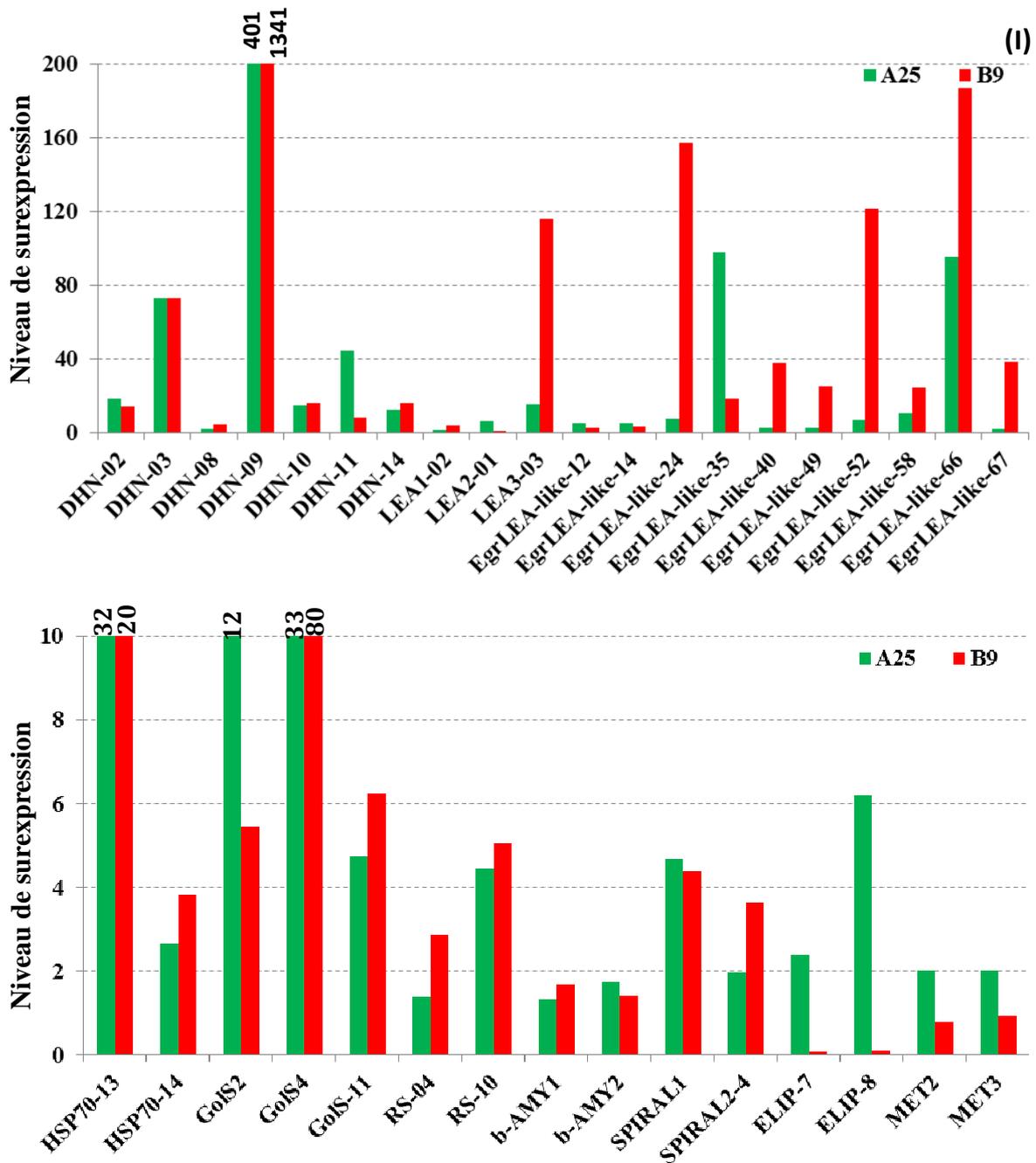


Fig. III-26. Niveau de surexpression (RT-qPCR) des gènes impliqués dans la réponse aux stress de température. (I) pour *LEA* (protection cellulaire), (II) pour *HSP70* (chaperonnes), *GolS*, *RS* et β -*AMY* (production de sucre), *SPIRAL*S (Stabilisation microtubules), *ELIP* (protection du système photosynthétique) et *MT* (détoxification). Comparaison des lignées A25 et B9 par rapport au contrôle (Pk7, 23°C). La surexpression est l'expression relative par rapport à la lignée contrôle (=1). Les gènes de référence utilisés: *18S* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions techniques. Un test statistique de Student est appliqué pour comparer des moyennes.

3. Analyse de l'expression des gènes cibles potentiels de DREB/CBF sur les lignées transgéniques

Les gènes ont été sélectionnés dans cette étude pour plusieurs raisons :

- Ils sont impliqués, selon la bibliographie, dans la réponse aux stress abiotiques tels que le froid, la chaleur et la déshydratation ou dans le développement en particulier la formation de la paroi.

- Ils s'expriment chez les lignées sur-exprimant le *CBF in vitro* (Navarro et al., 2012), ou font partie du transcriptome froid d'*E. gunnii* (Keller, Cao et al., 2013) et donc présents dans nos banques d'ADNc (ColdExpress).

- Ils appartiennent éventuellement au régulon *CBF* décrit chez d'autres espèces.

- Ils ont au moins un élément CRT/DRE ou LTRE dans leur promoteur d'après nos résultats d'analyse *in silico*. Pour chaque famille de gène annotée manuellement, au moins un membre a été testé. Le cas de la famille *LEA* est particulier car la taille de la famille étant très grande, nous avons choisi les membres qui ont un seul motif CRT/DRE dans leur promoteur.

Les analyses d'expression ont été réalisées sur des ADNc issus d'extrait d'ARN provenant d'un échantillon de la partie apicale des plantes (mix) pour les gènes impliqués dans la tolérance et le développement ; l'expression des gènes impliqués dans la formation de la paroi a été quantifiée (Fluidigm et RT-qPCR) sur des échantillons provenant de la partie basale des tiges plus riche en tissus lignifiés.

3.1. Gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques (froid et chaleur)

Parmi les gènes impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (froid et chaleur), 44 gènes sélectionnés et appartenant à une des huit familles multigéniques étudiées (chapitre 2) ont été testés sur la partie apicale (Mix) des deux lignées sur-exprimant le *CBF* (A25 et B9) et le contrôle. Les résultats d'expression relative présentés dans le figure III-26 et l'annexe III-20 correspondent au taux d'expression dans les lignées sur-exprimant *CBF* par rapport à la lignée contrôle (=1).

Pour au moins une lignée sur-exprimant le *CBF*, 34 gènes sont sur-exprimés avec un ratio supérieur à 2 par rapport à la lignée contrôle (tableau III-7). Le niveau de surexpression est globalement très fort, supérieur à 50 pour quatre gènes et compris entre 5 et 50 pour 14 autres gènes. Les gènes codant des *LEA* (en particulier *DHN*) sont les plus fortement exprimés. La plupart des gènes *Déhydrines* (*DHN*) sélectionnés (7/8) sont fortement surexprimés dans les deux lignées. En effet, les autres 12 gènes *LEA1*, *LEA2*, *LEA3* et *LEA-like* ayant un seul élément CRT/DRE dans leur promoteur sont surexprimés chez les deux lignées A25 et B9.

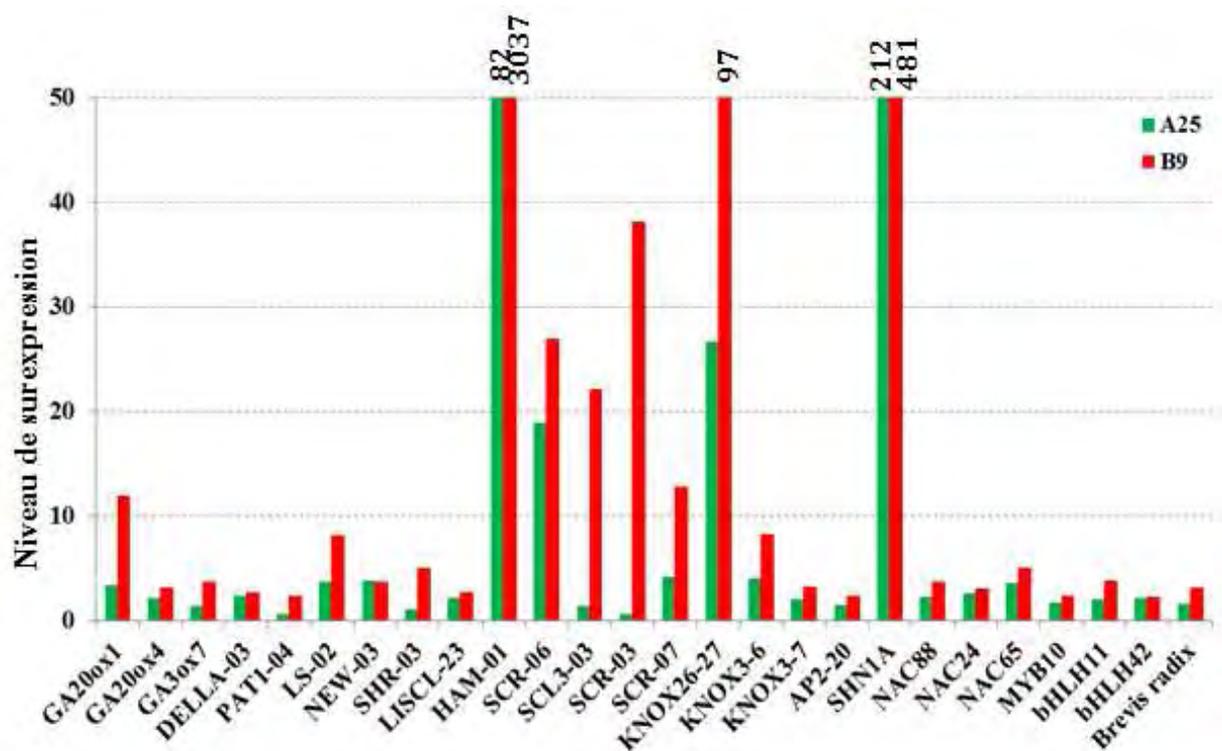


Fig. III-27. Niveau de surexpression (RT-qPCR) des gènes impliqués dans le développement. Comparaison des lignées A25 et B9 par rapport au contrôle (Pk7, 23°C). La surexpression est l'expression relative par rapport à la lignée contrôle (=1). Les gènes de référence utilisés: *18S* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions techniques. Un test statistique de Student est appliqué pour comparer des moyennes

La plupart des gènes montrent une induction pour les deux lignées A25 et B9, avec des ratios plus élevés pour la lignée B9 que pour A25. Pour 11 de ces gènes, le niveau de sur-expression est plus de deux fois supérieur pour B9 que pour A25, alors que la réciproque s'observe pour seulement quatre gènes (plus exprimés dans A25 que dans B9). Ces gènes pourraient appartenir à un régulon commun à *CBF1a* et *CBF1b*.

Cependant, certains gènes sont surexprimés dans une seule lignée, cinq dans A25 (*LEA2-01*, les deux *Elip* et les deux *MT*) et trois dans B9 (*LEA1-2*, *LEAlike-67* et *RS-4*). Ces résultats suggèrent une régulation spécifique à chaque *CBF* dans certains cas.

De façon générale, cette très forte expression des gènes cibles des *CBF* permet d'expliquer le gain de tolérance observé chez les lignées sur-exprimant le *CBF* chez *Eucalyptus*. La très forte expression des gènes *LEA* est cohérent avec la très forte représentation des ESTs correspondants dans le transcriptome de feuilles en cours d'acclimatation (Chapitre II).

3.2. Gènes impliqués dans le développement

Douze familles de gènes impliqués dans le développement ont été choisies pour l'étude de l'expression sur les mêmes échantillons Mix que pour les gènes de tolérance.

A part la famille GRAS, la plupart des gènes prédits comme potentiellement cibles des *CBF* (présence d'un cis-élément CRT/DRE) et impliqués dans le développement appartiennent à des familles qui n'ont pas été décrites dans le Chapitre 2. Les gènes ont été sélectionnés sur la base de la fonction décrite dans la littérature, mais nous n'avons pas réalisé l'annotation de la famille complète, car seulement quelques membres semblent être impliqués dans le développement via les *CBF*.

Les 46 gènes sélectionnés codent soit des protéines effectrices impliquées directement dans la voie de métabolisme des gibbérellines soit des facteurs de transcription appartenant à plusieurs grandes familles. Les GA20ox, GA3ox et GA2ox sont les trois enzymes clé de la synthèse de gibbérelline qui catalysent les réactions plus tardives dans cette voie; elles appartiennent à la superfamille 2OG-Fe (II) oxygenase (Hedden and Phillips, 2000). Les familles de facteurs de transcription sont celles déjà décrites comme les GRAS (*DELLA*, *HAM*, *LS*, *SCL3*, *PAT1*, *SCR*, *NEW*) et les AP2/ERF (*AP2*, *DREBA4*, *SHINE*, *ERFB6*). Les gènes *KNOX* codent pour des facteurs intervenant, via la voie des cytokinines, dans le développement du méristème et dans la formation de la paroi cellulaire (Hake *et al.*, 2004). Les MYB-R2R3 jouent des rôles dans différentes voies de régulation qui contrôlent le développement et la réponse au stress biotique et abiotique (Dubos *et al.*, 2010). Les NAC sont des facteurs de transcription spécifiques des plantes qui interviennent aussi dans le contrôle du développement et la réponse aux stress abiotiques (Nakashima *et al.*, 2012). Certains facteurs de transcription de type bHLH (basic helix-loop-helix), interviennent dans la signalisation du phytochrome en lien avec la réponse au stress (Jones, 2004). COBRA est une famille de gènes régulateurs dont certains ont été décrits dans le contrôle de l'orientation

Famille	Gène	A25	B14
PAL	PAL1	2,51	4,78
	PAL5	2,21	0,67
	PAL9	2,09	1,49
C4H	C4H1	0,94	2,79
	C4H2	0,6	3,4
HCT	HCT4	1,94	2,9
C3H	C3H2	5,53	12,04
	C3H3	0,8	3,2
	C3H4	0,78	2,99
CCoAOMT	CCoAOMT1	0,86	3,07
	CCoAOMT2	0,93	2,2
	CCoAOMT15	1,54	4,06
	CCoAOMT17	1,33	3,75
CCR	CCR2	0,79	5,1
COMT	COMT3	0,38	3,7
	COMT4	nd	2
	COMT12	0,42	2,36
	COMT57	2,25	3,82
	COMT64	3	1,31
F5H	F5H2	nd	2,77
CAD	CAD6	0,41	2,47
	CAD9	0,42	4,55
	CAD34	6,25	1,9
Galacturonosyltransferase	GAUT3	0,92	3,94
Glycosyltransferase	GT1	0,35	8,03
	GT2	1,36	3,26
	GT3	2,47	1,06
Galactosyltransferase	GalTase1	0,93	3,74
	GalTase2	0,42	0,65
XET	XET1	2,11	0,29
MYB R2R3	MYB19	2,79	1,4
	MYB41	0,63	4,96
	MYB47	0,84	3,89
	MYB59	0,8	4,65
	MYB62	0,65	3,21
	MYB73	1,21	3,3
	MYB130	0,72	2,65

Tab III-5. Niveau d'expression relative (puce Fluidigm) de gènes impliqués dans la formation de la paroi, comparaison des lignées A25 et B14 et contrôle (Pk7, 23°C). Les gènes de référence utilisés: *SAND*, *EF-1a*, *IDH* et *PP2A1* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions biologiques. Un test statistique de Student est appliqué pour comparer des moyennes.

des fibres de cellulose (Brady *et al.*, 2007) et les gènes de la famille *BREVIS RADIX*, spécifique des plantes (Li, Jing *et al.*, 2009), sont des modulateurs de croissance des racines via la voie des cytokinines, et sont décrits comme jouant un rôle dans la croissance des cellules de l'épiderme.

Les résultats montrent que 59% des gènes (27 parmi 46) présentent un niveau d'expression modifié chez les sur-exprimants par rapport au contrôle au moins dans une des lignées sur-exprimant le *CBF1* (figure III-27). La plupart (16 gènes) sont sur-exprimés dans B9 et A25 sauf *EgrLS-01* dont l'expression est plus faible chez les deux lignées sur-exprimant le *CBF* que dans le contrôle.

Aucun des gènes n'est plus fortement exprimé chez A25 que B9, alors qu'au contraire 11 gènes sont plus fortement exprimés chez B9 que chez A25. Le niveau de surexpression est très élevé (> 50 fois) pour trois gènes (*EgrHAM-01*, *KNOX26-27* et *SHINE*) dans les 2 lignées et pour 17 autres gènes ce niveau reste encore élevé (compris entre 5 et 50 fois) pour au moins une lignée par rapport au contrôle.

Les deux gènes effecteurs *GA20ox* sélectionnés sont sur-exprimés chez A25 et B9, par contre le gène *GA3ox* est plus exprimé seulement chez B9. Dans la superfamille *GRAS*, un seul *DELLA* (sur 3) est sur-exprimé chez les deux lignées sur-exprimantes. Pour le groupe *SCR*, *SCR-06* et *SCR-07* sont sur-exprimés chez A25 et B9 alors que *SCR-03* est sur-exprimé seulement pour la lignée B9. Sept autres *GRAS* sont sur-exprimés, quatre chez les deux A25 et B9 (*LISCL-23*, *NEW-03*, *HAM-01* et *LS-02*), trois autres seulement chez la lignée B9 (*PAT1-04*, *SHR-03* et *SCL3-03*). Parmi quatre gènes *KNOX* choisis, deux (26-27 et 3-6) sont sur-exprimés chez les deux sur-exprimants et un seul uniquement pour B9 (*KNOX3-7*). Enfin, une induction est observée aussi chez les deux sur-exprimants pour *SHNIA*, trois *NAC* (parmi 5) ainsi que les deux *bHLH* (11 et 42). Enfin, l'*AP2-20*, *MYB10* et *BREVIS RADIX* sont sur-exprimés uniquement chez la lignée B9.

Ces résultats suggèrent que les 16 gènes sur-exprimés chez les deux lignées appartiennent au régulon commun aux deux *CBF* (a et b), mais avec une activation par *CBF1b* qui semble plus forte que par *CBF1a* puisque les niveaux d'expression sont plus élevés chez B9 que chez A25, bien que le niveau de transgène inférieur. Par ailleurs, certains gènes ne sont sur-exprimés que dans la lignée B9, ce qui laisserait supposer que le régulon de *CBF1b* est plus large que celui de *CBF1a*.

3.3. Gènes impliqués dans la formation de la paroi

La puce fluidigm permet d'étudier le niveau d'expression d'un nombre important de gènes (86) sur un nombre important d'échantillons (96x96). Les matrices utilisées correspondent d'une part aux lignées transgéniques (A25 et B14) et au contrôle et d'autre part à différents échantillons de l'équipe, dont les résultats ne seront pas présentés ici. Concernant les lignées transgéniques dont les résultats sont présentés ci-dessous, cette étude d'expression a été réalisée en utilisant comme échantillon la partie lignifiée à la base de l'axe principal des plantes. Les 86 gènes sélectionnés pour cette étude appartiennent à 18 familles de gènes effecteurs et une famille de facteur de transcription (*MYB R2R3*). Ces gènes ont été choisis par

rapport à leur rôle dans la formation de la paroi (voies des phénylpropanoïdes et synthèse de cellulose), et sur la base des récents travaux de l'équipe sur leur régulation par le froid. Le critère de gène cible du *CBF* (présence de motif DRE dans leur promoteur) n'a pas été retenu pour la sélection des gènes, car ce n'était pas un critère commun avec les autres utilisateurs de la puce fluidigm.

Le résultat présenté dans le tableau III-5 montre que 32 gènes sur 86 (37%) sont surexprimés dans au moins une lignée. Parmi ces gènes, 2/3 présentent un motif CRT/DRE ou LTRE dans leur promoteur. Cinq de ces gènes sont sur-exprimés chez les deux lignées A25 et B14 (*PAL1*, *HCT4*, *C3H2*, *COMT57* et *CAD34*) suggérant qu'ils appartiennent au régulon commun à *CBF1a* et *CBF1b*.

Six gènes (soit 7%) sont sur-exprimés uniquement chez A25 (*PAL5*, *PAL9*, *COMT64*, *GT3*, *XET1*, et *MYB19*) et 21 gènes (soit 24%) sont sur-exprimés uniquement chez la lignée B14 (2 *C4H*, *C3H3* et *C3H4*, 4 *CCoAMT*, *CCR2*, *COMT12* et *COMT4*, *F5H2*, *CAD6* et *CAD9*, *GAUT3*, *GT1* et *GT2*, *GalTase1*, *MYB62*, 59, 47, 73, 41, 130). Ce résultat suggère que le régulon de *CBF1b* serait plus important que celui de *CBF1a*.

Basé sur ces résultats d'expression, en cohérence avec les modifications structurales de la tige, on peut penser que les CBF pourraient jouer un rôle dans le contrôle du métabolisme des phénylpropanoïdes et de la cellulose.

4. Conclusions et discussion

Mon travail a suivi celui réalisé dans l'équipe par Marie Navarro sur les explants *in vitro* qui sont cultivés dans un milieu peu naturel avec des phytohormones exogènes (Navarro et al., 2012). Le B9 a été décrit comme ayant un phénotype presque aussi marqué que la lignée A1 qui n'a pas pu être acclimaté à cause de sa petite taille, ses petites feuilles et surtout ses racines trop fines. Pour mon travail j'ai comparé les lignées B9-B14-B8 et A25-A27-A19 et en général, le phénotype des sur-exprimants *ex vitro* confirme ce qui a été observé sur les explants *in vitro*.

L'augmentation de la tolérance au froid chez *Eucalyptus* qui surexprime *CBF1a/CBF1b* est comparable au phénotype observé chez plusieurs espèces herbacées sur-exprimant le *CBF/DREB1* (*CBF* de l'espèce ou d'une autre espèce) tels qu'*Arabidopsis* (Tong et al 2009 ; Huang et al 2009 ; Kang 2011), le tabac (Shen et al., 2003; Kasuga et al., 2004; Agarwal et al., 2010; Yang et al., 2011), le riz (Figueiredo et al., 2012), la luzerne (Jin et al., 2010), le blé et le maïs (Xu et al., 2011; Soltész et al., 2013), *Medicago* (Chen, J-R et al., 2010). Récemment, des ligneux surexprimant le *CBF/DREB1* ont été décrits comme ayant une augmentation de la tolérance au froid comme le pommier (Wisniewski et al., 2011), le bambou (Zhang et al., 2012), la vigne (Tillett et al., 2012), la myrtille (Walworth et al., 2012). Ces augmentations de tolérance au froid chez *Eucalyptus* peuvent être expliquées en partie par la sur-expression de gènes effecteurs qui a été mise en évidence dans les lignées modifiées. La plupart des gènes

sont sur-exprimés de façon plus intense chez la lignée la plus tolérante B9 par rapport à A25. Ces gènes ont des rôles importants dans la réponse au stress tels que les *LEA*, *Elip*, *HSP*, *Spiral* (protection), *GolS* et *RS* (synthèse d'osmolytes) et *MT* (détoxification). Prédits comme cibles potentiels des gènes *CBF* d'après leur séquence promotrice, ces gènes appartiennent aux groupes majeurs du transcriptome froid de l'eucalyptus. Les plus induits codent des LEA (dont les déhydrines) qui sont aussi les plus représentés dans le transcriptome froid. Au contraire, les métallothionéines, plus faiblement surexprimés dans ces lignées peuvent être en plus du *CBF* sous le contrôle d'autres voies de régulation.

La surexpression des *LEA*, *MT* a déjà été décrite chez plusieurs sur-expresses de *CBF* comme le blé (Morran et al., 2011; Soltész 2013), *Arabidopsis* (Siddiqua et al., 2011; Yang et al., 2011; Oakenfull et al., 2011), la myrtille (Walworth et al., 2012), le riz (Cong et al., 2008) et la tomate (Zhang et al., 2013). La surexpression de gènes effecteurs comme les *GolS* et les *HSP70* ont déjà été décrits dans littérature pour les lignées surexprimant les *CBF* (Oakenfull et al., 2011; Walworth 2012; Zhang et al., 2013), (Agarwal et al., 2010; Xu 2011). Par contre, la surexpression des Spirals, Elips chez des lignées sur-exprimant un *CBF* qui est mise en évidence dans notre étude n'avait pas été mentionnée jusque là.

En parallèle, la lignée B9 apparaît plus thermotolérante, ce gain n'avait à ce jour que pour des lignées d'*Arabidopsis* sur-rexprimant un gène *DREB2* (Lim et al., 2007). Il pourrait être lié à l'accumulation des protéines protectrices des macromolécules ou membranes (LEA etc..) et également à des gènes plus spécifiques comme les *HSP*. Ce résultat est en cohérence avec la forte induction des *CBF* par la chaleur.

D'autre part, on observe à la surface des feuilles un dépôt de cire plus important chez B9 et A25 que chez Pk7. Cette augmentation de la quantité de cire peut être liée au facteur de transcription *SHNIA* dont la sur-expression est très forte chez les deux sur-exprimants, surtout chez B9. La teinte vert foncé des feuilles de la lignée B9 et la concentration élevée en chlorophylles chez ce sur-exprimant suggèrent une meilleure protection du système photosynthétique comme évoqué chez *Arabidopsis* (Zhang et al., 2011) le tabac (Yang et al., 2011) et la tomate (Zhang et al., 2010). Cette protection peut être en lien avec la sur-expression des gènes *Elips* dans notre étude.

Les sur-expresses en terre ont une taille réduite, de petites feuilles avec une épaisseur de limbe foliaire plus fine par rapport au contrôle. Ce résultat confirme le phénotype noté chez quelques lignées sur-exprimantes *in vitro*. Sur la surface foliaire, le dépôt de cire avait été observé chez la lignée A1 *in vitro*. Dans ce cas, le dépôt était très évident puisqu'il n'existe pas de cire chez les feuilles de microboutures contrôle dans cet environnement saturé en humidité. Sur les plantes en terre, les cires existent déjà sur la surface foliaire chez le contrôle, cependant nous avons observé une accumulation plus importante sur les feuilles des sur-exprimants. Ce résultat suggère que la cire jouerait un rôle important dans l'adaptation des *Eucalyptus* au stress sous contrôle des *CBF* ou des *DREB* en général. Ceci confirme des observations antérieures sur des écotypes d'*Eucalyptus* différant par leur épaisseur de cire (Tom Shepherd, 2006). Un dépôt de glandes à huile a été également observé dans tous les sur-exprimants *in*

in vitro et *ex vitro*, ce qui suggère un rôle protecteur de ces structures face au froid. Cette fonction avait déjà été suggérée par la corrélation observée entre la densité de glandes et la température maximum sur le site de récolte des graines (Burley et al, 1971) mais n'a encore jamais été mise en évidence.

En parallèle, les sur-expressesurs *CBF1b* ont une croissance réduite, ce phénotype est décrit chez plusieurs autres sur-exprimants *CBF/DREB1*, tels que *Arabidopsis* (Tong, Z et al., 2009; Siddiqua & Nassuth, 2011), le riz (Figureueiredo et al., 2012), tabac (Yang et al., 2011), *Medicago* (Li et al., 2011), vigne (Tillett et al., 2012), le bambou (Zhang et al., 2012) ou la myrtille (Walworth et al., 2012). La taille cellulaire réduite observée chez nos lignées pourrait en partie au moins expliquer cette réduction de croissance comme cela est décrit chez les sur-expressesurs des *CBF* chez *Arabidopsis* (Qin et al., 2004) et le pommier (Wisniewski et al., 2011).

Le B9 a une taille réduite par rapport au A25 et au Pk7. Il a aussi des feuilles plus petites que les autres lignées sur-exprimants et que le contrôle. Cette diminution de la taille des plantes est corrélée à une taille réduite des cellules. Cette modification peut être liée à la voie de cytokinine dont la synthèse est induite par les trois gènes *KNOX* qui s'expriment plus fortement chez B9 que A25.

Par contre, chez les sur-exprimants *CBF1a* et *CBF1b* les deux gènes *GA20ox* et un *GA3ox* qui participent à la synthèse des gibbérellines sont induits pendant les deux gènes *GA2ox* et les deux *DELLA* (1 et 2) n'ont pas un niveau d'expression renforcé. Ce résultat permet de mettre une hypothèse que la réduction de la taille des sur-exprimants n'est pas liée à la voie de gibbérelline ou bien qu'il y ait un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle pour les *GA20* et *GA3ox* chez *Eucalyptus*.

Globalement, il y a une modification structurale de la tige des lignées sur-expressesurs, particulièrement chez B9, telle que la taille et la densité des vaisseaux, la taille des cellules de fibre. L'observation pour ces dernières ne montre aucune différence significative de l'épaisseur pariétale mais un lumen très réduit chez B9 par rapport à Pk7. Donc, sur une surface de xylème, le ratio relatif de la paroi est augmenté chez B9, ce qui devrait aboutir à un bois est plus dense par rapport au contrôle. Cette modification peut être liée à la surexpression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez B9. Le résultat de puce Fluidigm réalisé avec les lignées A25 et B14 (sur-exprimant *CBF1b* avec le phénotype intermédiaire entre A25 et B9) appuie cette hypothèse.

En même temps, une proportion importante de vaisseaux bouchés est observée chez les deux lignées par rapport au contrôle particulièrement chez B9. Les analyses histochimiques permettent de proposer la présence de polysaccharides et peut être des composés phénoliques dans les « bouchons » dans les vaisseaux. L'apparence de petites structures sphériques suggèrent la présence de tyloses. De telles excroissances ont déjà observés dans des vaisseaux de l'eucalyptus (Deflorio et al., 2011) en réponse à des stress biotiques, ou chez le noyer après un stress mécanique (McElrone et al., 2010). Les substances sous forme de gel ressemblent à du mucilage ou de la gomme. Le mucilage dans les vaisseaux a été décrit chez des espèces de l'eucalyptus tolérantes au sel et à la sécheresse (Zimmermann et al., 2007), chez des plantes halophytes (Edmond Ghanem et al., 2010) et durant l'acclimatation au froid d'un

cactus (Loik and Nobel, 1991). Les mucilages pourraient en particulier permettre une meilleure alimentation en eau de l'apex des grands arbres (Clifford *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2004). Cette théorie ne paraît pas s'appliquer dans le cas de nos transformants (lignées B) qui présentent justement une dégénérescence de l'apex ce qui suggérerait que les bouchons ne contiennent pas de mucilage ou que les autres structures présentes (exemple tylose) empêcheraient la circulation de la sève. Alternativement, on peut envisager que l'accumulation de mucilage, si elle est avérée, trop forte dans nos transformants, a un effet négatif sur l'alimentation hydrique de la plante.

Au-delà des tyloses et polysaccharides, il pourrait y avoir des phénols solubles dans les vaisseaux bouchés avec dans ce cas un rôle protecteur plus probable dans la réponse aux stress biotiques comme cela a été montré chez *E. nitens* en réponse à des champignons (Barry *et al.*, 2002). Ces composés phénoliques s'accumulent en tout cas dans la plupart des cellules du cortex et dans ce cas ils pourraient participer à la synthèse de composés pariétaux tels que lignine ou subérine.

La modification de la structure de la tige observée dans notre étude chez *Eucalyptus* n'avait jamais été décrite chez des sur-exprimants *CBF* car les analyses anatomiques approfondies chez les autres espèces se focalisaient sur les feuilles, connues comme le site primaire des effets dus au gel.

Conclusion générale

Cette étude repose sur l'étude fonctionnelle de lignées d'*Eucalyptus* surexprimant le *CBF* complétée par une large analyse prédictive de séquences *in silico* à l'échelle du génome. Cette approche intégrée a permis d'obtenir une vision beaucoup plus précise du contrôle par le *CBF* de la réponse aux stress abiotiques chez ce ligneux.

La famille *CBF* comprend un très grand nombre de gènes qui, avec des profils de régulation très différents, permet des modulations très variées en réponse aux signaux de l'environnement. Cette voie participerait à la tolérance à plusieurs stress abiotiques dont au moins le froid et la chaleur, essentiellement par la régulation de gènes impliqués dans la protection des membranes et des macromolécules. Au-delà de la protection cellulaire qui se met en place lors de l'acclimatation au froid, les *CBF* d'*Eucalyptus* pourraient être impliqués dans des adaptations morphologiques plus spécifiques destinées à lutter contre le froid ou la déshydratation tels que la réduction du nombre de stomates, ou l'augmentation du nombre de glandes à huile. Ces contrôles pourraient mettre en jeu la transcription d'autres facteurs de transcription cibles des *CBF* et impliqués dans ces processus de différenciation.

Les différents résultats suggèrent la complexité de la voie *CBF*, tant au plan du nombre de gènes *CBF* avec leur régulation différentielle, que de la diversité de fonction de leurs gènes cibles et enfin des mécanismes adaptatifs qui sont contrôlés au niveau moléculaire, cellulaire et physiologique. Ceci peut être mis en regard avec l'absence de dormance et la persistance du feuillage en hiver, mais il est difficile de généraliser cette hypothèse car les seuls éléments de comparaison disponibles dans la littérature à ce jour pour une plante à feuilles persistantes concernent le *Citrus*.

Au-delà de l'aspect tolérance étudié de façon classique au niveau foliaire, cette étude apporte des informations totalement nouvelles sur le contrôle de la formation de la tige par le *CBF*. Ce groupe de gènes d'*Eucalyptus* sont exprimés dans cet organe en conditions normales ou suite à un stress. En plus de l'expression différentielle des gènes *CBF* en fonction des conditions et aussi des organes, la sur-expression de *CBF1a* et *CBF1b* ne semble pas produire des impacts équivalents sur tous les gènes cibles testés. Ces éléments renforcent l'hypothèse d'une subfonctionnalisation après duplication. D'autre part l'expression des *CBF* dans les tiges pourrait participer à des mécanismes adaptatifs non encore mis à jour et liés à cet organe.

L'analyse des plantes transgéniques confirme l'impact varié et intense d'une sur-expression *CBF* sur les tiges en cohérence avec la modulation de l'expression de gènes. Les principales modifications observées concernant le xylème (fibres et vaisseaux) ressemblent à une réponse amplifiée au stress.

Ces données originales sont encore préliminaires car obtenues en fin de thèse étant donné les délais nécessaires pour disposer d'un effectif suffisant de lignées transgéniques comparables. Elles devront être confirmées et élargies avant d'initier une étude approfondie de certains mécanismes observés.

Ces résultats nous permettent cependant de proposer que les *CBF* seraient responsables de nombreuses adaptations anatomiques et cellulaires à la fois au niveau des feuilles et des tiges d'*Eucalyptus*, permettant ainsi une protection de l'ensemble de la partie aérienne de la plante.

Par ces investigations sur les tiges, ces travaux ont permis d'apporter un éclairage nouveau sur la fonction des facteurs de transcription CBF chez les plantes.

Matériels et Méthodes

1. Matériel (origine et conditions de culture)

Différents types de matériel végétal ont été utilisés pour l'ensemble des travaux de ma thèse. Les feuilles d'*Eucalyptus grandis* et *Eucalyptus gunnii* ont été récoltées pour les études d'expression des gènes sur des plantules cultivées en conditions contrôlés. En parallèle, les plantules *ex vitro* de l'hybride *E. urophylla* x *E. grandis* et les calcs d'*E. gunnii* ont été utilisées pour le phénotypage ainsi que pour étudier l'expression des gènes.

1.1. Lignées d'*E. gunnii*

Des lignées d'*E. gunnii* issues de la sélection ont été fournies par FCBA sous forme de boutures enracinées en mottes Jiffy. Le clone 1058, est un génotype que l'équipe a caractérisé comme ayant une bonne tolérance intrinsèque et une forte acclimatation.

Après une quarantaine sanitaire au laboratoire, elles ont été transférées en salle de culture à la température est de 25°C/23°C pour une photopériode de 16h/8h, 80% d'humidité et 115µE d'éclairément (salle « *Eucalyptus* »).

1.2. Lignées d'*E. grandis*

Des graines d'*E. grandis* commerciales (www.b-and-t-world-seeds.com) ont été semées dans du terreau H4 et mises en culture dans la salle *Eucalyptus*. Les plantules sont repotées dans le même terreau après dans des pots de 1 litre (à deux semaines après la semée, la plantule à 5 cm en hauteur), puis dans les pots de 4 litres à l'âge de trois mois.

1.3. Lignées transgéniques de l'hybride *E. urophylla* x *E. grandis*

L'hybride *E. urophylla* x *E. grandis*, issu d'hybridation contrôlée, est très cultivé au Brésil mais pas en France à cause de sa faible tolérance au gel. A partir d'un lot de semences commerciales, notre équipe de recherche a sélectionné le génotype 201 (*E. urophylla* x *E. grandis*) pour sa bonne capacité de régénération et de transformation. La technique de transformation mise au point dans notre équipe (Tournier et al., 2003) a été utilisée pour introduire d'ORF des gènes *EguCBF1a* ou *Ib* sous le contrôle du promoteur CaMV-35S (construction pK7WG2D). A mon arrivée au laboratoire, plusieurs lignées cultivées *in vitro* sont disponibles et ont déjà fait l'objet d'une analyse phénotypique détaillée (Navarro, 2011). Les surexprimants sont désignés par une lettre en majuscule correspondant au CBF inséré suivie d'un chiffre identifiant la lignée. Une lignée témoin (Pk7) contient le vecteur de transformation «vide».

Les explants sont maintenus et multipliés sur le milieu M (milieu MS modifié, voir annexe donner le III-1), avec une fréquence de repiquage toutes les trois semaines. Les conditions de culture correspondent à une photopériode de 16 h/8 h, une température de 25°C/22°C et 115µE d'éclairement.

Un des objectifs de mes travaux a été de mettre au point les conditions d'allongement de tiges, d'enracinement afin d'acclimater ces lignées transgéniques *ex vitro* et de réaliser leur phénotypage. Après acclimatation *ex vitro*, les lignées obtenues ont été cultivées dans la salle *Eucalyptus*, en condition standard, et elles sont rempotées dans des pots de 4 litres après trois mois.

1.4. Conditions d'application des stress

1.4.1. Acclimatation d'*E. gunnii*

Les plantules cultivées dans la chambre de culture à 25°C sont transférées à des températures fraîches en utilisant un phytotron (Cryonext, Montpellier, France) avec une photopériode de 8h/16h pour jour/nuit avec thermopériode de 25°C jour / 22°C nuit et un éclairage de 45 µE. Le programme de l'acclimatation contient plusieurs étapes avec le changement de température pour jour/nuit : 3 jours à 25°C/22°C, puis 4 jours à 12°C/8°C et enfin 16 jours à 8°C/4°C. Ce programme se termine par une étape de désacclimatation avec 3 jours à 12°C/8°C avant remontée à 25°C/22°C. La tolérance au gel est mesurée avec la méthode de fuite d'ions (Dexter *et al.*, 1930), avant l'acclimatation, au cours et à la fin de l'acclimatation.

1.4.2. Traitement sur feuille détachée

Les feuilles développées à troisième rang foliaire de dix plantules à 4 mois d'*E. grandis* sont détachées pour constituer chaque échantillon pour tous les essais. Les expériences ont été répétées deux fois. Le contrôle pour tous les traitements contient des feuilles récoltées mises dans un milieu ¼ MS à 25°C pendant une heure à la lumière, sauf pour le traitement de sécheresse, les feuilles avec les pétioles maintenues sont immergées dans la solution ¼ MS pour 8 heures.

Les stress thermiques correspondent soit au choc froid (4°C) ou chaud (45°C) pendant 8 heures. Pour la sécheresse, les feuilles sont laissées sur papier Whatman dans une chambre de culture à 25°C pour 8 heures. Pour chaque condition de stress, l'ARN est extrait à partir chaque lot de 10 feuilles collectées après avoir été mises deux heures à la lumière et six heures à l'obscurité.

2. Méthodes

2.1. Production des matériels *ex vitro*

Pour obtenir des plantes *ex vitro*, un protocole comprenant 3 étapes a été établi après de nombreux essais réalisés en utilisant des variations du milieu MS correspondant à des modifications de pH et de composition en vitamines et/ou saccharose et/ou facteurs de croissance.

2.1.1. Etape d'allongement de tige

Le milieu W4 correspond à un MS modifié (Annexe III-6). Les surexprimants (soit *CBF1a* soit *CBF1b*) ou *Pk7* sont transférés dans les tubes contenant 20 ml de milieu W4 ou dans des pots Magenta contenant 120ml du milieu. Pendant une période de 3 semaines, la culture est réalisée sous lumière tamisée ($62 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en photopériode longue (16h/8h) et à la température de 25°C/22°C. Des micro-boutures qui n'ont pas une hauteur de tige suffisante pour s'enraciner (2-3 cm) sont remises sur un milieu neuf pour un nouveau cycle.

2.1.2. Etape d'enracinement

Des explants allongés ont mis d'abord sur milieu ¼ MS modifié (¼ MS pour des composants nutritifs et AIB ajouté à 2 mg l^{-1} , (annexe III-17) pendant 72h à l'obscurité puis transférés sur milieu ¼ MS + 0,5 g/L de charbon actif, sans AIB (annexe III-18) et remis dans la chambre de culture sous la lumière, long séjour (16h/8h), température 25°C/22°C.

2.1.3. Etape d'acclimatation *ex vitro*

Les explants enracinés sont cultivés dans les tubes contenant 20 ml de milieu ¼ MS avec charbon actif (pendant 2-3 semaines, ou plus si nécessaire) pour obtenir l'allongement des racines jusqu'à 2 cm, longueur minimale pour une bonne acclimatation *ex vitro*. Les explants ayant des racines suffisamment longues sont transférés dans un pot 7x7x7 cm comprenant du terreau traité avec du prévicur (Propamocarbe fosetyl) 0,25 %, pour éviter le développement de champignons. Chaque pot est mis dans une bouteille en plastique transparente, humidifié et fermé par une membrane en plastique transparent pendant une semaine. Pour une mise en atmosphère standard, les bouteilles sont ouvertes petit à petit pendant 2 semaines. Après encore une semaine dans les bouteilles, les plantules sont repotées dans des pots d'1L 11x11x12 cm.

2.2. Phénotypage des transformants

2.2.1. Estimation de la tolérance aux stress abiotiques (froid, chaleur)

- **Mesure de la fuite d'ions à vitesse contrôlée jusqu'au gel dans un cryostat**

La méthode de la fuite d'ions établie en 1930 par Dexter (Dexter *et al.*, 1930) et adaptée d'un protocole mis au point dans l'équipe (Travert *et al.*, 1997) est utilisée pour estimer la tolérance au gel des arbres. Pour chaque plante testée, 72 disques foliaires (feuilles du 5^{ème} rang) de 7 mm de diamètre sont découpés grâce à l'emporte-pièce, 6 placés dans 20 mL d'eau désionisée et refroidis artificiellement dans un cryostat (CC2 de Huber, Offenbourg, Allemagne). Le programme de refroidissement débute à +1°C et atteint -9°C à raison de 2,5°C/heure. A -1°C, un glaçon (créé à partir 3ml d'eau) de glace pilée est introduit dans le tube afin d'initier la formation de glace. Les tubes sont sortis du cryostat aux différentes températures de congélation choisies (-5,2°C, -5,6°C, -6°C, -6,4°C), et décongelés doucement à 4°C pendant la nuit. La conductivité de la solution est mesurée avant le refroidissement (Ci), après le passage au cryostat (Ct) et après la destruction totale des cellules par un passage à -80°C (Cf). La conductivité relative est calculée de la manière suivante : $Cr = (Ct - Ci) / (Cf - Ci)$. Chez *Eucalyptus*, il a été montré qu'une conductivité relative de 0.5 correspond à 50% de feuilles détruites (Tibbits and Reid, 1987). A partir des trois répétitions techniques réalisées pour chaque plante, les résultats présentés correspondent à la moyenne des mesures effectuées et sont exprimés en pourcentage de viabilité (correspondant à l'intégrité membranaire) après le gel. Un test de Tukey HSD a ensuite été appliqué pour analyser statistiquement les valeurs.

- **Mesure de la fluorescence de la chlorophylle des feuilles exposées au gel**

Les feuilles du 5^{ème} rang foliaire de trois plantes pour chaque lignée sont récoltées, coupées en deux transversalement pour pouvoir rentrer dans des tubes Falcon. La mesure de fluorescence initiale est enregistrée après 15 minutes d'adaptation au noir à l'aide de fluorimétrie (OS-30P Chlorophyll fluorometer, OPTI-SCIENCES). Les feuilles sont alors placées dans les tubes Falcon préalablement préparés contenant 25mL d'eau désionisée. Les tubes sont mis au cryostat (CC2 de Huber, Offenbourg, Allemagne). Le programme de refroidissement débute à +1°C et atteint -9°C à raison de 2,5°C/heure. A -1°C, un glaçon (créé à partir 4 ml d'eau) de glace pilée est introduit dans le tube afin d'initier la formation de glace. Les tubes sont sortis du cryostat aux différentes températures de congélation choisies (-4,8 °C, -5,2°C, -5,6°C, -6,0°C), et décongelés doucement à 4°C pendant la nuit. Les mesures de fluorescence finales sont faites (après 15 minutes d'adaptation au noir). La valeur relative du Fv/Fm est calculée en faisant le moins entre les valeurs du point initial et final. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des mesures effectuées sur 3 plantes. Un test de Tukey HSD a ensuite été appliqué pour analyser statistiquement les valeurs.

- ***Mesure de la fluorescence de la chlorophylle des feuilles exposées à la chaleur***

Les feuilles du 5^{ème} rang foliaire de trois plantes pour chaque lignée sont récoltées et mises en attente dans un bain contenant de l'eau distillée. Sur chaque feuille, une pastille d'adaptation au noir est installée pour une durée de 15 minutes, jusqu'à la première mesure de fluorescence. Les feuilles sont ensuite transférées dans les tubes Falcon remplis de 4mL d'eau distillée qui sont incubés à 45°C (étuve). La mesure de fluorescence est ensuite réalisée à 30, 90, 180 et 270 minutes de traitement. La valeur relative du Fv/Fm entre le point initial et final est calculée. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des mesures effectuées sur trois plantes. Un test de Tukey HSD a ensuite été appliqué pour comparer les valeurs.

2.2.2. *Evaluation de la croissance*

La croissance des plantes a été suivie dans le temps en mesurant différents paramètres : hauteur de l'axe principal, largeur de ramification, nombre de branches, diamètre du tronc et dimension des feuilles pour au moins trois plantes par lignées.

La hauteur de l'axe principal (H) est mesurée toutes les deux semaines jusqu'à 14 semaines. La croissance relative est calculée par cette formule : $H = H_t - H_0$

Toutes les deux semaines est également mesurée l'amplitude et le nombre de branches est compté. Le diamètre du tronc est mesuré grâce au pied à coulisse électronique (Fisher Darex) à 12 semaines et à 14 semaines. La longueur et la largeur de 5^{ème} feuille sur 5^{ème} branche sont mesurées.

Les résultats représentent la moyenne de toutes les plantes pour chaque lignée. Un test de Tukey HSD a ensuite été utilisé pour analyser statistiquement les valeurs. Lorsque le *p* est inférieur à 0.05, les valeurs sont considérées comme significativement différentes.

2.2.3. *Analyse anatomique par microscopie*

- ***Fixation et déshydratation des échantillons***

Les feuilles de 5^{ème} rang sont récoltées séparément. Les tiges secondaires et primaires sont distinguées aussi. Les feuilles et tiges à analyser sont récoltées puis fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2.5% dans 0.05 M de Cacodylate de sodium pH 7,1, pendant une nuit à 4°C. Les échantillons fixés dans le tampon glutaraldéhyde/cacodylate sont déshydratés deux fois 20 minutes pour les feuilles et 30 minutes pour des tiges dans des bains de concentration croissante d'éthanol (20, 40, 60, 80%). Pour chaque lignée, les échantillons ont été récoltés à partir d'au moins trois plantes et les analyses suivantes ont été réalisées sur ces répétitions biologiques.

- ***Observation de la surface des feuilles-MEB***

Les feuilles sont déshydratées encore en passant à solution 100% d'éthanol deux fois à 20 minutes. Elles sont ensuite déshydratées au point critique (CPD 750 Emscope), puis sont recouvertes d'une solution d'or-platine. Ils sont ensuite observés avec un microscope à balayage (Hitachi, Ibraki, Japon). Trois images à chaque résolution (300X, 450X, 600X, 900X) sont photographiés sur trois zones foliaires différentes et sur les deux faces supérieure et inférieure.

L'analyse des images par le logiciel ImageJ (version 1.47f7) a permis de déterminer la densité de stomates, de cellules de l'épiderme et de glandes à huile. Le résultat de densité représente le nombre de stomates/cellules de l'épiderme ou glandes à huile sur une surface $1000 \mu\text{m}^2$. Les valeurs moyennes sont obtenues pour au moins trois images. Un test de Tukey HSD a ensuite été réalisé pour comparer les valeurs moyennes entre lignées différentes. Lorsque le p est inférieur à 0.05, les valeurs sont considérées comme significativement différentes.

- ***Observation des coupes transversales de la feuille à l'aide du microscope***

Après la fixation, les échantillons sont déshydratés par une série de rinçages à l'éthanol 20%, 40%, 60%, 80% et 100%. Ils sont ensuite inclus dans de la résine LR White et trois coupes transversales ultrafines de $1\mu\text{m}$ sont réalisées au microtome au niveau de la partie centrale. Ces coupes sont déposées sur une lame et colorées au bleu de toluidine (dilué à 0.01M) pendant 1min 30s avant l'observation.

L'analyse des images par le logiciel ImageJ (version 1.47f7) a permis de mesurer le diamètre de nervure principale et l'épaisseur de limbe foliaire. A cause du nombre limité d'échantillons biologiques, les résultats ne sont pas traités statistiquement.

- ***Observation des coupes transversales de la tige à l'aide du microscope***

Les tiges déshydratées à 80% de l'éthanol sont coupées en coupes semi-fines de $60 \mu\text{m}$ à l'aide d'un Vibratome LEICA VT 1000S en utilisant une lame en saphir. L'appareil est réglé sur la vitesse 5,5 sur 9 avec une fréquence de 7 sur 9. Les coupes sont ensuite colorées avec différents colorants afin de mettre en évidence différentes structures et composants. Les coupes sont faites sur des plantes âgées de 14 semaines. Pour chaque lignée, plusieurs coupes ont été réalisées pour au moins trois plantes indépendantes.

→ **Phloroglucinol :**

Le phloroglucinol est utilisé en solution pure au moment du montage de l'échantillon sur lame. La coloration au phloroglucinol est instantanée et permet de révéler les composés phénoliques (en particulier les lignines). L'observation se fait sous lumière blanche.

→ **Calcofluor :**

La coloration au Calcofluor se fait à l'aide d'une solution à 0,01% (dilué dans l'eau). L'échantillon est traité dans un bain de calcofluor pendant 5 minutes avant le montage de la lame avec de l'eau. L'observation se fait sous UV bloc filtre A (Excitation range: Ultra-violet, BP: 340-380 nm, Dichromatic mirror: 400 nm, LP: 430 nm). Cette coloration permet de révéler les polysaccharides (en particulier la cellulose).

→ **Safranine et bleu d'alcian :**

Cette coloration se fait à l'aide d'une solution de safranine (0,05% dans l'eau) et d'une solution de bleu d'alcian (0,1% dans l'eau). L'échantillon est traité pendant 5 minutes dans un bain de safranine suivi de 5 minutes dans un bain de bleu d'alcian. Le montage de la lame se fait avec de l'eau et l'observation se fait sous lumière blanche. Cette coloration permet de révéler la cellulose en bleu et la lignine en rouge.

Dans certains cas, les coupes ont été traitées à l'hypochlorite de sodium (solution commerciale de ménage) pendant une heure suivi d'un rinçage avec l'acide acétique à 3% pendant 10 minutes et d'un rinçage avec de l'eau distillée. Ce traitement permet d'éliminer les composés non pariétaux.

→ **Lugol :**

La coloration au lugol (1% dans l'eau) est une coloration immédiate avec montage de la lame avec le lugol. L'observation se fait sous lumière blanche. Cette coloration permet de révéler les composés polysaccharidiques (en particulier l'amidon).

→ **Rouge de ruthénium :**

La coloration au rouge de ruthénium (solution à 0.02% dans l'eau) marque les pectines en rouge. Après un bain de 30 minutes l'observation des coupes se fait sous lumière blanche.

→ **Bleu d'aniline :**

La coloration au bleu d'aniline (solution à 0,01% dans du PBS, pH 9) permet la coloration des β 1-3 glucanes. Après un bain de 30 minutes dans le Bleu d'aniline, le montage de la lame est fait avec de l'eau. L'observation se fait sous UV bloc filtre A (Excitation range: Ultra-violet, BP: 340-380 nm, Dichromatic mirror: 400 nm, LP: 430 nm).

Des observations des coupes non colorées à l'aide d'un microscope photonique ont été faites sous UV bloc filtre A (Excitation range: Ultra-Violet, BP: 340-380 nm, Dichromatic mirror: 400 nm, LP: 430 nm) ce qui permet de visualiser l'épifluorescence des composés phénoliques (lignine).

• ***Identifier la nature des composés dans le vaisseau à l'aide du microscope***

Les branches de la plante étudiée sont coupées en morceaux de 5 cm, transférés dans un tube conique avant centrifugation à 1500 g pendant 20 minutes. Quelques gouttes de la sève extraite sont montées sur lame et colorées par des colorants tels que la safranine, le bleu d'alcian, le bleu d'aniline ou le calcofluor puis observées à l'aide du microscope (LEICA DM IRBE).

2.2.4. Dosage des chlorophylles

Les chlorophylles ont été dosées d'après méthode de Lichtenthaler (1987). Elles sont extraites à partir de 200 mg de feuilles fraîches en utilisant la solution d'acétone 80% ajustée à pH 7.8 avec du phosphate de sodium. L'absorbance due aux chlorophylles des extraits est mesurée à deux longueurs d'onde (663.2 et 646.8 nm). Les résultats sont calculés selon les formules ci-dessous :

$$C_a = 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8} \text{ et}$$

$$C_b = 21.50 \times A_{646.8} - 5.10 \times A_{663.2}$$

Pour chaque lignée, les extractions ont été réalisées indépendamment pour trois plantes différentes d'une même lignée. Un test de Tukey HSD a ensuite été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre des lignées différentes. Lorsque p est inférieur à 0.05, les valeurs sont considérées comme significativement différentes.

2.2.5. Vitesse d'extraction des chlorophylles

La quantité relative de cire est estimée indirectement par la vitesse d'extraction des chlorophylles. Pour chaque lignée transgénique, une feuille de 5^{ème} range foliaire est récoltée, rincée par une centrifuge légère (200 g pendant 2 minutes) puis épongée par le papier Whatman. La feuille est pesée avant de mettre dans un tube contenant 40 ml de l'éthanol 80%. Les échantillons sont mis à l'obscurité. Un mL d'extrait est prélevé chaque 15 minutes pour première heure puis 30 minutes jusqu'à trois heures. La chlorophylle est ensuite dosée par spectrométrie à deux absorbances 664 et 647 nm. La concentration de chlorophylle totale en μM par gramme de matériel frais est calculée d'après la formule ci-dessous (Lolle et al., 1997) :

$$\text{Nombre total de micromoles de chlorophylle} = 7.93 \times A_{664} + 19.53 \times A_{647}$$

Pour chaque lignée, les essais ont été réalisés indépendamment pour trois plantes différentes et les moyennes calculées par lignées. Un test de Tukey HSD a ensuite été utilisé pour comparer les valeurs moyennes entre des lignées différentes. Lorsque p est inférieur à 0.05, les valeurs sont considérées comme significativement différentes.

2.3. Analyse d'expression

2.3.1. Extraction des ARN totaux

Pour les plantes dont les feuilles sont riches en polyphénols et polysaccharides, les ARNs totaux sont extraits à partir de 100mg de feuilles broyées dans l'azote liquide en utilisant le kit « SV Total RNA Isolation System » de Promega aussi en remplaçant le tampon de lyse fourni dans le kit par un tampon décrit par Jones (Jones et al., 1985). De plus, les étapes de lavage des colonnes sont répétées 5 fois.

D'abord, le premier tampon du kit est utilisé pour lyser et plusieurs étapes supplémentaires de lavage des colonnes sont nécessaires avec la solution « RNA Wash Solution RWA » du kit d'extraction d'ARN de Promega. Le kit comprend un traitement DNase sur colonne de 30 minutes. Une étape de précipitation avec un mélange d'éthanol absolu et d'acétate de sodium est appliqué sur la solution aqueuse d'ARN puis un lavage à l'éthanol 70° est pratiqué avant un séchage et la conservation se fait en solution aqueuse à -80 °C. Enfin, les ARNs sont dosés à l'aide du spectrophotomètre ND-1000 de NanoDrop (Wilmington, DE, USA) et leur qualité est vérifiée sur gel d'agarose à 1 % dans TAE 1X.

2.3.2. Analyse par PCR en temps réel

- **Choix des amorces**

Les amorces utilisées pour la RT-qPCR en temps réel sont désignées dans la partie des transcrits prédits pour chaque gène étudié. La spécificité des amorces a été confirmée par la réalisation d'un BLAST contre le génome ou la base de données de transcrit *d'E. grandis* ou des bases données des EST d'*E. gunnii*. Des outils DNA calculator (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>), Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), Tm calculator (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/>) et OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) ont été utilisés pour valider techniquement chaque amorce. La concentration utilisée pour la RT-qPCR est de 300 nM pour chaque amorce.

- **Synthèse d'ADNc**

La synthèse est réalisée dans un mélange réactionnel de 25µl contenant : 3µg d'ARN, 1µl d'amorces aléatoires Random Primer (Invitrogen, Carlsbad, USA) à 3µg/µl, 1µl de dNTPs à 10mM, 0.7µl de RNAsin à 40 U/µl (Promega, Madison, WI, USA), et 1µl d'enzyme polymérase Superscript II Reverse Transcriptase à 200U/µl (Invitrogen, Carlsbad, USA). Le premier brin d'ADNc est synthétisé à 42°C. Après la synthèse, les ADNc sont dosés à l'aide du spectrophotomètre ND-1000 de NanoDrop (Wilmington, DE, USA). La qualité des ADNc (absence d'ADN génomique) est vérifiée par une amplification PCR d'une partie du gène de la tubuline d'*E. globulus* contenant un intron en la comparant à un témoin positif avec de l'ADN génomique *d'E. gunnii* et *d'E. grandis*. Après migration des produits PCR sur gel d'agarose à 1 % dans TAE 1 X, les ADNc non pollués par de l'ADN génomique montrent un produit d'amplification de tubuline plus court.

- **Amplification en temps réel**

Les réactions PCR sont réalisées trois fois pour chaque échantillon sur une plaque de 384 puits. Le mélange utilisé pour la PCR contient du Power SYBR Green PCR Master Mix (2 X) d'Applied

Biosystems (Foster City, CA, USA) et une masse de 200 ng d'ADNc pour les gènes CBF et les autres facteurs de transcription à amplifier, mais que 24 ng pour des gènes effecteurs, tout dans un volume réactionnel de 10 µl. L'amplification des gènes étudiés est comparée avec celle des gènes invariant dans des conditions de stress comme ribosomal *18S*, *PP2A3*, *PP2A1* (Serine/Threonine-protein phosphatase 2A) qui sont des témoins internes (normalisation) et de l'eau UHQ comme témoin négatif. La réaction de PCR est réalisée avec le thermocycleur ABI Prism 7900HT séquence Detection System d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

- **Analyse des données RT-qPCR**

Les données d'expression de RT-PCR sont analysées avec le logiciel SDS 2.2 d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) en intégrant les courbes de dissociation des amplifications.

Les nombres de cycles permettent le calcul du niveau d'expression de chaque gène étudié par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Le premier calcul vise à déterminer le niveau de surexpression des gènes étudiés chez les surexprimeurs CBF par rapport au contrôle. Les gènes de référence utilisés sont le *18S* et le *PP2A3* dont le C_t est constant dans tous les types de plantes étudiées.

- **Puce de Fluidigm**

Les réactions PCR sont réalisées une fois pour chaque échantillon biologique (trois répétitions biologiques chaque lignée) sur une plaque de 96 puits (puces 96.96 Dynamic Array). Le mélange utilisé pour la PCR correspond au Kits TaqMan Gene Expression Master Mix (ABI), 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm) et 20X EvaGreen (Biotum) et de 200 ng d'ADNc pour les gènes étudiés. L'appareil utilisé est le Biomark de Fluidigm de la Génopôle. Une pré amplification des cDNA est effectuée grâce au kit TaqMan PreAmp. Les 5 gènes de référence utilisés sont *PP2A3*, *PP2A1* (Serine/Threonine-protein phosphatase 2A), SAND (SAND protein) et IDH (isocitrate dehydrogenase) et le facteur de transcription EF-1a,. Les données d'expression de RT-PCR sont analysées avec le logiciel Fluidigm Real-Time PCR Analysis (Fluidigm Corporation, South San Francisco, USA). Les nombre de cycles permettent le calcul du niveau d'expression de chaque gène étudié en normalisant avec des gènes références. Les valeurs d'expression des gènes sont les valeurs relatives de quantité de transcrits entre le sur-exprimant *CBF* et les plantes contrôles toutes les lignées étant cultivées dans les conditions standard.

2.4. Analyse statistique

Le test de Tukey HSD a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes des répétitions biologiques ou techniques des données de phénotypage des transformants. Lorsque le p est inférieur à 0.05, les valeurs sont considérées comme significativement différentes. En parallèle, pour les données de l'expression des

gènes étudiés, le test Student est appliqué pour mettre en évidence les différences significatives de niveau d'expression des gènes étudiés entre les lignées sur-exprimant le CBF et la lignée contrôle ou entre les plantes traitées par le stress et les plantes non traitées.

2.5. Analyse in silico

2.5.1. Source des séquences

Les séquences génomiques, transcrites et protéiques de l'ensemble de famille des gènes étudiés d'*E. grandis* sont disponibles sur le site du web Phytozome (<http://phytozome.net/eucalyptus.php>). En parallèle, la première version du génome d'*E. camaldulensis* est disponible sur le site <http://www.kazusa.or.jp/eucaly/> (Hirakawa H, *et al.*, 2011). Le premier assemblage du génome d'*E. gunnii* a été réalisé dans notre laboratoire mais n'est pas disponible pour le public. Les génomes d'autres espèces sont trouvés sur Phytozome (le peuplier, la vigne, le pommier, le pêcher) ou sur TAIR (*A. thaliana*). Les orthologues des gènes étudiés ont été obtenus à partir de la littérature, ou sur les bases de données publiques comme NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Phytozome (<http://phytozome.net/>) ou d'EUCATOOL qui est la base de données ESTs d'*E. gunnii*, créée par notre groupe (<http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/eucatoool/summary.php>).

2.5.2. Prédiction des protéines chez *E. grandis*

Les familles de gènes étudiés ont été identifiées par différentes approches. Basée sur les résultats de l'annotation automatique, la collecte des séquences a été réalisée en utilisant le « mot clé – le nom de la famille ou Pfam ». Sur toutes les séquences protéiques retenues, la présence du domaine conservé et/ou des motifs consensus ou sites catalytiques a été vérifiée par Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Punta *et al.*, 2012), « Find conserved domain » sur NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ou InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) (Goujon *et al.*, 2010).

Les orthologues sont recherchés par un BLAST contre les génomes disponibles (*Arabidopsis*, peuplier, vigne) ou les séquences partielles décrites dans la littérature pour d'autres espèces. Les séquences protéiques obtenues ont été alignées en utilisant ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) ou/et MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato & Standley, 2013). Après avoir vérifié manuellement l'alignement des séquences, une correction est réalisée si nécessaire en combinant une prédiction des gènes et une recherche par homologie, FGESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>) ou FGESH+ (http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes_plus&group=programs&subgroup=gfs). Cette correction est ensuite validée par l'analyse des ESTs d'eucalyptus disponibles sur NCBI ou par

l'ensemble du génome d'*E. camaldulensis*. Lorsque certaines protéines n'ont pas été détectées à cause d'une mauvaise annotation, une recherche de nouveaux paralogues putatifs a été effectuée en utilisant SCIPPIO (Odrionitz et al., 2008). Dans certains cas, l'identification de gènes a été réalisée à partir des orthologues chez *Arabidopsis*, peuplier, vigne ou d'autres espèces en utilisant TBLASTN contre l'ensemble du génome d'*E. grandis*. Sur les toutes les protéines détectées, la présence de domaines conservés, de motifs consensus et/ou de sites catalytiques a toujours été vérifiée.

L'ensemble des orthologues d'*E. grandis* et d'*A. thaliana* a été aligné avec MAFFT (Kato & Standley, 2013), un programme d'alignement multiple de séquences, pour permettre la construction de l'arbre phylogénique en utilisant le logiciel MEGA version 5.05 (Tamura et al., 2011) avec le méthode statistique Maximum Likelihood, test phylogénique d'après le méthode Bootstrap avec 1000 répétitions.

2.5.3. Recherche des CBF/DREB1 et des DREB2 sur le génome d'*Eucalyptus*

Pour identifier des CBF/DREB1 sur le génome d'*E. grandis*, deux méthodes ont été utilisées parallèlement. Premièrement, les 4 séquences nucléotidiques (ADNc) de *EguCBF* (Navarro et al., 2009) ont été utilisées (BLAST) contre le génome d'*E. grandis* en utilisant Splign (Kapustin et al., 2008) disponible sur NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>). Les séquences d'*EgrCBF* détectées ont été traduites en protéines grâce à « Translate tool » sur le site de SIB (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://web.expasy.org/translate/>). La présence des deux signatures KKRAGRKKKFQETRHP et DSAWR autour du domaine AP2 des séquences détectées a été bien vérifiée. La recherche de la présence de ces signatures sur l'ensemble du génome traduit d'*E. grandis* a permis détecter des protéines EgrCBF que l'annotation automatique n'avait pas identifiées. Deuxièmement, les EgrCBF ont été identifiées par un TBLASTN en utilisant la séquence entière d'*EguCBF1A* (El Kayal et al., 2006) contre l'ensemble du génome d'*E. grandis* sur Phytozome.

Le blast TBLASTN a utilisé également pour chercher des CBF et DREB2 par un TBLASTN contre le génome d'*E. gunnii* et le génome d'*E. camaldulensis* (Hirakawa H, et al., 2011). La présence de la signature [K/R]GKGGPxN et du domaine AP2 de liaison à l'ADN a permis de détecter les DREB2/DREB3 (Nakano et al., 2006).

2.5.4. Prédiction des gènes cibles potentiels des CBF et DREB2

Chez les plantes, les facteurs de transcription DREB reconnaissent des éléments cis, A/GCCGAC, nommé « Drought Responsive Element » (DRE) ou « C-Repeat » (CRT) qui sont localisés dans la région promotrice des gènes participant à la réponse aux stress abiotiques (Sakuma et al., 2002). Différentes approches ont été utilisées pour prédire les gènes cibles potentiels des CBF et DREB2s dans l'ensemble du génome d'*E. grandis*.

D'abord, le programme Fuzznuc de l'EMBOSS (Rice et al. 2000) a été utilisé pour scanner le motif DRE de l'ensemble des promoteurs des gènes du génome entier d'*E. grandis* sur une longueur de 1000 pb en amont de l'ATG des séquences annotées. Les promoteurs ont été « réversés/complémentés » si nécessaire pour être dans le même sens que l'ARNm.

Les gènes contenant des éléments DRE dans la région promotrice et dont l'identité, selon la littérature, permet de prédire son implication soit dans le développement soit dans la tolérance des stress abiotiques ont été sélectionnés. Ensuite, pour éviter le risque d'annotation automatique incorrecte, l'ensemble des membres de ces familles de gènes a été recherché. Enfin, pour chaque membre de ces familles, l'analyse du promoteur, en particulier la recherche d'éléments DRE, sur la région de 1000 pb en amont de l'ATG a été réalisée en utilisant le programme PLACE (Higo et al. 1999) ou un programme développé par la Plateforme Bio-informatique du laboratoire (<http://www.polebio.lrsv.ups-tlse.fr/patternsCombinaison/>).

2.5.5. Prédiction de la localisation sous-cellulaire des protéines

Les séquences protéiques traduites ont été utilisées pour la prédiction de la localisation sous-cellulaire en utilisant le programme ProtComp Version 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>) et le programme SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011).

Références

- Adamska I 2004.** The Elip Family of Stress Proteins in the Thylakoid Membranes of Pro- and Eukaryota. In: Aro E-M, Andersson B eds. *Regulation of Photosynthesis: Springer Netherlands*, 487-505.
- Adamska I, Kloppstech K. 1991.** Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II. *Plant Mol Biol* **16**(2): 209-223.
- Adamska I, Kloppstech K. 1994.** Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions. *J Biol Chem* **269**(48): 30221-30226.
- Adamska I, Kloppstech K, Ohad I. 1993.** Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. *J Biol Chem* **268**(8): 5438-5444.
- Agarwal P, Agarwal PK, Joshi AJ, Sopory SK, Reddy MK. 2010.** Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Mol Biol Rep* **37**(2): 1125-1135.
- Al-Whaibi MH. 2011.** Plant heat-shock proteins: a mini review. *Journal of King Saud University-Science* **23**(2): 139-150.
- Andaya VC, Mackill DJ. 2003.** Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. *Journal Of Experimental Botany* **54**(392): 2579-2585.
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B. 1993.** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* **1143**(2): 113-134.
- Banilas G, Korkas E, Englezos V, Nisiotou A, Hatzopoulos P. 2012.** Genome-wide analysis of the heat shock protein 90 gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**(1): 29-38.
- Bañon S, Fernandez JA, Franco JA, Torrecillas A, Alarcón JJ, Sánchez-Blanco MJ. 2004.** Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae* **101**(3): 333-342.
- Bennett I, McComb J, Tonkin C, McDavid D. 1994.** Alternating cytokinins in multiplication media stimulates in vitro shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany* **74**(1): 53-58.
- Berti M, Pinto M. 2012.** Expression of Early Light Induced Protein in Grapevine and Pea, under Different Conditions and its Relation with Photoinhibition. *Chilean journal of agricultural research* **72**: 371-378.
- Binyamin L, Falah M, Portnoy V, Soudry E, Gepstein S. 2001.** The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212**(4): 591-597.
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale G, Hall N, Hyland B, Johnston R, Kleinig D, McDonald M, Turner J. 2006.** *Forest trees of Australia*: CSIRO publishing.
- Bolle C. 2004.** The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**(5): 683-692.
- Bork P, Sander C, Valencia A, Bukau B. 1992.** A module of the DnaJ heat shock proteins found in malaria parasites. *Trends Biochem Sci* **17**(4): 129.
- Borsani O, Cuartero J, Fernandez JA, Valpuesta V, Botella MA. 2001a.** Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *Plant Cell* **13**(4): 873-887.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA. 2001b.** Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol* **126**(3): 1024-1030.
- Botella MA, Rosado A, Bressan RA, Hasegawa PM. 2005.** Plant adaptive responses to salinity stress. *Plant Abiotic Stress*: 38-70.
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BL, Custers JB, van Lookeren Campagne MM. 2002.** Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* **14**(8): 1737-1749.
- Boyer JS. 1982.** Plant productivity and environment. *Science* **218**(4571): 443-448.
- Brady SM, Song S, Dhugga KS, Rafalski JA, Benfey PN. 2007.** Combining expression and comparative evolutionary analysis. The COBRA gene family. *Plant Physiology* **143**(1): 172-187.
- Brooker MIH. 2000.** A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). *Australian Systematic Botany* **13**: 79-148.
- Brooker MIH, Kleinig D. 1996.** *Eucalyptus : an illustrated guide to identification*. Melbourne: Reed Books.
- Bruce WB, Edmeades GO, Barker TC. 2002.** Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal Of Experimental Botany* **53**(366): 13-25.

- Bruno AK, Wetzel CM. 2004.** The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *Journal Of Experimental Botany* **55**(408): 2541-2548.
- Buchner J. 1999.** Hsp90 & Co.–a holding for folding. *Trends in biochemical sciences* **24**(4): 136-141.
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J. 2011.** Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae* **130**(2): 357-372.
- Carr D, Carr S, Lenz J. 1986.** Leaf Venation in *Eucalyptus* and Other Genera of Myrtaceae: Implications for Systems of Classification of Venation. *Australian Journal of Botany* **34**(1): 53-62.
- Cheetham ME, Caplan AJ. 1998.** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell stress & chaperones* **3**(1): 28.
- Chen H, Hwang JE, Lim CJ, Kim DY, Lee SY, Lim CO. 2010.** Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **401**(2): 238-244.
- Chen J-R, Lü J-J, Liu R, Xiong X-Y, Wang T-x, Chen S-Y, Guo L-B, Wang H-F. 2010.** DREB1C from *Medicago truncatula* enhances freezing tolerance in transgenic *M. truncatula* and China Rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *Plant Growth Regulation* **60**(3): 199-211.
- Chen JX, Dai F, Wei K, Zhang GP. 2006.** Relationship between malt qualities and beta-amylase activity and protein content as affected by timing of nitrogen fertilizer application. *J Zhejiang Univ Sci B* **7**(1): 79-84.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J-K. 2004.** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**(395): 225-236.
- Chuck G, Meeley RB, Hake S. 1998.** The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes Dev* **12**(8): 1145-1154.
- Ciarmiello LF, Woodrow P, Fuggi A, Pontecorvo G, Carillo P. 2011.** Plant genes for abiotic stress.
- Ciccarelli D, Forino LMC, Balestri M, Pagni AM. 2009.** Leaf anatomical adaptations of *Calystegia soldanella*, *Euphorbia paralias* and *Otanthus maritimus* to the ecological conditions of coastal sand dune systems. *Caryologia* **62**(2): 142-151.
- Clifford SC, Arndt SK, Popp M, Jones HG. 2002.** Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. *Journal Of Experimental Botany* **53**(366): 131-138.
- Constantin M, Henke R, Mansur M. 1977.** Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. *In Vitro* **13**(5): 293-296.
- de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA. 1998.** Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* **22**(3-4): 151-162.
- de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S. 2008.** A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**(7177): 480-484.
- Deflorio G, Franz E, Beadle C, Mohammed C. 2011.** Defence responses in plantation-grown *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* after artificial fungal inoculation. *Forest Pathology* **41**(5): 398-406.
- Dhanaraj AL, Alkharouf NW, Beard HS, Chouikha IB, Matthews BF, Wei H, Arora R, Rowland LJ. 2007.** Major differences observed in transcript profiles of blueberry during cold acclimation under field and cold room conditions. *Planta*.
- Dhanaraj AL, Slovin JP, Rowland LJ. 2004.** Analysis of gene expression associated with cold acclimation in blueberry floral buds using expressed sequence tags. *Plant Science* **166**(4): 863-872.
- Domenech J, Mir G, Huguet G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S. 2006.** Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. *Biochimie* **88**(6): 583-593.
- dos Santos TB, Budzinski IG, Marur CJ, Petkowicz CL, Pereira LF, Vieira LG. 2011.** Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem* **49**(4): 441-448.
- Douglas SE, Penny SL. 1999.** The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved syntenic groups confirm its common ancestry with red algae. *Journal of molecular evolution* **48**(2): 236-244.

- Duarte JM, Wall PK, Edger PP, Landherr LL, Ma H, Pires JC, Leebens-Mack J, dePamphilis CW. 2010.** Identification of shared single copy nuclear genes in Arabidopsis, Populus, Vitis and Oryza and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evol Biol* **10**: 61.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010.** MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **15**(10): 573-581.
- Edmond Ghanem M, Han RM, Classen B, Quetin-Leclercq J, Mahy G, Ruan CJ, Qin P, Perez-Alfocea F, Lutts S. 2010.** Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: localization and composition in relation to salt stress. *J Plant Physiol* **167**(5): 382-392.
- El Kayal W, Navarro M, Marque G, Keller G, Marque C, Teulieres C. 2006.** Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal Of Experimental Botany* **57**(10): 2455-2469.
- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR. 1996.** AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* **8**(2): 155-168.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants.*
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra S 2009.** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable Agriculture*: Springer, 153-188.
- Feng JX, Liu D, Pan Y, Gong W, Ma LG, Luo JC, Deng XW, Zhu YX. 2005.** An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the Arabidopsis AP2/EREBP transcription factor gene family. *Plant Mol Biol* **59**(6): 853-868.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schafer E, Fu X, Fan LM, Deng XW. 2008.** Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* **451**(7177): 475-479.
- Figueiredo DD, Barros PM, Cordeiro AM, Serra TS, Lourenco T, Chander S, Oliveira MM, Saibo NJ. 2012.** Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene OsDREB1B. *Journal Of Experimental Botany* **63**(10): 3643-3656.
- Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW. 1986.** Halophytes. *Quarterly Review of Biology*: 313-337.
- Freisinger E. 2011.** Structural features specific to plant metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* **16**(7): 1035-1045.
- Goodger J, Heskes A, King D, Gleadow R, Woodrow I. 2008.** Micropropagation of Eucalyptus polybractea selected for key essential oil traits. *Functional Plant Biology* **35**: 247 - 251.
- Goodger J, Heskes A, Mitchell M, King D, Neilson E, Woodrow I. 2010.** Isolation of intact subdermal secretory cavities from Eucalyptus. *Plant Methods* **6**(1): 20.
- Goodger JQD, Cao B, Jayadi I, Williams SJ, Woodrow IE. 2009.** Non-volatile components of the essential oil secretory cavities of Eucalyptus leaves: Discovery of two glucose monoterpene esters, cuniloside B and froggattiside A. *Phytochemistry* **70**(9): 1187-1194.
- Goodger JQD, Connelly CA, Woodrow IE. 2007.** Examination of the consistency of plant traits driving oil yield and quality in short-rotation coppice cultivation of Eucalyptus polybractea. *Forest ecology and management* **250**(3): 196-205.
- Gopal J, Iwama K, Jitsuyama Y. 2008.** Effect of water stress mediated through agar on in vitro growth of potato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **44**(3): 221-228.
- Gross Y, Kigel J. 1994.** Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* **36**(3): 201-212.
- Guo J, Wang M-H. 2011.** Expression profiling of the DREB2 type gene from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under various abiotic stresses. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **52**(1): 105-111.
- Guy C. 1999.** The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. *Plant responses to environmental stresses.* Marcel Dekker, New York: 497-548.
- Guy C, Kaplan F, Kopka J, Selbig J, Hinch DK. 2008.** Metabolomics of temperature stress. *Physiol Plant* **132**(2): 220-235.
- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, Zhang JZ. 2002.** Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**(2): 639-648.
- Hadeler B, Scholz S, Reski R. 1995.** Gelrite and agar differently influence cytokinin-sensitivity of a moss. *Journal Of Plant Physiology* **146**(3): 369-371.

- Hake S, Smith HM, Holtan H, Magnani E, Mele G, Ramirez J. 2004.** THE ROLE OF KNOX GENES IN PLANT DEVELOPMENT#. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 125-151.
- Hallam ND. 1970.** Leaf wax fine structure and ontogeny in Eucalyptus demonstrated by means of a specialized fixation technique. *Journal of Microscopy* **92**(2): 137-144.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Fujita M. 2013.** Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants.
- Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J. 1999.** Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *European Molecular Biology Organisation Journal* **18**(23): 6744-6751.
- Heddad M, Noren H, Reiser V, Dunaeva M, Andersson B, Adamska I. 2006.** Differential expression and localization of early light-induced proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**(1): 75-87.
- Hemming MN, Trevaskis B. 2011.** Make hay when the sun shines: the role of MADS-box genes in temperature-dependant seasonal flowering responses. *Plant Science* **180**(3): 447-453.
- Hill JE, Hemmingsen SM. 2001.** Arabidopsis thaliana type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones* **6**(3): 190-200.
- Hirsch S, Oldroyd GE. 2009.** GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signal Behav* **4**(8): 698-700.
- Holliday JA, Ralph SG, White R, Bohlmann J, Aitken SN. 2008.** Global monitoring of autumn gene expression within and among phenotypically divergent populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytologist* **178**(1): 103-122.
- Hundertmark M, Hinch DK. 2008.** LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **9**: 118.
- Hutin C, Nussaume L, Moise N, Moya I, Kloppstech K, Havaux M. 2003.** Early light-induced proteins protect Arabidopsis from photooxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4921-4926.
- Ingram J, Bartels D. 1996.** The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.
- Itoh H, Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Kamiya N, Hasegawa Y, Ashikari M, Matsuoka M. 2005.** Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J* **44**(4): 669-679.
- Jagadish SVK, Craufurd PQ, Wheeler TR. 2007.** High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal Of Experimental Botany* **58**(7): 1627-1635.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R. 2009.** Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int J Agric Biol* **11**(1): 100-105.
- Janska A, Marsik P, Zelenkova S, Ovesna J. 2010.** Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? *Plant Biol (Stuttg)* **12**(3): 395-405.
- Jin T, Chang Q, Li W, Yin D, Li Z, Wang D, Liu B, Liu L. 2010.** Stress-inducible expression of GmDREB1 conferred salt tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **100**(2): 219-227.
- Jones G, Barabas A, Elliott W, Parsons S. 2002.** Female greater wax moths reduce sexual display behavior in relation to the potential risk of predation by echolocating bats. *Behavioral Ecology* **13**(3): 375-380.
- Jones S. 2004.** An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *GENOME BIOLOGY*. **5**(6): 226-226.
- Kaçar Y, Biçen B, Varol I, Mendi Y, Serçe S, Cetiner S. 2010.** Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research* **9**(1): 416-424.
- Kacperska A 1999.** Plant responses to low temperature: signaling pathways involved in plant acclimation. *Cold-Adapted Organisms*: Springer, 79-103.
- Kaplan F, Guy CL. 2004.** Beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* **135**(3): 1674-1684.
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004.** A Combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-Inducible rd29A Promoter Improved Drought- and Low-Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. *Plant Cell Physiol.* **45**(3): 346-350.
- Keller G, Cao P, San Clemente H, El Kayal W, Marque C, Teulieres C. 2013.** Transcript profiling combined with functional annotation of 2,662 ESTs provides a molecular picture of Eucalyptus gunnii cold acclimation. *Trees - Structure and Function*: 1-23.

- Keller G, Marchal T, SanClemente H, Navarro M, Ladouce N, Wincker P, Couloux A, Teulieres C, Marque C. 2009.** Development and functional annotation of an 11,303-EST collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes* **5**(2): 317-327.
- King DJ, Gleadow RM, Woodrow IE. 2006.** Regulation of oil accumulation in single glands of *Eucalyptus polybractea*. *New Phytologist* **172**(3): 440-451.
- Kirch R, Astarita LV, Santarém ER, Pasquali G 2011.** *Eucalyptus* transgenic plants: from genetic transformation protocols to biosafety analysis. *BMC Proceedings: BioMed Central Ltd.* P179.
- Knight H, Zarka DG, Okamoto H, Thomashow MF, Knight MR. 2004.** Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiology* **135**(3): 1710-1717.
- Kosova K, Vitamvas P, Prasil IT. 2011.** Expression of dehydrins in wheat and barley under different temperatures. *Plant Science* **180**(1): 46-52.
- Kossmann J, Lloyd J. 2000.** Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* **35**(3): 141-196.
- Krasensky J, Jonak C. 2012.** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal Of Experimental Botany* **63**(4): 1593-1608.
- Krishna P, Gloor G. 2001.** The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* **6**(3): 238-246.
- Kumar A, Sharma S, Mishra S. 2010.** Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**(3): 297-306.
- Lahuta L, Górecki R. 2011.** Raffinose in seedlings of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) under osmotic stress and followed by recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**(3): 725-733.
- Lan T, Gao J, Zeng Q-Y. 2013.** Genome-wide analysis of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genetics & Genomes* **9**(1): 253-264.
- Lata C, Prasad M. 2011.** Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal Of Experimental Botany* **62**(14): 4731-4748.
- Leborgne N, Teulieres C, Cauvin B, Travert S, Boudet AM. 1995.** Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during frost-hardening in controlled conditions. *Trees - Structure and Function* **10**: 86-93.
- Leborgne N, Teulieres C, Travert S, Rols MP, Teissie J, Boudet AM. 1995.** Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. *European Journal of Biochemistry* **229**: 710-717.
- Lee JH, Yu DJ, Kim SJ, Choi D, Lee HJ. 2012.** Intraspecies differences in cold hardiness, carbohydrate content and β -amylase gene expression of *Vaccinium corymbosum* during cold acclimation and deacclimation. *Tree Physiol* **32**(12): 1533-1540.
- Lee U, Wie C, Escobar M, Williams B, Hong SW, Vierling E. 2005.** Genetic analysis reveals domain interactions of *Arabidopsis* Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell* **17**(2): 559-571.
- Li J, Mo X, Wang J, Chen N, Fan H, Dai C, Wu P. 2009.** BREVIS RADIX is involved in cytokinin-mediated inhibition of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Planta* **229**(3): 593-603.
- Li J, Qian X, Hu J, Sha B. 2009.** Molecular chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading. *J Biol Chem* **284**(35): 23852-23859.
- Li XW, Liu HJ, Xie SX, Yuan HY. 2013.** Isolation and characterization of two genes of the early light-induced proteins of *Camellia sinensis*. *Photosynthetica* **51**(2): 305-311.
- Lian Y, Zhao J, Xu P, Wang Y, Zhao J, Jia L, Fu Z, Jing L, Liu G, Peng S. 2013.** Protective Effects of Metallothionein on Isoniazid and Rifampicin-Induced Hepatotoxicity in Mice. *PLoS One* **8**(8): e72058.
- Lin B-L, Wang J-S, Liu H-C, Chen R-W, Meyer Y, Barakat A, Delseny M. 2001.** Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell stress & chaperones* **6**(3): 201.
- Lindemose S, O'Shea C, Jensen MK, Skriver K. 2013.** Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences* **14**(3): 5842-5878.
- Liu M, Shi J, Lu C. 2013.** Identification of stress-responsive genes in *Ammopiptanthus mongolicus* using ESTs generated from cold-and drought-stressed seedlings. *BMC Plant Biology* **13**(1): 88.

- Liu W, Kohlen W, Lillo A, Op den Camp R, Ivanov S, Hartog M, Limpens E, Jamil M, Smaczniak C, Kaufmann K, Yang WC, Hooiveld GJ, Charnikhova T, Bouwmeester HJ, Bisseling T, Geurts R. 2011.** Strigolactone biosynthesis in *Medicago truncatula* and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* **23**(10): 3853-3865.
- Lobell DB, Field CB. 2007.** Global scale climate–crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environmental Research Letters* **2**(1): 014002.
- Magrané J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW. 2004.** Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed β -amyloid in neurons. *The Journal of neuroscience* **24**(7): 1700-1706.
- Mahajan S, Tuteja N. 2005.** Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**(2): 139-158.
- Margoshes M, Vallee BL. 1957.** A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Amer Chem Soc* **79**: 2.
- Martin JT, Juniper BE. 1970.** The cuticles of plants. *The cuticles of plants*.
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010.** Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol Genet Genomics* **283**(2): 185-196.
- McCaskill D, Croteau R. 1999.** Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. *Nature Biotechnology* **17**(1): 31-36.
- McElrone AJ, Grant JA, Kluepfel DA. 2010.** The role of tyloses in crown hydraulic failure of mature walnut trees afflicted by apoplexy disorder. *Tree Physiology* **30**(6): 761-772.
- Meng S, Dane F, Si Y, Ebel R, Zhang C. 2008.** Gene expression analysis of cold treated versus cold acclimated *Poncirus trifoliata*. *Euphytica* **164**(1): 209-219.
- Meyer G, Kloppstech K. 1984.** A rapidly light-induced chloroplast protein with a higher turnover coded for by pea nuclear DNA. *J Biochem* **138**: 7.
- Mittal D, Chakrabarti S, Sarkar A, Singh A, Grover A. 2009.** Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. *Plant Physiol Biochem* **47**(9): 785-795.
- Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011.** AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*.
- Monroy AF, Dryanova A, Malette B, Oren DH, Ridha Farajalla M, Liu W, Danyluk J, Ubayasena LW, Kane K, Scoles GJ, Sarhan F, Gulick PJ. 2007.** Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Mol Biol* **64**(4): 409-423.
- Muhammad W, Asghar A. 2012.** MECHANISM OF DROUGHT TOLERANCE IN PLANT AND ITS MANAGEMENT THROUGH DIFFERENT METHODS. *Continental Journal of Agricultural Science* **5**(1).
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. 2006.** Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **140**(2): 411-432.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. 2009.** Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* **149**(1): 88-95.
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2012.** NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1819**(2): 97-103.
- Nanjo T, Futamura N, Nishiguchi M, Igasaki T, Shinozaki K, Shinohara K. 2004.** Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant and Cell Physiology* **45**(12): 1738-1748.
- Navarro M, Ayax C, Martinez Y, Laur J, El Kayal W, Marque C, Teulieres C. 2011.** Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. *Plant Biotechnol J* **9**(1): 50-63.
- 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. *Journal Of Experimental Botany* **60**(9): 2713-2724.
- Neštáková M, Havrlentova M, Farago J. 2000.** Effect of gelling agents on in vitro multiplication of two ornamental plants. *Biología (Bratislava)* **55**(4): 409-411.
- Nishiyama I 1995.** *Damage due to extreme temperatures*. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center.

- Nishizawa-Yokoi A, Yabuta Y, Shigeoka S. 2008.** The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signal Behav* **3**(11): 1016-1018.
- Norén H, Svensson P, Stegmark R, Funk C, Adamska I, Andersson B. 2003.** Expression of the early light-induced protein but not the PsbS protein is influenced by low temperature and depends on the developmental stage of the plant in field-grown pea cultivars. *Plant, Cell & Environment* **26**(2): 245-253.
- Nourissier S, Monteouis O. 2008.** In vitro rooting of two Eucalyptus urophylla X Eucalyptus grandis mature clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **44**(4): 263-272.
- Okamuro JK, Caster B, Villaruel R, Van Montagu M, Jofuku KD. 1997.** The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**(13): 7076-7081.
- Olvera-Carrillo Y, Luis Reyes J, Covarrubias AA. 2011.** Late embryogenesis abundant proteins: versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant Signal Behav* **6**(4): 586-589.
- Oono Y, Seki M, Satou M, Iida K, Akiyama K, Sakurai T, Fujita M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006.** Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Functional & Integrative Genomics*: 1-23.
- Owens LD, Wozniak CA. 1991.** Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **26**(2): 127-133.
- Park S, Keathley DE, Han KH. 2008.** Transcriptional profiles of the annual growth cycle in *Populus deltoides*. *Tree Physiol* **28**(3): 321-329.
- Peng Y, Lin W, Wei H, Krebs SL, Arora R. 2008.** Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation-associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense*. *Physiol Plant* **132**(1): 44-52.
- Peterbauer T, Mach L, Mucha J, Richter A. 2002.** Functional expression of a cDNA encoding pea (*Pisum sativum* L.) raffinose synthase, partial purification of the enzyme from maturing seeds, and steady-state kinetic analysis of raffinose synthesis. *Planta* **215**(5): 839-846.
- Pillet J, Egert A, Pieri P, Lecourieux F, Kappel C, Charon J, Gomès E, Keller F, Delrot S, Lecourieux D. 2012.** VvGOLS1 and VvHsfA2 are involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant Cell Physiol* **53**(10): 1776-1792.
- Pötter E, Kloppstech K. 1993.** Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur J Biochem* **214**(3): 779-786.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK. 2007.** Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**(3): 98-105.
- Potts BM, Reid JB. 1985.** Variation in the *Eucalyptus gunnii*-*archeri* complex. I. Variation in the adult phenotype. *Australian Journal of Botany* **33**(3): 337-359.
- Prasad P, Staggenborg S, Ristic Z. 2008.** Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*(responseofcrops): 301-355.
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2004.** Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiology* **45**(8): 1042-1052.
- Qin F, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011.** Achievements and Challenges in Understanding Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Plant and Cell Physiology* **52**(9): 1569-1582.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L. 2006.** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**(22): 2560-2570.
- Qu AL, Ding YF, Jiang Q, Zhu C. 2013.** Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **432**(2): 203-207.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003.** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* **133**(4): 1755-1767.
- Rajan VB, D'Silva P. 2009.** Arabidopsis thaliana J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Funct Integr Genomics* **9**(4): 433-446.

- Rasmussen-Poblete S, Valdes J, Gamboa MC, Valenzuela PDT, Krauskopf E. 2008.** Generation and analysis of an Eucalyptus globulus cDNA library constructed from seedlings subjected to low temperature conditions. *Electronic Journal of Biotechnology* **11**: 56-68.
- Reardon W, Chakrabortee S, Pereira TC, Tyson T, Banton MC, Dolan KM, Culleton BA, Wise MJ, Burnell AM, Tunnacliffe A. 2010.** Expression profiling and cross-species RNA interference (RNAi) of desiccation-induced transcripts in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *BMC Mol Biol* **11**: 6.
- Reinhold H, Soyk S, Simková K, Hostettler C, Marafino J, Mainiero S, Vaughan CK, Monroe JD, Zeeman SC. 2011.** β -amylase-like proteins function as transcription factors in Arabidopsis, controlling shoot growth and development. *Plant Cell* **23**(4): 1391-1403.
- Rodríguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O. 2005.** Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotecnología Aplicada* **22**(1): 1-10.
- Rohde A, Bhalerao RP. 2007.** Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* **12**(5): 217-223.
- Rowland LJ, Alkharouf N, Darwish O, Ogden EL, Polashock JJ, Bassil NV, Main D. 2012.** Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. *BMC Plant Biol* **12**: 46.
- Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A, Hurry V 2009.** Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. In: Kader JC, Delseny M eds. *Advances in Botanical Research, Vol 49*, 35-150.
- Sahin-Cevik M, Moore GA. 2006** Identification and expression analysis of cold-regulated genes from the cold-hardy Citrus relative *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Mol Biol* **62**(1-2): 83-97.
- Saito M, Yoshida M. 2011.** Expression analysis of the gene family associated with raffinose accumulation in rice seedlings under cold stress. *J Plant Physiol* **168**(18): 2268-2271.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2002.** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **290**(3): 998-1009.
- Saravitz DM, Pharr DM, Carter TE. 1987.** Galactinol synthase activity and soluble sugars in developing seeds of four soybean genotypes. *Plant Physiol* **83**(1): 185-189.
- Sarkar NK, Kim YK, Grover A. 2009.** Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics* **10**: 393.
- Sävenstrand H, Olofsson M, Samuelsson M, Strid A. 2004.** Induction of early light-inducible protein gene expression in *Pisum sativum* after exposure to low levels of UV-B irradiation and other environmental stresses. *Plant Cell Rep* **22**(7): 532-536.
- Scheidig A, Fröhlich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J. 2002.** Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* **30**(5): 581-591.
- Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E. 2008.** Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J* **54**(4): 702-711.
- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S. 1996.** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* **21**(8): 289-296.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K. 2002.** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **31**(3): 279-292.
- Serrano RL, Rodriguez P, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. 1996.** ATP-regulated activity of the plasmin-streptokinase complex: a novel mechanism involving phosphorylation of streptokinase. *Biochem J* **313** (Pt 1): 171-177.
- Shahbaz M, Ashraf M, Al-Qurainy F, Harris PJC. 2012.** Salt tolerance in selected vegetable crops. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**(4): 303-320.
- Shen L, Kang YG, Liu L, Yu H. 2011.** The J-domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**(2): 499-514.
- Shen YG, Zhang WK, Yan DQ, Du BX, Zhang JS, Liu Q, Chen SY. 2003.** Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. *Theor Appl Genet* **107**(1): 155-161.
- Siddiqua M, 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**(8): 1345-1359.

- Siddique M, Gernhard S, Koskull-Doring P, Vierling E, Scharf KD. 2008.** The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones* **13**: 183-197.
- Singh A, Singh U, Mittal D, Grover A. 2010.** Genome-wide analysis of rice ClpB/HSP100, ClpC and ClpD genes. *BMC Genomics* **11**: 95.
- Soltész A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W, Vágújfalvi A. 2013.** Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal Of Experimental Botany*.
- Su L, Zhao CZ, Bi YP, Wan SB, Xia H, Wang XJ. 2011.** Isolation and expression analysis of LEA genes in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Biosciences* **36**(2): 223-228.
- Sun X, Jones WT, Rikkerink EH. 2012.** GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochem J* **442**(1): 1-12.
- Sung D-Y, Kaplan F, Guy CL. 2001.** Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum* **113**(4): 443-451.
- Sung D-Y, Kaplan F, Lee K-J, Guy CL. 2003.** Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* **8**(4): 179-187.
- Sung DY, Vierling E, Guy CL. 2001.** Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology* **126**(2): 789-800.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2002.** Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**(4): 417-426.
- Teulieres C, Marque C. 2007.** II. 3 *Eucalyptus*. *Transgenic Crops V* **60**: 387.
- Thakur P, Kumar S, Malik JA, Berger JD, Nayyar H. 2010.** Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany* **67**(3): 429-443.
- Thomashow MF. 1999.** Plant cold acclimation : freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599.
- Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M. 2004.** Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **54**(4): 519-532.
- Tillett RL, Wheatley MD, Tattersall EAR, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC. 2012.** The *Vitis vinifera* C-repeat binding protein 4 (VvCBF4) transcriptional factor enhances freezing tolerance in wine grape. *Plant Biotechnology Journal* **10**(1): 105-124.
- Tom Shepherd DWG. 2006.** The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* **171**(3): 469-499.
- Tong H, Jin Y, Liu W, Li F, Fang J, Yin Y, Qian Q, Zhu L, Chu C. 2009.** DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *Plant J* **58**(5): 803-816.
- Tong Z, Hong B, Yang Y, Li Q, Ma N, Ma C, Gao J. 2009.** Overexpression of two chrysanthemum DgDREB1 group genes causing delayed flowering or dwarfism in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **71**(1-2): 115-129.
- Travert S, Valerio L, Fouraste I, Boudet AM, Teulière C. 1997.** Enrichment in specific soluble sugars of two *Eucalyptus* cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. *Plant Physiology* **114**(4): 1433-1442.
- Uemura M, Steponkus PL. 1999.** Cold Acclimation in Plants: Relationship Between the Lipid Composition and the Cryostability of the Plasma Membrane. *Journal of Plant Research* **112**(2): 245-254.
- Unda F, Canam T, Preston L, Mansfield SD. 2012.** Isolation and characterization of galactinol synthases from hybrid poplar. *Journal Of Experimental Botany* **63**(5): 2059-2069.
- Veramendi J, Villafranca M, Sota V, Mingo-Castel A. 1997.** Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Baraka. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **33**(3): 195-199.
- Verheul M, Picatto C, Stamp P. 1996.** Growth and development of maize (< i> *Zea mays*</i> L.) seedlings under chilling conditions in the field. *European Journal of Agronomy* **5**(1): 31-43.
- von Koskull-Döring P, Scharf KD, Nover L. 2007.** The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci* **12**(10): 452-457.
- Wahid A. 2003.** Physiological significance of morpho-anatomical features of halophytes with particular reference to Cholistan flora. *Int J Agric Biol* **5**(2): 207-212.
- Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, Lithgow T. 2004.** The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**(6): 567-571.

- Walworth AE, Rowland LJ, Polashock JJ, Hancock JF, Song GQ. 2012.** Overexpression of a blueberry-derived CBF gene enhances cold tolerance in a southern highbush blueberry cultivar. *Molecular Breeding* **30**(3): 1313-1323.
- Wang H, Huang Z, Chen Q, Zhang Z, Zhang H, Wu Y, Huang D, Huang R. 2004.** Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol Biol* **55**(2): 183-192.
- Wang ML, Hsu CM, Chang LC, Wang CS, Su TH, Huang YJ, Jiang L, Jauh GY. 2004.** Gene expression profiles of cold-stored and fresh pollen to investigate pollen germination and growth. *Plant Cell Physiol* **45**(10): 1519-1528.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**(1): 1-14.
- Wang X, Cai J, Liu F, Jin M, Yu H, Jiang D, Wollenweber B, Dai T, Cao W. 2012.** Pre-anthesis high temperature acclimation alleviates the negative effects of post-anthesis heat stress on stem stored carbohydrates remobilization and grain starch accumulation in wheat. *Journal of Cereal Science* **55**(3): 331-336.
- Wang X, Liu S, Liu X, Chen Z, Pang Y, Sun X, Tang K. 2004.** Molecular cloning and characterization of a CBF gene from *Capsella bursa-pastoris*. *DNA Seq* **15**(3): 180-187.
- Waters ER. 2013.** The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *Journal Of Experimental Botany* **64**(2): 391-403.
- Waters ER, Aevermann BD, Sanders-Reed Z. 2008.** Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress Chaperones* **13**(2): 127-142.
- Wei H, Dhanaraj AL, Rowland LJ, Fu Y, Krebs SL, Arora R. 2005.** Comparative analysis of expressed sequence tags from cold-acclimated and non-acclimated leaves of *Rhododendron catawbiense* Michx. *Planta* **221**(3): 406-416.
- Wierstra I, Kloppstech K. 2000.** Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley. *Plant Physiol* **124**(2): 833-844.
- Wirthensohn MG, Collins G, Jones GP, Sedgley M. 1999.** Variability in waxiness of *Eucalyptus gunnii* foliage for floriculture. *Scientia Horticulturae* **82**(3-4): 279-288.
- Wisniewski M, Bassett C, Norelli J, Macarasin D, Artlip T, Gasic K, Korban S. 2008.** Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiol Plant* **133**(2): 298-317.
- Wisniewski M, Norelli J, Bassett C, Artlip T, Macarasin D. 2011.** Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus x domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta* **233**(5): 971-983.
- Wrigley J, Fagg M. 2010.** Eucalypts.
- Xu M, Li L, Fan Y, Wan J, Wang L. 2011.** ZmCBF3 overexpression improves tolerance to abiotic stress in transgenic rice (*Oryza sativa*) without yield penalty. *Plant Cell Rep* **30**(10): 1949-1957.
- Yadav SK. 2010.** Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development* **30**(3): 515-527.
- Yakovlev IA, Asante DKA, Fossdal CG, Partanen J, Junttila O, Johnsen O. 2008.** Dehydrins expression related to timing of bud burst in Norway spruce. *Planta* **228**(3): 459-472.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2006.** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 781-803.
- Yang J-C, Chung J-D, Chen Z-Z. 1995.** Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* X urophylla and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. *Plant Cell Reports* **15**(3-4): 170-173.
- Yang W, Liu XD, Chi XJ, Wu CA, Li YZ, Song LL, Liu XM, Wang YF, Wang FW, Zhang CA, Liu Y, Zong JM, Li HY. 2011.** Dwarf apple MbDREB1 enhances plant tolerance to low temperature, drought, and salt stress via both ABA-dependent and ABA-independent pathways. *Planta* **233**(2): 219-229.
- Zeng Q, Chen X, Wood AJ. 2002.** Two early light-inducible protein (ELIP) cDNAs from the resurrection plant *Tortula ruralis* are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity, and high light. *Journal Of Experimental Botany* **53**(371): 1197-1205.
- Zhang F, Wan X, Zhang H, Liu G, Jiang M, Pan Y, Chen Q. 2012.** The effect of cold stress on endogenous hormones and CBF 1 homolog in four contrasting bamboo species. *Journal of Forest Research* **17**(1): 72-78.

- Zhao T, Liang D, Wang P, Liu J, Ma F. 2012.** Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Mol Genet Genomics* **287**(5): 423-436.
- Zhu J-K, Song C-p, Jagendorf A, Stevenson R 2003.** Interplant communication via airborne methyl jasmonate confers cold tolerance in an *Arabidopsis* mutant. In Biologists ASoP. *Plant Biology* 2003. Honolulu, Hawaii USA.
- Zhu JK. 2002.** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Revue Plant Biology* **53**: 247-273.
- Zhuang J, Cai B, Peng RH, Zhu B, Jin XF, Xue Y, Gao F, Fu XY, Tian YS, Zhao W, Qiao YS, Zhang Z, Xiong AS, Yao QH. 2008.** Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. *Biochemical And Biophysical Research Communications* **371**(3): 468-474.
- Zhuang J, Chen JM, Yao QH, Xiong F, Sun CC, Zhou XR, Zhang J, Xiong AS. 2011.** Discovery and expression profile analysis of AP2/ERF family genes from *Triticum aestivum*. *Mol Biol Rep* **38**(2): 745-753.
- Zhuo C, Wang T, Lu S, Zhao Y, Li X, Guo Z. 2012.** A cold responsive galactinol synthase gene from *Medicago falcata* (MfGolS1) is induced by myo-inositol and confers multiple tolerances to abiotic stresses. *Physiol Plant*.
- Zimmermann D, Westhoff M, Zimmermann G, Geßner P, Gessner A, Wegner LH, Rokitta M, Ache P, Schneider H, Vásquez JA, Kruck W, Shirley S, Jakob P, Hedrich R, Bentrup FW, Bamberg E, Zimmermann U. 2007.** Foliar water supply of tall trees: evidence for mucilage-facilitated moisture uptake from the atmosphere and the impact on pressure bomb measurements. *Protoplasma* **232**(1-2): 11-34.
- Zimmermann U, Schneider H, Wegner LH, Haase A. 2004.** Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state? *New Phytologist* **162**(3): 575-615.
- Zimmermann U, Wagner H-J, Heidecker M, Mimietz S, Schneider H, Szimtenings M, Haase A, Mitlöhner R, Kruck W, Hoffmann R, König W. 2002.** Implications of mucilage on pressure bomb measurements and water lifting in trees rooting in high-salinity water. *Trees - Structure and Function* **16**(2-3): 100-111.
- Zuther E, Buchel K, Hundertmark M, Stitt M, Hinch DK, Heyer AG. 2004.** The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **576**(1-2): 169-173.

Annexes

Annexe II-1 Caractérisation des GolS chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrGolS-01	Eucgr.B01791	Egrandis_v1_0.018917m	332	38.37	6.12	2	32735328..32736424	1	2	2
EgrGolS-02	Eucgr.B01793	Egrandis_v1_0.018973m	332	38.28	5.64	2	32745920..32747016	1	2	2
EgrGolS-03	Eucgr.B03987	Egrandis_v1_0.018661m	337	38.22	4.93	2	63760516..63762840	3		1
EgrGolS-04	Eucgr.H00906	Egrandis_v1_0.018674m	337	38.34	5.07	8	11257020..11255697	2		1
EgrGolS-05	Eucgr.H02584	Egrandis_v1_0.018465m	340	38.51	5.06	8	36224823..36226825	3	1	3
EgrGolS-06	Eucgr.H03312	Egrandis_v1_0.018541m	339	38.61	5.34	8	48522859..48524504	2		4
EgrGolS-07	Eucgr.K03563	Egrandis_v1_0.018649m	337	38.41	4.89	11	44777508..44778923	3		
EgrGolS-08	Eucgr.L00234	Egrandis_v1_0.018953m	332	38.45	5.64	17	29774..28678	1	2	3
EgrGolS-09	Eucgr.L00235	Egrandis_v1_0.049706m	335	38.28	4.93	17	35009..33883	1	3	6
EgrGolS-10	Eucgr.L00240	Egrandis_v1_0.018627m	337	38.78	5.23	17	148150..147027	1	1	2
EgrGolS-11	Eucgr.L00241	Egrandis_v1_0.018570m	338	38.81	5.39	17	180664..179534	1	1	2
EgrGolS-12	Eucgr.L00243	Egrandis_v1_0.018652m	337	38.71	5.23	17	203540..202417	1	1	1
EgrGolS-13	Eucgr.L00245	Egrandis_v1_0.018825m	334	38.52	5.07	17	230495..229375	1	2	2
EgrGolS-14	Eucgr.L00248	Egrandis_v1_0.041066m	337	38.59	5.24	17	283164..282039	1	3	4
EgrGolS-15	Eucgr.L00249	Egrandis_v1_0.018607m	337	38.66	5.45	17	289116..287991	1	3	4
EgrGolS-16	Eucgr.L00250	Egrandis_v1_0.052371m	338	38.88	5.54	17	294793..293657	1	3	3
EgrGolS-17	Eucgr.L00251	Egrandis_v1_0.018551m	338	38.95	5.45	17	303678..302543	1	3	3

Annexe II-2 Caractérisation des RS chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrRS-01	Eucgr.A02374	Egrandis_v1_0.003743m	754	82.58	5.69	1	34515322..34510342	11		
EgrRS-02	Eucgr.B00178	Egrandis_v1_0.003799m	750	83.36	5.10	2	2664666..2660691	13		1
EgrRS-03	Eucgr.B00223	Egrandis_v1_0.003706m	758	83.74	5.62	2	3289405..3293121	13		
EgrRS-04	Eucgr.C04266	Egrandis_v1_0.003391m	906	99.17	6.03	3	77870162..77866383	6	2	5
EgrRS-05	Eucgr.E04226	Egrandis_v1_0.003288m	791	87.28	5.23	5	73056432..73061528	13		1
EgrRS-06	Eucgr.F01231	Egrandis_v1_0.003635m	758	83.57	5.89	6	15540204..15536021	12	1	1
EgrRS-07	Eucgr.F03658	Egrandis_v1_0.003695m	763	85.03	5.58	6	44902867..44898486	12	3	5
EgrRS-08	Eucgr.H00997	Egrandis_v1_0.002615m	853	93.77	5.93	8	12251708..12248873	3		
EgrRS-09	Eucgr.I01755	Egrandis_v1_0.006251m	786	85.52	5.56	9	27469566..27467013	2		1
EgrRS-10	Eucgr.I01757	Egrandis_v1_0.002773m	839	91.84	5.48	9	27487189..27484388	3	1	2
EgrRS-11	Eucgr.J02233	Egrandis_v1_0.003548m	770	84.69	5.63	10	28227231..28231614	4	1	1
EgrRS[P]-1	Eucgr.K02779	Egrandis_v1_0.054640m	591	65.89	5.54	11	35872277..35868303	10		
EgrRS-12	Eucgr.K02813	Egrandis_v1_0.003349m	785	87.22	6.22	11	36144923..36141503	4		1
EgrRS-13	Eucgr.K03553	Egrandis_v1_0.002608m	853	94.06	5.87	11	44614053..44617194	4		

Annexe II-3 Caractérisation des β -AMY chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Phytozome locus name	Phytozome Alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Cellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE
Egrb-AMY1	Eucgr.A01734	Egrandis_v1_0.006932m	591	66.80	6.03	Cytoplasmic	1	27500332..27504772	7	1	1
Egrb-AMY2	Eucgr.D02573	Egrandis_v1_0.005199m	667	75.37	5.61	Cytoplasmic	4	40361667..40355217	9		4
Egrb-AMY3	Eucgr.E00138	Egrandis_v1_0.008170m	546	61.77	5.41	Chloroplast/Mitochondrial	5	1504398..1508714	7		1
Egrb-AMY4	Eucgr.E00139	Egrandis_v1_0.004613m	699	76.95	5.58	Nuclear/Mitochondrial	5	1512195..1519516	8	1	7
Egrb-AMY5	Eucgr.E00330	Egrandis_v1_0.008266m	543	60.61	7.24	Vacuole/Nuclear	5	3108654..3111495	3	2	2
Egrb-AMY6	Eucgr.E01023	Egrandis_v1_0.008026m	551	61.57	7.90	Chloroplast/Mitochondrial	5	10805036..10802091	3	1	1
Egrb-AMY7	Eucgr.H02879	Egrandis_v1_0.007122m	584	64.68	6.11	Vacuolar/Cytoplasmic	8	41908181..41905257	3		
Egrb-AMY8	Eucgr.H03767	Egrandis_v1_0.008679m	532	58.45	5.96	Cytoplasmic	8	54968233..54965365	1	1	1

Annexe II-4 Caractérisation des sHSP chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome Alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Cellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrsHSP-01	CP	Eucgr.A01416	Egrandis_v1_0.025516m	228	25.52	5.74	Plastid	1	22645057..22644168	1	1	2	1
EgrsHSP-02	CI	Eucgr.B02376	Egrandis_v1_0.029820m	158	18.06	5.84	Cytosol	2	44734332..44734805	0		1	2
EgrsHSP-03	CVI	Eucgr.B02741	Egrandis_v1_0.030208m	143	16.41	6.20	Cytosol	2	50341697..50342125	0			
EgrsHSP-04	CVI	Eucgr.B02743	Egrandis_v1_0.053553m	131	14.77	7.84	Cytosol	2	50383690..50384082	0	1	1	
EgrsHSP-05	CII	Eucgr.C00684	Egrandis_v1_0.032822m	111	12.52	9.51	Cytosol	3	11982739..11982407	0	1	1	
EgrsHSP-06	CII	Eucgr.C00678	Egrandis_v1_0.029182m	168	18.88	6.33	Cytosol	3	11941800..11941297	0	1	2	1
EgrsHSP-07	CII	nd	nd	118	13.00	6.35	Cytosol	3	11949979..11944389	0	1	1	
EgrsHSP-08	CII	Eucgr.C00690	Egrandis_v1_0.034372m	128	14.63	9.68	Cytosol	3	12036395..12035625	1			
EgrsHSP-09	CII	Eucgr.C03071	Egrandis_v1_0.030894m	156	17.31	5.81	Cytosol	3	57691673..57691206	0	1	1	2
EgrsHSP-10	CIV	Eucgr.D01309	Egrandis_v1_0.031185m	136	15.44	5.23	Cytosol	4	23596395..23595839	1	1	1	1
EgrsHSP-11	MT	Eucgr.D02070	Egrandis_v1_0.024798m	239	25.92	5.44	Mitochondria	4	25886290..25885805	0	3	3	1
EgrsHSP-12	MT	nd	nd	225	25.44	5.24	Mitochondria	4	34877302..34876131	2	1	1	
EgrsHSP-13	MT	Eucgr.D02073	Egrandis_v1_0.026100m	219	24.40	5.73	Mitochondria	4	34892149..34891295	1	1	2	1
EgrsHSP-14	MT	Eucgr.E00433	Egrandis_v1_0.026371m	200	22.01	5.43	Mitochondria	5	4141541..4142485	1	1	1	1
EgrsHSP-15	CV	Eucgr.F00998	Egrandis_v1_0.027503m	196	22.32	5.74	Cytosol	6	13258082..13257226	1			1
EgrsHSP-16	Per*	Eucgr.F02898	Egrandis_v1_0.030845m	141	15.78	6.84	Peroxisome	6	38641313..38642129	1			
EgrsHSP-17	MTII	Eucgr.F03866	Egrandis_v1_0.021389m	235	26.74	6.87	Mitochondria	6	46899328..46900323	1			3
EgrsHSP-18	ER	Eucgr.F04109	Egrandis_v1_0.026663m	210	23.86	6.05	ER	6	49332267..49331638	0	1	1	1
EgrsHSP-19	CP	Eucgr.F04479	Egrandis_v1_0.055111m	161	18.15	7.13	Plastid	6	53728820..53728413	0	1	1	1
EgrsHSP-20	ER	Eucgr.G00061	Egrandis_v1_0.027456m	197	21.85	6.86	ER	7	652775..653365	0			2
EgrsHSP-21	CP	Eucgr.H04692	Egrandis_v1_0.023513m	261	29.24	9.20	Plastid	8	67232581..67233674	1		1	2
EgrsHSP-22	CIII	Eucgr.I02136	Egrandis_v1_0.029742m	159	17.47	7.76	Cytosol	9	31143938..31145144	1	1	2	

Per* : Peroxisome

Annexe II-4 Caractérisation des sHSP chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Cellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrsHSP-23	CI	Eucgr.J00981	Egrandis_v1_0.029164m	168	18.93	5.58	Cytosol	10	10663874..10664377	0			1
EgrsHSP-24	CI	Eucgr.J01957	Egrandis_v1_0.045806m	162	18.81	5.83	Cytosol	10	25745140..25745625	0	1	5	
EgrsHSP-25	CI	Eucgr.J01958	Egrandis_v1_0.028485m	162	18.73	5.83	Cytosol	10	25752019..25752504	0	1	2	
EgrsHSP-26	CI	Eucgr.J01959	Egrandis_v1_0.049442m	162	18.73	5.82	Cytosol	10	25755907..25756392	0			
EgrsHSP-27	CI	Eucgr.J01960	Egrandis_v1_0.029594m	162	18.73	5.82	Cytosol	10	25761245..25761730	0	1	2	1
EgrsHSP-28	CI	nd	nd	162	18.71	6.19	Cytosol	10	25768170..25768654	0	1	2	1
EgrsHSP-29	CI	nd	nd	162	18.58	5.55	Cytosol	10	25776347..25776832	0	1		
EgrsHSP-30	CI	Eucgr.J01964	Egrandis_v1_0.027303m	158	18.08	5.37	Cytosol	10	25787561..25788034	0	2	3	1
EgrsHSP-31	CI	Eucgr.J01966	Egrandis_v1_0.029529m	163	18.77	8.86	Cytosol	10	25795220..25795708	0			2
EgrsHSP-32	CI	Eucgr.J01969	Egrandis_v1_0.029833m	158	18.07	7.94	Cytosol	10	25838926..25839399	0	1	2	2
EgrsHSP-33	CI	Eucgr.J01972	Egrandis_v1_0.029961m	156	18.03	7.94	Cytosol	10	25858001..25858468	0	1	2	2
EgrsHSP-34	CI	Eucgr.J01975	Egrandis_v1_0.054359m	162	18.69	5.82	Cytosol	10	25864524..25864039	0		1	
EgrsHSP-35	CI	Eucgr.J01976	Egrandis_v1_0.054740m	162	18.69	5.82	Cytosol	10	25869393..25868908	0			
EgrsHSP-36	CI	Eucgr.J01977	Egrandis_v1_0.047517m	162	18.73	5.82	Cytosol	10	25872193..25871708	0		1	
EgrsHSP-37	CI	Eucgr.J01978	Egrandis_v1_0.029588m	162	18.68	6.19	Cytosol	10	25877178..25876693	0			
EgrsHSP-38	CI	Eucgr.J01979	Egrandis_v1_0.053548m	162	18.84	5.82	Cytosol	10	25880044..25879559	0		2	1
EgrsHSP-39	CI	Eucgr.J01980	Egrandis_v1_0.050985m	162	18.68	5.82	Cytosol	10	25883528..25883043	0			
EgrsHSP-40	CI	Eucgr.J01981	Egrandis_v1_0.044900m	162	18.70	5.50	Cytosol	10	25886290..25885805	0		1	
EgrsHSP-41	CI	Eucgr.J01982	Egrandis_v1_0.039863m	162	18.74	5.56	Cytosol	10	25891176..25890691	0			
EgrsHSP-42	CI	Eucgr.J01983	Egrandis_v1_0.029465m	164	18.82	5.33	Cytosol	10	25902139..25901648	0			
EgrsHSP-43	CI	Eucgr.J01985	Egrandis_v1_0.029570m	162	18.64	5.72	Cytosol	10	25918941..25918456	0			
EgrsHSP-44	CI	Eucgr.J01986	Egrandis_v1_0.027952m	162	18.50	6.18	Cytosol	10	25926730..25926245	0		3	
EgrsHSP-45	CP	Eucgr.K00423	Egrandis_v1_0.025529m	228	25.28	8.90	Plastid	11	4776585..4777938	1		1	
EgrsHSP-46	CI	Eucgr.K03016	Egrandis_v1_0.040719m	162	18.27	6.59	Cytosol	11	38294814..38295299	0		1	1

Annexe II-5 Caractérisation des DNAj/HSP40 chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Groupe	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrDNAj-001	III	Eucgr.A00001	Egrandis_v1_0.052539m	12711..17350	1	10	2	2	
EgrDNAj-002	III	Eucgr.A00085	Egrandis_v1_0.023424m	1196398..1198526	1	1			
EgrDNAj-003	IV	Eucgr.A00221	Egrandis_v1_0.032489m	2585950..2589219	1	3	1	1	
EgrDNAj-004	III	Eucgr.A00280	Egrandis_v1_0.023511m	3509446..3511573	1	1			
EgrDNAj-005	II	Eucgr.A00544	Egrandis_v1_0.007311m	8861317..8866162	1	6		1	2
EgrDNAj-006	II	Eucgr.A00545	Egrandis_v1_0.008515m	8897917..8902638	1	7			
EgrDNAj-007	III	Eucgr.A01173	Egrandis_v1_0.032705m	18226232..18227682	1	2			
EgrDNAj-008	III	Eucgr.A01316	Egrandis_v1_0.023648m	21209350..21211763	1	3		2	2
EgrDNAj-009	III	Eucgr.A01493	Egrandis_v1_0.006120m	23356222..23358156	1	1			2
EgrDNAj-010	II	Eucgr.A01858	Egrandis_v1_0.017584m	28948384..28951276	1	2		2	1
EgrDNAj-011	II	Eucgr.A01861	Egrandis_v1_0.019273m	28957114..28960240	1	2	1	2	1
EgrDNAj-012	III	Eucgr.A02166	Egrandis_v1_0.028094m	32332131..32334121	1	2			
EgrDNAj-013	III	Eucgr.A02407	Egrandis_v1_0.022040m	34774483..34777336	1	7	1	2	
EgrDNAj-014	III	Eucgr.A02558	Egrandis_v1_0.022798m	36078443..36081128	1	5	1	1	2
EgrDNAj-015	I	Eucgr.B00059	Egrandis_v1_0.016298m	1254120..1262991	2	16	1	3	
EgrDNAj-016	III	Eucgr.B00103	Egrandis_v1_0.002976m	1831615..1834116	2	0		1	
EgrDNAj-017	II	Eucgr.B00399	Egrandis_v1_0.017660m	5224437..5227362	2	1		3	1
EgrDNAj-018	III	Eucgr.B00530	Egrandis_v1_0.004546m	6928694..6944930	2	18	1	1	
EgrDNAj-019	III	Eucgr.B00587	Egrandis_v1_0.006502m	7457222..7459515	2	2		1	2
EgrDNAj-020	II	Eucgr.B01595	Egrandis_v1_0.038026m	26886451..26887515	2	0			
EgrDNAj-021	III	Eucgr.B01771	Egrandis_v1_0.003549m	32319595..32321907	2	0			
EgrDNAj-022	III	nd	nd	35224315..35227532	2	6	3	5	
EgrDNAj-023	III	Eucgr.B01968	Egrandis_v1_0.023374m	37082898..37085681	2	6		1	
EgrDNAj[P]-001	III	nd	nd	37094221..37097689	2	5			1
EgrDNAj-024	III	Eucgr.B02081	Egrandis_v1_0.029319m	40377863..40380015	2	6	1	2	1
EgrDNAj-025	II	Eucgr.B02802	Egrandis_v1_0.017898m	51488994..51494299	2	3	1	3	1
EgrDNAj-026	III	Eucgr.B02899	Egrandis_v1_0.028113m	52822402..52823790	2	4	2	4	1
EgrDNAj-027	II	Eucgr.B02999	Egrandis_v1_0.013953m	54978740..54983255	2	10			
EgrDNAj-028	II	Eucgr.B03370	Egrandis_v1_0.045976m	58560698..58565408	2	10			
EgrDNAj-029	II	Eucgr.B03403	Egrandis_v1_0.018746m	58845649..58848284	2	1	1	3	
EgrDNAj-030	II	Eucgr.B03981	Egrandis_v1_0.004186m	63645602..63652609	2	8		1	1
EgrDNAj-031	II	Eucgr.C01157	Egrandis_v1_0.016728m	18061683..18062786	3	0	1	4	
EgrDNAj-032	IV JLP2	Eucgr.C01583	Egrandis_v1_0.026393m	26315183..26318898	3	5	1	1	
EgrDNAj-033	III	Eucgr.C01802	Egrandis_v1_0.036267m	30749431..30751167	3	3			
EgrDNAj-034	II	Eucgr.C01816	Egrandis_v1_0.020867m	30925776..30927456	3	2		2	
EgrDNAj[P]-002	III	nd	nd	48131953..48132897	3	2			1
EgrDNAj-035	III	Eucgr.C02748	Egrandis_v1_0.026929m	52624349..52625214	3	3			1
EgrDNAj-036	III	Eucgr.C03150	Egrandis_v1_0.025972m	59867891..59868948	3	3			
EgrDNAj-037	III	Eucgr.C04138	Egrandis_v1_0.000029m	76177143..76194929	3	21	1	2	
EgrDNAj-038	III	Eucgr.D00243	Egrandis_v1_0.051564m	3921899..3925333	4	9	1	3	
EgrDNAj-039	III	Eucgr.D00271	Egrandis_v1_0.009859m	4342530..4345091	4	6			

Annexe II-5 Caractérisation des DNAj/HSP40 chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Groupe	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrDNAj-040	II	Eucgr.D00597	Egrandis_v1_0.018402m	11069612..11071614	4	2			1
EgrDNAj-041	III	Eucgr.D00958	Egrandis_v1_0.041312m	17500952..17501380	4	0		2	
EgrDNAj-042	I	Eucgr.D02530	Egrandis_v1_0.013208m	39872581..39876589	4	6			1
EgrDNAj-043	III	Eucgr.E00426	Egrandis_v1_0.008290m	4086477..4093719	5	12	2	2	2
EgrDNAj-044	III	Eucgr.F00104	Egrandis_v1_0.025089m	1918569..1921827	6	6			
EgrDNAj-045	III	Eucgr.F00241	Egrandis_v1_0.028503m	3462563..3463105	6	0			1
EgrDNAj-046	II	Eucgr.F00419	Egrandis_v1_0.019003m	5320630..5321625	6	0			
EgrDNAj-047	III	Eucgr.F01444	Egrandis_v1_0.008060m	18700124..18706521	6	8		2	
EgrDNAj-048	III	Eucgr.F01963	Egrandis_v1_0.052463m	26255726..26261538	6	10	1	2	
EgrDNAj-049	III	Eucgr.F02131	Egrandis_v1_0.031386m	28872784..28875396	6	5	1	1	1
EgrDNAj-050	III	Eucgr.F02213	Egrandis_v1_0.025236m	30063732..30067229	6	6	1	1	
EgrDNAj-051	III	Eucgr.F03659	Egrandis_v1_0.030055m	44909888..44910352	6	0		2	1
EgrDNAj-052	III	Eucgr.F03733	Egrandis_v1_0.022623m	45501904..45504320	6	4			
EgrDNAj-053	III	Eucgr.F03971	Egrandis_v1_0.029922m	47971289..47972463	6	2			
EgrDNAj-054	III	Eucgr.F03977	Egrandis_v1_0.029897m	48050832..48052020	6	2	1	1	
EgrDNAj-055	III	Eucgr.F04124	Egrandis_v1_0.006131m	49439762..49448228	6	11			
EgrDNAj-056	III	Eucgr.F04280	Egrandis_v1_0.016325m	51092123..51095741	6	8		1	
EgrDNAj-057	III	Eucgr.G00982	Egrandis_v1_0.010979m	16912179..16913621	7	0	1	3	
EgrDNAj-058	III	Eucgr.G01646	Egrandis_v1_0.015594m	29698585..29703075	7	7	2	2	
EgrDNAj-059	III	Eucgr.G01791	Egrandis_v1_0.014859m	33113618..33116082	7	3		1	
EgrDNAj-060	III	Eucgr.G01935	Egrandis_v1_0.003406m	35285939..35288284	7	0	1	1	
EgrDNAj-061	II	Eucgr.G02304	Egrandis_v1_0.014004m	41361981..41367009	7	10	1	3	
EgrDNAj-062	III	Eucgr.G02581	Egrandis_v1_0.010375m	44232701..44235590	7	4			1
EgrDNAj-063	III	Eucgr.G02806	Egrandis_v1_0.032908m	46279588..46281306	7	3	1	2	1
EgrDNAj-064	III	Eucgr.G03185	Egrandis_v1_0.005616m	50227803..50229746	7	0			
EgrDNAj-065	I	Eucgr.G03399	Egrandis_v1_0.012192m	51983626..51991006	7	17	3	3	2
EgrDNAj-066	IV JLP3	Eucgr.H00433	Egrandis_v1_0.032460m	5685147..5687163	8	3	1	1	1
EgrDNAj-067	I	Eucgr.H00540	Egrandis_v1_0.012805m	7506627..7512776	8	10	1	2	1
EgrDNAj-068	III	Eucgr.H00599	Egrandis_v1_0.032545m	8153440..8155153	8	3		4	
EgrDNAj-069	III	Eucgr.H01056	Egrandis_v1_0.006004m	12803615..12806535	8	2			
EgrDNAj-070	III	Eucgr.H02689	Egrandis_v1_0.027035m	38139748..38141566	8	1			1
EgrDNAj-071	III	Eucgr.H03712	Egrandis_v1_0.001627m	54152223..54155147	8	0		4	
EgrDNAj-072	III	Eucgr.H05116	Egrandis_v1_0.001653m	73274292..73282245	8	7			
EgrDNAj-073	III	Eucgr.I00248	Egrandis_v1_0.022651m	4944202..4947894	9	6			
EgrDNAj-074	III	Eucgr.I00723	Egrandis_v1_0.008909m	15182339..15188120	9	4	1	2	
EgrDNAj-075	III	Eucgr.I01393	Egrandis_v1_0.025317m	24398526..24399302	9	1			1
EgrDNAj-076	III	Eucgr.I02134	Egrandis_v1_0.026993m	31131255..31134438	9	5	1	4	
EgrDNAj-077	III	Eucgr.I02342	Egrandis_v1_0.029908m	33979811..33980284	9	0	1	2	
EgrDNAj-078	III	Eucgr.I02680	Egrandis_v1_0.054290m	37946284..37946853	9	0	3	3	
EgrDNAj-079	III	Eucgr.I02686	Egrandis_v1_0.043609m	38017852..38019044	9	3			
EgrDNAj-080	I	Eucgr.J00292	Egrandis_v1_0.014029m	3012782..3015590	10	5	2	2	

Annexe II-5 Caractérisation des DNAj/HSP40 chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Groupe	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrDNAj-081	III	Eucgr.J00577	Egrandis_v1_0.024344m	6497297..6502497	10	8		1	
EgrDNAj-082	I	Eucgr.J00583	Egrandis_v1_0.014029m	6554341..6556530	10	5	2	3	1
EgrDNAj-083	III	Eucgr.J00737	Egrandis_v1_0.000491m	7800488..7809769	10	10	1	1	
EgrDNAj-084	III	Eucgr.J02231	Egrandis_v1_0.020834m	28212452..28214033	10	5			1
EgrDNAj-085	III	Eucgr.J02609	Egrandis_v1_0.024364m	31838320..31840512	10	5		1	1
EgrDNAj-086	I	Eucgr.J03072	Egrandis_v1_0.010276m	37851766..37859421	10	10	2	3	1
EgrDNAj-087	III	Eucgr.J03121	Egrandis_v1_0.029686m	38276851..38278016	10	2		2	2
EgrDNAj-088	III	Eucgr.K00072	Egrandis_v1_0.031955m	1448559..1450761	11	5			
EgrDNAj-089	III	Eucgr.K00578	Egrandis_v1_0.031313m	6384444..6386135	11	5		1	
EgrDNAj-090	III	Eucgr.K00647	Egrandis_v1_0.004751m	7321627..7323702	11	0	1	2	
EgrDNAj-091	III	Eucgr.K01146	Egrandis_v1_0.018598m	14523801..14530319	11	8	1	3	
EgrDNAj-092	III	Eucgr.K01499	Egrandis_v1_0.020449m	18106502..18108822	11	2	1	5	
EgrDNAj-093	III	Eucgr.K01572	Egrandis_v1_0.000993m	18945814..18956016	11	11		1	1
EgrDNAj-094	III	Eucgr.K01842	Egrandis_v1_0.023924m	22846236..22849912	11	5	2	2	
EgrDNAj-095	III	Eucgr.K02127	Egrandis_v1_0.027704m	28415969..28416839	11	1	1	1	
EgrDNAj-096	III	Eucgr.K03238	Egrandis_v1_0.010574m	41173492..41177988	11	8	1	1	2
EgrDNAj-097	I	Eucgr.K03340	Egrandis_v1_0.012745m	42434026..42439818	11	6			1
EgrDNAj-098	III	Eucgr.K03532	Egrandis_v1_0.018063m	44476252..44480086	11	9		1	
EgrDNAj-099	III	nd	nd	44525195..44527610	11	2	1	2	1

Annexe II-6 Caractérisation des HSP60 chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Subcellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrHSP60-01	CCT	Eucgr.A02095	Egrandis_v1_0.008391m	540	58.25	5.37	Cytoplasmic	1	31681361..31676498	12		1	1
EgrHSP60-02	Cpn60	Eucgr.B02532	Egrandis_v1_0.005399m	583	61.41	5.21	Chloroplast	2	47409892..47412910	7		1	1
EgrHSP60-03	CCT	Eucgr.B03239	Egrandis_v1_0.008589m	535	59.16	5.40	Cytoplasmic	2	57331242..57327389	8	1	1	1
EgrHSP60-04	Cpn60	Eucgr.B03593	Egrandis_v1_0.006234m	620	66.14	5.52	Chloroplast / Mitochondrial	2	60412742..60416486	12			
EgrHSP60-05	Cpn60	Eucgr.D00059	Egrandis_v1_0.007107m	584	62.01	6.04	Chloroplast	4	886389..881302	8			
EgrHSP60-06	CCT	Eucgr.E02761	Egrandis_v1_0.007864m	557	60.58	5.75	Cytoplasmic	5	44688277..44695268	12			1
EgrHSP60-07	CCT	Eucgr.F01711	Egrandis_v1_0.007059m	527	57.24	5.74	Plasma membrane/ Vacuolar	6	21858043..21852908	10			1
EgrHSP60-08	CCT	Eucgr.F02483	Egrandis_v1_0.008545m	535	59.13	5.88	Mitochondrial	6	34392697..34385615	14		1	1
EgrHSP60-09	Cpn60	Eucgr.F03134	Egrandis_v1_0.005483m	573	61.42	6.35	Mitochondrial	6	40733542..40740485	17	1	1	
EgrHSP60-10	CCT	Eucgr.F03537	Egrandis_v1_0.008850m	527	57.36	5.57	Chloroplast / Vacuolar	6	43970125..43965685	10			
EgrHSP60-11	Cpn60	Eucgr.G02400	Egrandis_v1_0.006849m	594	64.00	9.03	Chloroplast	7	42568252..42563859	13			
EgrHSP60-12	Cpn60	Eucgr.H02866	Egrandis_v1_0.007379m	575	61.19	5.84	Mitochondrial	8	41659289..41663536	17			1
EgrHSP60-13	CCT	Eucgr.I00662	Egrandis_v1_0.008193m	544	59.07	5.86	Cytoplasmic	9	14056063..14048287	16		1	1
EgrHSP60-14	CCT	Eucgr.J00618	Egrandis_v1_0.007763m	562	60.38	6.20	Cytoplasmic	10	6867434..6861312	13	1	1	
EgrHSP60-15	CCT	Eucgr.K02244	Egrandis_v1_0.044781m	535	57.56	6.74	Cytoplasmic	11	29647281..29645677	0			1

Annexe II-7 Caractérisation des HSP70 chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pl	Subcellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrHSP70-01	Hsp110/SSE	Eucgr.C01277	Egrandis_v1_0.001909m	939	103.16	5.22	Chloroplast/ Vacuolar	3	20053804..20043666	13	1	1	
EgrHSP70[P]-01	Hsp110/SSE	Eucgr.J02987	Egrandis_v1_0.002627m	373	41.13	6.71	Cytoplasmic	5	8641269..8637055	2			
EgrHSP70-02	DnaK	Eucgr.E01024	Egrandis_v1_0.004242m	667	73.56	5.07	Endoplasmic reticulum	5	10808141..10811622	7			1
EgrHSP70-03	DnaK	Eucgr.E03189	Egrandis_v1_0.009020m	522	56.96	5.80	Cytoplasmic	5	54262635..54260102	1	5	5	
EgrHSP70-04	Hsp110/SSE	Eucgr.F00767	Egrandis_v1_0.004276m	774	86.80	6.07	Nuclear	6	10032082..10027186	8	1	2	2
EgrHSP70-05	DnaK	nd	nd	655	71.77	5.15	Cytoplasmic	6	48071465..48069501	0	3	4	
EgrHSP70-06	DnaK	Eucgr.F03980	Egrandis_v1_0.003388m	658	72.29	5.30	Cytoplasmic	6	48079253..48081226	0	1	1	2
EgrHSP70-07	DnaK	Eucgr.G00235	Egrandis_v1_0.004469m	706	75.81	5.50	Plasma membrane	7	3747594..3743692	7			1
EgrHSP70-08	DnaK	Eucgr.G01045	Egrandis_v1_0.004853m	684	73.08	5.62	Chloroplast	7	18099929..18103596	5			1
EgrHSP70[P]-02	Hsp110/SSE	Eucgr.J02987	Egrandis_v1_0.002630m	486	53.18	9.53	Plasma membrane	7	22226441..22222351	3			
EgrHSP70-09	DnaK	Eucgr.H03518	Egrandis_v1_0.007477m	572	61.94	5.40	Plasma membrane/ Chloroplast	8	51990208..51988493	0	1	2	
EgrHSP70-10	DnaK	Eucgr.H04513	Egrandis_v1_0.006282m	665	73.21	5.17	Endoplasmic reticulum	8	64416865..64413755	7		3	1
EgrHSP70-11	DnaK	Eucgr.I02583	Egrandis_v1_0.004893m	682	73.30	5.75	Mitochondrial/ Chloroplast	9	37130306..37126754	5		2	2
EgrHSP70-12	DnaK	Eucgr.I02771	Egrandis_v1_0.004259m	718	76.03	5.45	Chloroplast	9	38692189..38688665	7	2	4	1
EgrHSP70-13	DnaK	Eucgr.J00023	Egrandis_v1_0.005576m	649	71.27	5.13	Cytoplasmic	10	455802..458400	1	1	2	2
EgrHSP70-14	DnaK	Eucgr.J00025	Egrandis_v1_0.003884m	649	71.14	5.16	Cytoplasmic	10	507094..509806	1	1	2	2
EgrHSP70[P]-03	DnaK	Eucgr.J00025.7	Egrandis_v1_0.003976m	498	55.21	5.36	Chloroplast/ Mitochondrial	10	533238..529848	3			
EgrHSP70-15	Hsp110/SSE	Eucgr.J02987	Egrandis_v1_0.002630m	851	93.75	5.15	Nuclear	10	37092515..37097452	9		2	
EgrHSP70-16	Hsp110/SSE	Eucgr.J02991	Egrandis_v1_0.002416m	874	95.66	5.09	Nuclear	10	37118228..37123035	8	1	4	
EgrHSP70-17	DnaK	Eucgr.J03127	Egrandis_v1_0.005502m	652	71.47	5.43	Cytoplasmic/ Vacuolar	10	38347322..38345367	0			1
EgrHSP70-18	DnaK	Eucgr.L03563	Egrandis_v1_0.014542m	406	45.01	5.26	Cytoplasmic/ Nuclear	3673	1..1,251				

Annexe II-8 Caractérisation des HSP90 chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Subcellular localization	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrHSP90A[P]-01	HSP90A	nd	nd	278	32.11	5.25	Cytoplasmic	1	1054018..1052168	4			
EgrHSP90C-01	HSP90B	Eucgr.A01044	Egrandis_v1_0.003245m	794	89.28	5.20	Chloroplast	1	16260037..16265710	19			
EgrHSP90A-01	HSP90A	Eucgr.A02734	Egrandis_v1_0.004510m	704	80.68	5.04	Cytoplasmic	1	37937570..37934478	3	1	1	1
EgrHSP90A-02	HSP90A	Eucgr.B01235	Egrandis_v1_0.007453m	666	76.88	5.29	Chloroplast/ Endoplasmic reticulum	2	20148863..20151794	7	1	1	
EgrHSP90C-02	HSP90C	Eucgr.B03110	Egrandis_v1_0.003189m	799	90.60	4.91	Chloroplast	2	56092792..56085937	18			1
EgrHSP90A[P]-02	HSP90A	nd	nd	615	71.30	5.39	Cytoplasmic	2	58209339..58207268	3	1	1	
EgrHSP90A[P]-03	HSP90A	nd	nd	428	49.83	5.04	Cytoplasmic/ Plasma membrane	3	631262..633055	3			
EgrHSP90A-03	HSP90A	Eucgr.C01179	Egrandis_v1_0.051652m	691	79.01	4.92	Cytoplasmic	3	18274267..18271251	3	1	2	
EgrHSP90A[P]-04	HSP90A	nd	nd	327	37.45	6.67	Cytoplasmic	3	18446508..18447872	2		1	
EgrHSP90A-04	HSP90A	Eucgr.C02653	Egrandis_v1_0.049918m	692	80.10	5.37	Chloroplast/ Endoplasmic reticulum	3	50639873..50637258	4		1	
EgrHSP90A[P]-05	HSP90A	Eucgr.C04059	Egrandis_v1_0.011365m	471	54.71	5.49	Cytoplasmic/ Plasma membrane	3	75244938..75241943	6			
EgrHSP90A-05	HSP90A	Eucgr.E00653	Egrandis_v1_0.004525m	703	81.11	5.01	Cytoplasmic	5	6181243..6184209	3	1	2	
EgrHSP90A[P]-06	HSP90A	Eucgr.E03944	Egrandis_v1_0.033920m	362	42.45	5.54	Endoplasmic reticulum	5	68456621..68457775	4	2	3	1
EgrHSP90A-06	HSP90A	Eucgr.F03673	Egrandis_v1_0.004524m	703	80.56	4.94	Cytoplasmic	6	45060059..45063143	2	1	3	

Annexe II-8 Caractérisation des HSP90 chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Subcellular localization	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrHSP90A[P]-07	HSP90A	Eucgr.G00012	Egrandis_v1_0.040555m	309	36.14	5.23	Cytoplasmic/ Plasma membrane	7	127448..126313	3			1
EgrHSP90B	HSP90A	Eucgr.H00972	Egrandis_v1_0.002935m	822	93.77	4.81	Endoplasmic reticulum/ Extracellular	8	11941511..11947008	14		3	
EgrHSP90A[P]-08	HSP90A	Eucgr.H03726	Egrandis_v1_0.052440m	322	38.17	5.25	Cytoplasmic/ Plasma membrane	8	54314016..54315136	2			1
EgrHSP90A[P]-09	HSP90C	Eucgr.J00713	Egrandis_v1_0.017582m	423	48.80	5.54	Cytoplasmic/ Plasma membrane	10	7582139..7579771	4			
EgrHSP90A[P]-10	HSP90A	Eucgr.J01486	Egrandis_v1_0.025366m	319	36.56	4.61	Nuclear/ Peroxisomal	10	19052039..19050496	4		1	
EgrHSP90A-07	HSP90A	Eucgr.K00295	Egrandis_v1_0.004588m	700	80.58	5.05	Cytoplasmic	11	3606124..3608695	3	1	6	1
EgrHSP90A[P]-11	HSP90A	nd	nd	429	49.55	5.42	Cytoplasmic/ Plasma membrane	11	32448708..32451075	4			
EgrHSP90A[P]-12	HSP90A	Eucgr.K03124	Egrandis_v1_0.008775m	529	62.01	5.60	Cytoplasmic	11	39867201..39865363	3	1	1	

Annexe II-9 Caractérisation des HSP100 chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Subcellular location	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE	HSE
EgrHSP100-I1	ClpB	Eucgr.B00581	Egrandis_v1_0.002430m	872	97.00	6.56	Vacuolar	2	7384971..7388096	5		2	1
EgrHSP100-I2	ClpA	Eucgr.C00199	Egrandis_v1_0.001188m	1050	115.35	8.63	Chloroplast	3	4592947..4596683	2		1	1
EgrHSP100-I3	ClpB	Eucgr.C02666	Egrandis_v1_0.001494m	996	110.56	7.92	Chloroplast	3	50901195..50888771	9	2	2	
EgrHSP100[P]-I1	ClpB	nd	nd	771	86.09	6.89	Chloroplast	3	51416270..51122116	10	3	3	
EgrHSP100-II1	ClpX	Eucgr.F04107	Egrandis_v1_0.004144m	724	77.61	8.67	Nuclear/ Mitochondrial	6	49324266..49316105	14	1	1	1
EgrHSP100-II2	ClpX	Eucgr.G00073	Egrandis_v1_0.007228m	581	62.49	7.55	Chloroplast	7	802280..809686	13		1	
EgrHSP100-I4	ClpD	Eucgr.H00243	Egrandis_v1_0.001629m	974	106.34	8.41	Chloroplast	8	3479330..3484856	11		1	
EgrHSP100[P]-I2	ClpB	Eucgr.H01528	Egrandis_v1_0.041656m	378	41.54	7.73	Vacuolar/ Chloroplast	8	18194417..18193284	0	3	4	
EgrHSP100-I5	ClpB	Eucgr.I01982	Egrandis_v1_0.001619m	976	108.85	6.17	Chloroplast	9	29608381..29614564	9	1	1	1
EgrHSP100-I6	ClpA	Eucgr.J00203	Egrandis_v1_0.000900m	1123	122.50	5.82	Nuclear	10	2064174..2058888	2	2	2	
EgrHSP100-II3	ClpX	Eucgr.K00383	Egrandis_v1_0.006842m	594	64.91	5.88	Chloroplast	11	4472479..4465835	14	1	3	
EgrHSP100-I7	ClpC	Eucgr.K02198.1	Egrandis_v1_0.002035m	922	101.97	6.41	Chloroplast	11	29243028..29248247	8	1	2	
EgrHSP100-I8	ClpC	Eucgr.K02198.2	Egrandis_v1_0.002033m	913	100.73	6.18	Chloroplast	11	29250298..29256272	8			
EgrHSP100-I9	ClpB	Eucgr.K02521	Egrandis_v1_0.044829m	909	101.32	5.83	Vacuolar/ Cytoplasmic	11	32354459..32357646	5	3	4	

Annexe II-10 Caractérisation des Elip chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrSep-1	Two-Helix	Eucgr.A02934	Egrandis_v1_0.038728m	251	28.00	6.45	1	39763444..39762433	2		4
EgrElip-1	Three-Helix	Eucgr.B01004	Egrandis_v1_0.028410m	181	19.20	9.26	2	14609579..14610406	2		
EgrElip-2	Three-Helix	Eucgr.B01006	Egrandis_v1_0.028435m	181	19.21	9.23	2	14621302..14622150	2		
EgrElip-3	Three-Helix	Eucgr.B01007	Egrandis_v1_0.022056m	179	18.82	9.57	2	14636060..14638825	2		1
EgrElip-4	Three-Helix	Eucgr.B01008.3	Egrandis_v1_0.024790m	181	18.97	9.25	2	14642139..14643020	2	1	2
EgrElip-5	Three-Helix	Eucgr.B01008.7	Egrandis_v1_0.028620m	178	18.72	9.51	2	14646737..14647610	3		1
EgrElip-6	Three-Helix	Eucgr.B01895.3	Egrandis_v1_0.028418m	181	19.31	9.72	2	36026261..36027321	2		
EgrElip-7	Three-Helix	Eucgr.B01895.2	Egrandis_v1_0.027357m	199	21.00	9.51	2	36028201..36029113	2	2	2
EgrElip-8	Three-Helix	Eucgr.B01896.1	Egrandis_v1_0.028431m	199	21.00	9.51	2	36032384..36033262	2	1	2
EgrElip-9	Three-Helix	Eucgr.B01896.3	Egrandis_v1_0.028411m	181	19.20	9.57	2	36036966..36037848	2		1
EgrOhp-1	One-Helix	Eucgr.G01508	Egrandis_v1_0.030700m	143	15.42	9.91	7	26105786..26106645	1	1	2
EgrOhp-2	One-Helix	Eucgr.G00292	Egrandis_v1_0.042808m	140	15.48	6.83	7	4858500..4859389	2		1
EgrSep-2	Two-Helix	Eucgr.H03224	Egrandis_v1_0.028024m	144	14.67	11.20	8	47542433..47544366	3	1	1
EgrSep-3	Two-Helix	Eucgr.I00326	Egrandis_v1_0.026865m	200	21.26	7.57	9	6207558..6206093	1		2
EgrOhp-3	One-Helix	Eucgr.K03081	Egrandis_v1_0.032099m	121	13.14	10.36	11	39087198..39088063	2	1	2
EgrOhp-4	One-Helix	Eucgr.K03086	Egrandis_v1_0.033295m	114	12.71	11.29	11	39229067..39229932	2		2
EgrOhp[P]-1	One-Helix	Eucgr.K03089	Egrandis_v1_0.032796m	121	13.01	10.77	11	39253489..39254353	2		1
EgrOhp-5	One-Helix	Eucgr.K03092	Egrandis_v1_0.032101m	121	13.22	10.12	11	39285749..39286610	2	1	1
EgrOhp-6	One-Helix	Eucgr.K03094	Egrandis_v1_0.048443m	115	12.61	5.30	11	39345913..39346667	1		
EgrOhp[P]-2	One-Helix	nd	nd	159	17.38	10.34	11	39587491..39588370	2	1	1
EgrOhp-7	One-Helix	nd	nd	181	20.62	9.87	11	39665417..39667190	3	3	5

Annexe II-11 Caractérisation des LEA chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sous-famille	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrLEAlike-01	LEA-like	Eucgr.A00854	Egrandis_v1_0.041036m	13712484..13713107	1	0		1
EgrLEAlike-02	LEA-like	Eucgr.A01404	Egrandis_v1_0.026705m	22544601..22545230	1	0	1	1
EgrLEA4-01	LEA4	Eucgr.A01582	Egrandis_v1_0.042868m	24771102..24773215	1	3		
EgrLEAlike-03	LEA-like	Eucgr.A01717	Egrandis_v1_0.047299m	27358413..27358966	1	1		
EgrLEAlike-04	LEA-like	Eucgr.A01719	Egrandis_v1_0.053654m	27366661..27367206	1	0		
EgrDHN-01	DHN	Eucgr.A02128	Egrandis_v1_0.033759m	31969062..31966754	1	0	3	3
EgrLEAlike-05	LEA-like	Eucgr.A02388	Egrandis_v1_0.027385m	34647033..34647632	1	0		1
EgrLEAlike-06	LEA-like	Eucgr.A02596	Egrandis_v1_0.026656m	36465062..36465697	1	0		
EgrLEAlike-07	LEA-like	Eucgr.A02597	Egrandis_v1_0.027760m	36469309..36469914	1	0		
EgrLEAlike-08	LEA-like	Eucgr.A02687	Egrandis_v1_0.028082m	37453136..37453699	1	0		1
EgrLEAlike-10	LEA-like	Eucgr.B03819	Egrandis_v1_0.048422m	62291132..62291800	2	0	1	2
EgrSMP-01	SMP	Eucgr.B01083	Egrandis_v1_0.039574m	17124788..17125797	2	2	2	2
EgrSMP-02	SMP	Eucgr.B01084	Egrandis_v1_0.050502m	17128975..17129846	2	2	1	1
EgrSMP-03	SMP	Eucgr.B01734	Egrandis_v1_0.040079m	31803602..31804687	2	2		
EgrLEAlike-09	LEA-like	Eucgr.B03782	Egrandis_v1_0.051063m	62003568..62004368	2	0	1	2
EgrLEAlike-11	LEA-like	Eucgr.C00894	Egrandis_v1_0.044271m	14270222..14270866	3	0	3	3
EgrLEA5[P]-01	LEA5	nd	nd	57024235.. 57024071	3	0		
EgrLEA4-02	LEA4	Eucgr.D00608	Egrandis_v1_0.051493m	11,202,579..11,201,611	4	1		1
EgrLEAlike-12	LEA-like	Eucgr.D00819	Egrandis_v1_0.025603m	15217889..15218572	4	0	1	1
EgrLEAlike-13	LEA-like	Eucgr.D01803	Egrandis_v1_0.026068m	32011213..32011875	4	0		
EgrLEAlike-14	LEA-like	Eucgr.D01804	Egrandis_v1_0.042470m	32021995..32022639	4	0	1	1
EgrLEAlike-15	LEA-like	Eucgr.D01805	Egrandis_v1_0.053789m	32025094..32025645	4	0	1	1
EgrLEAlike-16	LEA-like	Eucgr.D01806	Egrandis_v1_0.046501m	32030747..32035314	4	3	2	2
EgrLEA2-24	LEA2	Eucgr.D02327	Egrandis_v1_0.037745m	37150380..37151325	4	2	1	1
EgrLEAlike-17	LEA-like	Eucgr.E00095	Egrandis_v1_0.049983m	823842..824498	5	0		
EgrLEA1-01	LEA1	Eucgr.E00290	Egrandis_v1_0.031036m	2759538..2760050	5	1		2
EgrLEAlike-18	LEA-like	Eucgr.E00787	Egrandis_v1_0.044072m	8196452..8197039	5	0		
EgrLEAlike-19	LEA-like	Eucgr.E00788	Egrandis_v1_0.027430m	8200379..8200975	5	0	1	1
EgrLEAlike-20	LEA-like	Eucgr.E00789	Egrandis_v1_0.043722m	8209658..8210254	5	0		1
EgrLEAlike-21	LEA-like	Eucgr.E00790	Egrandis_v1_0.027403m	8227669..8228265	5	0		1
EgrLEAlike-22	LEA-like	Eucgr.E00791	Egrandis_v1_0.028662m	8231661..8232299	5	0		1
EgrLEAlike-23	LEA-like	Eucgr.E00792	Egrandis_v1_0.026132m	8239818..8240477	5	0		
EgrLEAlike-24	LEA-like	Eucgr.E00793	Egrandis_v1_0.026299m	8243435..8244085	5	0	1	1
EgrLEAlike-25	LEA-like	Eucgr.E00794	Egrandis_v1_0.051253m	8248273..8248929	5	3		
EgrLEAlike-26	LEA-like	Eucgr.E00795	Egrandis_v1_0.026331m	8253250..8253900	5	0		
EgrLEAlike-27	LEA-like	Eucgr.E00796	Egrandis_v1_0.026292m	8259043..8259693	5	0		1
EgrLEAlike-28	LEA-like	Eucgr.E00797	Egrandis_v1_0.026318m	8262852..8263502	5	0		
EgrLEAlike-29	LEA-like	Eucgr.E00798	Egrandis_v1_0.026309m	8267661..8268311	5	0		
EgrLEAlike-30	LEA-like	Eucgr.E00800	Egrandis_v1_0.044845m	8285301..8285906	5	0		
EgrLEAlike-31	LEA-like	Eucgr.E00801	Egrandis_v1_0.040056m	8289470..8290063	5	0	1	1
EgrLEAlike-32	LEA-like	Eucgr.E00802	Egrandis_v1_0.040366m	8297380..8297970	5	0	3	4

Annexe II-11 Caractérisation des LEA chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Sous-famille	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrLEAlike-33	LEA-like	Eucgr.E00803	Egrandis_v1_0.024497m	8300648..8301920	5	1		
EgrLEAlike-34	LEA-like	Eucgr.E01156	Egrandis_v1_0.027244m	12250402..12251007	5	0		
EgrLEA5-01	LEA5	nd	nd	68331927..68332252	5	1		
EgrLEAlike-35	LEA-like	Eucgr.F00213	Egrandis_v1_0.019746m	3251923..3253145	6	2	1	4
EgrDHN-02	DHN	nd	nd	22000822..22001759	6	1	5	8
EgrDHN-03	DHN	nd	nd	22009455..22010330	6	1	3	3
EgrDHN-04	DHN	nd	nd	22078952..22079841	6	1	2	5
EgrDHN-05	DHN	nd	nd	22178116..22179015	6	1	2	7
EgrDHN-06	DHN	Eucgr.F01726	Egrandis_v1_0.026680m	22297780..22299283	6	2	1	2
EgrDHN-07	DHN	Eucgr.F01727	Egrandis_v1_0.037697m	22319088..22318224	6	2	3	3
EgrLEAlike-36	LEA-like	Eucgr.F02015	Egrandis_v1_0.022767m	27082470..27083291	6	0		
EgrLEA4-03	LEA4	Eucgr.F02549	Egrandis_v1_0.043584m	35.068.035..35.067.299	6	2		
EgrLEAlike-37	LEA-like	Eucgr.F02922	Egrandis_v1_0.023742m	38902378..38903154	6	0		
EgrLEAlike-38	LEA-like	Eucgr.F03017	Egrandis_v1_0.026407m	39773831..39774905	6	1		1
EgrLEAlike-39	LEA-like	Eucgr.F03033	Egrandis_v1_0.054150m	39856225..39858869	6	2	2	2
EgrLEAlike-40	LEA-like	Eucgr.F03133	Egrandis_v1_0.024050m	40731181..40731942	6	0	1	1
EgrLEA6-01	LEA6	Eucgr.F03587	Egrandis_v1_0.050179m	44287729..44288873	6	1		
EgrLEA5[P]-02	LEA5	nd	nd	29566732..29566896	7	0		
EgrLEA5-02	LEA5	Eucgr.G03071	Egrandis_v1_0.038692m	49316364..49316911	7	1	3	4
EgrLEA2-02	LEA2	Eucgr.H00245	Egrandis_v1_0.020063m	3498141..3499631	8	1	1	1
EgrLEA5-03	LEA5	nd	nd	10582755..10583081	8	1	1	2
EgrLEA3-01	LEA3	Eucgr.H01103	Egrandis_v1_0.033683m	13412404..13412910	8	1		
EgrLEA3-02	LEA3	Eucgr.H01104	Egrandis_v1_0.033713m	13419456..13419971	8	1		
EgrLEA3-03	LEA3	Eucgr.H01105	Egrandis_v1_0.042878m	13426310..13427219	8	2	1	1
EgrSMP-04	SMP	Eucgr.H01465	Egrandis_v1_0.041528m	17371312..17372440	8	2	2	2
EgrLEAlike-41	LEA-like	Eucgr.H01684	Egrandis_v1_0.042317m	20575734..20577262	8	2		
EgrLEAlike-42	LEA-like	Eucgr.H02051	Egrandis_v1_0.041480m	26596474..26597998	8	2		
EgrLEA6-02	LEA6	Eucgr.H02273	Egrandis_v1_0.034066m	30152856..30153143	8	0	2	5
EgrLEA6-03	LEA6	Eucgr.H02278	Egrandis_v1_0.044848m	30262817..30263104	8	0	2	4
EgrSMP-05	SMP	Eucgr.H03461	Egrandis_v1_0.023435m	50442397..50443458	8	2	2	2
EgrLEA4-04	LEA4	Eucgr.H04126	Egrandis_v1_0.047555m	59197792..59199169	8	1	1	1
EgrSMP-06	SMP	Eucgr.H04398	Egrandis_v1_0.022526m	63148585..63149663	8	2		
EgrDHN-08	DHN	Eucgr.I01292	Egrandis_v1_0.046031m	23609044..23609796	9	1		1
EgrLEAlike-43	LEA-like	Eucgr.I01480	Egrandis_v1_0.019889m	25080177..25083257	9	2		1
EgrDHN-09	DHN	nd	nd	25083874..25084608	9	1	1	1
EgrLEA3-04	LEA3	Eucgr.I02160	Egrandis_v1_0.042318m	31454677..31455211	9	1		1
EgrLEA3-05	LEA3	nd	nd	31458552..31459096	9	1	2	2
EgrLEA5[P]-03	LEA5	nd	nd	32616045..32616212	9	0		
EgrDHN-10	DHN	Eucgr.I02392	Egrandis_v1_0.029056m	34559062..34559796	9	1	2	4
EgrDHN-11	DHN	Eucgr.I02395	Egrandis_v1_0.026702m	34586628..34587482	9	1	4	6
EgrLEA4-05	LEA4	Eucgr.I02433	Egrandis_v1_0.016214m	34,921,476..34,925,012	9	2	1	2

Annexe II-11 Caractérisation des LEA chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Sous-famille	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrLEAlie-44	LEA-like	Eucgr.I02708	Egrandis_v1_0.024487m	38171650..38174118	9	1		
EgrLEAlie-45	LEA-like	Eucgr.I02774	Egrandis_v1_0.026670m	38702900..38703532	9	0		
EgrLEA5-04	LEA5	Eucgr.J00194	Egrandis_v1_0.054131m	1988051..1988845	10	1		2
EgrLEA5-05	LEA5	Eucgr.J00195	Egrandis_v1_0.033934m	1991024..1991658	10	1	1	1
EgrLEAlie-46	LEA-like	Eucgr.J00393	Egrandis_v1_0.027380m	3839345..3839944	10	0		2
EgrLEAlie-47	LEA-like	Eucgr.J00502	Egrandis_v1_0.053206m	5364280..5364831	10	0		
EgrLEAlie-48	LEA-like	Eucgr.J00542	Egrandis_v1_0.050266m	5947497..5948126	10	0		
EgrLEAlie-49	LEA-like	Eucgr.J00543	Egrandis_v1_0.024450m	5954770..5955507	10	0	1	1
EgrLEAlie-50	LEA-like	Eucgr.J00544	Egrandis_v1_0.049465m	5958058..5958798	10	0	1	2
EgrLEAlie-51	LEA-like	Eucgr.J00628	Egrandis_v1_0.023043m	6941884..6942690	10	0		
EgrLEAlie-52	LEA-like	Eucgr.J01845	Egrandis_v1_0.050646m	24520883..24521626	10	0	1	2
EgrLEAlie-53	LEA-like	Eucgr.J02114	Egrandis_v1_0.041357m	27141645..27142082	10	0		1
EgrLEAlie-54	LEA-like	Eucgr.J02115	Egrandis_v1_0.027955m	27149682..27150251	10	0		
EgrLEAlie-55	LEA-like	Eucgr.J02116	Egrandis_v1_0.027936m	27164933..27165502	10	0		
EgrLEAlie-56	LEA-like	Eucgr.J02117	Egrandis_v1_0.024524m	27170945..27171729	10	1		
EgrLEAlie-57	LEA-like	Eucgr.J02118	Egrandis_v1_0.025080m	27174186..27174996	10	1		
EgrLEAlie-58	LEA-like	Eucgr.J02119	Egrandis_v1_0.052042m	27181755..27182567	10	1	1	3
EgrDHN-12	DHN	Eucgr.J02380	Egrandis_v1_0.046985m	29701570..29702057	10	1		
EgrLEAlie-59	LEA-like	Eucgr.J02856	Egrandis_v1_0.023116m	35508705..35509508	10	0	2	3
EgrLEAlie-60	LEA-like	Eucgr.J02990	Egrandis_v1_0.025001m	37111498..37112936	10	1		1
EgrLEA4-06	LEA4	Eucgr.J03043	Egrandis_v1_0.044584m	37,561,149..37,560,638	10	1		
EgrLEAlie-61	LEA-like	Eucgr.K00036	Egrandis_v1_0.048390m	798953..799684	11	0		
EgrLEAlie-62	LEA-like	Eucgr.K00959	Egrandis_v1_0.052588m	11634897..11635604	11	0	1	1
EgrLEA4-07	LEA4	Eucgr.K01100	Egrandis_v1_0.003637m	13860151..13863141	11	2		
EgrLEAlie-63	LEA-like	Eucgr.K01310	Egrandis_v1_0.038918m	16234738..16235367	11	0		
EgrLEAlie-64	LEA-like	Eucgr.K01311	Egrandis_v1_0.026905m	16239251..16239871	11	0		
EgrLEAlie-65	LEA-like	Eucgr.K01312	Egrandis_v1_0.043116m	16247827..16248447	11	0	1	1
EgrLEAlie-66	LEA-like	Eucgr.K01313	Egrandis_v1_0.051633m	16252268..16252888	11	0	1	2
EgrDHN-13	DHN	nd	nd	18306258..18305983	11	0	2	5
EgrDHN-14	DHN	nd	nd	18351943..18351629	11	0	3	3
EgrLEA1-02	LEA1	Eucgr.K01836	Egrandis_v1_0.042066m	22782718..22783364	11	1	1	2
EgrLEAlie-67	LEA-like	Eucgr.K02330	Egrandis_v1_0.024317m	30442073..30442819	11	0	1	1
EgrLEAlie-68	LEA-like	Eucgr.K02608	Egrandis_v1_0.026648m	33913456..33914091	11	0		1
EgrLEAlie-69	LEA-like	Eucgr.K02611	Egrandis_v1_0.048534m	33930845..33931540	11	0	2	3
EgrLEAlie-70	LEA-like	Eucgr.K02612	Egrandis_v1_0.040159m	33941839..33942537	11	0		
EgrLEAlie-71	LEA-like	Eucgr.K02612	Egrandis_v1_0.031752m	33952787..33953485	11	0		
EgrLEAlie-72	LEA-like	Eucgr.K02614	Egrandis_v1_0.049426m	33961576..33962274	11	0		
EgrLEAlie-73	LEA-like	Eucgr.K02615	Egrandis_v1_0.026372m	33971323..33972581	11	1	1	1
EgrLEA3-06	LEA3	Eucgr.K03492	Egrandis_v1_0.049335m	44051858..44052266	11	1	1	1
EgrLEA3-07	LEA3	nd	nd	44073103..44073511	11	1		1

Annexe II-12 Caractérisation des MT chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Sub class	Phytozome locus name	Phytozome alias	Lenght (aa)	Molecular weight (kDa)	pI	Scaffold	Localisation	Introns number	CRT/DRE	LTRE
EgrMT2-1	MT2	Eucgr.A01262	Egrandis_v1_0.026955m	80	7.84	4.79	1	20469838..20470371	2	1	2
EgrMT1	MT1	Eucgr.B02368	Egrandis_v1_0.036342m	75	7.46	5.57	2	44666367..44665854	2	1	1
EgrMT3	MT3	Eucgr.F01127	Egrandis_v1_0.037125m	69	7.18	4.82	6	14457928..14458945	2		
EgrMT4-1	MT4	Eucgr.G00244	Egrandis_v1_0.048697m	127	12.67	8.44	7	3928695..3929183	1		1
EgrMT4-2	MT4	Eucgr.G00245	Egrandis_v1_0.053288m	87	8.23	7.90	7	3935100..3935461	1		3
EgrMT4-3	MT4	Eucgr.G01861	Egrandis_v1_0.035161m	83	8.22	8.14	7	34116888..34116391	1		
EgrMT4-4	MT4	Eucgr.I01530	Egrandis_v1_0.044465m	87	8.34	7.85	9	25394095..25393572	1	1	2
EgrMT2-2	MT2	Eucgr.J02054	Egrandis_v1_0.035211m	76	7.54	5.64	10	26547406..26546791	2		
EgrMT2-3	MT2	Eucgr.K03136	Egrandis_v1_0.035212m	82	8.16	6.17	11	40030544..40029972	2		2

Annexe II-13 Caractérisation des GRAS chez *Eucalyptus grandis*

Nomination	Groupe	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	DRE	LTRE
EgrPAT1-01	PAT1	Eucgr.A00109	Egrandis_v1_0.012502	1415189..1416529	1	0		
EgrPAT1-02	PAT1	Eucgr.A00354	Egrandis_v1_0.046644m	4943572..4945272	1	0		1
EgrPAT1-03	PAT1	Eucgr.A00355	Egrandis_v1_0.008919m	4950916..4952713	1	0		
EgrPAT1-04	PAT1	Eucgr.A00605	Egrandis_v1_0.049221m	9639838..9641430	1	0	1	2
EgrPAT1-05	PAT1	Eucgr.A00751	Egrandis_v1_0.018396m	12102557..12103854	1	3	1	1
EgrPAT1-06	PAT1	Eucgr.A00762	Egrandis_v1_0.044924m	12252869..12254034	1	2	1	1
EgrPAT1-07	PAT1	Eucgr.A00764	Egrandis_v1_0.018525m	12336715..12338412	1	0		
EgrSHR-01	SHR	Eucgr.A00766	Egrandis_v1_0.015259m	12355912..12357275	1	0	1	1
EgrSCR-01	SCR	Eucgr.A00769	Egrandis_v1_0.014518m	12626728..12628370	1	0		1
EgrPAT1-08	PAT1	Eucgr.A00771	Egrandis_v1_0.043565m	12653377..12654410	1	4		1
EgrLISCL-01	LISCL	Eucgr.A00772	Egrandis_v1_0.013973m	12728272..12729770	1	0		
EgrPAT1-09	PAT1	Eucgr.A00903	Egrandis_v1_0.011361m	14448611..14450513	1	0		1
EgrNEW-01	NEW	Eucgr.A01051	Egrandis_v1_0.008901m	16309592..16313782	1	1		
EgrNEW-02	NEW	Eucgr.A01279	Egrandis_v1_0.003893m	20668104..20671957	1	1		1
EgrHAM-01	HAM	Eucgr.A02754	Egrandis_v1_0.045681m	38039335..38041811	1	0	1	6
EgrLISCL-02	LISCL	Eucgr.B02328	Egrandis_v1_0.004441m	44278714..44281774	2	1		
EgrLISCL-03	LISCL	Eucgr.B02329	Egrandis_v1_0.050253m	44285152..44287509	2	1	1	1
EgrLISCL-04	LISCL	Eucgr.B02330	Egrandis_v1_0.054642m	44322500..44324479	2	1	1	1
EgrLISCL-05	LISCL	Eucgr.B02331	Egrandis_v1_0.039844m	44357074..44359598	2	1		
EgrLISCL-06	LISCL	Eucgr.B02333	Egrandis_v1_0.039556m	44368608..44370699	2	3		
EgrLISCL-07	LISCL	Eucgr.B02335	Egrandis_v1_0.003397m	44375975..44379818	2	3		
EgrLISCL-08	LISCL	Eucgr.B02337	Egrandis_v1_0.003314m	44385238..44389375	2	2	1	1
EgrLISCL-09	LISCL	Eucgr.B02338	Egrandis_v1_0.038459m	44392761..44397491	2	3		
EgrLISCL-10	LISCL	Eucgr.B02340	Egrandis_v1_0.011253m	44408625..44410220	2	0		
EgrLISCL-11	LISCL	Eucgr.B02342	Egrandis_v1_0.054850m	44441758..44443901	2	3		
EgrLISCL-12	LISCL	Eucgr.B02343	Egrandis_v1_0.055136m	44452576..44454710	2	1		
EgrLISCL-13	LISCL	Eucgr.B02344	Egrandis_v1_0.005336m	44463202..44465725	2	1		
EgrLISCL-14	LISCL	Eucgr.B02345	Egrandis_v1_0.003579m	44470138..44472721	2	1	1	4
EgrLISCL-15	LISCL	Eucgr.B02346	Egrandis_v1_0.003301m	44474351..44478211	2	0	1	4
EgrLISCL-16	LISCL	Eucgr.B02347	Egrandis_v1_0.046224m	44491538..44494602	2	6		
EgrLISCL-17	LISCL	Eucgr.B02348	Egrandis_v1_0.003375m	44498469..44501207	2	1		3
EgrLISCL-18	LISCL	Eucgr.B02349	Egrandis_v1_0.003184m	44502848..44505861	2	0	1	3
EgrLISCL-19	LISCL	Eucgr.B02350	Egrandis_v1_0.003539m	44510002..44513443	2	1	1	4
EgrSCL3-01	SCL3	Eucgr.B03716	Egrandis_v1_0.011395m	61546896..61549085	2	1	1	4
EgrDELLA-01	DELLA	Eucgr.C04156	Egrandis_v1_0.007612m	76353530..76355435	3	0	1	2
EgrPAT1-10	PAT1	Eucgr.D01435	Egrandis_v1_0.008101m	25477122..25480624	4	1		2
EgrLS-01	LS	Eucgr.D01917	Egrandis_v1_0.005072m	33105203..33107724	4	0	1	1
EgrHAM-02	HAM	Eucgr.E01509	Egrandis_v1_0.004081m	17670574..17673602	5	0		
EgrHAM-03	HAM	Eucgr.E01510	Egrandis_v1_0.005259m	17683705..17686876	5	1		2
EgrPAT1-11	PAT1	Eucgr.E03895	Egrandis_v1_0.008215m	67973289..67976620	5	1	2	3
EgrPAT1-12	PAT1	Eucgr.F01003	Egrandis_v1_0.007268m	13283060..13286646	6	0		1
EgrLS-02	LS	Eucgr.F01978	Egrandis_v1_0.040701m	26497215..26498666	6	0	1	1
EgrLS-03	LS	Eucgr.F02630	Egrandis_v1_0.011449m	35899826..35901282	6	0		
EgrPAT1-13	PAT1	Eucgr.F03414	Egrandis_v1_0.007473m	43154247..43157782	6	1		
EgrPAT1-14	PAT1	Eucgr.F03523	Egrandis_v1_0.042698m	43880852..43882399	6	0		
EgrHAM-04	HAM	Eucgr.F03769	Egrandis_v1_0.045531m	45894080..45895492	6	0		
EgrPAT1-15	PAT1	Eucgr.F04276	Egrandis_v1_0.008422m	51029129..51032106	6	1		1
EgrHAM-05	HAM	Eucgr.F04370	Egrandis_v1_0.041890m	52593008..52593890	6	1		

Annexe II-13 Caractérisation des GRAS chez *Eucalyptus grandis* (suite)

Nomination	Groupe	Phytozome name	Phytozome alias	Localisation	Scaffold	Introns number	DRE	LTRE
EgrSCR-02	SCR	Eucgr.F04460	Egrandis_v1_0.048258m	53569364..53571530	6	1	1	2
EgrDELLA-02	DELLA	Eucgr.G02163	Egrandis_v1_0.044798m	39240918..39243319	7	0	1	2
EgrLISCL-20	LISCL	Eucgr.G02939	Egrandis_v1_0.003840m	48021354..48024558	7	1	1	2
EgrLISCL-21	LISCL	Eucgr.G02940	Egrandis_v1_0.004899m	48036728..48039359	7	4	1	3
EgrLISCL-22	LISCL	Eucgr.G02941	Egrandis_v1_0.003984m	48051987..48054546	7	1	1	1
EgrSCL3-02	SCL3	Eucgr.G03258	Egrandis_v1_0.011381m	50699522..50703701	7	2		
EgrNEW-03	NEW	Eucgr.H01009	Egrandis_v1_0.040918m	12344935..12346302	8	1	1	2
EgrNEW-04	NEW	Eucgr.H01010	Egrandis_v1_0.042010m	12349701..12351398	8	0	1	3
EgrHAM-06	HAM	Eucgr.H01257	Egrandis_v1_0.011732m	15290795..15292625	8	0		
EgrSHR-02	SHR	Eucgr.H02292	Egrandis_v1_0.012906m	30707435..30708754	8	0		
EgrSCR-03	SCR	Eucgr.H03356	Egrandis_v1_0.045339m	49162178..49164474	8	1		
EgrNEW-05	NEW	Eucgr.H04039	Egrandis_v1_0.044784m	58266402..58268189	8	0		
EgrSCR-04	SCR	Eucgr.H04688	Egrandis_v1_0.042449m	67215762..67217288	8	1		
EgrSHR-03	SHR	Eucgr.I00236	Egrandis_v1_0.041554m	4855110..4856239	9	1	1	3
EgrSCR-05	SCR	Eucgr.I00704	Egrandis_v1_0.049330m	14775663 - 14777634	9	0		1
EgrSCL3-03	SCL3	Eucgr.I01625	Egrandis_v1_0.042579m	26198826..26201029	9	1		
EgrLS-04	LS	Eucgr.I02056	Egrandis_v1_0.017817m	30320350..30321604	9	0		4
EgrHAM-07	HAM	Eucgr.I02451	Egrandis_v1_0.006847m	35131205..35133661	9	1		
EgrLISCL-23	LISCL	Eucgr.J01242	Egrandis_v1_0.004236m	14114388..14117102	10	1	2	2
EgrLISCL-24	LISCL	Eucgr.J01244	Egrandis_v1_0.004468m	14161180..14164042	10	1	4	4
EgrDELLA-03	DELLA	Eucgr.J01594	Egrandis_v1_0.051080m	20846536..20849061	10	0		1
EgrLISCL-25	LISCL	Eucgr.J02040	Egrandis_v1_0.054350m	26433728..26435755	10	0		1
EgrLISCL-26	LISCL	Eucgr.J02041	Egrandis_v1_0.002984m	26436598..26440515	10	1	1	2
EgrLISCL-27	LISCL	Eucgr.J02042	Egrandis_v1_0.003597m	26446648..26449653	10	1	1	2
EgrLISCL-28	LISCL	Eucgr.J02043	Egrandis_v1_0.004358m	26476500..26478908	10	1	1	1
EgrLISCL-29	LISCL	Eucgr.J02044	Egrandis_v1_0.003631m	26495880..26499164	10	1		2
EgrSHR-04	SHR	Eucgr.J02815	Egrandis_v1_0.007845m	35164078..35166062	10	1		1
EgrSHR-05	SHR	Eucgr.K00873	Egrandis_v1_0.052931m	10733904..10735355	11	0		
EgrSCR-06	SCR	Eucgr.K01320	Egrandis_v1_0.003402m	16317980..16321237	11	3	1	3
EgrLISCL-30	LISCL	Eucgr.K01383	Egrandis_v1_0.048853m	16982276..16983420	11	1	1	1
EgrLISCL-31	LISCL	Eucgr.K01384	Egrandis_v1_0.044805m	16994948..16995751	11	0		1
EgrSCR-07	SCR	Eucgr.K02752	Egrandis_v1_0.040390m	35709904..35711343	11	1		2
EgrHAM-08	HAM	Eucgr.K02964	Egrandis_v1_0.043485m	37752029..37753486	11	2		
EgrHAM-09	HAM	Eucgr.K02965	Egrandis_v1_0.043737m	37757188 - 37758749	11	1		
EgrLISCL-32	LISCL	Eucgr.K03117	Egrandis_v1_0.050175m	39747687..39749663	11	0	1	1
EgrLISCL-33	LISCL	Eucgr.K03118	Egrandis_v1_0.041798m	39767197..39769062	11	0		1
EgrLISCL-34	LISCL	Eucgr.K03119	Egrandis_v1_0.047874m	39808137..39813972	11	1	1	1
EgrLISCL-35	LISCL	Eucgr.K03120	Egrandis_v1_0.044574m	39818419..39819411	11	0		
EgrLISCL-36	LISCL	Eucgr.K03121	Egrandis_v1_0.052920m	39824474..39825250	11			
EgrLISCL-37	LISCL	Eucgr.K03122	Egrandis_v1_0.042039m	39828610..39830436	11	0		3
EgrLISCL-38	LISCL	Eucgr.K03125	Egrandis_v1_0.053217m	39890169..39890733	11	1	1	1
EgrLISCL-39	LISCL	Eucgr.K03126	Egrandis_v1_0.006245m	39893425..39895514	11	0		
EgrLISCL-40	LISCL	Eucgr.K03127	Egrandis_v1_0.006074m	39900823..39902954	11	0	1	1
EgrLISCL-41	LISCL	Eucgr.K03128	Egrandis_v1_0.053208m	39917274..39919376	11	2		

Annexe III-1. Composition du milieu M (Multiplication) utilisé pour le repiquage d'*E. urophylla* x *E. grandis*

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
KNO ₃	1900		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	Acide Nicotinique	5
		Thiamine HCl	10
		Pyridoxine HCl	1.2
		Myo-inositol	200
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Saccharose (g.l⁻¹)	30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	Agar (g.l⁻¹)	7
H ₃ BO ₃	6.2		
KI	0.83	Hormone (µM)	
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9	NAA*	0.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	BAP*	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6		
		pH	5.6

* : composés à ajouter après la stérilisation

Annexe III-2. Composition du milieu SDM (Shoot Development Multiplication) utilisé pour le repiquage d'*E. urophylla* x *E. grandis*

Macroéléments (mg.l⁻¹)		K₂SO₄	990
NH ₄ NO ₃	391.8		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Vitamines (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	441.9	Acide Nicotinique	5
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	323.3	Pyridoxine HCl	1.2
		Myo-inositol	200
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Saccharose (g.l⁻¹)	30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6		
H ₃ BO ₃	6.2	Agar (g.l⁻¹)	6
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Hormones (µM)	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25	NAA*	0.5
		BAP*	2
FER-EDTA (mg.l⁻¹)		Polyamines (µM)	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	Putrescine*	100
Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25	Spermidine*	10
pH	5.6		

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-3. Composition du milieu W1 pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Acide Nicotinique	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	0.5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Saccharose (g.l⁻¹)	20
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6	Agar (g.l⁻¹)	7
KI	0.83	pH	6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025		

**Annexe III-4. Composition du milieu W2 pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Acide Nicotinique	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	0.5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Saccharose (g.l⁻¹)	20
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6	Agar (g.l⁻¹)	7
KI	0.83	Hormone (µM)	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	BAP*	0.5
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025		
pH	6		

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-5. Composition du milieu W3 pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Acide Nicotinique	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	0.5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Saccharose (g.l⁻¹)	20
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6	Phytigel (g.l⁻¹)	3.5
KI	0.83	pH	6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025		

**Annexe III-6. Composition du milieu W4 pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Acide Nicotinique	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	0.5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Saccharose (g.l⁻¹)	20
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6	Phytigel (g.l⁻¹)	3.5
KI	0.83	Hormone (μM)	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	BAP*	0.5
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025		
pH	6		

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-7. Composition du milieu W4 + C pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	37.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Acide Nicotinique	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Thiamine HCl	0.5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.1
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Saccharose (g.l⁻¹)	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6		20
KI	0.83	Phytigel (g.l⁻¹)	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		3.5
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025	Hormone (µM)	
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025	BAP*	0.5
pH	6	Charbon actif (g.l⁻¹)	
			2

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-8. Composition du milieu SPM pour l'allongement de tige
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	825	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KNO ₃	950	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Myo-inositol	50
KH ₂ PO ₄	85	Calcium penthotenate	1
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Thiamine HCl	1
H ₃ BO ₃	6.2	Pyridoxine HCl	1
MnSO ₄ , H ₂ O	16.2	Acide Nicotinique	1
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	10.6	Saccharose (g.l⁻¹)	
KI	0.83		20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Charbon actif (g.l⁻¹)	
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.025		1.5
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.025	Phytigel (g.l⁻¹)	
pH	6		4

**Annexe III-9. Composition du milieu M1 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950		
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	825	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125		
H ₃ BO ₃	3.1	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.415		
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	Agar (g.l⁻¹)	7
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3	Hormone (μM)	
		AIB*	2.5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-10. Composition du milieu M2 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950		
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	825	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125		
H ₃ BO ₃	3.1	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.415		
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3	Hormone (μM)	
		AIB*	2.5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-11. Composition du milieu M3 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950		
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	825	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125		
H ₃ BO ₃	3.1	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.415		
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	Agar (g.l⁻¹)	7
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3	Hormone (μM)	
		AIB*	5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-12. Composition du milieu M4 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950		
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	825	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125		
H ₃ BO ₃	3.1	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.415		
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3	Hormone (μM)	
		AIB*	5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-13. Composition du milieu M5 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Acide Nicotinique	2.5
NH ₄ NO ₃	825	Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125	Saccharose (g.l⁻¹)	20
H ₃ BO ₃	3.1	Agar (g.l⁻¹)	7
KI	0.415	Hormone (µM)	
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	AIB*	7.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125	pH	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3		

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-14. Composition du milieu M6 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	220	FeSO ₄ .7H ₂ O	13.925
KH ₂ PO ₄	85	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	18.625
KNO ₃	950	Vitamines (mg.l⁻¹)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	185	Acide Nicotinique	2.5
NH ₄ NO ₃	825	Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125	Saccharose (g.l⁻¹)	20
H ₃ BO ₃	3.1	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
KI	0.415	Hormone (µM)	
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	AIB*	7.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.125	pH	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.3		

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-15. Composition du milieu M7 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	110	FeSO ₄ .7H ₂ O	6.9625
KH ₂ PO ₄	42.5	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	9.3125
KNO ₃	475		
MgSO ₄ .7H ₂ O	92.5	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	412.5	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00625	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00625		
H ₃ BO ₃	1.55	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.2075		
MnSO ₄ .H ₂ O	4.225	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0625		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.15	Hormone (μM)	
		AIB*	5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-16. Composition du milieu M8 pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	110	FeSO ₄ .7H ₂ O	6.9625
KH ₂ PO ₄	42.5	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	9.3125
KNO ₃	475		
MgSO ₄ .7H ₂ O	92.5	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	412.5	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00625	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00625		
H ₃ BO ₃	1.55	Saccharose (g.l⁻¹)	20
KI	0.2075		
MnSO ₄ .H ₂ O	4.225	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0625		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.15	Hormone (μM)	
		AIB*	7.5
		pH	6

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-17. Composition du milieu ¼ MS modifié pour l'induction racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		FER-EDTA (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	110	FeSO ₄ .7H ₂ O	6.9625
KH ₂ PO ₄	42.5	Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	9.3125
KNO ₃	475		
MgSO ₄ .7H ₂ O	92.5	Vitamines (mg.l⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	412.5	Acide Nicotinique	2.5
		Thiamine HCl	5
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Pyridoxine HCl	0.6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00625	Myo-inositol	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00625		
H ₃ BO ₃	1.55	Saccharose (g.l⁻¹)	10
KI	0.2075		
MnSO ₄ .H ₂ O	4.225	Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0625		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.15	Hormone (µM)	
		AIB*	10
		pH	5,8

* : composés à ajouter après la stérilisation

**Annexe III-18. Composition du milieu ¼ MS modifié pour l'allongement racinaire
d'*E. urophylla* x *E. grandis***

Macroéléments (mg.l⁻¹)		Vitamines (mg.l⁻¹)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	110	Acide Nicotinique	2.5
KH ₂ PO ₄	42.5	Thiamine HCl	5
KNO ₃	475	Pyridoxine HCl	0.6
MgSO ₄ .7H ₂ O	92.5	Myo-inositol	100
NH ₄ NO ₃	412.5		
		Saccharose (g.l⁻¹)	10
Oligoéléments (mg.l⁻¹)		Phytogel (g.l⁻¹)	3.5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00625		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00625	Hormone (µM)	
H ₃ BO ₃	1.55	AIB*	-
KI	0.2075		
MnSO ₄ .H ₂ O	4.225	Charbon actif (g.l⁻¹)	0,5
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.0625		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.15		
		pH	5,8
FER-EDTA (mg.l⁻¹)			
FeSO ₄ .7H ₂ O	6.9625		
Na ₂ EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .H ₂ O)	9.3125		

Annexe III-19. Liste des amorces utilisées dans cette étude

Gènes	Sens (5' → 3')	Antisens (5' → 3')
EuGolS4	GACACGTCCTTGGATCTGAG	GTGCAGGAACATAGGAGATAGCG
EuDHN1B	CTTGTGTGTATGAGGGAGGGACTTG	AAGAGCAACTTTCAGGTGCAAGC
EubAMY1	GTTGTGCTGAACTTCACGTG	CAGTTTTAGCTGCCACCTTCAC
EubAMY3	TTCAGCTAGAGAAGATGTACAGATG	AGGCTTTCTCAATAGCTTCATGG
EuHSP70	ACCCCCCTCTCTCAAGGTTTG	CAGGTTGGTTATCCGAGTAGGTAG
EgrGASA1A	CCCAGTTCTCTAAAATTCGCAGAC	CAAGTGCCCATGAGACCAAGTG
EgrGArp	GTGCTATGCCAGGCTCAAGAC	GGGTAAGAACCAAGAACAAACACG
EgrGASA1B	GATGTCTGTCCATGCTACGCTAAC	CAACCATCGGAAAGAAACGAAG
EgrSHN1A	ATCTTCTTCATCGGTGCCGTC	GAGCTCTTCAATCATTTGCAAGG
EgrSHN1B	AGATGATTGAGGAGCTCCTCAAC	GGTATCCTTTTTTCTCACTCTTGGC
EgrIBAr5	GTTCTTGTGCATTGCATGTCC	GTAACCTCTGCAAGCCTCCATC
EgrIAAg	AGCGTCCCTACCATTTCCAAAG	ATTGGAGGGACGGGTTTATGTG
EgrCR9A	GGCCTGTGATAATCTTGGAGGAG	GGCAGACTGATCTACAGAAGCTC
EgrCR9B	GCAGAGGCTTGTGATGATCTCG	CGCCTAGGAAGTCTCTCTTTTGTG
EgrMYB44	GAGATGATACGGAAGGAGGTGAG	CTAACGCCGATGCGCTTAAC
EgrMYB61	AAAGATGTGGGAAGAGCTGCAG	AACAGCGTGAAGCTCAATGATG
EguHSP812l	CTTTTTGTTTGTGGGGCAGC	AGGAGGAATTACCACTATAAGAACCG
EguELIP1p	GGGTTGATGACTTCCGATG	CTACACAAGTGTCCCTCCCTTG
EguORSRpp	TCTGAATCTTGAAGGTGCACG	GTGATCTCCAATCAAGAAAGCAG
EguFER1p	GAACAAATCATCACCACGG	CTATCCCCAGGCTTTCAGTAAAC
EguLEAp	AACTTTGCATCTCGGCGTG	CACCTGGTTGCACTTCTCCTG
EgupUQ3p	GTCTTCGTGGTGGTATGCAG	TGGATCTTGGCCTTGACG
EguHSP70p	CGCACTGTCATCAAGGTTTTTC	GTGAGAAGCCAATAGAGGCTC
EguFarnesylp	GTAAAAGCTGATTGGGTAGGAAG	CCCTCTCCCCAGATATTACC
EguLGlyasep	GTGGCTCAGTAGGTCAATAGGC	GGCCAACAACATCTTCAAC
EguBChitinasep	CTCCTTTGGGAGACCAGAAG	CGCCACAAAAACAAAACAAC
EguGluS2l	GAAACAGCCAGCATCAACAC	GGCCCACACGGATAGAGC
EguAAT2l	AACAAGTCCAGGACAATTGC	CTGTGGGCTGAAAAAGC
EgubAMY7p	GTTATCCATCATACCCCGAG	TCGGCTGCAGCTTTCAAG
EguEnchitinaseAl	GCGAGAGCAAGGCAATCC	CGGCCCGTAGTTGTAGTTGTAAG
Egub1,3Glucanase2l	GAATAAGGGCACACCTGCC	CTCCGTGATTTATTGTGATTGAC
EguAMDPe	GAACCTGCCCTCAGCTGC	TGCCGATTTTCAGATTTTGG
EguOEEP1e	GCCCTTCTCTTACCATC	GTATGAGGGCACGAGGAAC
EguCatalaseE	CATGTCTGTTGCTGTTGG	CAGCTTTCTGTGCTCCTTCC
EguTM4e	GAACCAATCACATCATCGTATG	CCCCACAAAAGAAACGGTAG
EguPRP10e	GTCTTCAAGGCCGTGGAG	TCCGCGAAAAGAGAGATGC
EguHSP70E	CAGGGTACAGACGCGAGG	GACAGTCATGACACCTCCAGC
EgrDHN-11	ACAAGATCATGGATAAGCTGCC	GAGACAGAACGACAAATACGTACC
EuDHN-10	CTTGTGTGTATGAGGGAGGGACTTG	AAGAGCAACTTTCAGGTGCAAGC
EgrHSP70ER	GCGGTACATTCGACGTGAGTATC	TCCATGACTCTGTGGTCAAG
EgrHSP70cytA	GCGTATCATCAATGAGCCGAC	GACACATCGAATGTACCACCAC
EuHSP70	ACCCCCCTCTCTCAAGGTTTG	CAGGTTGGTTATCCGAGTAGGTAG
EgrMET3	CTGCTGACTTCGTGGAGACTG	GCACTTGCCTTGGCCATCATT
EgrMET2	GACCCGTGCAGCTGTAAATG	ACTAAAACACTAGACCCGGTCTC
EubAMY1	GTTGTGCTGAACTTCACGTG	CAGTTTTAGCTGCCACCTTCAC
GAPDH	TAGCCATTTCCAGAACCCTCG	CGGAGATGACAACCTTCTTAG
EgrCBF1	AACCACTTCTTCTTCTTACTCCGA	AGGAGGACGACGCTTCAGC

EgrCBF22	GTGGAGTCCGAGTCCGAGGAC	TCCTCGTCGTCGTACAGCATT
EgrCBF3	GTGGAATCTAAGGACGTAATTGGG	AAGTTCCCGTCGCCCTCTC
EgrCBF4	AAGGAAGTGCAGCTCGCGTC	GTCTCCCGGAAC TTCTTCTC
EgrCBF5	GTTGCACGACGAGGACATCTTC	CAAGTTCCCATTTGCCCTCTG
EgrCBF6	CCCTCATCAGTAAACACTCCTCACTTC	GTA CTCTTCCGTCAGATGGCG
EgrCBF7	CGCCTCACCAGTACCACAC	CTAAAGGAGTTGGGGTGGGAGA
EgrCBF8	CTCAACACCCCTTATCACTCAGTAAAC	GAGTGAAGTGGATGATGAATGTGG
EgrCBF9	CCCTCACCCTCTCAGTATCTGCTTC	AGTAGGTGGGGTGGGAGCGATA
EgrCBF10	CGTAAGCCATTTTTTGGTGTGC	CTATCCGCTTTATCGATGGCCC
EgrCBF11	ACCTCAACTTCACGGACTCCACA	TGCCCTCTGTATGTCCTTGGTGT
EgrCBF12	GCGTGCCATTCAACAAAAAGC	TTTCTGACTGCTCTATCGGCG
EgrCBF13	CATTCCAAC TCA TGA ACTCTTCTCT	GGGATAGCAGCAACGAGAGAGG
EgrCBF14	GTTTGGGACGACTTTGATGCCTTAC	TGTCCGTTCAACTTTTATCCGCACT
EgrCBF17	TCGCCGTCTCAGTCGGAGT	GATGCCTCGTCTCCTTGAAGAC
EgrCBF7	TGGGAAC TTGGATACATACGTGC	TAAGTAGGGCATCGAAGTCGTCC
EgrbAMY3	TTGGTGGGGAGTGGTAGAG	GAAC TTCAGCTCATGTACCATCTG
EgraAMY2	CTTCCGATGGGATAAGAAAGAG	GCAGTTGGAAAGTCACTTAAGC
EgrRS6	CTTGTGAACCCGAAGAACGTG	CACTGCGCATCCACCTTAAC
EgrCBF11_PCR	ACCTCAACTTCACGGACTCAACAT	CTGATGTTGCGGTGAACACAG
EuGolS1	AGATGTTGGTCCAGAAGTGGCG	CCGACAGAGATGCTATGAATGGC
ORFSeq.	GATTTTTGCGGACTCTAGCATGGC	GACTCCGGTATTTTTACAACAATACCACAAC
LAC_Eucgr.F02674	TTCCGAGCCAGTAATCCTGGAG	CGCCGTTCTTACAATGAACAC
GalacturoT_Eucgr.I02091	TGGCAGA ACTTGAATGGAGATCAG	CCAAGCCCAAGAATGCCAAG
CesA_Eucgr.C01769	GAACGCAGGGCAATGAAGAGAG	TGCGCTTTGGCAACTAAAGCATTG
FRA_Eucgr.J03017	CGCCATTGCTCAGATCAACAAGC	TTCGCCCCGAATTAAGGGATCATCG
Gly_trans_Eucgr.A02868	TTCTTCGGCTCGCGTTTCATTC	AGGAGG TCACTTTTCGCACTTCG
FRA_Eucgr.J02860	AGGCAATTTAAGGCGGAGACTGAG	TACGCCTGTTTGTCTCTGAGC
Gly_trans_Eucgr.A00510	GACAAGAAACACCCGCTCTTGC	TGTTACCGTCGAAGGTCAAGGC
COMT35_Eucgr.F02623	ACGCCGT CATGATCAAGGATACC	TCCTCCGGCAACACTACACCTATC
CCR3_Eucgr.B02222	TTGGCCTGCTGATCGAGTGAAG	TACCACAGCCATTCTGCTTGC
COMT64_Eucgr.K00955	TGATGTTGTGCTGAAACCAGACG	TCCAACACCAATCCGTTCTCATCG
UBI_intron	GCGGCTTTTAAGTCTCTTGC GAA	TTCGAAGCATAGCTTCGCCATATG
CAD6_Eucgr.D00472	AACTTTGGTAGGCGTTCCATGC	CTTCCAGAAATGCTCCTCATACCC
MYB_Eucgr.C00826	TCACCAACTACATCAAGGCTCACG	ACATCTCTGCAACCCTGCTTTC
GalacturoT_Eucgr.D01335	GGGCAATGCATATGGACAAGTTGC	ACCAGCTTAACCACCTACCAC
COMT13_Eucgr.A01865	GCGGATGCAATCTTACTCAAGTGG	TGATCACCTTTCCAATCCCATCCC
MYB_Eucgr.K00153	ATGCCACTCTCGGCAATAGGTG	GAGTGACTGGATCAATGCCATC
COMT12_Eucgr.A01863	TGACTGTGTCCGAGCTTGTGTC	TGGACGCAACCGACTTTGTTG
XET_Eucgr.C00179	CCTGAGTGCTCCATGTCTTAAACG	ATCAATTGCTTCTCGGCCACAG
CCoAOMT14_Eucgr.H04644	ACGACCTTATTGCAAATGGCGAAG	AATGTTGTCGTACCCGATCACC
CCoAOMT15_Eucgr.H04646	AACCTCCTTACGGTCCAGAAGC	AGGAGTCCAATGACTCGCCAAG
MYB_Eucgr.F00002	AAGGAGGTGAGGAGCTACATGTCC	TGCGCTTAACGGTCACATTCCG
CCoAOMT17_Eucgr.H04650	TCGGTTCTGAACGACCTTATCGC	CCTCATGAAGTCGTCCTTCTTGGC
CAD26_Eucgr.E02559	TCATCGGCACCGTCTTTGTAGTGC	TCCAATGGCACTTCCCACCATGAC
Gal_trans_Eucgr.H04088	ATGGGTTGGTCTGGAGGGTTTC	ACTGACCATGGTTCAAGTTTCTCC
FRA_Eucgr.B01444	AGCAGTTCCTTGTGGCTTTGGG	ATCCTCAAACCAACAGCTCCCTTG
Glu_syn_Eucgr.B03640	GGCACATATCCGGACCTTTAGTGG	ACCCATGACAGGCCATACTG
Glu_syn_Eucgr.J00836	ACACATACGAGAAGTGTCTGGTG	TGATCAGCCGGAAGACAAGCTG
Glu_syn_Eucgr.B00160	TGGCCCAGGGATCCAGAAATTAAG	AGCCGCCGTTTCTTAAACAGTG
CesA_Eucgr.I00286	TGGTCATAGTGGTGTCTGCGATG	TGACTGCAGAGACCCGAATCAAG
Gly_trans_Eucgr.J01374	TCTCTTTGGTGTCTCAGGCTCAC	TCGTGGGTCAGGGACAACTTTC

PAL9_Eucgr.J01079	TGGAAGGAGCCAGAATCATGCC	TTGTGGACCGACCATAATGTGC
Gal_trans_Eucgr.E02455	ATCGTTATGAGCTCGTGGTCCTG	TGCTGCTGTACATTCTGAATCCC
4CL7_Eucgr.B03943	GTGCTCATACAAACCAGCACACAG	AATCGCTGCAAGCGAAACGC
GalacturoT_Eucgr.A00881	TCGGAGGTTGGTGCAAGAGTTG	AAACCCACTCGCCATCCAAAGC
LAC_Eucgr.G03098	TTCTCTGTGGCGGTGACATTGG	TCTTCACCTTGGTCGCTTGAACG
GalacturoT_Eucgr.K02133	TGCTTGAGAAGGGAGAAGTGC	CCACAAGGTTGGTTCATTTCAG
GalacturoT_Eucgr.D00963	GCAGCGGATCAAAGAAGTTCAACG	GCTTTCAACCGCTCATAGGAGTTC
CAD17_Eucgr.E01107	CTCCTTGAATGGCTTCGCCTCT	AAGTGAACAAGCAGATGCTTGAGGAG
COMT65_Eucgr.K00956	GATGGCATGTTTCGATAAGATCGGACT	GAGGAAACCCCTCCATCTCCAAG
EgrCAD8_Eucgr.D01086	CCCTCTGGAATAATGTCGACTACTTTG	CACATAAAGGAACTCTCGTGATTACG
COMT67_Eucgr.K01696	GAGACTATACCGCATGCTGATGCG	TGGATTCCCACCCTTCTGACAC
EgrDHN02	CGGATCTCCAAGGAGAAGAAGG	AAAGGCGGTTCTCCCTCAGT
EgrDHN03	CGGATCTCCAAGGAGAAGAAGG	GGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGC
EgrDHN14	CGAGCACAAAGGAGGAGCACAA	TCGTGACCCTCCTTGTCTATGC
XET_Eucgr.C00180	TCTTCGTTTTTTTTTTTTCCCTTTG	CAATTGCTTCTCGAGTACATCGAGAG
XET_Eucgr.C00177	CCACAACGCATCATAGAGTTCAAG	AGTGAAGGGCGCTCTGGTC
COMT61_Eucgr.K00951	AAACCCCTTCCATGTTGTCCAT	AGCTCGAGTGGGTTTGGTTGTT
COMT32_Eucgr.E03874	CAAAATACGTTCTGCGCGTGTA	TACCACCAACACTCCGACCATA
ESKIMO1_Eucgr.J00196	AGACTGTTCTCTGCCCGAGTTC	ACATAAGCCGCTTGTTCTCAGC
EgrHSP70cytC	TACGGTGCTGCTGTTCAAGCTG	TGACACCCAACAGCAAGAGATCC
EgrHSP70cytD	AGGACAAAACGGCTGGAACGA	CATTGCTCAATGTCGTCCTTG
RTCBF1A	GTACAAAAAAGCAGGCTATATGAACCC	TGGCACTCCTCCGTCAGAT
RtCBF1B	AAAAGCAGGCTATATGAACTCTTCCTC	GGACAGCAGCAACGAGAAAG
EgrDHN-06	ATCAGCAGCTCCAGCTCTCACAAG	TCCAGGCAGTTTCTCCTTTCGC
EgrDHN-08	TTTCGTGAGGAATGGCTCTGTAGC	ATTGGGTTCCCATGCTCGTCTC
ELIP-07	CGCGTAAGGTGTATGACTGAGGAG	TGAAGAGGGAACGTCAGAAGCAG
ELIP-08	ACCATAGTCTTAGATTGGCTCCTC	TGTGAAGTGGTGCTAACCTTTG
EgrDHN-09	GAGCTCGTCCGGTGATGAAGAAG	TTCAAGCTCCCCACCTGCTTC
EgrLEA1-02	AAATGCAGCCCATGAAGAACGC	GCCGTCATCTTCTCCATCTTCTC
EgrLEA218	TCAACATCACGCTCCGGAACCTC	TCCGTCGAATGCATCGTAGTCG
EgrLEA221	ACGGTAAGGTCGAGTTGATGCTC	CATGGTGCAATCCATGCTCGTG
EgrLEA222	ATTGCAAAGGGTCGTGCCAAGG	TCGACATCACGTCAACCGTCAC
EgrLEA2-02	TCTCGTCGCGAAATTCGATCC	TCTCTCTCTCTCTCTGCTGCTG
EgrLEA232	ACATCAACAAATGCGGTCCAATCC	TGGGAAATCACACTCTCGCATCC
EgrLEA246	TTCGTGCTCGGGTTCTTCATCC	TTGCTCGAAGGTGATGCTCCTC
EgrLEA251	AAGACCACAATCGCGAGCAACG	TTCATGTCCGACGTCAGCTTCG
EgrLEA262	TGGCAAGGTTCAAAGCCGGATG	TGCCGAGACAACCTTAATCACC
EgrLEA265	AAGTTGCATCGATTGCCGTTTCG	CCTATGTGCACCTCAGCTTGCTTG
EgrLEA271	GAGAACGCCGGTTGAAATCACG	TGATGCCGATCGTCCACTTCAC
EgrLEA279	ACGGTGACCATCTTGGGATTGTTTC	GACACAAGCACGCTCAAATCGC
EgrLEA280	AAGTGCCACGGCACCTTTAGTG	GCAACGGAGAAGCTCGATGAAC
EgrLEA3-03	TCTTTGTGCAACCGTCAAACGC	TCACGTTGAAGCTCGAAGCAAC
COBRA.B00629	CGTCGAGAGCGCTCCAAATATAC	TGCTGTGTGCACTGTAGTATCGG
COBRA.F03435	CGGCTCCAGAATGATGGGTATAAG	ACAAGCATTGCGTTCGTACCAC
COBRA.I01370	GTGGACAACCGATGGATATATGGC	AGCCCACGTCCATCCTAACTTC
EgrCOBRA09	AAACTTTGACAATCTGACGCAGAG	GCCATCTTCCATAAGCAGATCAT
EgrCOBRA11	AACTACAGAATGAACTACACCCAGTGG	ATCCTGCATAGGGAGTCAGTGAC
EgrGRAS04	AACCGGAGCGATTGCTTGACAC	AGGGAAACGCCTGGTCAAATGC
EgrGRAS34	TCACGGACTACAACTCCTGTGG	AAAGCCTCCGTAATCGATGCG
EgrGRAS37	AGTTGTGGATCGGCTGGAAGAC	AACACAGTTCACGGCGACTC
EgrGRAS42	CCGATGTTCTGCAACGGTTTG	CGAATCGAACACCGCTGTGTAGTG

EgrGRAS55	GCCTTGTTCTTCTACAGCGCATAAC	TGATCTTCACGCTCCTCACGAC
EgrGRAS56	AGGCAGAACCGGTAAGTCAAGG	TGCCTGCGGCATTTAAGAGTGG
EgrGRAS62	CACTTGTGAATGTGAGCGGCTTC	TCCCCTCTCTTGCTCAATCAC
EgrGRAS67	CGCTGGGTTGAGTCACGATTTG	TGTCTGGTGGTCGATCCATTTGAG
EgrGRAS04	AGAGAGCGTTGTGGAAGCCCA	CAGGAGGAAAATCTGGCCAGTTC
EgrGRAS42	GGCTCCATTACCCATCCGAG	GCCAAGAAGAGACTGTGAAGAGG
EgrGRAS55	CGTGAGGAGCGTGAAGATCAAC	CAACCAGGTGAGCATGATAGAGC
EgrGRAS56	CACCAGGAGTGTGAAGATTGACG	GACAAGGTGGGCATGATAAATTG
EgrGRAS62	GCCAAGGCCTCATCTTCCTTG	AAGCCGCTCACATTCACAAGTG
EgrGRAS67	GAAGCAGGCAATGAATGTCATT	CGTGTGATGATTTGTATGTCTCGG
EgrERF007	TTCCCGCGCAAATAACGGTAGC	AGCAGCGCAACCAAACCTTCTTG
EgrERF020	ACATGGCCTCGTTGCAGATGAC	TGAGAACTGGGTGGCTTCTGTG
EgrKNOX.K02826	GTATGTTGATTGCCACAAGGTTGG	GCCGGATTTCTGCCAGTAAACC
KNOX2826_27	GAAGAAAGTAACCGTAGCCATCATG	GCTCAGGTGAAAAGACGTCG
EgrMT2B	CGGATGCAAGAGGAACCCAAG	CTCAGTGCTCATCTCTGGCACCT
EgrWXP2	ATCGTCGTGTAATCCGACCAC	CGGAACGCATGAGATGATCCAC
EgrPeterPan	AAGTTGAGGAAGGATTGTGCTC	GTCAGCAGCATTTCCGTATTC
EgrbHLH42	TTTGGCACCCACGGAAAGGGTTC	TGGAGGTCGAGTGTTCGGAAAG
EgrbHLH11	TGCAGATAGCAAAGTCTTCACTCG	AAGCACACCACAGTCTGAATGG
EgrAP201	AGCGAGATAGAAGCTGCAAGGGC	TCAAAGTTGGTGACGGCTTCCC
EgrAP220	GGTAGGAAACTCTGCTGCATCCTG	TCCATGCAAGGAAAGACGCTAGG
EgrGA3ox7	CATCAGAAGCACAAAGGCTGCTC	AACGAAGAGATCCGTGCCACAC
EgrMYB10	CGTTGCCCAAGATCACAAACAAC	TGGCCAAAGCTGTTCATCATCG
EgrMYB5.2	CGATTGCTTGGTAAACAGGTGGTC	TTCTTGCTGATGAGTTTCTTGC
EgrGA3ox8	GCAAGTGCTTAAAGAAGGCAGTGG	CATTGCTCGATGGAGGACGAAG
EgrRS06	TCAGAGCTGTTCTTCAAGGGAACG	TGTATCAACGGCAGGATCACAC
EgrRS07	CACCCAATGGCGGAATATCATGG	GCTGACCAGGTTTATCACTGACG
EgrRS11	TGCTTCTCTTCAACCCGGTGAC	AACTTGCTCGTGGCGACTTTGG
EgrGolS05	GACACGTCCTTGATCTGAGTGC	GGTGCAGGAACATAGGAGATAGCG
EgrGolS10	CGATAAGGGTAAACTCCATCGCC	CACCTCATATCTTTTACCAGATCC
EgrGolS11	CCGCAATATGAAATCGGGTATTG	CCGCGTTGAAGTAAAAAGGCG
EgrGolS12	ATAAGGGTAACTCCGTCGCC	GCACCTCATATCTTTTACCCTTATCC
EgrBrevisRadix	ACCAAGGTCTGAAGATGAGAGC	CGTGGTAGACGTTCTTTGTAAG

Annexe III-20. Liste des gènes impliqués dans la tolérance (étudiés en RT-qPCR)

Niveau de surexpression chez la lignée A25 et la lignée B9 est l'expression relative par rapport à la lignée contrôle (=1). Les gènes de référence utilisés: *18S* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions techniques (test statistique de Student).

Gène	Phytozome locus	CRT/DRE	LTRE	A25	B9
EgrDHN-02	nd	5	8	18,41±3,17	13,91±0,26
EgrDHN-03	nd	3	3	72,81±4,95	72,64±0,01
EgrDHN-06	Eucgr.F01726	1	2	nd	nd
EgrDHN-08	Eucgr.I01292		1	2,11±0,16	4,08±0,00
EgrDHN-09	nd	1	1	401,09±90,25	1341,90±16,06
EgrDHN-10	Eucgr.I02392	2	4	14,51±0,67	15,86±0,06
EgrDHN-11	Eucgr.I02395	4	6	44,30±0,02	7,98±0,02
EgrDHN-14	nd	3	3	12,12±0,01	15,85±0,43
EgrLEA1-02	Eucgr.K01836	1	2	1,34±0,00	3,81±0,58
EgrLEA2-24	Eucgr.D02327	1	1	5,97±1,06	0,86±0,04
EgrLEA3-03	Eucgr.H01105	1	1	15,30±115,95	45,43±11,13
EgrLEA-like-12	Eucgr.D00819	1	1	4,68±0,61	2,45±0,06
EgrLEA-like-14	Eucgr.D01804	1	1	4,68±0,03	2,83±0,04
EgrLEA-like-15	Eucgr.D01805	1	1	2,06±4,70	3,78±8,13
EgrLEA-like-24	Eucgr.E00793	1	1	7,63±7,83	157,39±0,04
EgrLEA-like-35	Eucgr.F00213	1	4	97,59±24,35	18,35±0,27
EgrLEA-like-40	Eucgr.F03133	1	1	2,58±2,63	37,54±1,02
EgrLEA-like-49	Eucgr.J00543	1	1	2,53±1,12	24,89±0,57
EgrLEA-like-52	Eucgr.J01845	1	2	6,86±23,95	121,24±43,13
EgrLEA-like-58	Eucgr.J02119	1	3	10,14±0,34	24,05±17,67
EgrLEA-like-66	Eucgr.K01313	1	2	95,36±29,40	186,60±0,41
EgrLEA-like-67	Eucgr.K02330	1	1	1,71±2,51	38,46±2,80
EgrHSP70-13	Eucgr.J00023	1	2	32,23±0,36	20,38±0,42
EgrHSP70-14	Eucgr.J00025	1	2	2,67±0,45	3,84±0,04
EgrElip-7	Eucgr.B01895.2	2	2	2,40±0,07	0,06±0,10
EgrElip-8	Eucgr.B01896.1	1	2	6,19±0,76	0,09±0,01
EgrGolS-02	Eucgr.B01793	2	2	12,34±0,16	5,45±0,07
EgrGolS-04	Eucgr.H00906		1	33,28±1,41	80,97±0,58
EgrGolS-05	Eucgr.H02584	1	3	0,70±0,00	1,51±0,01
EgrGolS-10	Eucgr.L00240	1	2	0,00±nd	0,00±0,00
EgrGolS-11	Eucgr.L00241	1	2	4,74±0,67	6,24±0,41
EgrGolS-12	Eucgr.L00243	1	1	nd	nd
EgrRS-04	Eucgr.C04266	2	5	1,38±0,00	2,87±0,00
EgrRS-06	Eucgr.F01231	1	1	0,80±0,01	0,75±0,00
EgrRS-07	Eucgr.F03658	3	5	1,75±0,07	1,53±0,03
EgrRS-10	Eucgr.I01757	1	2	4,46±0,28	5,06±0,06
EgrRS-11	Eucgr.J02233	1	1	0,78±0,02	0,47±0,00
EgrMT2-1	Eucgr.A01262	1	2	1,69±0,05	1,46±0,01
EgrMT1	Eucgr.B02368	1	1	2,03 ± 0,02	0,78 ± 0,01
EgrMT3	Eucgr.F01127			2,02 ± 0,02	0,91 ± 0,00
Egrb-AMY5	Eucgr.E00330	2	2	1,76±0,04	1,40±0,00
Egrb-AMY7	Eucgr.H02879			1,32±0,02	1,68±0,01
EgrSPIRAL1	Eucgr.J01387	1	1	4,69±0,07	4,38±0,10
EgrSPIRAL2-4	Eucgr.D00655	1	1	1,96±0,08	3,63±0,01

Annexe III-21. Liste des gènes impliqués dans le développement (étudiés en RT-qPCR)

Niveau de surexpression chez la lignée A25 et la lignée B9 est l'expression relative par rapport à la lignée contrôle (=1). Les gènes de référence utilisés: *18S* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions techniques (test statistique de Student)

Gene	Phytozome locus	CRT/DRE	LTRE	A25	B9
EgrGA2ox3	Eucgr.F03208	2	2	1,80±0,07	1,19±0,02
EgrGA2ox4	Eucgr.F03208	2	2	1,38±0,04	0,58±0,00
EgrGA3ox8	Eucgr.J03019			0,00±nd	0,00±0,00
EgrGA20ox1	Eucgr.H05152	1		3,25 ± 0,050	11,90 ± 0,68
EgrGA20ox4	Eucgr.F02524			2,06 ± 0,01	3,10 ± 0,06
EgrGA3ox7	Eucgr.F02568		1	1,33 ± 0,01	3,67 ± 0,13
EgrPAT1-04	Eucgr.A00605	1	2	0,55 ± 0,06	2,25 ± 0,00
EgrHAM-01	Eucgr.A02754	1	6	82,89 ± 353,10	3037,38 ± 134,49
EgrLS-01	Eucgr.D01917	1	1	0,19 ± 0,00	0,05 ± 0,00
EgrLS-02	Eucgr.F01978	1	1	3,63 ± 0,21	8,05 ± 0,84
EgrNEW-03	Eucgr.H01009	1	2	3,69 ± 0,16	3,60 ± 0,02
EgrSCR-03	Eucgr.H03356			0,49 ± 0,79	38,10 ± 0,69
EgrSHR-03	Eucgr.I00236	1	3	0,99 ± 0,09	4,93 ± 1,37
EgrSCL3-03	Eucgr.I01625			1,25 ± 0,66	22,14 ± 1,74
EgrLISCL-23	Eucgr.J01242	2	2	2,08 ± 0,14	2,63 ± 0,01
EgrDELLA-02	Eucgr.G02163	1	2	2,28 ± 0,07	2,62 ± 0,11
EgrSCR-06	Eucgr.K01320	1	3	18,81 ± 2,39	26,86 ± 0,27
EgrSCR-07	Eucgr.K02752		2	4,04 ± 1,00	12,77 ± 0,03
EgrDELLA-03	Eucgr.J01594		1	1,46 ± 0,02	1,61 ± 0,00
EgrDELLA-01	Eucgr.C04156	1	2	0,97 ± 0,05	0,48 ± 0,08
EgrSCL3-01	Eucgr.B03716	1	4	0,52 ± 0,01	1,32 ± 0,00
EgrNEW-04	Eucgr.H01010	1	3	0,92 ± 0,03	0,36 ± 0,02
EgrKNOX3-7	Eucgr.D01935		1	1,99 ± 0,05	3,19 ± 0,02
EgrKNOX3-6	Eucgr.H03292			3,91 ± 0,15	8,22 ± 0,10
EgrKNOX3-8	Eucgr.H02544		1	1,35 ± 0,01	1,69 ± 0,06
EgrKNOX26-27	Eucgr.K02826	1	2	4,89 ± 5,18	9,47 ± 2,82
EgrbHLH11	Eucgr.D01841	1	1	1,98 ± 0,04	3,78 ± 0,01
EgrbHLH42	Eucgr.H01487	1	1	2,03 ± 0,05	2,15 ± 0,00
EgrAP2-20	Eucgr.J02113.1	1	1	1,37 ± 0,01	2,30 ± 0,01
EgrAP2-01	Eucgr.A01182.1	1	1	1,18 ± 0,04	1,49 ± 0,02
EgrDREB54	Eucgr.H02094.1	3	4	0,55 ± 0,06	0,63 ± 0,15
EgrSHN1A	Eucgr.C01178.1	1	1	211,96 ± 158,28	481,38 ± 16,77
EgrSHIN1B	Eucgr.C04221.1	1	1	1,31 ± 0,00	0,15 ± 0,00
EgrERF007	Eucgr.B00720.1			1,29 ± 0,00	1,44 ± 0,01
EgrERF020	Eucgr.C02719.1			0,65 ± 0,02	1,07 ± 0,01
EgrWAX2	Eucgr.C00214.1			0,74 ± 0,00	1,22 ± 2,30
EgrNAC007	Eucgr.E03226			0,97 ± 0,07	0,89 ± 0,00
EgrNAC24	Eucgr.A02638			2,54 ± 0,13	2,91 ± 0,05
EgrNAC65	Eucgr.F01091	3	4	3,47 ± 0,05	4,95 ± 0,10
EgrNAC078	Eucgr.F04341			1,11 ± 0,27	0,80 ± 0,13
EgrBrevis radix	Eucgr.C00839	1	1	1,50 ± 0,06	3,11 ± 0,01
EgrPeter PAN	Eucgr.K03479	1	1	1,25 ± 0,02	1,22 ± 0,01
EgrCOBRA-03	Eucgr.B00629	2	3	0,84 ± 0,05	2,51 ± 0,05
EgrCOBRA-05	Eucgr.F03435	1	1	1,55 ± 0,16	0,41 ± 0,06
EgrMYB10	Eucgr.A02110	1	1	1,68 ± 0,03	2,31 ± 0,01
EgrMYB5.2	Eucgr.K01504	1	2	1,24 ± 0,08	1,72 ± 0,02

Annexe III-22. Liste des gènes impliqués dans la formation de tige (étude Fluidigm)

Niveau de surexpression chez la lignée A25 et la lignée B9 est l'expression relative par rapport à la lignée contrôle (=1). Les gènes de référence utilisés: *SAND*, *EF-1a*, *IDH* et *PP2A1* et *PP2A3*. Les valeurs moyennes sont obtenues pour 3 répétitions biologiques (test de Student)

Famille	Gène	Phytozome locus	Plante à 18 mois	Plantes à 4 mois				Cis-élément
			A25	A25	A27	B14	B9	
PAL	EgrPAL1	Eucgr.A01144	0,02	2,51	2,97	4,78	2,1	
	EgrPAL2	Eucgr.C03570	0,76	1,51	1,77	1,26	1,53	
	EgrPAL3	Eucgr.G02848	1,69	0,76	1,22	0,7	0,59	DRE
	EgrPAL4	Eucgr.G02849	11,13	0,79	1,1	0,83	0,86	DRE
	EgrPAL5	Eucgr.G02850	0,29	2,21	1,51	0,67	2,55	DRE
	EgrPAL7	Eucgr.G02852	0,91	1,04	1,1	0,87	0,83	DRE
	EgrPAL8	Eucgr.J00907	0,08	0,38	0,81	0,88	0,87	LTRE
EgrPAL9	Eucgr.J01079	1,58	2,09	1,52	1,49	1,08	DRE	
C4H	EgrC4H1	Eucgr.C00065	0,47	0,94	0,58	2,79	0,73	
	EgrC4H2	Eucgr.J01844	0,44	0,6	0,75	3,4	0,92	
4CL	Egr4CL1	Eucgr.C02284	1,63	0,97	1,02	1,18	0,7	LTRE
HCT	EgrHCT1	Eucgr.F03972	nd	nd	2,6	nd	2,38	DRE
	EgrHCT2	Eucgr.F03973	nd	nd	ndn	nd	nd	
	EgrHCT4	Eucgr.F03978	0,74	1,94	1,5	2,9	1,08	
	EgrHCT5	Eucgr.J03126	1,89	1,14	0,92	0,63	0,67	
C3H	EgrC3H1	Eucgr.A02185	7,18	0,42	0,85	0,46	0,43	
	EgrC3H2	Eucgr.A02188	0,8	5,53	16,66	12,04	5,19	LTRE
	EgrC3H3	Eucgr.A02190	4,43	0,8	1	3,2	0,6	DRE
	EgrC3H4	Eucgr.G03199	1,34	0,78	0,64	2,99	1,46	LTRE
CCoAOMT	EgrCCoAOMT1	Eucgr.I01134	1,21	0,86	0,9	3,07	0,82	
	EgrCCoAOMT15	Eucgr.H04646	2,01	1,54	2,11	4,06	6,98	
	EgrCCoAOMT17	Eucgr.H04650	0,11	1,33	1,57	3,75	3,05	
	EgrCCoAOMT2	Eucgr.G01417	1,3	0,93	0,96	2,2	0,78	
CCR	EgrCCR1	Eucgr.J03114	0,95	0,94	0,87	0,96	0,79	LTRE
	EgrCCR2	Eucgr.F03954	nd	0,79	3,46	5,1	7,13	DRE
	EgrCCR3	Eucgr.B02222	3,39	0,67	1,15	0,68	0,77	DRE
COMT	EgrCOMT1	Eucgr.A01397	0,81	1,08	0,93	0,97	0,61	
	EgrCOMT13	Eucgr.A01865	nd	ndn	nd	nd	nd	
	EgrCOMT12	Eucgr.A01863	0,02	0,42	1,78	2,36	1,07	
	EgrCOMT24	Eucgr.A02870	nd	nd	nd	nd	nd	DRE
	EgrCOMT3	Eucgr.A01389	0,27	0,38	1,95	3,7	1,23	
	EgrCOMT35	Eucgr.F02623	1,94	0,63	1,16	0,86	0,62	
	EgrCOMT4	Eucgr.A01392	nd	nd	0,56	2	nd	
	EgrCOMT57	Eucgr.K00041	nd	2,25	2,38	3,82	1,49	DRE
	EgrCOMT6	Eucgr.A01395	nd	nd	nd	nd	nd	
	EgrCOMT61	Eucgr.K00951	6,03	0,7	0,97	0,83	0,68	
EgrCOMT64	Eucgr.K00955	0,24	3	1,22	1,31	1		
EgrCOMT65	Eucgr.K00956	0,16	0,9	0,96	0,91	0,71		
F5H	EgrF5H1	Eucgr.I02371	0,45	1,45	1,37	1,12	0,8	DRE
	EgrF5H2	Eucgr.J02393	nd	nd	nd	2,77	nd	DRE
CAD	EgrCAD18	Eucgr.E01108	14,92	0,47	1,03	0,43	0,64	DRE
	EgrCAD2	Eucgr.G01350	4,41	0,86	1,22	1	1	DRE
	EgrCAD34	Eucgr.G02223	0,079	6,25	5,51	1,9	1,24	DRE
	EgrCAD21	Eucgr.E01117	1,02	1,26	1,17	1,11	1,2	DRE
	EgrCAD6	Eucgr.D00472	nd	0,41	1,27	2,47	1,34	
	EgrCAD9	Eucgr.D01087	0,053	0,42	2,28	4,55	1,23	LTRE
CesA	EgrCesA1	Eucgr.A01324	1,4	1,08	0,93	0,97	0,56	DRE
	EgrCesA2	Eucgr.C01769	0,92	0,79	0,97	0,96	0,92	DRE
	EgrCesA3	Eucgr.G03380	1,4	0,8	1,1	0,92	0,86	LTRE
	EgrCesA4	Eucgr.D00476	1,01	1,1	0,91	1,02	0,57	
	EgrCesA5	Eucgr.F03635	0,68	1,11	0,97	1,36	1,29	DRE
	EgrCesA6	Eucgr.I00286	1,2	1,4	1,68	1,1	0,78	DRE
FRA	EgrFRA1	Eucgr.J02860	1,16	1	1,18	1,26	1,1	LTRE
	EgrFRA2	Eucgr.G01977	1,04	0,99	0,92	0,87	0,62	LTRE

	EgrFRA3	Eucgr.J00384	1,34	0,83	1,05	0,9	0,91	LTRE
Galacturonosyltransferase	EgrGAUT1	Eucgr.D01335	1,27	0,71	1	0,97	1,15	DRE
	EgrGAUT2	Eucgr.A00881	2,6	0,66	1,16	1,1	0,83	DRE
	EgrGAUT3	Eucgr.K02133	2,18	0,92	1,33	3,94	0,81	DRE
	EgrGAUT4	Eucgr.D00963	1,64	0,6	0,95	1,29	0,83	
	EgrGAUT5	Eucgr.I02091	1,46	0,72	1	1,02	0,89	DRE
Glycosyltransferase	EgrGT1	Eucgr.A00510	0,05	0,35	2,78	8,03	2,19	DRE
	EgrGT2	Eucgr.J01374	0,58	1,36	1,43	3,26	1,55	DRE
	EgrGT3	Eucgr.A02868	2,1	2,47	2,16	1,06	0,83	DRE
Galactosyltransferase	EgrGalTase1	Eucgr.E02455	1,12	0,93	0,97	3,74	0,8	DRE
	EgrGalTase2	Eucgr.H04088	2,84	0,42	0,85	0,65	0,66	DRE
Glucan synthase	EgrGLS1	Eucgr.B00160	0,9	1,07	1,3	1,12	1,14	DRE
	EgrGLS2	Eucgr.B03640	2,6	1	1,3	0,84	0,77	DRE
	EgrGLS3	Eucgr.J00836	1	0,92	1,1	0,98	1,06	LTRE
XET	EgrXET1	Eucgr.C00179	14,47	2,11	1,34	0,29	0,25	DRE
	EgrXET2	Eucgr.C00180	9,5	0,64	1,5	0,3	0,31	DRE
Laccase	EgrLAC1	Eucgr.G03098	0,73	1	1,08	0,92	0,49	DRE
	EgrLAC2	Eucgr.J01941	0,9	1,7	1,6	1,01	0,84	DRE
	EgrLAC3	Eucgr.F02674	1,6	0,56	0,81	1,01	0,82	DRE
MYB R2R3	EgrMYB20	Eucgr.B00866	0,14	0,34	0,66	0,89	1,23	
	EgrMYB23	Eucgr.B01964	nd	nd	nd	nd	nd	
	EgrMYB36	Eucgr.C00721	0,1	0,45	0,54	0,9	1,04	LTRE
	EgrMYB64	Eucgr.D02390	0,14	0,28	0,7	1,76	1,03	DRE
	EgrMYB19	Eucgr.B00865	0,01	2,79	0,4	1,4	2,21	
	EgrMYB62	Eucgr.D02099	1,07	0,65	0,78	3,21	1,19	
	EgrMYB82	Eucgr.F02864	1,38	0,83	1,27	0,89	0,75	
	EgrMYB59	Eucgr.D01701	0,16	0,8	0,85	4,65	2,06	
	EgrMYB47	Eucgr.C03151	0,72	0,84	2,01	3,89	1,54	
	EgrMYB8	Eucgr.A01767	1,23	0,82	1,7	1,16	1,61	LTRE
	EgrMYB73	Eucgr.F00002	1,12	1,21	1,7	3,3	0,84	DRE
	EgrMYB41	Eucgr.C00826	2,1	0,63	0,8	4,96	1,24	DRE
EgrMYB130	Eucgr.K00153	1,1	0,72	0,84	2,65	0,75	LTRE	

Résumé

Eucalyptus, feuillu le plus planté dans le monde, est fortement exposé au froid en raison de l'absence de dormance. Les facteurs de transcription CBF (CRT-binding Factor) jouent un rôle important dans la réponse aux stress abiotiques, particulièrement au froid. Préalablement à mes travaux, 17 gènes *CBF* avaient été identifiés chez *E. grandis*. Une étude fonctionnelle par surexpression de gènes *CBF* chez un hybride d'*E. urophylla* x *E. grandis* avait été initiée avec un phénotypage des lignées transgéniques au stade microboutures. Mon travail s'est articulé autour d'une étude *in silico* du régulon potentiel des *CBF* et de la caractérisation des sur-exprimants *CBF* après les avoir enracinés puis acclimatés *ex vitro*. Les résultats obtenus mettent en évidence de profondes modifications dans la tolérance, la croissance, la morphologie et l'anatomie des transformants qui, le plus souvent, ont pu être reliées à la surexpression de gènes impliqués dans ces processus. Au-delà d'un impact sur les feuilles, ces travaux suggèrent fortement pour la première fois un contrôle très important des *CBF* sur la formation de la tige.

Mots clés : *Eucalyptus*, *CBF*, surexpression, tolérance, stress abiotiques, développement.

Abstract

Eucalyptus, the most widely planted hardwood in the world, is highly exposed to the cold due to the lack of dormancy. CBF transcription factors play an important role in the response to abiotic stress, particularly cold stress. Previously, 17 *CBF* genes have been identified in *E. grandis* and a functional study of *CBF* genes by overexpressing in a hybrid *E. urophylla* x *E. grandis* has been initiated through the phenotyping of transgenic lines at microcutting stage. My work involved *in silico* study of the potential CBF regulon and the characterization of these transformants after rooting and *ex vitro* acclimatization. The results show substantial changes in tolerance, growth, morphology and anatomy of transformants which most often could be associated to the overexpression of genes involved in the corresponding process. Beyond the impact on the leaves, this work strongly suggests for the first time a very important control of *CBF* on stem formation.

Keywords: *Eucalyptus*, *CBF*, overexpression, abiotic stress, tolerance, development.