

## Mécanismes moléculaires du remodelage du bois en réponse au froid chez l'Eucalyptus

HADJ BACHIR Ines<sup>1</sup>, PLOYET Raphael<sup>1</sup>, CAO Bang<sup>1</sup>, SAN CLEMENTE Hélène<sup>1</sup>, AGUILAR Marielle<sup>1</sup>, DUPAS Annabelle<sup>1</sup>, LADOUCE Nathalie<sup>1</sup>, GRIMA-PETTENATI Jacqueline<sup>1</sup>, TEULIERES Chantal<sup>1</sup>, HUSSEY Steven<sup>2</sup>, MOUNET Fabien<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546 UT3/CNRS/Toulouse INP, 31320 Auzeville-Tolosane

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Genetics and Microbiology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), Genomics Research Institute (GRI), University of Pretoria, Private Bag X28, Pretoria 0002, South Africa

[ines.hadj-bachir@lrsv.ups-tlse.fr](mailto:ines.hadj-bachir@lrsv.ups-tlse.fr)

**Mots clefs :** Eucalyptus, stress froid, xylogénèse, paroi secondaire, biologie des systèmes, régulation transcriptionnelle

### Contexte et objectifs

En tant que plantes pérennes, les arbres sont particulièrement soumis aux contraintes de l'environnement, et d'autant plus menacés par le changement climatique. Le bois, appelé aussi xylème secondaire, est un tissu essentiel à la physiologie de l'arbre. Il est formé à partir des cellules souches du cambium vasculaire, par un processus appelé xylogénèse, qui génère différents types cellulaires spécialisés (majoritairement des vaisseaux, des cellules de rayons et des fibres). Lors de leur différenciation, les cellules cambiales se divisent et grandissent, puis s'entourent d'une paroi secondaire épaisse, composée principalement de lignines, cellulose et hémicelluloses (Plomion, 2001). Toutes ces étapes sont finement régulées par un réseau complexe et hiérarchisé de facteurs de transcription. En réponse aux contraintes de l'environnement, on assiste à une reprogrammation de l'expression de ces gènes, qui se traduit par une modification de la structure et de la composition du bois. Ce mécanisme est encore mal compris, il agit à l'interface entre la réponse aux stress et la formation du bois. Cette plasticité, qui contribue à l'adaptation des arbres vis à vis des contraintes abiotiques, implique de nombreux gènes dont la fonction est encore inconnue. Dans le cadre de mon doctorat, réalisé au sein de l'équipe « Régulation et Dynamique de la formation du Bois » (ReDyWood), je m'intéresse à l'effet du froid sur le processus de différenciation du xylème secondaire. Des travaux antérieurs ont montré que la voie de signalisation impliquant les facteurs de transcription DREB1/CBF jouait un rôle majeur dans le remodelage des tissus du bois en réponse à une acclimatation au froid (Nguyen 2017 ; Ployet 2018 ; Cao 2020). Les CBF sont des éléments clés de la réponse au froid chez les plantes, ils sont très rapidement induits et sont capables de réguler l'expression de gènes cibles qui contribuent à augmenter la tolérance au gel de la plante (Zhao 2016). J'ai donc pour objectif : (1) d'identifier les cibles des facteurs de transcription CBF, (2) de caractériser finement les effets du froid sur la structure et la composition du bois et (3) de comprendre en quoi ces modifications contribuent à la tolérance des arbres vis-à-vis du froid. Mes travaux sont réalisés chez l'Eucalyptus, arbre feuillu le plus planté au monde, qui représente une ressource agronomique très importante, notamment pour la production de pâte à papier. L'utilisation des espèces les plus productives d'Eucalyptus dans les filières forestières des pays de l'hémisphère nord est limité par leur forte sensibilité au gel. Je travaille donc sur une variété hybride d'*Eucalyptus gunnii* (*E.gunnii* x *E.dalrympleana*) capable de résister aux conditions hivernales. Ces arbres, qui ne

présentent pas d'endodormance, ont une croissance continue, y compris en hiver, ce qui laisse présager des mécanismes biologiques originaux en réponse au stress froid.

### Matériel et méthode

Des outils d'analyses automatisées de coupes transversales de xylème ont été utilisés pour mesurer des paramètres cellulaires (épaisseur de paroi, taille et densité des vaisseaux, activité cambiale) à partir de tiges de plants d'Eucalyptus âgés de 6 mois, soumis ou non à une acclimatation au froid à 4°C pendant 7 semaines. La composition du xylème est analysée par des dosages biochimiques ciblés et une approche globale de spectroscopie infra rouge à transformée de fourrier (FT-IR) à partir de poudre de tiges sans écorce. Ces données sont corrélées, par des approches de biologie des systèmes, à des données transcriptomiques afin d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans le remodelage des tissus du bois en réponse au froid. J'ai utilisé la technique de DNA Affinity Purification Sequencing (DAPseq), une nouvelle génération d'analyse haut débit, pour identifier les cibles de ces facteurs de transcription.

### Résultats et discussion

Nous avons pu montrer que le remodelage du xylème secondaire en réponse au froid est caractérisé par un ralentissement de l'activité cambiale, un épaississement et une lignification de la paroi secondaire des cellules du xylème situées immédiatement sous le cambium, correspondant au xylème en différenciation formé pendant l'acclimatation au froid (Fig. 1 : zone entre les pointillés), ainsi que la formation de vaisseaux plus petits et en plus grand nombre. Ce phénotype est observé en réponse à une acclimatation au froid en conditions contrôlées, aussi bien que sur des arbres adultes dont le xylème a été récolté en hiver (Poyet 2018). Des phénotypes similaires sont observés dans des Eucalyptus transgéniques qui surexpriment un facteur de transcription essentiel de la réponse au froid, appartenant à la famille des CBF (Cao 2020). De plus, l'analyse FTIR montre une modification du spectre d'absorption en réponse à une acclimatation au froid, au niveau de nombres d'ondes reliés à des composés de la paroi secondaire (cellulose, hémicelluloses et lignine) d'après les données de la littérature (Fig. 2).

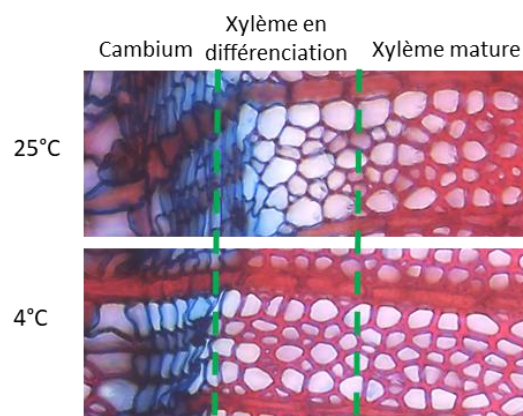


Fig. 1 : La structure et la composition du bois est modifiée en réponse au froid. Coloration Safranine/Astra Blue de sections transversales de tiges d'Eucalyptus, ayant poussé à 25°C ou pendant 7 semaines à 4°C.

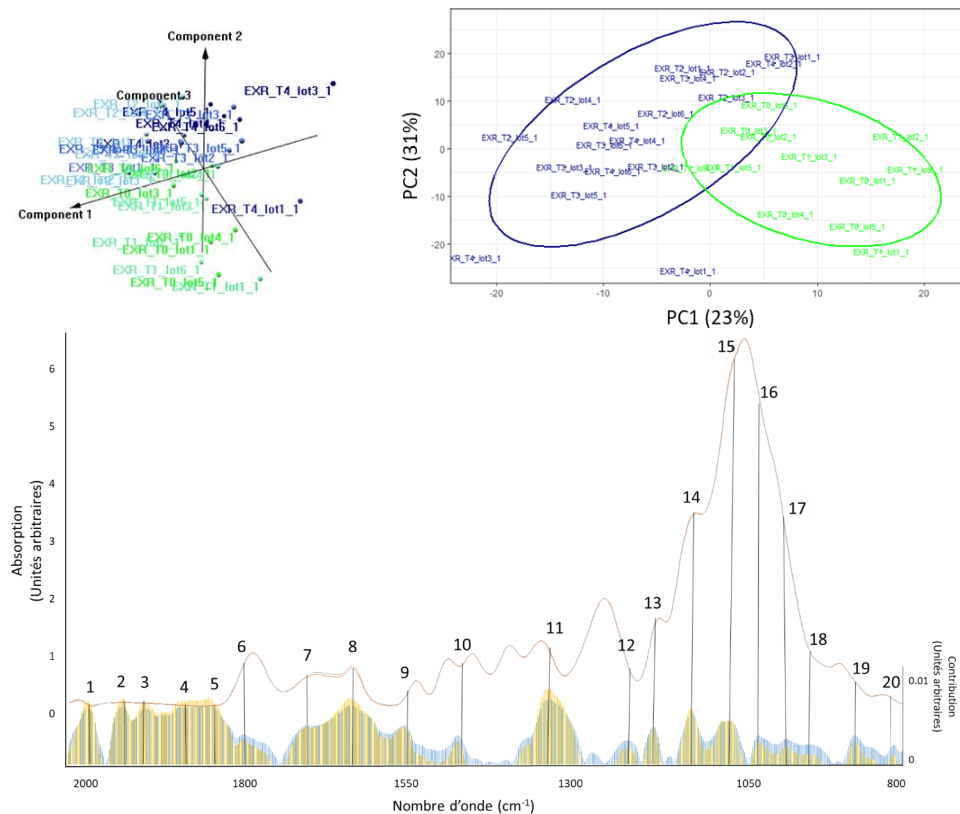


Fig. 2 : L'analyse FTIR révèle des changements majeurs de composition de la paroi secondaire du bois en réponse au froid. A : PLSDA 3D réalisée sur les valeurs normalisées du spectre d'absorption (2000 à 800  $\text{cm}^{-1}$ ), à partir d'échantillons de tiges ayant subi une cinétique de stress froid. B : PLSDA réalisée sur 2 groupes : échantillons avant (T0 et T1, en vert) ou après une longue acclimation au froid (T2, T3 et T4, en bleu). C : Spectres médians d'absorption des échantillons avant (courbe grise) ou après (courbe orange) une longue acclimation au froid. L'histogramme bleu représente la contribution de chaque nombre d'onde à la composante 1 de la Fig. 2B. L'histogramme jaune représente la contribution des 500 nombres d'ondes les plus discriminants sur la composante 1, identifiés à partir d'une Sparse-PLSDA. Les nombres représentent les nombres d'ondes expliquant le mieux la séparation des échantillons, certains d'entre eux étant reliés à des composés de la paroi d'après les données de la littérature.

L'analyse du transcriptome des tissus du xylème soumis au froid montre que les CBF sont au cœur d'un réseau de co-expression impliquant aussi bien des mécanismes de défense que des gènes impliqués dans la formation du bois. La recherche de cibles directes de ces facteurs de transcription CBF par DAPseq a révélé un nombre conséquent de gènes reliés au processus de différenciation du xylème secondaire : on retrouve des gènes de biosynthèse de lignines, de cellulose, d'hémicelluloses, des régulateurs de la formation de la paroi secondaire mais aussi des gènes impliqués dans des voies de signalisation hormonales comme l'auxine (Fig. 3). Tout ceci contribue à confirmer l'hypothèse d'une implication de la voie de signalisation de la réponse au froid impliquant les facteurs de transcription CBF dans le remodelage du bois observé en réponse au froid.

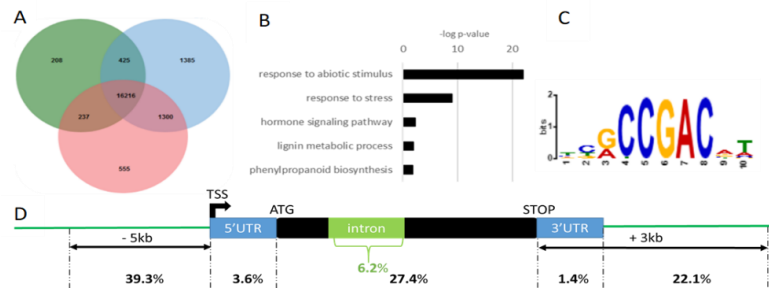


Fig.3 : CBF a un rôle clé dans la réponse au stress et le remodelage du xylème secondaire. A : Diagramme de Venn des gènes cibles de CBF identifiés dans les trois répliques techniques. B : Analyse de Gene Ontology réalisée avec g:Profiler. C : La recherche de motif conservé via MEME-ChiP au sein des séquences de 500bp autour du maximum du pic révèle le motif consensus de liaison des CBF décrit dans la littérature. D : Localisation des pics identifiés

### Conclusion et perspectives

Le bois formé lorsque l'arbre est soumis à des températures froides présente des caractéristiques de composition et de structure différentes d'une croissance à température optimale. Ce remodelage du xylème secondaire en réponse au froid semble lié à l'action de facteurs de transcription CBF, un acteur clé de la réponse au froid chez les plantes. Les résultats de mes travaux montrent que les CBF pourraient influencer la formation du bois en induisant l'expression (1) de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi secondaire, (2) de facteurs de transcription qui contrôlent la différenciation des cellules du xylème et (3) en modifiant les balances hormonales impliqués dans la xylogénèse. Mon prochain objectif est de comprendre comment ces modifications du bois observées en réponse au froid peuvent contribuer à une meilleure tolérance de l'arbre face aux conditions gélives.

### Remerciements

Ce travail a été financé par le Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), l'Université Paul Sabatier Toulouse III (UPS, IDEX UNITI, projet EuCoWood), le Laboratoire d'Excellence TULIP (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). R.P. and I.H.B. ont bénéficié d'une bourse de thèse du Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Les auteurs remercient la FR AIB pour le financement Jeunes Scientifiques 2020 du projet DAPseq.

### Références

- Cao, P.B., Ployet, R., Nguyen, C., Dupas, A., Ladouce, N., Martinez, Y., Grima-Pettenati, J., Marque, C., Mounet, F., and Teulière, C. (2020). Wood architecture and composition are deeply remodeled in frost sensitive eucalyptus overexpressing CBF/DREB1 transcription factors. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–17.
- Nguyen, H.C., Cao, P.B., San Clemente, H., Ployet, R., Mounet, F., Ladouce, N., Harvengt, L., Marque, C., and Teulière, C. (2017). Special trends in CBF and DREB2 groups in *Eucalyptus gunnii* vs *Eucalyptus grandis* suggest that CBF are master players in the trade-off between growth and stress resistance. *Physiol. Plant.* 159, 445–467.
- Plomion, C., Leprovost, G., and Stokes, A. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* 127, 1513–1523.
- Ployet, R., Soler, M., Carocha, V., Ladouce, N., Alves, A., Rodrigues, J.C., Harvengt, L., Marque, C., Teulière, C., Grima-Pettenati, J., et al. (2018). Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*. *Tree Physiol.* 38, 409–422.
- Zhao, C., Zhang, Z., Xie, S., Si, T., Li, Y., and Zhu, J.-K. (2016). Mutational evidence for the critical role of CBF genes in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 171(4):2744–2759.