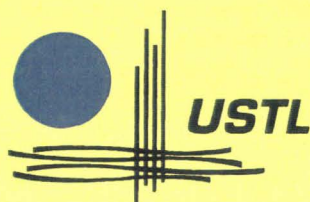


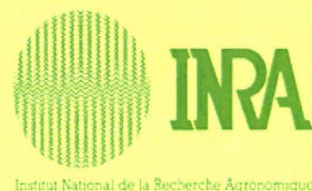
50376
2007
51

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE



UFR DE BIOLOGIE

Stress Abiotique et Différenciation des Végétaux Cultivés,
Equipe de Physiologie des Parois Végétales
UMR USTL/INRA 1281, ERT
UFR de Biologie, USTL,
59655 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex



THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Ecole Doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
Spécialité : Stratégie d'Exploitation des Fonctions Biologiques

Ahmad BAGHDADY

RÔLES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MYB D'*Eucalyptus* DANS LE CONTRÔLE DE LA LIGNIFICATION CHEZ *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh)

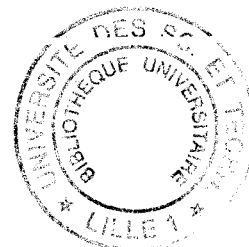
N° d'ordre : 4003

Présentée publiquement le 04 juillet 2007, devant le jury composé de :

M ^f Hilbert J.-L.	Professeur, Université de Lille I	Président / Examineur
M ^f Brière C.	Chargé de Recherche, (CR1), HDR, CNRS, Toulouse	Rapporteur
M ^f Driouich A.	Professeur des Universités, HDR, CNRS, Rouen	Rapporteur
M ^f Sivadon P.	MCF, CNRS, Toulouse	Examineur
M ^f HAWKINS S.	Professeur, Université de Lille I	Directeur de thèse



Sommaire



INTRODUCTI N GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	10
A. La xylogenèse	10
A.1. Formation du xylème primaire et secondaire	10
A.2. <i>Eucalyptus</i> : Modèles d'études, intérêts fondamentaux et appliqués.....	11
B. Organisation, architecture moléculaire et composition de la paroi cellulaire végétale	11
B.1 Organisation et fonction des parois végétales	11
B.2 La lamelle moyenne	12
B.3 La paroi primaire	13
B.4 La paroi secondaire	13
C. Architecture moléculaire de la paroi cellulaire	14
C.1 Polysaccharides de paroi cellulaire	14
C.1.1 La cellulose	15
C.1.2 Les hémicelluloses	16
C.1.3 Les pectines	16
C.2 Les composés protéiques de paroi	17
C. 3 Les composés phénoliques	18
C.3.1 Les lignines : nature, fonction et structure	19
C.3.2 Hétérogénéité des lignines	20
C.4 Autres constituants	21
D. La biosynthèse des composés phénoliques	21
D.1 La voie générale des phénylpropanoïdes	21
D.1.1 La PAL	21
D.1.2 Les étapes d'hydroxylation	22
D.1. 3 Les réactions de méthylation	23
D.1.4 La 4CL	24
D.2 La voie de biosynthèse des monolignols	25
D.2.1 La CCR	25
D.2.2 La CAD	26
D.2.3 La SAD	28
D.3 Stockage et transport des monolignols	28
D.4 La polymérisation des monolignols	29
D.4.1 Les peroxydases	29
D.4.2 Les laccases	30
E. Régulation transcriptionnelle et formation du xylème	30
F. La régulation transcriptionnelle des gènes de la lignification	32
F.1 Régulation transcriptionnelle de la lignification	32
F.2 Les facteurs de transcription Myb	33
F.3 Les Mybs chez les végétaux	33
F.4 Les répétitions des Mybs	36
F.5 La complexité et les sous-groupes de la famille R2R3-MYB	38
F.6 Rôle des facteurs R2R3-Myb	40

G. Etude des profils d'expression transcriptionnelle des gènes par la technique des puces à ADN (microarray)	43
G.1 La notion d'expression génique	44
G.2 Les techniques d'étude des profils de l'expression transcriptionnelle	45
G.2.1 L'étiquetage des transcrits	45
G.2.1.1 Les ESTs : étiquettes de gènes exprimés.....	45
G.2.1.2 Les étiquettes SAGE	46
G.2.1.3 L'approche MPSS	46
G.2.2 La technique ADNc-AFLP	46
G.2.3 Réseau d'ADN (Puces à ADN)	47
G.2.3.1 Les puces d'ADNc.....	47
G.2.3.2 Les puces d'oligonucléotides	48
G.2.3.3 Les puces représentant le génome entier	48
H. Objectifs du travail	49

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel végétal	53
A.1 Les plantes	53
A.2 Description des conditions de culture utilisée	53
A.2.1 Pour créer des lignées transgéniques.....	53
A.2.2 Pour obtenir une paroi secondaire.....	53
A.3 Souches bactériennes.....	53
A.3.1 <i>Escherichia coli</i>	53
A.3.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54
A.3.3 Conservation des souches	54
A.4 Constructions plasmidiques utilisées pour la transformation d' <i>Arabidopsis</i>	54
B. Méthodes.....	55
B.1 Méthodes relatives à la transformation.....	55
B.1.1 Transformation des bactéries.....	55
B.1.1.1 Préparation des bactéries <i>E. coli</i> compétentes.....	55
B.1.1.2 Transformation des bactéries CaCl ₂ compétentes par choc thermique ...	55
B.1.1.3 Sélection des clones transformés (Extraction d'ADN plasmidique).....	55
B.1.1.3.1 Minipréparation d'ADN : lyse alcaline.....	55
B.1.1.3.2 Vérification par digestion enzymatique	56
B.1.1.4 Transformation d' <i>A. tumefaciens</i> par congélation/décongélation	56
B.1.2 Transformation génétique d' <i>A. thaliana</i>	57
B.1.3 Stérilisation des graines et sélection des plantes transformées	57
B.2 Méthodes de biologie moléculaire	58
B.2.1 Extraction d'acides nucléiques.....	58
B.2.1.2 Extraction d'ADN génomique végétal	58
B.2.1.3 Extraction ARNs totaux	58
B.2.2 Migrations électrophorétiques	59
B.2.2.1 Electrophorèse d'ADN	59
B.2.2.2 Électrophorèse d'ARNs	60
B.2.3 Amplification d'ADN par PCR	60
B.2.3.1 Amplification standard.....	60

B.2 3.2 Transcription inverse et polymérisation en chaîne d'ADNc (RT-PCR)	61
B.3 Analyse des transformants	62
B.3.1 Analyse de l'activité GUS (β -glucuronidase)	62
B.3.1.1 Révélation histochimique de l'activité GUS	62
B.4 Vérification de la présence des transgènes par PCR	63
B.4.1 Sur colonie d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
B.4.2 Sur un disque foliaire d' <i>Arabidopsis</i>	63
B.5 Techniques de cytologie	64
B.5.1 Inclusions en résine de méthacrylate et préparer les coupes	64
B.5.2 Coloration au bleu de toluidine	64
B.5.3 Détection histochimique des lignines en microscopie optique	66
B.5.4 Observation microscopique du système vasculaire d' <i>A. thaliana</i>	66
B.6 Analyse chimique des parois de transformants	66
B.6.1 La méthode de Klason.....	66
B.7 Analyse de polymères polysaccharidiques	66
B.7.1 Le principe	67
B.7.2 Culture et préparation des parois	67
B.7.3 Hydrolyse	68
B.8 Analyse les profils d'expression génétique chez les transformants	
MYB d' <i>Arabidopsis</i> par les puces à ADN	68
B.8.1 Prélèvements	68
B.8.2 La technique	68
B.8.3 Le principe.....	68

RESULTATS CHAPITRE I70

Article 1 : *Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 Promoter activities are in lignifying cells during Primary and Secondary Xylem formation in *Arabidopsis thaliana*

RESULTATS CHAPITRE II71

A. Obtention des lignées transgéniques surexprimant <i>EgMYB</i> et leurs versions dominantes négatives	73
B. Caractérisation phénotypique des plantes <i>EgMyb1</i> ⁺ et <i>EgMyb2</i> ⁺	74
B.1 Analyses phénotypiques	74
B.2 Analyses histologiques.	75
B.3 Analyses chimiques des parois des plantes <i>EgMyb1</i> ⁺ et <i>EgMyb2</i> ⁺	81
B.3.1 Analyses de la lignine	81
B.3.2 Analyses de polymères polysaccharidiques.....	84
C. DISCUSSION	84
C.1 La sur-expression des gènes <i>EgMYB1</i> , <i>EgMyb2</i> induit des modifications phénotypiques importantes	85
C.2 La sur-expression du gène <i>EgMyb1</i> est associée à l'absence de tissus vasculaires secondaires dans la hampe florale	85
C.3 La sur-expression des gènes <i>Myb</i> est associée à la présence	

de cellules xylémiennes collapsées (EgMyb1) et aux modifications de la teneur en lignine (EgMyb1 et EgMyb2).	88
D. CONCLUSION	90

RESULTATS CHAPITRE III.....91

Recherche des gènes cibles des facteurs de transcription <i>EgMYB1</i> et <i>EgMYB2</i>	92
A. Génération des données de transcriptomique.....	93
A.1 Principe des puces à ADN	93
A.2 Le projet CATMA.....	94
A.3 Description du dispositif expérimental pour identifier les gènes cibles potentiels des facteurs <i>EgMYB</i> chez <i>Arabidopsis</i>	95
A.4 Analyses statistiques et tableaux de résultats	96
A.5 Pré-traitement informatique des résultats des hybridations sur puces CATMA	96
B. Analyse des résultats	98
B.1 Le tri des données.....	98
B.1.1 Les règles du tri.....	98
B.1.2 Les résultats du tri en fonction de la classification GO et des rapports d'expression par rapport au contrôle.....	100
B.2 Les processus biologiques qui dépendent probablement des gènes <i>EgMYB1</i> et <i>EgMYB2</i>	101
B.2.1 Les processus probables communs aux deux organes des surexprimeurs <i>EgMYB1</i> ⁺	101
B.2.2 Les processus probables communs aux deux organes des surexprimeurs <i>EgMYB2</i> ⁺	103
B.3 Les gènes qui sont potentiellement cibles des facteurs <i>EgMYB1</i> et <i>EgMYB2</i>	103
B.3.1 Gènes de paroi	104
B.3.1.1 Biosynthèse de la cellulose	104
B.3.1.2 Métabolisme de phénylpropanoïdes et biosynthèse des lignines	105
B.3.2 Expansion cellulaire	107
B.4 Analyse structurale des gènes cibles potentiels des facteurs <i>EgMYB</i>	108
C. Discussion	109

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....112

Conclusions générales	113
Perspectives	118

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE121

ANNEXES153

ABA : acide abscissique
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN Complémentaire
ADNc-AFLP : ADNc- Amplified Fragment Length Polymorphism
ADN-T : ADN de transfert
AGI : Arabidopsis Genome Initiative
AGP : Arabinogalactane Proteine
AMV : Rétrovirus du myéloblastome aviaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN Messenger
ARN Pol II : ARN polymérase II
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
BEt : bromure d'éthidium
bp: paire de bases
bZIP : leucine zipper (facteur de transcription)
C3H : Coumarate 3-Hydroxylase
C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase
CAD : Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase : alcool cinnamylique déshydrogénase
CaMV : Virus de mosaïque de chou-fleur
CAP : catabolite activator protéine
CATMA : Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray
CCA1 : Circadian clock associated1
CCoAOMT : Caféoyl Coenzyme A *O*-MéthylTransférase
CCR : Cinnamoyl Coenzyme A Réductase
CDK7 : cyclin-dependent kinase 7
4CL : 4-coumarate CoA ligase
Col-0 : Columbia-O
COMT : acide Caféique/acide 5-hydroxyfêrulique *O*-MéthylTransférase
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
CTAB : cethyltriméthylammonium bromide
CTD : carboxy terminal domain kinases
CTF : CCAAT binding transcription factor
DCG : Glycosylés d'alcool coniférylique
dCTP : désoxycytidine 5'-triphosphate

DEPC : diéthylpyrocarbonate
DNase : Deoxyribonucléase
Dnmt : DNA méthyltransferase
dNTP : désoxyribonucléoside 5' phosphate
DO : densité optique
dTTP : désoxythymine 5'-triphosphate
DO : densité optique
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine triacétique
EST : Expressed Sequence Tag (étiquettes de séquences exprimées)
EtOH : Ethanol
F5H : Férulate 5-Hydroxylase
G : Gaïacyle
GFP : Protéines fluorescentes
GFT : Facteurs généraux de transcription
GLP : protéines « germin-like »
GRP : Glycin Rich Protein : Protéine riche en glycine
GST : Gene Sequence Tag
GUS : β -glucuronidase
H : *p*-Hydroxyphényl (en général) ou 4-Hydroxybenzaldéhyde (réaction du nitrobenzène)
HATs ou HDACs : Histones acétyltransférases ou déacétylases
HCl : Acide Hydrique
HD : homéodomains
HRGP : Hydroxyprolin Rich GlycoProtein : Glycoprotéine riche en hydroxyproline
HTH ou HBH : Hélice-Tour-Hélice ou Hélice-Boucle-Hélice
Kb : kilo base
KDa : kilodalton
LB : milieu de Luria-Bertani
LHY : Late Elongated Hypocotyl
Mb : megabases
MBD : Methyl Binding Protein
 μ g : microgramme ,
mL : millilitre
 μ l : microlitre
MOPS : acide 3-[N-morpholino]propane sulfonique

MPSS : Massively Parallel Signature Sequencing
NPTII : Néomycine phosphotransférase II
MS : Murashige and Skoog
MYB : Oncogene de v-Myb du virus de myeloblastosis (*Avian myelobblastosis*)
NaOH : Hydroxyde de sodium
nm : nanomètre
OMT : *O*-MéthylTransférase
PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase
pb : Paire de base
PCR : Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne
PME Pectine MéthylEstérase
PRP : Prolin Rich Protein : protéine riche en proline
p/v : rapport Poids / Volume
RNase : Ribonuclease
rpm: roll par minute
RT : Reverse transcription
S : Syringyle
SAD : Sinapyl Alcohol Dehydrogenase : alcool sinapylrique déshydrogénase
SAGE : Serial Analysis of Gene Expression
SDS : dodécyl sulfate de sodium
SPIR : Spectrométrie dans le Proche Infrarouge
SSII : SuperScript II aa
T0 : Plantes sauvages
T1 : Transformants primaires
T2 : Deuxième génération (lignées himizygotés)
T3 : Troisième génération (lignées homozygotés)
TAE : Tris-acetate-EDTA buffer
TAF : TBP-associated factor
TBP : TATA-binding-protein
TE8 : Tris-EDTA pH8
TEMED : N, N, N, N, tétra méthyl éthylène diamine
TFII : Facteur de transcription II (A, B, D, E, F, H)
TFA : acide trifluoroacétique
TMV : Virus de mosaïque de tabac
Tris : Tris [hydroxyméthyl] aminométhane

Tween : polyoxyéthylène-sorbitan mono-oléate

UHQ : Ultra Haute Qualité

URGV : Unité de Recherche en Génomique Végétale

UV : Ultra-Violet

V : volte

v/v : rapport Volume / Volume

WS : Wassileweskija

X-Gluc: 5-bromo- 4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid

INTRODUCTION

Introduction générale

À la fin de la période silurienne, il y a environ 400 millions d'années, l'apparition du système vasculaire a joué un rôle crucial dans l'adaptation des végétaux à la vie terrestre. En effet, l'acquisition par certains végétaux, les plantes vasculaires, de la capacité à synthétiser les lignines a probablement été un facteur déterminant dans leur conquête du milieu terrestre (Lewis et Yamamoto., 1990). De par leurs propriétés physico-chimiques, les lignines sont impliquées dans différents rôles biologiques comme la rigidité de l'appareil végétatif, l'étanchéité du système vasculaire et l'exclusion des pathogènes en se comportant comme une barrière physique difficilement franchissable (Walter, 1992). Seule la lignification des parois donne aux cellules la rigidité nécessaire à l'édification du tronc des arbres et aux vaisseaux la capacité de conduire la sève sur de grandes distances. À la fin de la période silurienne, il y a environ 400 millions d'années, le système vasculaire a joué un rôle crucial dans l'adaptation des végétaux à la vie terrestre. En effet, l'acquisition par certains végétaux, les plantes vasculaires, de la capacité de synthétiser les lignines a probablement été un facteur déterminant dans leur conquête du milieu terrestre (Lewis et Yamamoto., 1990). Le système vasculaire chez les végétaux supérieurs est composé de tissus conducteurs spécialisés, le xylème et le phloème qui dérivent du cambium vasculaire (Mauseth, 1988).

Un autre rôle important joué par les polymères des parois cellulaires végétales tels que la cellulose ou les lignines concerne la production de biomasse. Dans la nature, les végétaux terrestres produisent annuellement des milliards de tonnes de biomasse végétale. Les parois végétales jouent à ce titre un rôle central dans un nombre important d'utilisations agro-industrielles des plantes : alimentation humaine et animale (fibres alimentaires), matière première pour l'industrie papetière et textile, source d'énergie renouvelable, matériau de construction... L'optimisation des propriétés des parois est donc une préoccupation majeure du secteur agro-industriel. Les propriétés que l'on cherche à améliorer et/ou introduire dépendent des qualités biochimiques et/ou technologiques requises pour l'utilisation ultérieure des végétaux.

La lignine (du latin : lignum ou bois) représente 35 % de la matière sèche du bois chez certaines espèces ligneuses, ce qui en fait le deuxième bio polymère végétal en abondance, après la cellulose, avec un quart de la biomasse terrestre (Higuchi, 1990). L'essentiel de cette

biomasse se retrouve dans les parois secondaires, en particulier dans le xylème et le phloème, qui forment le système vasculaire secondaire (Mauseth, 1988). Le xylème s'organise pour former des vaisseaux qui permettent la circulation de la sève brute, constituée d'eau, de nutriments minéraux et d'hormones comme l'ABA et les cytokinines. Il est constitué de cellules parenchymateuses vivantes et majoritairement des parois de cellules mortes dont les parois longitudinales sont épaissies par des dépôts de lignine et de cellulose interrompus de place en place. Le xylème joue aussi un rôle important de soutien. Le phloème joue également un rôle conducteur : il permet la conduction verticale de la sève élaborée, une solution riche en saccharoses et protéines, des feuilles vers les racines. Il a aussi un rôle de réserve avec les parenchymes et un rôle de soutien avec les fibres libériennes.

Chez les plantes, la formation des organes et des tissus résulte de l'activité des méristèmes et a lieu tout au long de la vie de la plante. Ceci est une des caractéristiques des organismes végétaux puisque chez les animaux, celles-ci ont surtout lieu durant l'embryogenèse. Chez beaucoup de plantes, il existe deux types de croissance : une croissance en longueur ou primaire qui permet l'allongement des tiges et des racines, et une croissance en épaisseur ou secondaire qui assure une augmentation en diamètre des tiges et racines chez les espèces ligneuses (Zimmermann et Brown, 1971; Mauseth, 1988). Ces deux types de croissance sont possibles grâce à deux classes de méristèmes, différents l'un de l'autre par leur localisation dans la plante, leurs caractères cytologiques et leur rôle dans la construction des organes : les méristèmes apicaux ou primaires et les méristèmes latéraux ou secondaires. En ce qui concerne les méristèmes secondaires, on distingue le procambium et le cambium vasculaire. Les cellules du procambium dans les tiges et les racines dérivent des méristèmes apicaux et donnent naissance au xylème et au phloème primaire dans les parties jeunes des tiges et des racines. Les cellules du cambium vasculaire qui dérivent essentiellement des cellules procambiales se différencient en cellules du xylème secondaire vers l'intérieur de la tige et en cellules du phloème secondaire vers l'extérieur. La formation du xylème secondaire, ou xylogenèse, est caractérisée par des étapes cellulaires majeures. En effet, dans le cambium vasculaire, les cellules subissent d'abord un processus de division pour produire du tissu. Du côté xylème, les cellules subissent alors une expansion pour atteindre leur taille finale. Elles vont enfin former une paroi secondaire lignifiée et enfin arriver dans une zone de mort cellulaire programmée (sauf les cellules parenchymateuses) où tous ces processus cellulaires se transmettent (*Figure 1* ; Mauseth, 1988; Fukuda, 1997; Chaffey, 1999). Le fonctionnement du cambium est polarisé et il produit beaucoup moins de liber que de bois, le liber ne faisant

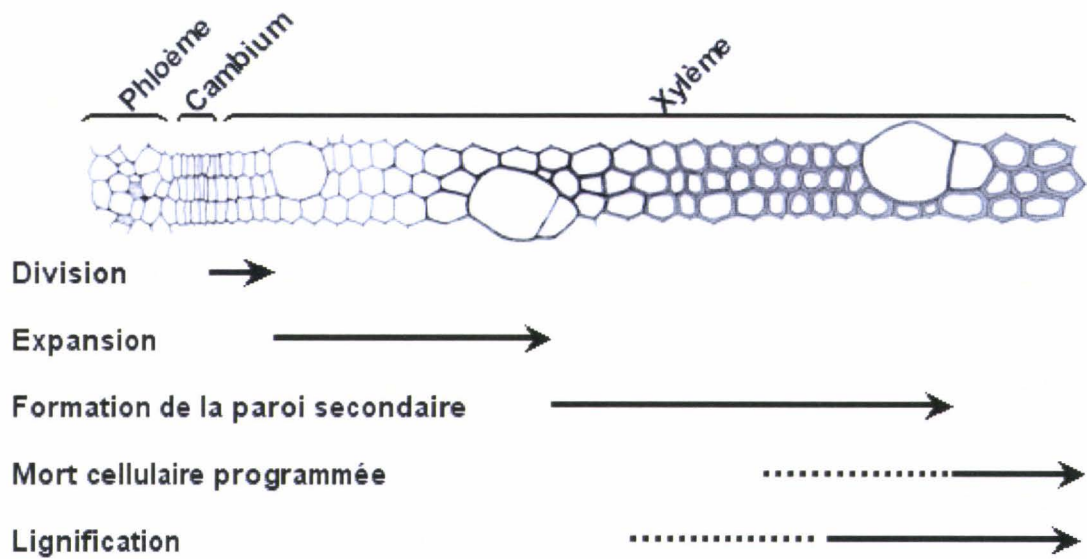


Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de la xylogénèse (d'après [Hertzberg et al., 2001](#)).

Le développement du xylème s'effectue en plusieurs étapes. Les étapes précoces : la division (au niveau de la « zone cambiale ») et l'élongation cellulaire, puis les étapes tardives : la formation de la paroi secondaire, au cours de laquelle s'effectue un important dépôt de lignines, puis pour les futurs éléments conducteurs du xylème, une dernière étape de mort cellulaire programmée.

que quelques millimètres d'épaisseur. Les structures primaires se trouvent repoussées à l'extrémité des structures secondaires.

L'importance majeure des lignines, aussi bien d'un point de vue fondamental qu'appliqué, est soulignée par les très nombreux travaux publiés depuis plusieurs dizaines d'années sur le sujet. La voie de biosynthèse des lignines est aujourd'hui en grande partie caractérisée, notamment grâce à l'utilisation de mutants, au clonage et à l'analyse fonctionnelle des gènes de lignification (pour revues : Higuchi, 1985 et 1990 ; Lewis et Yamamoto, 1990; Chen, 1991; Whetten et Sederoff, 1995; Boudet *et al.*, 1995; Campbell et Sederoff, 1996; Boudet *et al.*, 1998; Baucher *et al.*, 1998; Joachim *et al.*, 1998; Grima Pettenati et Goffner, 1999; Boudet, 2000; Boudet et Chabannes, 2001; Hatfield et Vermerris, 2001; Boerjan *et al.*, 2003; Chaubet *et al.*, 2003; Rogers et Campbell, 2004; Sivadon et Grima Pettenati, 2004)..

La biosynthèse des lignines résulte de la polymérisation oxydative de trois unités monomériques (monolignols), les alcools p-coumarylique, coniférylique et synapylique. La voie de biosynthèse spécifique des monolignols comprend deux étapes de réduction catalysées respectivement par la cinnamoyl CoA réductase (CCR) et l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD). Afin de mieux comprendre ce mécanisme chez l'Eucalyptus, première espèce de reboisement industriel dans le monde, Le groupe de Jacqueline Grima-Pettaniti à Toulouse a isolé et caractérisé deux gènes *CCR* et *CAD* d'*Eucalyptus gunnii*. Des études fonctionnelles ont été réalisées chez le tabac et le peuplier sur les promoteurs de ces deux gènes en les fusionnant avec le gène rapporteur *Uida*. Ces études ont permis de révéler que leur expression est régulée au niveau transcriptionnel et étroitement associée aux tissus lignifiés, avec une localisation préférentielle dans les tissus vasculaires (Lacombe *et al.*, 1997; Lauvergeat *et al.*, 2002). Des délétions 5' sériées des promoteurs *CCR* et *CAD* ont permis de délimiter des régions *cis* régulatrices d'une cinquantaine de paires de bases qui contrôlent l'expression de ces gènes au niveau vasculaire. D'autre part, ces résultats d'expression spécifique contrôlée par cette région *cis*-régulatrice sont observés dans plusieurs types de plantes (Lauvergeat *et al.*, 2002), ce qui semble indiquer qu'il existe un mécanisme commun de régulation des gènes de la lignification chez les végétaux supérieurs. Ces régions régulatrices contiennent un motif MBSIIG connu pour être la cible de facteurs de transcription de type MYB. Ces sites sont également retrouvés dans les promoteurs d'autres gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, suggérant que des mécanismes

communs, impliquant des facteurs trans de type MYB, puissent réguler l'expression coordonnée de ces gènes dans les tissus vasculaires.

Les facteurs de transcription qui se comportent comme des interrupteurs généraux, contrôlant de façon coordonnée l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes d'une même voie métabolique, apparaissent comme des acteurs clés à considérer en priorité à la fois dans des stratégies de transformation génétique et de sélection assistée par marqueur dédiées à l'amélioration de la qualité du bois. Dans ce but, deux facteurs de transcription de type Myb ont été clonés à partir de xylème d'*Eucalyptus*, *EgMYB1* et *EgMYB2*. Nous avons développé une stratégie visant à sur et/ou à sous exprimer ces gènes dans une plante modèle afin d'étudier les répercussions sur le phénotype, plus particulièrement la biosynthèse des lignines et la formation des parois secondaires. Étant donné que la transformation génétique de l'*Eucalyptus* est longue et difficile, nous avons choisi de transformer la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ce travail constitue une première étape vers l'utilisation de ces facteurs, comme outils biotechnologiques pour améliorer la composition en lignines des parois de productions végétales d'intérêt pour l'agroindustrie de production d'énergie et de produits polluants. Ce travail était effectué pour tester le rôle des facteurs *EgMYB* isolés à partir de bois d'*Eucalyptus*, et d'étudier en polluants.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

A. La xylogénèse

A.1 Formation du xylème primaire et secondaire

La xylogénèse, formation du xylème, est un processus développemental complexe aboutissant à la mort cellulaire programmée, événement véritablement terminal de la différenciation. Elle a été beaucoup étudiée non seulement parce que la fonction du xylème est essentielle à l'existence des plantes vasculaires mais également parce que la formation du xylème semble être un bon modèle pour analyser la différenciation chez les végétaux supérieurs (Aloni, 1987 ; Fukuda 1992 ; Fukuda et Komamine 1985 ; Northcote 1995 ; Roberts *et al.*, 1988). Le xylème, initié par des cellules cambiales ou procambiales méristématiques, se compose de cellules de conduction ou d'éléments trachéaires (ETs), et de cellules non conductrices incluant des cellules du parenchyme et des fibres (Ye *et al.*, 2002). Les ETs sont des cellules capables de s'allonger (le protoxylème) qui sont caractérisées par l'épaississement annulaire ou spirale, tandis que les éléments de metaxylème qui ont été formés plus tard ont un réticule plus complexe ou des domaines de déposition secondaire de paroi cellulaire (Dharmawardhana *et al.*, 1992; Busse et Evert, 1999a; Mahonen *et al.*, 2000).

Chez les plantes ligneuses, la différenciation de xylème primaire et secondaire implique une cascade de processus intéressants. Du côté du xylème de la zone cambiale, chaque cellule doit se diviser et s'allonger, avant que des couches de matériaux pariétaux soient déposés perpendiculairement à la direction de l'élongation de cellules. Ce dépôt renforce les cellules contre les forces de compressions des tissus entourant. Le matériel pariétal est renforcé et imperméabilisé par le dépôt des composés phénoliques. Enfin, l'intérieur des cellules est décomposé et le contenu est détruit. Donc, la formation d'ETs implique plusieurs processus qui sont fondamentaux pour le développement des plantes, y compris la division de cellules, l'élongation de cellules, la synthèse de paroi et le dépôt, la lignification et la mort cellulaire programmée (PCD) (Fig. 1 ; Turner et Hall, 2000 ; Nieminen *et al.* 2004). Ensemble, ces processus de différenciation impliquent des centaines de gènes (McCann, 1997). Plusieurs de ces gènes ont été identifiés dans deux criblages à grande échelle comportant le séquençage d'ADNc du matériel dérivé de tissu jeune de xylème du pin loblolly (Allona, 1998), des arbres *Eucalyptus* (Foucart *et al.*, 2006) et peuplier (Sterky, 1998) et de *Zinnia* (Pesquet *et al.*, 2003). Le nombre de gènes identifiés de cette façon est impressionnant, mais il reste à voir combien d'entre eux sont réellement impliqués dans la xylogénèse elle-même, car ces bases de données incluent les ADNc d'un mélange des types de cellules à différents stades de développement.

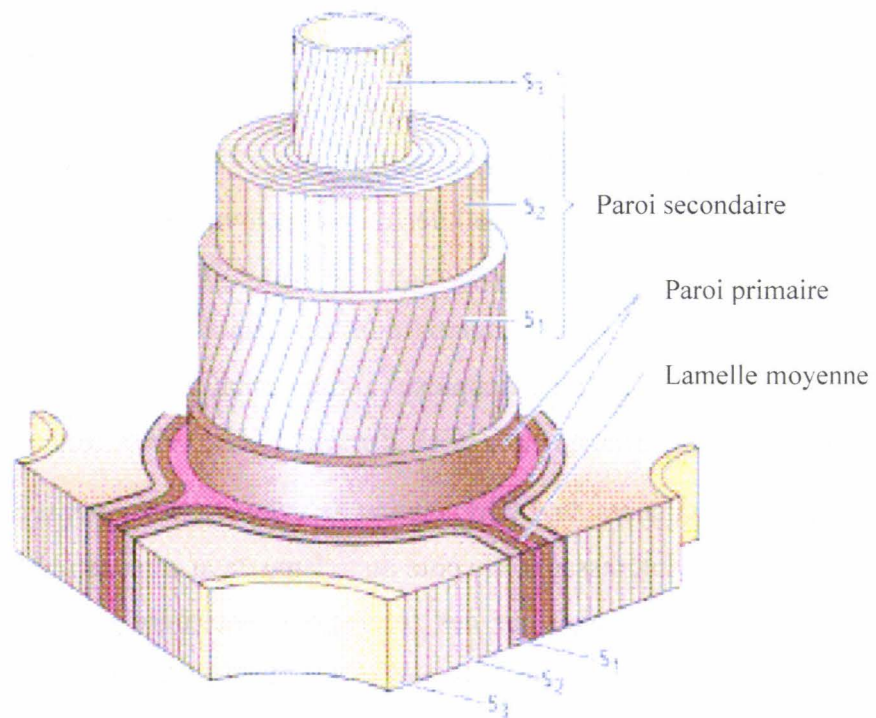


Figure 2 : Le Schéma proposé ci - dessous représente une configuration très schématique de l'architecture des parois des cellules xylémienne d'une espèce dicotylédone, montrant l'orientations des microfibrilles de cellulose dans les différentes couches pariétales (d'après Taiz et Zeiger, 2000)

Tableau 1 : répartition des composés dominants au sein d'une paroi végétale +++: Riche, ++: Moyen, +:Faible (<http://dc.plantouz.chez.tiscali.fr/anatomie.htm>)

	Lamelle moyenne	Paroi primaire	Paroi secondaire
Composés pectiques	+++	++	+
Protéine	++	+	0
Cellulose	0	++	+++
Hémicelluloses	0	++	+
Lignine	0	0	+++

Le progrès récent dans les études de la différenciation de xylème est venu des expériences *in vivo* et *in vitro* et nous a permis de disséquer le processus de la différenciation (Aloni, 1991 ; Beheke et Sjolund, 1990 ; Fukuda, 1992 ; Roberts *et al.*, 1988).

A.2 *Eucalyptus* : Modèles d'études, intérêts fondamentaux et appliqués

Le nom *Eucalyptus* provient du Grec eu (bien) et kaliptos (couvert). Le genre *Eucalyptus* comprend environ 700 espèces qui appartient à la famille Myrtacées. L'*Eucalyptus* d'arbre, espèces et hybrides ont pendant les dernières cinq décennies deviennent les bois durs le plus largement plantés dans le monde. La proportion des plantations industrielles a fortement augmenté ces dernières années et elles représentaient en 1995 environs 63 % des surfaces plantées en *Eucalyptus* (Pandey, 1997). Ces plantations à croissance rapide soutiennent aujourd'hui des industries multi-billion d'€ basées sur la fibre d'*Eucalyptus* (pulpe, papier, cellulose, etc.) et les produits de bois dur (poteaux, construction, meubles, etc.).

L'*Eucalyptus* devient aujourd'hui la première espèce industrielle de reboisement dans le monde. La croissance très rapide, la grande homogénéité, l'excellente fibre et aussi bien un bois de densité élevée font l'*Eucalyptus* un des meilleurs arbres pour la ligniculture. L'*Eucalyptus* est un bon modèle des arbres pour l'amélioration génétique et des approches génomiques sur la formation de bois et l'adaptation aux stresses biotiques et abiotiques, selon sa petite taille de génome, la disponibilité des cartes génétiques et QTL. Les plantations d'*Eucalyptus* contribuent à réduire la pression sur les forêts naturelles. Ainsi que, l'*Eucalyptus* est recherché spécialement pour la fabrication de pâte à papier. Pour cela certains groupes financiers poursuivent leurs efforts de recherche-développement, pour une optimisation des gains et une réduction des risques, écologique, pathologique et agronomique de cette culture.

B. Organisation, architecture moléculaire et composition de la paroi cellulaire végétale

B.1 Organisation et fonction des parois végétales

Plus de 300 ans sont passés, Robert Hooke (1635-1703), examine un bouchon de liège en coupe transversale et en coupe longitudinale ; il distingue ce qu'il appelle d'abord un « *wall* » ou mur ("paroi" en français). Chaque cellule végétale est entourée par une paroi située à l'extérieur de la membrane plasmique qui, plus que tout autre structure, la distingue de la cellule animale (Mauseth, 1988).

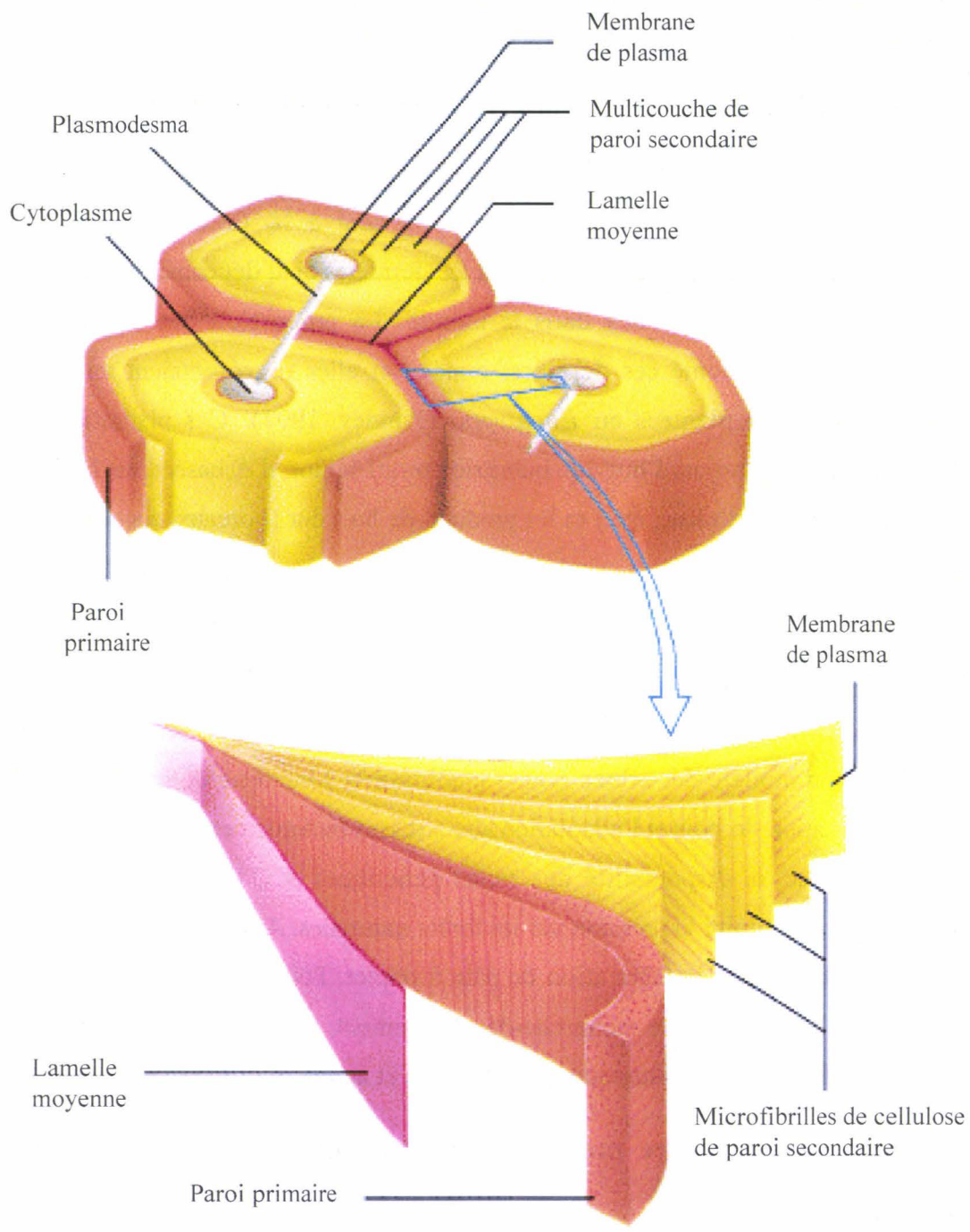


Figure 3 : La structure de la paroi cellulaire secondaire, composée de séries de couches de cellulose, hémicellulose et de lignine. (d'après McCann et K. R. Roberts, 1991)

Les parois cellulaires remplissent plusieurs fonctions qui, chez les animaux, sont assurées par le squelette, l'épiderme et le système circulatoire. Elles forment un revêtement qui maintient et définit la taille et la forme de la cellule végétale pour chaque cellule. Bien que rigide, elle autorise et régule la croissance cellulaire. Les parois végétales permettent aussi l'adhésion des cellules végétales entre-elles et servent de support à l'ensemble de la plante. La paroi cellulaire est cependant très poreuse et autorise le passage des petites molécules telles que les protéines à 60,000 MW (Tepfer et Taylor, 1981). L'ensemble du réseau formé par les parois cellulaires constitue un système de canaux dans lesquels circulent les fluides, appelé apoplaste. Il apparaît que l'apoplaste joue des rôles majeurs dans des processus multiples chez les plantes selon Sakurai (1998) comme la transduction du signal intercellulaire, le transport de l'eau, des nutriments, des sucres, des hormones et des protéines. L'apoplaste joue également le rôle de barrière physique qui contrôle les balances ioniques cellulaires, qui assure la résistance mécanique et la protection contre les stress biotique et abiotique.

L'étude de l'ultrastructure de la paroi au microscope électronique (Fig. 2 et 3) montre une formation extracellulaire, comportant au moins 3 couches (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La lamelle moyenne : produite pendant la division cellulaire,
- La paroi primaire : produite pendant l'accroissement cellulaire,
- La paroi secondaire : produite après que l'accroissement soit achevé (sauf quelques vaisseaux, type annelés et spiralés, qui restent extensibles après la différenciation).

Chez toutes les plantes, la paroi cellulaire est une structure dynamique essentiellement composée de polymères glucidiques (Tableau 1), cellulose, hémicellulose et pectine (Talbot et Ray 1992; Carpita et Gibeau 1993; Brett et Waldron, 1996; Fry, 2000; Dhugga, 2001), de protéines pariétales (Fry, 2000), de protéines (Varner et Lin, 1989; McCann et Roberts, 1994), et d'autres composées de nature phénolique (lignine et subérine) dont la proportion dépend du tissu (Dhugga, 2001; McNeil *et al.*, 1984; Fry, 1988; Brett et Waldron, 1996; Carpita, 1996; Edashige et Ishii, 1996). Les parois secondaires des cellules du xylème contiennent par exemple plus de 30% de lignines.

B.2 La lamelle moyenne

C'est la partie la plus externe de la paroi primaire (Fig. 2 et 3). Elle est constituée principalement de matières pectiques (Tableau 1). La lamelle moyenne est commune à deux cellules contiguës (Ornston *et al.*, 1987) et elle aide à l'adhésion des cellules végétales entre elles (Timell, 1964; Saka et Goring, 1983; Fry, 1987b; Brett et Waldron, 1996). Cette

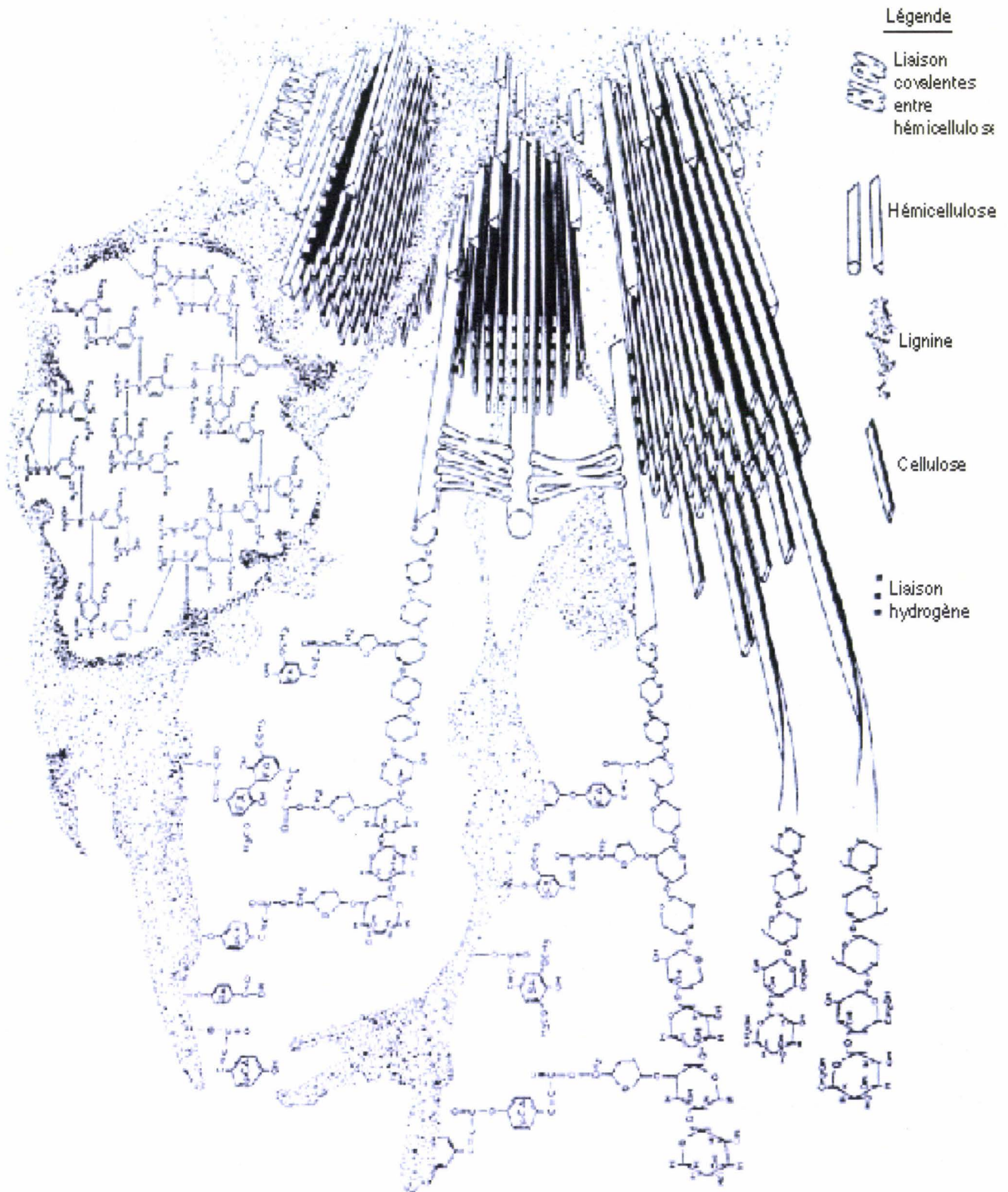


Figure 4 : Modèle de la paroi secondaire montrant les microfibrilles de cellulose les chaînes d'hémicellulose et la déposition des lignines (d'après Bidlack *et al.*, 1992)

structure est mise en place lors de la division cellulaire, lors de la télophase, lorsque se constitue la nouvelle paroi qui séparera les deux cellules filles. À l'équateur du fuseau, se rassemblent des vésicules d'origine golgienne qui constituent le phragmoplaste. Les vésicules se rejoignent et confluent au centre de la plaque équatoriale. Celle-ci s'étend de manière centripète jusqu'à la paroi ancienne. À la fin du processus, la nouvelle paroi se soude aux parois longitudinales anciennes (Fry, 1987b). Cette première paroi commune aux deux cellules filles est appelée lamelle moyenne. De nouvelles sécrétions de part et d'autre constitueront la paroi primaire propre à chacune des deux cellules.

B.3 La paroi primaire

La paroi primaire est la première formée, et la seule pour les cellules indifférenciées (Fry, 2000; Dickison, 2000). Elle est dynamique et capable de croître en longueur et en épaisseur. La matrice de cette paroi est relativement plastique et riche en eau, ce qui permet l'expansion cellulaire. La paroi primaire typique est une structure fortement hydratée (90 % d'eau) et plastique de 1 à 3 microns d'épaisseur constituée principalement de trois polysaccharides majeurs : la cellulose (9-25 %), les hémicelluloses (25-50 %) et les composés pectiques (10-35 %). On y trouve également de nombreuses enzymes et protéines de structure (10 %) (Tableau 1 et Fig. 2 et 3 ; Esau, 1977; Goodwin et Mercer, 1983; Salisbury et Ross, 1992; Zablackis *et al.*, 1996).

La composition et la structure de cette paroi varient fortement en fonction du tissu, du stade de développement de la plante et des conditions environnementales. L'épaisseur de la paroi cellulaire primaire augmente avec le dépôt de nouvelle matière à l'extérieur de la cellule. La matière qui constitue la matrice est transportée dans les vésicules de l'appareil de Golgi et est exportée par exocytose, tandis que la cellulose est synthétisée et assemblée à l'extérieur de la cellule grâce à des enzymes situées dans la membrane plasmique.

B.4 La paroi secondaire

La paroi secondaire est située entre la membrane plasmique et la paroi primaire (Fig. 2 et 3). En règle générale, elle est plus épaisse que la paroi primaire et la renforce. La paroi secondaire apparaît lors de la différenciation de la cellule et se forme sur la paroi primaire par suite du dépôt de cellulose, ensuite renforcée par d'autres matières (lignine, cutine et subérine) (Theander et Aman, 1984; Bidlack et Buxton, 1992). La paroi secondaire se met en place à la fin de l'expansion cellulaire et se développe selon la fonction de la cellule, une forme et une composition spécifiques.

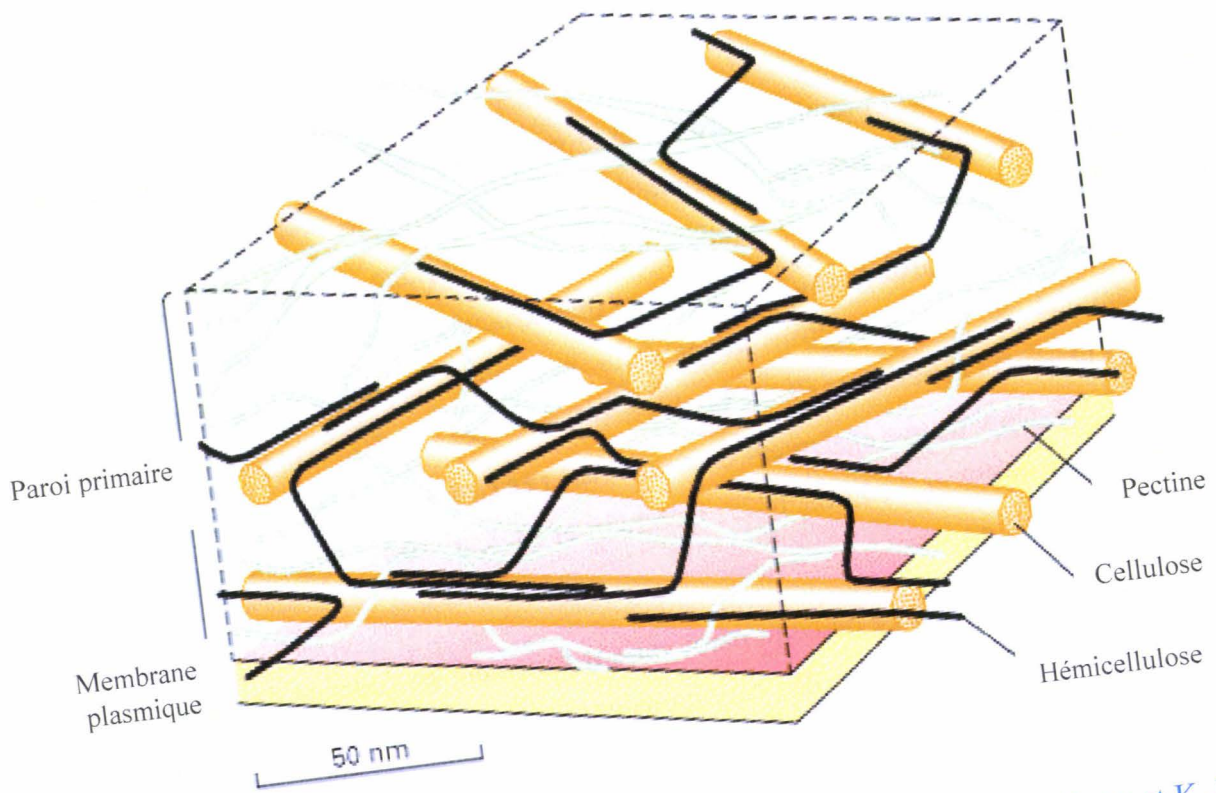


Figure 5 : Diagramme simple de paroi cellulaire de l'ognion. (d'après McCann et K. R. Roberts, 1991)

Les principales propriétés de cette paroi sont une grande rigidité et une structure peu hydratée contenant moins de 20 % d'eau (Tableau 1; Fig. 2). Elle est constituée en général de cellulose (40-80%) sous forme cristalline et des hémicelluloses (10-40%). La cellulose se dépose généralement, dans les parois primaires, en plusieurs couches concentriques où les microfibrilles de cellulose sont disposées parallèlement entre elles (Roland, 1980). Les parois secondaires présentent une orientation différente des microfibrilles et forment une structure semblable à celle du contre-plaqué, ce qui lui confère sa rigidité. Il a été mis en évidence dans ces parois une structure pluristratifiée où trois régions sont généralement différenciables, numérotées selon l'ordre de leur formation : S1 (externe), S2 (médiane) et S3 (interne) (Fig. 2; Fengel et al., 1984). Ces différentes couches diffèrent par leur composition chimique et par leur orientation de leurs éléments structuraux, notamment de leur architecture fibrillaire. Certaines parois secondaires sont enrichies en composés phénoliques : lignines (5-25%) (pour renforcer la rigidité), une molécule complexe et rigide, qui se dépose surtout dans les cellules ayant une fonction de soutien, comme celles qui forment le bois. (Fig. 2 et 3 ; Salisbury et Ross, 1992; Bidlack et Buxton, 1992).

C. Architecture moléculaire de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire végétale est constituée principalement de polysaccharides (Mc Neil *et al.*, 1984), mais aussi de protéines de structure et d'autres composées de nature phénolique (lignine et subérine), d'enzymes et de nombreux ions (Tableau 1; Fig. 4).

C.1 Polysaccharides de paroi cellulaire :

Les polysaccharides sont des chaînes longues linéaires ou ramifiées de sucres. Ils peuvent diviser dans trois groupes de polysaccharides majoritaires : cellulose, hémicelluloses et pectines (Mc Neil *et al.*, 1984; Carpita, 1996).

La biosynthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale résulte d'un processus complexe nécessitant l'intervention de nombreuses voies biochimiques différentes (Fry, 1987a). Tous les polysaccharides pariétaux sont générés au départ de sucres diphosphonucléosidiques (NDP-sucres) synthétisés à partir d'hexoses phosphates par l'intermédiaire de nucléosides diphosphates pyrophosphorylases (Delmer et Amor, 1995). Plusieurs enzymes comme les épiméras, déhydrogénases, déhydratases et décarboxylases sont impliquées dans l'interconversion des sucres diphosphonucléosidiques. La polymérisation des polysaccharides est quand à elle réalisée par des enzymes membranaires (glycosyltransférases ou polysaccharide synthase) qui transfèrent un ose à partir d'un sucre

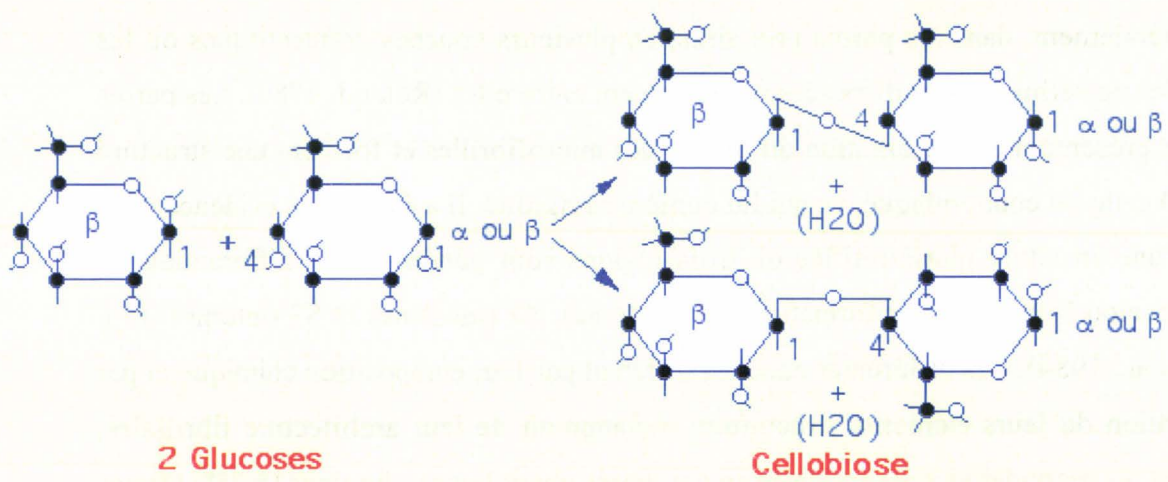


Figure 6 : Les chaînes de la cellulose et l'unités constatives de base, le cellobiose.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>

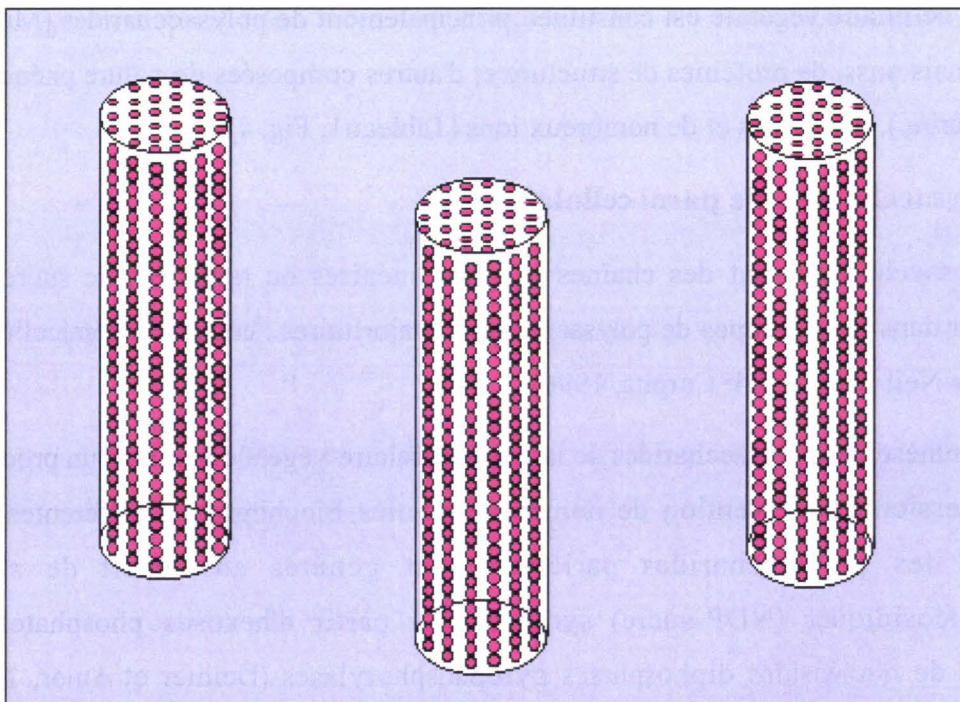


Figure 7 : Diagramme de cellulose seule. Les molécules de cellulose (chaînes de bêta glucose) sont associées sous forme de microfibrilles.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/architecture.htm>

diphosphonucléosidique sur une molécule donnée (Barnoud, 1980; Delmer et Amor, 1995; Delmer, 1999).

C.1.1 La cellulose

La cellulose est le polymère polysaccharidique pariétal le plus abondant dans la nature (Barnoud, 1980; Dey et Brinson, 1984). Elle constitue entre 9-25% et 40-80% des parois primaire et secondaire respectivement (Goodwin et Mercer, 1983; Salisbury et Ross, 1992; Bidlack et Buxton, 1992), et la cellulose constitue environ 50% du bois chez les arbres avec l'hémicellulose et la lignine (Tableau 2).

La cellulose est une macromolécule aplatie en forme de ruban composée de plusieurs molécules de glucose. Elle est faite de la répétition du monomère glucose (Fig. 5). Deux molécules de glucose liés en β -1,4 forment le motif de base, le cellobiose ou glucane (Fig. 6; Barnoud, 1980; Delmer et Amor, 1995).

L'association de nombreuses molécules de cellulose permet la formation de chaînes parallèles appelées microfibrilles (Fig. 7; Dey et Brinson, 1984; Brett et Waldron, 1996), qui possèdent, par endroit, une structure cristalline, un diamètre de 4 à 10 nm et des propriétés de résistance remarquables (Dickison, 2000). Elles sont impliquées dans la réalisation de la charpente pariétale et elles sont réunies entre elles par une matrice constituée de pectines et d'hémicelluloses (Fig. 10).

Les microfibrilles de cellulose sont fabriquées au niveau de la membrane plasmique par des celluloses synthétases. Elles s'assemblent dans le périplasme avec les microfibrilles préexistantes selon une architecture particulière (Fig. 3 et 10).

La biosynthèse de la cellulose est réalisée par un complexe simple d'enzymes de Cesa, appelé rosette (Fig. 8 ; Doblin *et al.*, 2002). Cette rosette située à la membrane plasmique est constituée de six sous-unité, contenant probablement six polypeptides de Cesa. On pense que les rosettes se déplacent grâce à la membrane plasmique en synthétisant de multiples chaînes individuelles de cellulose qui s'associent pour former des "cristallites", qui alors peuvent s'associer pour former des microfibrilles (Delmer et Amor, 1995; Ha *et al.*, 1998).

La rosette de synthèse de la cellulose peut contenir 18 à 36 protéines Cesa (Delmer et Amor, 1995 ; Ha *et al.*, 1998). Au moins trois gènes *Cesa* sont nécessaires pour la synthèse de cellulose dans les parois cellulaires secondaires de vaisseaux développés de xylème : IRX3 (AtCesA7) (Taylor *et al.*, 1999), IRX1 (AtCesA8) (Taylor *et al.*, 2000), et IRX5 (AtCesA4) (Taylor *et al.*, 2003). Ces trois protéines interagissent les unes avec les autres, formant

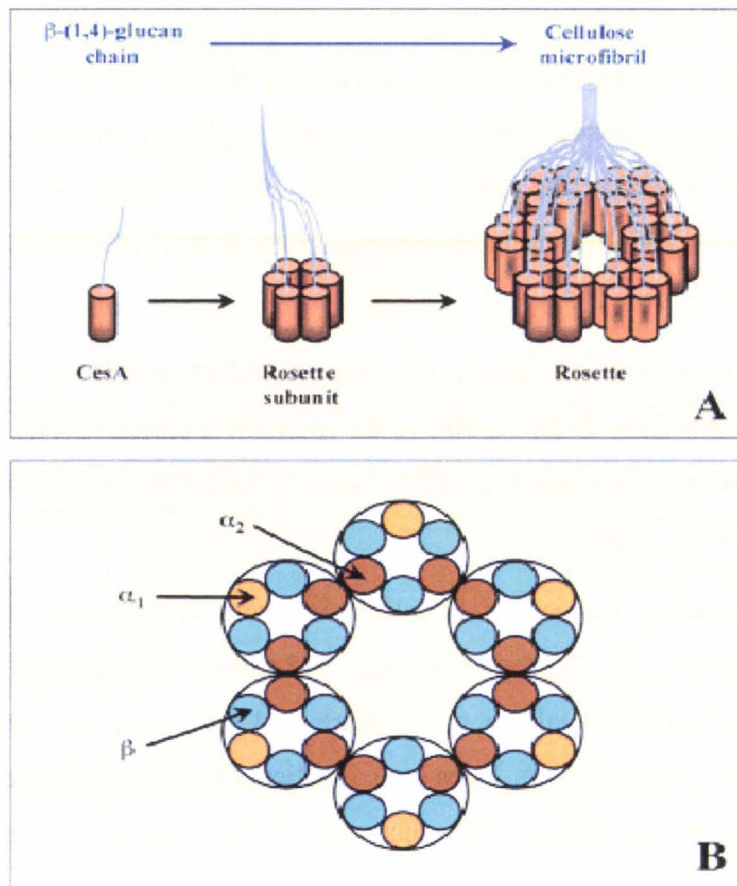


Figure 8 : Modèle pour la structure de la rosette. (A) Six sous-unités, contenant probablement six polypeptides CesaA, agissent l'une sur l'autre pour former une rosette, un complexe simple d'enzymes CesaA. Il a été montré que chaque polypeptide CesaA est impliqué dans la synthèse d'une chaîne de β -(1,4)-glucan. La protéine CesaA a TMHs prévu par huit qui pourrait potentiellement former un pore dans la membrane plasmique par laquelle la chaîne naissante est expulsée dans la paroi. Une fois que les 36 chaînes émergent de la rosette, elles fusionnent pour former une microfibrille élémentaire de cellulose. (B) Dans ce modèle modifié de la structure de la rosette par [Scheible et al. \(2001\)](#), au moins deux types de polypeptides CesaA, solides ou solubles, sont exigés pour la rosette spontanée. Deux types différents d'isoformes peuvent être distingués, 1 qui agissent les uns sur les autres avec deux isoformes de solides solubles seulement, et 2 agissant les uns sur les autres avec encore 2 isoformes et deux isoformes de solides solubles. (d'après [Doblin et al., 2002](#)).

Tableau 2 : Les principaux polysaccharides présentent dans la paroi primaire des dicot et des monocotylédones (d'après *Varner et lin, 1989*).

Polysaccharides	% de matière sèche pariétale	
	Dicotyllédones	Monocotylédones
Cellulose	20 - 30	
Hémicelluloses	Xyloglucanes	20
	Xylanes	2
Pectines	35	15 - 20
		≈ 0

certainement une partie du même complexe (Taylor *et al.*, 2000 et 2003). Jusqu'ici, cependant, peu d'informations sont disponibles sur la structure des protéines CesaA, sur leur façon de s'assembler dans le complexe et d'interagir avec un autre.

C.1.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une classe de polymères très variés (de nombreux monomères et de nombreux branchements différents) et donc mal définis. Elles sont très variées en quantité et complexité chez différentes espèces végétales, types de cellules et paroi (Huisman *et al.*, 2000) Les hémicelluloses sont généralement classifiées selon le sucre principal constituant l'hémicellulose : les xyloglucanes, les xylanes, les mannanes, les galactanes et les glucanes. (Tableau 2; Fig. 9).

Elles représentent environ 25-50 % de la masse sèche des parois primaires et 10 à 40 % de la masse sèche des parois secondaires des dicotylédones (Goodwin et Mercer, 1990). De par leur conformation (glucoses liés en β -1,4), les xyloglucanes peuvent contracter des liaisons H avec la cellulose (Fig. 4 et 9). A cause de la présence de chaînes latérales, ils ne sont pas eux-mêmes susceptibles de constituer des microfibrilles. Ils peuvent ainsi jouer un rôle fondamental dans le maintien d'une architecture pariétale organisée en liant les microfibrilles de cellulose entre elles.

C.1.3 Les pectines

Les pectines sont prédominantes au sein de la lamelle moyenne et des parois primaires. Elles représentent 10 à 35 % de leur masse sèche (O'Neill *et al.*, 1990; Carpita et Gibeaut 1993; Brett et Waldron, 1996). Ces composés sont des polymères de plusieurs polysaccharides, neutres comme le rhamnose, l'arabinose et le galactose ou acides comme l'acide galacturonique. Elles sont constituées d'une chaîne principale et de chaînes secondaires branchées. La chaîne principale est constituée d'acide galacturonique ou acide polygalacturonique. Les chaînes formées constituent un réseau grâce à des liaisons faibles qui peuvent facilement se rompre, et il en résulte une certaine élasticité (Fig. 10). Les monomères sont variés ainsi que les types de branchements. Des rhamnoses cassent la linéarité et des chaînes latérales constituées de divers oses rendent la molécule très complexe. Cette famille de molécules peut donc présenter à la fois des fonctions informatives et des fonctions structurales Ce polymère est plus ou moins acide selon le degré de méthylation de l'acide galacturonique (-COOH). Lorsque deux portions de chaînes sont constituées d'acide galacturonique non méthylé, elles peuvent se lier en présence de calcium. Des chaînes

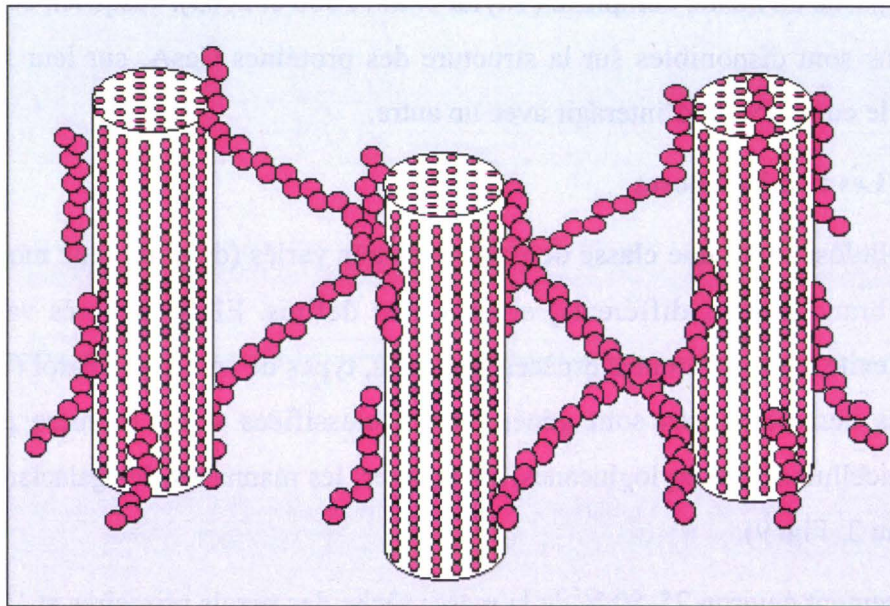


Figure 9 : Celluloses et hémicelluloses. Certaines hémicelluloses comme les xyloglucanes permettent le positionnement des microfibrilles cellulosiques entre elles. Cellulose et xyloglucanes sont réunis par des liaisons H.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>

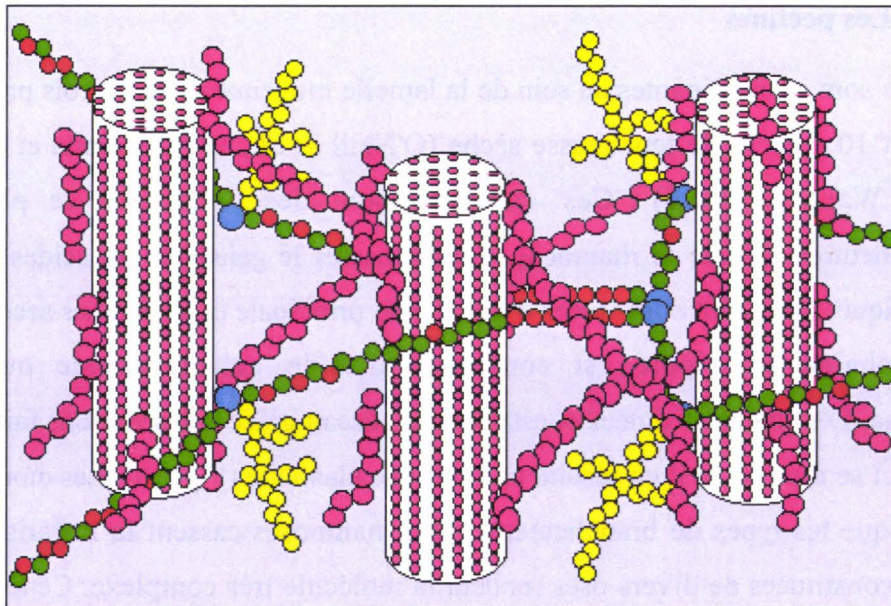


Figure 10 : Cellulose, hémicelluloses et pectines. Un réseau supplémentaire de pectines augmente la complexité de la matrice.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>

peuvent ainsi se lier et les pectines forment alors un gel (Fig. 11). Cette gélification peut s'interrompre et les pectines devenir fluides si on enlève le calcium.

Les pectines possèdent de nombreuses fonctions, peuvent jouer un rôle structural qui peut dépendre des conditions ioniques du milieu, (en particulier du rapport H^+ / Ca^{++}), elles interviennent dans l'hydratation, la porosité et la plasticité. En outre, elles participent à l'adhésion cellulaire et sont également impliquées dans la signalisation cellulaire et le mécanisme de défense (Brett et Waldron, 1996; Dickison, 2000; Dumville et Fry, 2000; Carpita et McCann, 2002).

C.2 Les composés protéiques de paroi

Les protéines structurales sont généralement divisées en plusieurs familles en fonction de leur composition en acides aminés. Trois grandes familles principales de protéines pariétales sont distinguables : Les protéines GRP (glycin-rich proteins) qui sont spécifiques des tissus vasculaires (Ringli *et al.*, 2001), les protéines PRP (prolin-rich proteins) (Vignols *et al.*, 1999) et les glycoprotéines HRGP (hydroxyprolin-rich proteins) qui constituent une grande famille (Fig. 12; Kieliszewski et Lampion, 1994 ; Showalter, 2001). Un sous-groupe majeur des HRGPs est représenté par les protéines arabinogalactanes (AGP).

Les protéines pariétales sont très variables et peuvent représenter environ 10 % de sa matière sèche. Certaines jouent un rôle structural, et d'autres enzymatique (Showalter, 2001). Les glycoprotéines jouent des rôles divers dans les matrices extracellulaires eucaryotiques de plantes et animaux. Toutefois, la superfamille de HRGP est limitée aux plantes et aux algues vertes. Elle forme une classe majeure de protéines structurales des parois des dicotylédones (Cassab, 1998).

Les protéines GRP ont été identifiées dans les parois de nombreuses dicotylédones (Showalter, 1993). Elles sont codées par une famille multigénique et elles constituent un groupe très hétérogène. Leur fonction est mal connue, bien qu'elles peuvent jouer dans l'épaississement de la paroi cellulaire au cours du développement (Fry *et al.*, 1988 ; Carpita et Gibeau 1993). Ces protéines GRPs sont retrouvées dans les parois du xylème et pourraient donc jouer un rôle dans son développement (Ryser *et al.*, 1997; Cassab, 1998)

Les protéines PRPs comportent 1 à 5 familles de protéines structurales de paroi cellulaire et sont identifiées chez les plantes supérieures (Carpita et Gibeau 1993; Cassab, 1998). Elles ont été caractérisées, pour la première fois, dans les parois cellulaires en réponse au stress abiotique et peuvent également jouer un rôle de défense contre les pathogènes

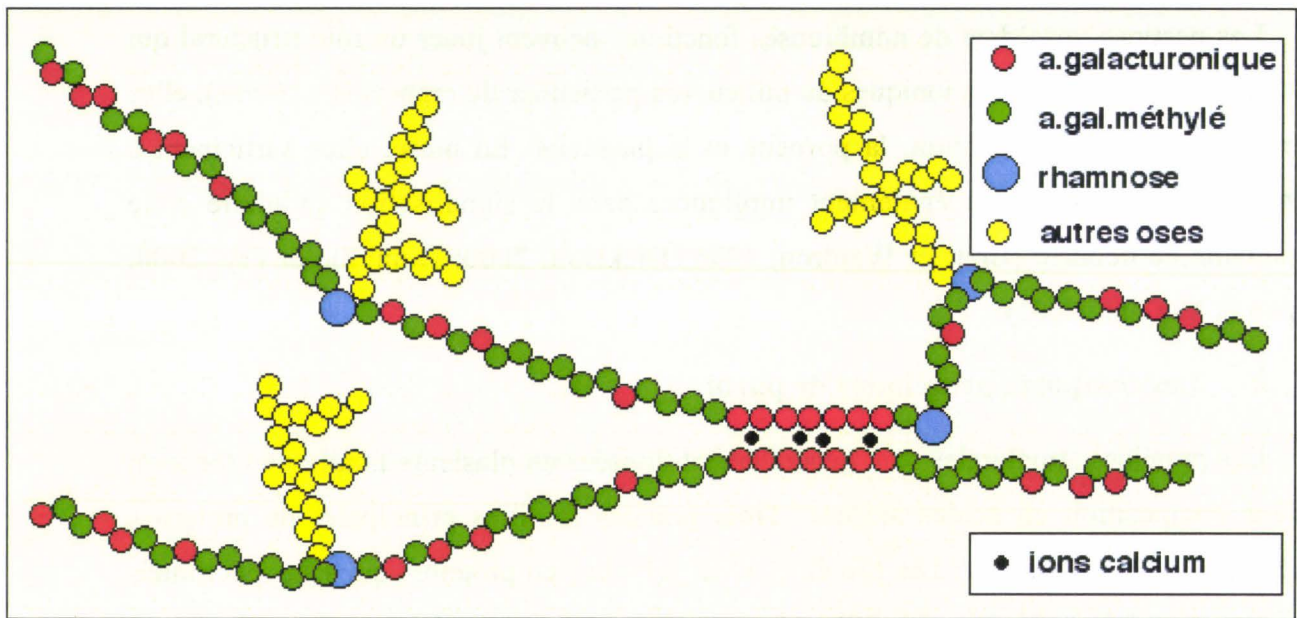


Figure 11 : Liaison de 2 chaînes de pectines. L'ensemble forme alors un réseau complexe
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>

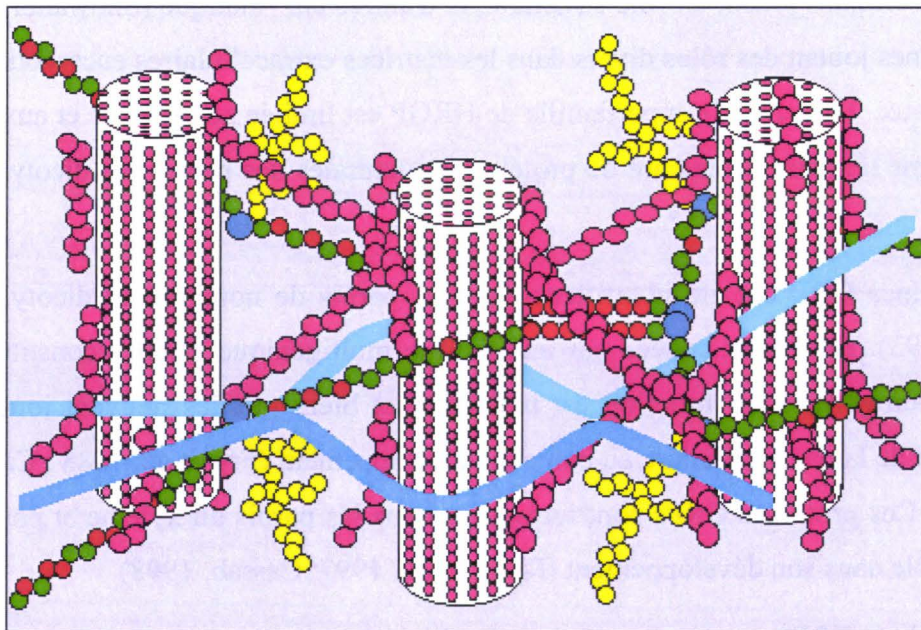


Figure 12 : Cellulose, hémicelluloses, pectines et HRGP. En fin de croissance le réseau de protéines peut rigidifier la matrice en créant un réseau secondaire.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/paroi/cellulose.htm>

(Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994). On leur suppose aussi un rôle pendant le développement (Chen et Varner 1985; Tierney *et al.*, 1988).

Initialement nommées extensines, car impliquées dans l'extensibilité de la paroi primaire, les HRGPs sont propices à une consolidation du réseau fibrillaire de la paroi. Les différentes unités de HRGP sont unies entre elles par des liaisons de différentes forces (liaisons covalentes et liaisons hydrogènes) notamment entre deux tyrosines. Ce réseau d'HRGP associé avec des ions minéraux (Ca^{2+}) intervient comme élément stabilisateur. Il bloque en effet les propriétés de plasticité du réseau polysaccharidique de la paroi végétale. Ce réseau d'HRGP participe dans tous les aspects du développement de plante comme la croissance, la nutrition et la transduction de signaux (Tan *et al.*, 2003). Les protéines AGP sont codées par une famille multigénique, et certaines sont associées à la paroi cellulaire. A ce jour, environ 50 gènes codant des protéines AGPs ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Schultz *et al.*, 2002), bien que peu de mutants, tel que *rat1*, sont identifiés (Gaspar *et al.*, 2004). Elles sont solubles et glycosylées par des résidus galactose et arabinose (Knox, 1995; Hu *et al.*, 1996). Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de la différenciation cellulaire, les interactions cellulaires et l'embryogenèse (Knox, 1996; Schultz *et al.*, 1998; Majewski-Sawka et Nothnagel 2000).

La paroi compte également un grand nombre d'enzymes très variées qui sont impliquées dans la modification de la paroi cellulaire au cours du développement, la morphogenèse et la lignification de certaines parois cellulaires. Elles sont également impliquées dans les mécanismes de résistance aux stress et de défense contre les pathogènes (certaines protéines HRGP (Tiré *et al.*, 1994), dans la modification/polymérisation ou la dégradation des substrats pariétaux (pectine méthyl estérases; glycanases; chitinases; xyloglucane hydrolases; xyloglucane endotransférases; pectinases; laccases; peroxydases) (Tabuchi *et al.*, 2001; Kaku *et al.*, 2002; Cassab et Varner, 1988; Fry 1995; Cassab, 1998; Ranocha *et al.*, 1999; Davin *et al.*, 2000).

C.3 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractérisés par un noyau aromatique. Chez les plantes, ils possèdent des propriétés et des structures très variables (Harborne, 1989). On peut citer la lignine, qui est un constituant majeur des parois végétales, les tanins qui ont un rôle protecteur de la plante vis-à-vis des agressions externes et certains flavonoïdes qui interviennent, entre

autres, comme signaux moléculaires dans la symbiose entre les bactéries (*Rhizobium*) et les légumineuses (Fisher *et al.*, 1988).

C.3.1 Les lignines : nature, fonction et structure

Comme la cellulose, la lignine est un des constituants majeurs de certaines parois cellulaires. Cependant les lignines sont mal connues malgré leur abondance et leurs rôles importants. La quantité et la qualité des lignines affectent également directement les propriétés physico-chimiques des parois secondaires. Ainsi, d'un point de vue agronomique, les performances agro-industrielles des plantes ou de la biomasse végétale dépendent en grande partie des lignines. Elles jouent par exemple directement sur la qualité du bois. Ainsi, dans l'industrie papetière, la lignine est un produit indésirable et son extraction polluante et très coûteuse constitue l'un des enjeux industriels majeurs. Chez les plantes fourragères, la lignine limite la digestibilité du fourrage par les herbivores et elle est très difficilement dégradée par les micro-organismes (Cherney *et al.*, 1988).

Cette molécule se dépose en particulier au niveau des parois des vaisseaux de xylème. Elle existe sous forme de lignocellulose intimement combinée avec la cellulose et l'hémicellulose par des liaisons diverses, renforçant les microfibrilles de cellulose des plantes supérieures (Tableau 2; Fig. 4; Sarkanen et Ludwic, 1971). Chez les arbres forestiers, la lignine représente près de 20 à 25 % de la biomasse (Tableau 2; Higuchi, 1985 et 1990). En raison de sa composition chimique, la lignine est difficilement dégradée. Seuls certains champignons supérieurs (Ascomycètes) produisent des enzymes lignolytiques (lignine oxydases) efficaces en aérobiose. En imprégnant les parois, les lignines assurent, chez les plantes vasculaires, le fonctionnement des tissus de soutien ou conducteurs et protègent la plante contre les agressions biotiques ou abiotiques (Dixon et Paiva 1995) comme les blessures (Lange *et al.*, 1995; Hawkins et Boudet, 1996; Brill *et al.*, 1999), les attaques de pathogènes (Walter, 1992; Bennett et Wallsgrove, 1994; Bucciarelli *et al.*, 1998) et les métaux lourds (Diaz *et al.*, 2001) ou en réponse à l'ozone (Cabané *et al.*, 2004).

Les lignines sont des hétéro-polymères phénoliques tridimensionnels très complexes. Elles dérivent de la polymérisation oxydative de trois alcools hydroxycinnamyliques (monolignols), composés de sous-unités aromatiques qui diffèrent par leur degré de méthylation : l'alcool trans-*p*-coumarylique (unité H), l'alcool trans-coniférylique (unité G) et l'alcool trans-sinapylique (unité S) (Fig. 15; Sarkanen et Ludwic, 1971 ; Higuchi, 1985). Ces trois unités dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Fig. 14).

La variété des modèles de substitution des sous-unités signifie qu'une multitude de liaisons intermoléculaires peuvent être formées pendant la polymérisation (Freudenberg et Neish, 1968 ; Lewis et Yamamoto, 1990). La lignine change, donc, dans sa composition en sous-unités et en liaisons intermoléculaires. D'autre part, le manque de contrôle enzymatique à la polymérisation (formation) des lignines produit une structure très complexe (Jung et Fahey, 1983; Novikova *et al.*, 2002). D'autres types de liaisons entre les lignines et d'autres polymères pariétaux telles que les hémicelluloses et les protéines peuvent augmenter la complexité de sa structure (Lewis et Yamamoto, 1990).

C.3.2 Hétérogénéité des lignines

La lignine est un polymère phénolique complexe et hétérogène. Non seulement, elle est formée de trois unités phénoliques différentes, mais les teneurs, la composition en monolignols et la proportion en liaisons intermonomériques peuvent varier (Lewis et Yamamoto, 1990 ; Monties, 1991 ; Baucher *et al.*, 1998).

La proportion relative des trois unités H, G ou S est variable entre les espèces et les individus de la même espèce, entre les tissus au stade de développement (Hawkins et Boudet, 1994), et entre les parois d'une seule cellule. La lignine peut être divisée en deux groupes principaux, la lignine riche en G et la lignine riche en G et S (Gibbs, 1958). Le bois tendre (chez les gymnospermes) contient principalement les unités G (80 %) avec 14 % et 6 % pour les unités H et S respectivement, tandis que le bois dur (chez les angiospermes dicotylédones) contient les unités G (56 %), H (4 %) et aussi les unités S (40 %). Chez l'épicéa (*Picea abies*) la proportion G:S:H est de 94:1:5 (Erickson *et al.*, 1973) alors que chez le pin (*Pinus taeda*), le ratio G:S:H est de 86:2:13 (Glasser et Glasser, 1981). Les lignines chez les monocotylédones sont riches en unités H (Jung et Fahey, 1983). Généralement, les angiospermes dicotylédones et les herbes contiennent des proportions variables d'unités G et S (Schwartz *et al.*, 1989; Lewis et Yamamoto, 1990) et les monocotylédones possèdent des proportions de ces trois unités G, S et H, tandis que les gymnospermes contiennent principalement des unités G.

Le contenu de lignine est également variable dans des populations des plantes d'un même genre. Dans le genre *Pinus*, par exemple, la teneur moyenne de la lignine s'étend de 25% (*Pinus monticola*) à 30% (*Pinus palustris*) (Zobel et Van Buijtenen, 1989). Dans différentes espèces des plantes ligneuses, le contenu de lignine peut s'étendre entre 15 et 36% du poids sec de bois (Zobel et Van Buijtenen, 1989).

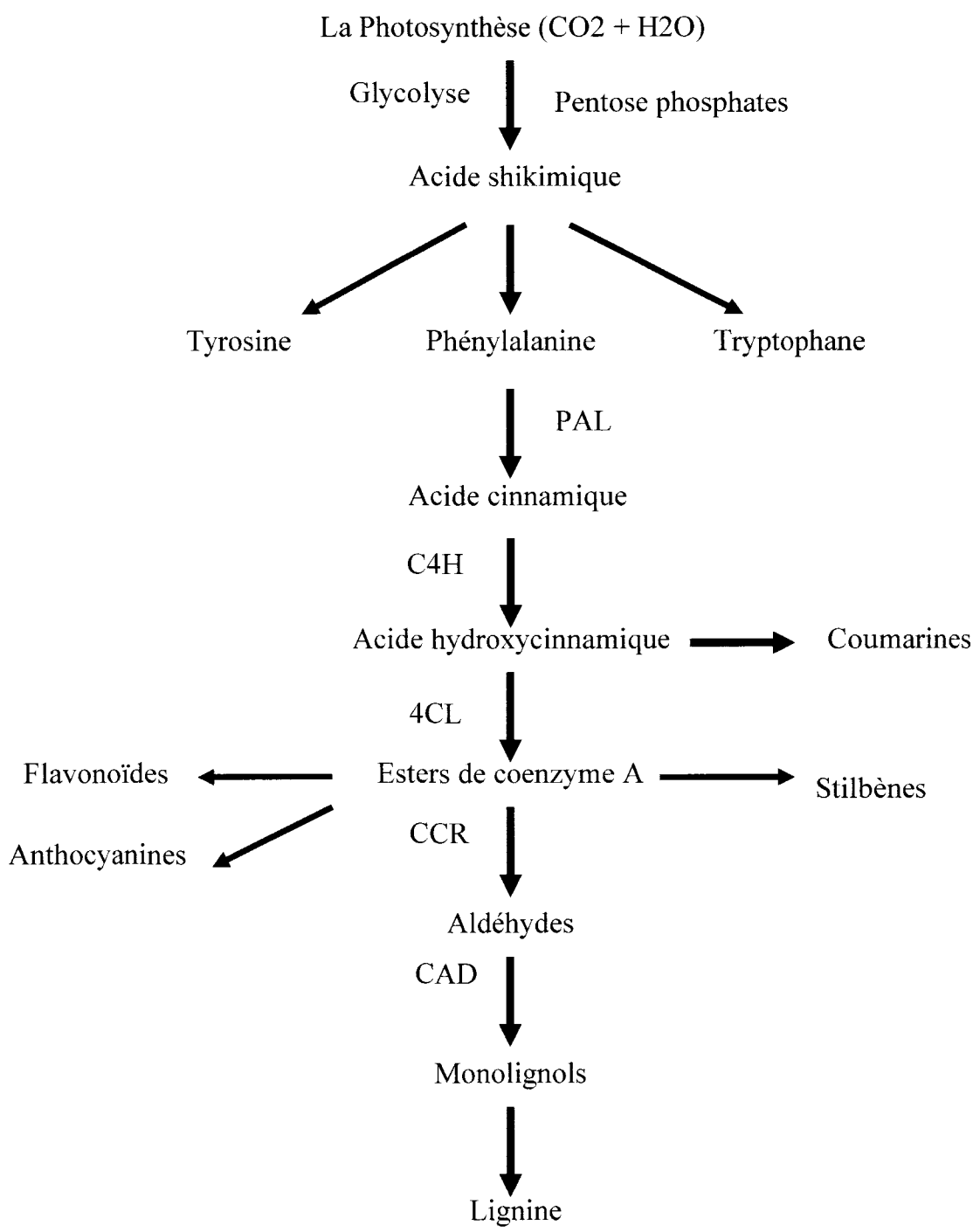


Figure 13 : La voie générale des phénylpropanoïdes et des voies métaboliques associées

C.4 Autres constituants

La paroi ne contient pas que des polymères. Les autres constituants les plus importants sont :

- L'eau : les constituants polysaccharidiques sont hydrophiles et surtout la paroi primaire contient un très fort pourcentage d'eau (Tableau 1).
- Les ions : on trouve de très nombreux ions dont deux jouent un rôle essentiel. Il s'agit d'abord du calcium qui joue un rôle important dans la gélification des pectines, et des protons qui maintiennent un pH dans la paroi, acidité qui joue un rôle important aussi bien dans l'élongation cellulaire (intermédiaire de la réaction auxinique à court terme) que dans un antagonisme avec le calcium vis-à-vis de la gélification des pectines.

D. La biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse de la lignine nécessite un grand nombre de réactions enzymatiques. Cette biosynthèse se produit *via* deux voies aromatiques qui sont :

- La voie du shikimate qui aboutit, en utilisant sept enzymes et des composés intermédiaires, le glucose et le pentose phosphate, d'abord à la synthèse de l'acide shikimique, puis à la synthèse de trois acides aminés, le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine (Fig. 13; Ogino *et al.*, 1982; Herrmann, 1999).
- La voie des phénylpropanoïdes qui commence avec la phénylalanine et conduit à la formation des composés phénoliques comme les flavonoïdes, les tanins et les lignines. (Fig. 13; Dixon et Paiva, 1995).

D.1 La voie générale des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes est formée d'une succession de réactions de désamination, d'hydroxylation, de méthylation et d'estérification (Fig. 13).

D.1.1 La PAL

L'enzyme L-phénylalanine ammonia lyase (PAL) catalyse la première étape de la biosynthèse de phénylpropanoïdes. L'intervention de cette enzyme est contrôlée par une régulation transcriptionnelle des gènes *PAL* et une régulation post-traductionnelle sur l'enzyme, ce qui permet de maîtriser la biosynthèse de tous les composés phénylpropanoïques en contrôlant la synthèse du premier intermédiaire. La PAL est une protéine tetramérique qui est codée par une famille de plusieurs gènes (Baucher *et al.*, 1998). Quatre gènes potentiels

PAL sont identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (*PAL1* à *4*) (Costa *et al.*, 2003). Chez la luzerne (*Medicago sativa*), 5 à 10 gènes *PAL* sont présents, dont deux gènes sont activés en réponse aux attaques de pathogènes (Dixon et Harrison, 1990). Un rôle similaire a été décrit chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) où deux gènes *PAL* sont activés après l'infection de la plante par le virus TMV (Pellengrini *et al.*, 1994). Une forte activité *PAL* est également retrouvée, de façon constitutive, dans le xylème, site principal de production des lignines.

D.1.2 Les étapes d'hydroxylation

La synthèse des monolignols à partir de la phénylalanine passe par un série d'hydroxylation du groupement phényl. Le nombre d'hydroxylation définit l'identité du monolignol qui pourra comporter une (alcool p-coumarylique), deux (alcool coniférylique) ou trois (alcool synapylique) oxygénations. Ces trois hydroxylation sont catalysés par trois enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (Chapple, 1998; Ro *et al.*, 2001 ; Meyer *et al.*, 1998).

La cinnamate 4 hydroxylase (C4H) est une enzyme catalyse la conversion de l'acide cinnamique en acide 4-coumarique par hydroxylation du 4^e carbone du groupement phényl. La *C4H* a été bien étudiée et l'expression de ces gènes examinée en détail. Le flux de carbone destiné à la synthèse de monolignols (lignines) est déterminé par la combinaison de l'activité de *PAL* et *C4H*. Ces rôles sont confirmés par des études différentes qui sont démontrées qu'une réduction de l'activité de *PAL* ou *C4H* résulte dans une réduction marquée de niveau des lignines (Elkind *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1999; Blee *et al.*, 2001). Par contre, une augmentation de l'activité de *C4H* ne produit pas plus de lignine (Anterola *et al.*, 1999; Anterola *et al.*, 2002).

La 4-coumarate 3 hydroxylase (C3H) est responsable de l'ajout un groupe hydroxyl en *meta*-position des phénylpropanoïdes pour produire l'acide cafféique (Lewis *et al.*, 1999). L'élimination de l'activité de *C3H* affecte fortement le flux de carbone dans la voie de biosynthèse des monolignols et les processus de croissance et de développement (Anterola et Lewis, 2002)

La férulate 5 hydroxylase (F5H) introduit le dernier groupe hydroxyl sur le carbone 5 du cycle aromatique. Ainsi, elle est nécessaire pour la formation des unités syringyle (S) par la conversion de l'acide férulique en acide sinapique (Chapple *et al.*, 1992). Cette enzyme a été détectée la première fois chez le peuplier (*Populus euramericana*) (Grand, 1984). Elle a

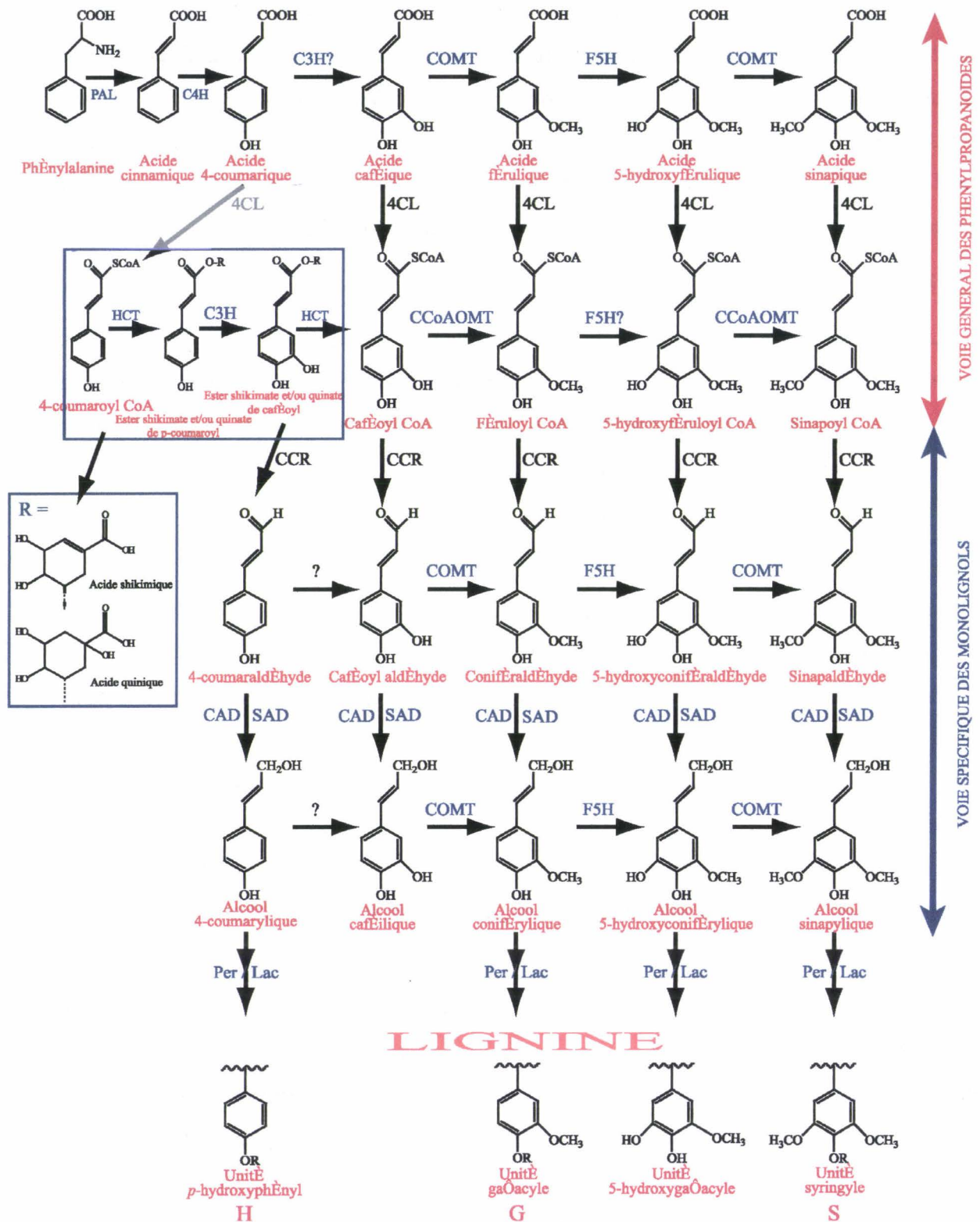


Figure 1: Voie de biosynthèse des monolignols regroupant la voie commune des phenylpropanoïdes et la voie spécifique des monolignols (d'après Baucher et al., 2003 et Dixon et al., 2001). Les enzymes mentionnées sous forme abrégée sont les suivantes : La phényl alanine ammonia lyase (PAL), La cinnamate 4 hydroxylase (C4H), La 4-coumarate 3 hydroxylase (C3H), l'acide caféique O-méthyltransférase (COMT), La férulate 5 hydroxylase (F5H), La 4-coumarate CoA ligase (4CL), l'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimite/quinatate hydroxycinnamoyltransférase (HCT), la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT), la cinnamoyl coenzyme A réductase (CCR), l'alcool cinnamylique déshydrogénase (CAD), l'alcool sinapylique déshydrogénase (SAD), les peroxydases (Per) et les laccases (Lac).

également été caractérisée chez le maïs et l'arabette (Ohashi *et al.*, 1987 ; Chapple *et al.*, 1992).

D'autres études suggèrent que les réactions d'hydroxylation et la méthylation se produisent plus en aval dans la voie de biosynthèse, au niveau de l'alcool coniférylique (Fukushima *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 2000), suggérant ainsi que la voie de biosynthèse de l'alcool sinapylique aurait lieu de façon prédominante via l'alcool coniférylique et 5-hydroxyconiférylique (Fukushima *et al.*, 1997.; Chen *et al.*, 1999).

D.1.3 Les réactions de méthylation

La voie de la biosynthèse des lignines comporte également une succession de réactions de méthylation des monomères, par méthylation des groupements hydroxyls présents sur le cycle aromatique (Fig. 14). Plusieurs études récentes suggèrent qu'il existerait deux classes d'enzymes capables de méthyler les esters de coenzyme A: La première est l'acide caféique O-méthyltransférase (COMT), qui est capable de catalyser la méthylation de l'acide caféique en acide férulique et de l'acide 5-hydroxyférulique en acide sinapique (Fig. 14; Davin et Lewis, 1992). La deuxième enzyme est la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) qui va transformer le caféoyl CoA en féruloyl CoA (Pakusch *et al.*, 1989). La participation de CCoAOMT dans la voie de biosynthèse de lignine pour former les monomères de lignine a été suggérée par (Ye *et al.*, 1994; Zhong *et al.*, 1998). Plus récemment, (Chen *et al.*, 1999) ont montré que la méthylation de monomères de lignine pouvait également intervenir au niveau des intermédiaires aldéhyde ou alcool.

La COMT est une protéine monomérique de taille de 40kDa (Edwards et Dixon, 1991; Davin *et al.*, 1992). Des nombreux travaux ont été montrés qu'une activité COMT réduite (Bugos *et al.*, 1991; Atanassova *et al.*, 1995; Meng et Campbell, 1998) obtenue par mutagenèse (stratégies antisens) dans différentes espèces (Vignols *et al.*, 1995; Jouanin *et al.*, 2000; Marita *et al.*, 2003) induisait une réduction de la teneur en lignines, avec notamment une réduction marquée de la quantité d'unités syringyles (Lapierre *et al.*, 1998).

La CCoAOMT est une enzyme homodimérique de 48 kDa, clonée pour première fois chez le persil (Schmitt *et al.*, 1991). La CCoAOMT a été depuis isolée et caractérisée au cours de nombreuses espèces ligneuses ou herbacées (Zou et Taylor, 1994; Ye, 1997; Meng et Campbell, 1998; Busam *et al.*, 1997; Martz *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Anterola *et al.*, 2002; Baucher *et al.*, 2003). La CCoAOMT est généralement codée par une famille multigénique (Lewis *et al.*, 1999), et plusieurs isoformes ont été mises en évidence. Ainsi, au

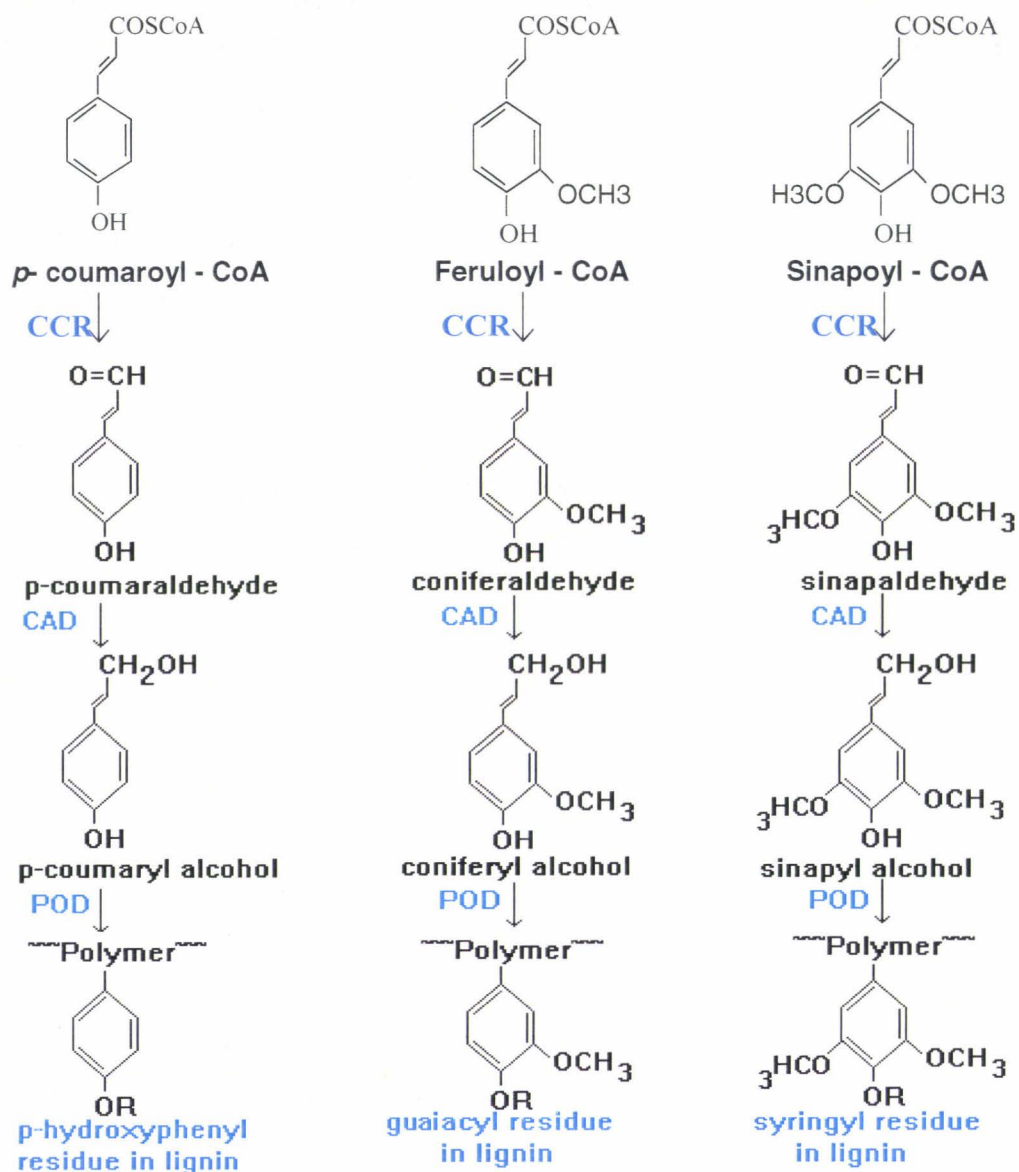
moins six isoformes de CCoAOMT sont connues chez le tabac, cinq chez *Zinnia elegans*, deux chez le peuplier et l'arabette, alors qu'on en retrouve une seule chez le tremble, le persil et *Vitis vinifera* (Anterola et Lewis, 2002).

Elle a été identifiée comme une enzyme impliquée dans la réponse de stress biotique (Pakush *et al.*, 1991; Pakush et Matern, 1991). La réduction de l'activité CCoAOMT dans les plantes transgéniques provoque une diminution de 33 à 45 % de teneur de lignine (Zhong *et al.*, 1998 ; Pinçon *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2001 ; Meyermans *et al.*, 2000 ; Zhong *et al.*, 2000).

D.1.4 La 4CL

La 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) catalyse la formation des esters CoA à partir des acides *p*-coumarique, caféique, férulique, 5-hydroxyférulique et sinapique (Fig. 14; Lee *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1998). Les esters produits par cette enzyme sont précurseurs de nombreux composés phénoliques comme les lignines, les flavonoïdes et d'autres métabolites phénoliques (Hahlbrock et Scheel, 1989; Dixon et Paiva, 1995; Douglas, 1996; Higuchi, 1997; Whetten *et al.*, 1998). Chez plusieurs espèces, cette enzyme est présente sous forme de plusieurs isoenzymes, avec pour chacune une expression spatio-temporelle particulière (Knobloch et Hahlbrock, 1975; Lewis et Yamamoto, 1990; Hu *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 2002). Les gènes codant les 4CL constituent généralement de petites familles. On trouve par exemple 4 gènes chez *Arabidopsis* (Raes *et al.* 2003) et neuf gènes "4CL-like". Ces gènes sont classés en deux groupes (Cukovic *et al.*, 2001), notés I (4CL1, 4CL2 et 4CL4) et II (4CL3). Les 4CL1 et 4CL2 semblent être impliqués dans la biosynthèse des monolignols au cours de la lignification, car leur expression semble spécifique des tissus avec une proportion élevée de cellules lignifiées (Ehlting *et al.*, 1999; Raes *et al.*, 2003). Le degré de conservation entre les différents membres de ces familles varie selon les espèces. Chez certaines espèces, les différents gènes codent des enzymes identiques, par contre dans d'autres espèces (pin, pomme de terre, peuplier, *Arabidopsis*) les isoformes sont divergentes (Becker-Andre' *et al.*, 1991; Uhlmann et Ebel, 1993; Voo *et al.*, 1995; Zhang et Chiang, 1997; Cukovic *et al.*, 2001; Kumar et Ellis, 2003).

Ces isoenzymes peuvent parfois présenter un profil d'expression spécifique et/ou une préférence de substrats variable selon le degré de méthylation des acides hydroxycinnamiques (Allina *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998; Lindermayr *et al.*, 2002). Par exemple, l'expression du gène *Pt4CL1* est associée aux tissus qui sont en cours de lignification, alors que *Pt4CL2*, qui montre une expression associée aux tissus non lignifiés



Légende

- C4H = cinnamate-4-hydroxylase
- C3H = *p*-coumarate-3-hydroxylase
- OMT = O-methyltransferase
- F5H = ferulate 5-hydroxylase
- 4CL = 4-coumarate:CoA ligase
- CCoA-OMT = caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase
- CCR = cinnamoyl-CoA reductase
- CAD = cinnamyl alcohol dehydrogenase
- POD = peroxidase

Figure 15 : La voie de biosynthèse de monolignol (d'après Whetten et Sederoff, 1995)

comme l'épiderme chez les feuilles, est impliquée dans d'autres processus de biosynthèse comme la biosynthèse de flavonoïdes (Hu *et al.*, 1998).

La diminution des activités 4CL induit une réduction des teneurs en lignines chez *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 1997), le tremble (Hu *et al.*, 1999), et le tabac (Kajita *et al.*, 1997).

D.2 La voie de biosynthèse des monolignols

Les monolignols sont l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, qui conduisent respectivement aux unités hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S) du polymère (Fig. 15).

La voie spécifique des monolignols est une branche de la voie générale des phénylpropanoïdes (Fig. 14 et 15). Les monolignols sont les précurseurs des lignines, mais ils peuvent également être les précurseurs des lignanes et des dimères glycosylés d'alcool coniférylique (DCG) (Lewis *et al.*, 1999; Petersen et Alfermann, 2001). Les lignanes sont des composés solubles et présents dans tous les organes de la plante. Ils sont étudiés pour leurs propriétés biocides (bactéricides, insecticides), et ils jouent un rôle dans la défense de la plante (antioxydant) (Lewis et Davin, 1999). Les DCGs peuvent agir comme composés dans la cascade régulatrice de la cytosine qui contrôle la division et peut être l'expansion cellulaire (Binns *et al.*, 1987; Teutonico *et al.*, 1991)

Les deux étapes successives de réduction, qui sont considérées comme spécifiques de la synthèse des monolignols, sont effectuées par deux enzymes : la CCR (cinnamoyl CoA réductase) et la CAD (alcool cinnamylique déshydrogénase). La CCR utilise les cinnamoyl CoA et forme les aldéhydes correspondants qui sont réduits en alcools par la CAD donnant les monolignols (Fig. 14). Une troisième enzyme, la SAD (alcool sinapylique déshydrogénase) serait spécifique de la conversion du sinapoyl-CoA en alcool sinapylique (Li *et al.*, 2001).

Les gènes *CAD* et *CCR* ont été clonés chez différentes espèces comme l'*Eucalyptus*, le peuplier et le tabac (Tableau 3).

D.2.1 La CCR

La CCR occupe une position clé entre la voie générale des phénylpropanoïdes et la voie des monolignols. Elle catalyse la première étape spécifique de la voie de biosynthèse des monolignols en réduisant les esters d'hydroxycinnamoyl CoA en leurs aldéhydes correspondants.

Tableau 3. Différents gènes de la voie de biosynthèse des monolignols

Gène/enzyme	Espèce	Référence
CCR (<i>EgCCR</i>)	<i>Eucalyptus gunnii</i>	<i>Lacombe et al., (1997)</i>
CAD (<i>NtCAD</i>)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Knight et al., (1992)</i>
SAD (<i>PtSAD</i>)	<i>Populus tremuloides</i>	<i>Li et al., (2001)</i>
Myb(<i>AmMyb308, AmMyb330</i>)	<i>Antirrhinum majus</i>	<i>Tamagnone et al., (1998)</i>
Laccase	<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Lafayette et al., (1995)</i>
Peroxydases	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Lagrimini et al., (1987)</i>
Lim (<i>NtLim1</i>)	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Kawaoka et al., (2000)</i>

L'enzyme a été purifiée à homogénéité à partir de xylème d'*Eucalyptus* (Goffner *et al.*, 1994) et le premier ADNc de cette enzyme a été cloné chez *Eucalyptus gunnii* (Lacombe *et al.*, 1997). Elle a depuis été purifiée chez le soja, l'épicéa, le peuplier et l'arabette. L'enzyme est un monomère de 33 kDa (épicéa) à 38 kDa (eucalyptus) (Lüderitz et Grisebach, 1981 ; Sarni *et al.*, 1984 ; Goffner *et al.*, 1994). Contrairement à la CCR purifiée de pin (Lüderitz et Grisebach, 1981) spécifique du féruloyl CoA, les CCR de dicotylédones possèdent un spectre d'activité plus large. Elles réduisent le féruloyl CoA, le sinapoyl CoA et le *p*-coumaroyl CoA.

Chez des espèces différentes, la CCR serait codée par un ou deux gènes (Lacombe *et al.*, 1997; Poke *et al.*, 2003 ; Lauvergeat *et al.*, 2001). Récemment chez l'*Arabidopsis*, des analyses ont montré qu'il y aurait actuellement 11 homologues putatifs de CCR (Costa *et al.*, 2003). Les deux CCR de l'arabette possèdent des profils d'expression différents. Le gène AtCCR1 serait impliqué dans la lignification constitutive des tissus alors que AtCCR2 serait exprimé lors de stress (Pichon *et al.*, 1998) et deux gènes ont été caractérisés chez le maïs (Jones *et al.*, 2001; Pichon *et al.*, 1998)

Son rôle dans la régulation des flux de carbone destinés à la synthèse des lignines a été démontré par génie génétique. En effet, une sous-expression de la CCR chez le tabac et *Arabidopsis* induit une diminution de près de 50 % de leur teneur en lignines (Piquemal *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 1998; Goujon *et al.*, 2003 ; Halpin *et al.*, 2001) ce qui confirme l'importance de la CCR dans la biosynthèse des lignines. Le mutant *irx4* d'*Arabidopsis* affectant le gène *CCR* montre également une réduction considérable de la teneur en lignines (Jones *et al.*, 2001). Une coloration brun-orange du xylème, une augmentation du rapport S/G et la présence de composés phénoliques inhabituels dans sa lignine sont également observées, accompagnées d'altérations dans la morphologie et l'architecture des parois secondaires des tissus vasculaires : croissance plus faible, écrasement des vaisseaux du xylème, altération des parois des fibres xylémiennes, dépôt anormal de lignines et une forte baisse des teneurs en sous-unités G qui induit une augmentation des ratios S/G (Piquemal *et al.*, 1998; Chabannes *et al.*, 2001a; Chabannes *et al.*, 2001b; Pinçon *et al.*, 2001; Goujon *et al.*, 2003). Une augmentation des ratios S/G et la coloration du xylème sont également détectées suite à la réduction des activités CCR chez le peuplier (Baucher *et al.*, 2003).

D.2.2 La CAD

La CAD catalyse la seconde étape de la biosynthèse des monolignols en convertissant, en présence du cofacteur NADPH, la réduction des hydroxycinnamaldéhydes en leur alcool

hydroxycinnamylique correspondant (alcool *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique, (Fig. 14 et 15).

Jusqu'aujourd'hui, les recherches sur les CADs (homologues) ont été respectivement conduites chez le tabac (Knight *et al.*, 1992), le pin (O'Malley *et al.*, 1992), l'*Eucalyptus* (Hawkins et Boudet, 1994; Goffner *et al.*, 1992; Grima-Pettenati *et al.*, 1993), le haricot (Grima-Pettenati *et al.*, 1994), le peuplier (Van-Doorselaere *et al.*, 1995), la luzerne (Van-Doorselaere *et al.*, 1995; Brill *et al.*, 1999), le maïs (Halpin *et al.*, 1998), le tremble (Li *et al.*, 2001) et l'arabette (Sibout *et al.*, 2003).

Cette enzyme pourrait être associée dans un complexe multienzymatique cytosolique à la 4CL et à la CCR (Wengenmayer *et al.*, 1976; Ruelland *et al.*, 2003). La CAD présente différentes spécificités de substrat suivant les espèces végétales. Par exemple, la CAD de isolée chez l'épicéa (*Picea abies*) (Lüderitz et Grisebach, 1981) ou le pin (*Pinus taeda*), tous deux gymnospermes (O'Malley *et al.*, 1992), montre une affinité forte pour le *p*-coumaraldéhyde et le coniféraldéhyde et une affinité faible pour le sinapaldéhyde. En conséquence la composition monomérique des lignines de ces plantes ne contient généralement pas d'unités syringyls (Galliano *et al.*, 1993). En revanche, la situation est plus complexe chez les angiospermes. Chez ces derniers, deux isoformes sont généralement présentes qui se distinguent par leur spécificité de substrats, leur poids moléculaire et leur séquence en acides aminés (Boudet *et al.*, 1995). La CAD1 est un monomère avec une masse moléculaire de ~40 kDa incapable d'utiliser le sinapaldéhyde. Son rôle n'est toujours pas clairement établi : elle interviendrait dans la synthèse de composés phénoliques en réponse à un stress (Waletr *et al.*, 1992; Hawkins et Boudet, 1994; Goffner *et al.*, 1998). La CAD2 est un hétérodimère composé de deux sous unités d'environ 40 kDa chacune, qui présente une affinité efficace pour les différents substrats avec une préférence pour les aldéhydes : le *p*-coumaraldéhyde, le coniféraldéhyde et le sinapaldéhyde avec une spécificité variable selon sa composition monomérique (Hawkins et Boudet, 1994; Baucher *et al.*, 1998). Elle serait impliquée dans la biosynthèse des lignines constitutives des tissus où elle participerait au contrôle de leur composition monomérique (Grima-Pettenati *et al.*, 1993; Hawkins et Boudet, 1994). En conséquence, les angiospermes contiennent des lignines riches en unités G et S

Le rôle de la CAD a été intensivement étudiée chez de nombreuses espèces par des approches de mutagenèse (Baucher *et al.*, 1996 ; Halpin *et al.*, 1994; Ralph *et al.*, 1997; Sibout *et al.*, 2003 ; Hibino *et al.*, 1995; Baucher *et al.*, 1996; Tahiaoui *et al.*, 1997; Ralph *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2003). La sous-expression de CAD n'affecte pas la teneur en lignines.

En revanche, la composition monomérique des lignines est modifiée. Ces plantes possèdent des lignines enrichies en aldéhydes qui pourraient être responsables de la coloration rouge du xylème (Higauchi *et al.*, 1994; Baucher *et al.*, 1996; Yahiaoui *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 2001b; Kim *et al.*, 2003). L'effet de cette transgénèse sur la composition monomérique des lignines est variable selon les espèces : contrairement au peuplier (Baucher *et al.*, 1996; Lapierre *et al.*, 1999), une baisse des ratios S/G est observée chez le tabac et la luzerne, (Baucher *et al.*, 1999).

D.2.3 La SAD

La CAD sert de médiateur dans la réduction des coniféraldéhydes et des sinapaldéhydes en monolignols (Li *et al.*, 2001). Un gène codant pour une enzyme avec une affinité 60 fois plus grande pour le sinapaldéhyde que celle de la CAD a été isolé chez le tremble. Cette enzyme qui semble spécifique du sinapaldéhyde a été appelée SAD (Li *et al.*, 2001). La séquence de la protéine *PtSAD* se distingue phylogénétiquement de toutes les séquences connues des CAD. L'existence de ce gène *PtSAD* suggère qu'en plus de CAD, une fonction SAD discrète soit essentielle à la biosynthèse de l'alcool sinapylique chez les angiospermes.

Dans les tissus primaires de tige de tremble, *PtCAD* a été immunolocalisée exclusivement dans les éléments du xylème dans lesquels seulement la lignine de type G a été déposée, tandis que *PtSAD* a été abondamment retrouvée dans les fibres de phloème où se trouvent des lignines enrichies en unités S. La même observation a été faite dans le xylème. L'hypothèse actuelle quant à la fonction de la SAD serait qu'elle agirait de façon complémentaire et coordonnée avec la CAD pour réguler la teneur en unités S et G des parois secondaires des angiospermes (Li *et al.*, 2001).

D.3 Stockage et transport des monolignols

Les monolignols sont des composés toxiques et instables qui ne peuvent pas s'accumuler dans la cellule végétale (Whetten *et al.*, 1995). La polymérisation des monolignols a lieu dans la paroi. Ceux-ci doivent ensuite être exportés par un mécanisme encore peu connu. Cependant, trois glucosides de monolignols ont été identifiés très tôt, dès 1963 glucosides d'alcool *p*-coumarylique, coniférine et syringine, dans la sève des gymnospermes et de quelques angiospermes (Freudenberg et Harken, 1963). Ceux-ci pourraient jouer le rôle de précurseurs des lignines et être exportés pour être polymérisés en lignine après la suppression du groupement glycosidique par des glucosidases spécifiques

(Vogt *et al.*, 2000 ; Terashima *et al.*, 1986 ; Fukushima et Terashima 1990 ; Dharmawardhana *et al.*, 1995 ; Steeves *et al.*, 2001; Samuels *et al.*, 2002).

D.4 La polymérisation des monolignols

Le processus *in vivo* de la polymérisation des monolignols, notamment sa régulation spatio-temporelle pendant la mise en place des tissus lignifiés, reste peu connu. Ce mécanisme est en grande partie étudié grâce à l'utilisation de suspensions cellulaires de pin et de zinnia qui permettent de conduire et d'étudier les réactions de polymérisation dans le milieu extracellulaire (Tokunaga *et al.*, 2005 ; Nose *et al.*, 1995 ; Anterola *et al.* 1999 ; Simola *et al.*, 1992 ; Kärkönen *et al.*, 2002 ; Fukuda 1997).

Par exemple, il a été récemment montré que l'alcool coniferylique est fourni aux vaisseaux conducteurs (TE) par les cellules de parenchyme xylémien qui les entourent (Hosokawa *et al.*, 2001). L'approvisionnement en monolignols des cellules vivantes peut donc soutenir la lignification de TEs même après la mort de cellules. Au moins 12 composés phénoliques comprenant quatre dilignols ont également été détectés dans le milieu, suggérant ainsi que les dilignols puissent être des intermédiaires de polymérisation des lignines.

La polymérisation déshydrogénative des monolignols dans la paroi est initiée par l'oxydation enzymatique des monolignols en radicaux phénoxy, lesquels s'assemblent ensuite pour former la lignine (Higuchi, 1990). Actuellement, au moins six classes d'enzymes sont impliquées lors de l'étape d'oxydation des monolignols (Lewis *et al.*, 1999), les laccases et les peroxydases étant considérées comme les principales enzymes responsables de ce processus (Dean et Erikson, 1994 ; Gavnholt *et al.*, 2002).

D.4.1 Les peroxydases

Les peroxydases forment une grande classe chez les plantes supérieures et plusieurs isoformes anioniques, cationiques ou neutres de peroxydases sont présentes dans une même plante. Ces enzymes sont localisées dans la paroi ou dans la vacuole et sont exprimées dans les tissus lignifiés (Kim *et al.*, 2002 ; El Mansouri *et al.*, 1999). Elles participent à plusieurs processus physiologiques comme la détoxification du H₂O₂, l'oxydation de phénols, la lignification, la synthèse de la subérine et la résistance aux agents pathogènes. Lors de la lignification, les peroxydases catalysent, en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la formation de radicaux phénoxy à partir des alcools qui seraient ensuite polymérisés (Baucher *et al.*, 1998).

Plusieurs peroxydases spécifiques de la lignification ont été caractérisées (Lagrimini *et al.*, 1987; Quiroga *et al.*, 2000). On compte 73 peroxydases putatives dans le génome d'*Arabidopsis* (Tognolli et Coll, 2002). Ces peroxydases sont exprimées à des niveaux variables dans la plante. Dans le xylème de peuplier, cinq peroxydases anioniques ont été purifiées et parmi elles, deux enzymes PXP3-4 et PXP-5 pourraient être impliquées dans la polymérisation des précurseurs de la lignine (Christensen *et al.*, 1998 ; Christensen *et al.*, 2001). Chez *Zinnia*, la localisation de H₂O₂ est corrélée avec les zones de lignification (Olson et Varner, 1993). Cependant aucune modification des teneurs en lignines n'est appréciable dans des tabacs déficients en une peroxydase anionique dont l'activité avait été corrélée à leur lignification (Chabbert *et al.*, 1992; Lagrimini *et al.*, 1997). Par contre, l'inhibition de 44% de la peroxydase anionique spécifique chez des peupliers transgéniques provoque de diminution de 21% des teneurs en lignines (Baucher *et al.*, 2003).

D.4.2 Les laccases

Les laccases catalysent *in vitro* l'oxydation des monolignols en utilisant cette fois-ci l'oxygène comme accepteur d'hydrogène et de protons (Freudenberg *et al.*, 1958 ; Reinhammar et Malström, 1981).

L'implication des laccases dans la polymérisation oxydative n'est pas encore évidente. Il a en effet été montré qu'une laccase pure isolée à partir du milieu de culture d'une suspension de cellule d'*Acer pseudoplatanus* (Bligny et Douce, 1983) ou au niveau des tissus en cours de lignification (Driouich *et al.*, 1992), était capable d'oxyder et de polymériser les monolignols et former une molécule proche des lignines (Sterjiades et Coll., 1993). Les laccases ont été identifiées chez plusieurs espèces végétales, dont *Arabidopsis* (Richardson *et al.*, 2000 ; Sato *et al.*, 2001b).

Une laccase purifiée pour la première fois à partir du xylème en différenciation du pin est spécifiquement associée à la lignification (Bao *et al.*, 1993). Chez le peuplier, Ranocha et Coll. (1999) ont isolé 5 ADNc de laccases s'exprimant spécifiquement dans la tige. La sous-expression par stratégie antisens de 3 de ces gènes n'a pas permis de montrer de façon directe l'implication de ces enzymes dans le phénomène de lignification (Ranocha *et al.*, 2001 et 2002).

E. Régulation transcriptionnelle et formation du xylème

Les espèces d'arbres subissent la croissance secondaire et produisent le bois (le xylème) à partir du cambium vasculaire. Le contrôle de la croissance et de la différenciation cambiale est effectué en changeant l'activité des gènes principaux impliqués dans des voies de développement. Récemment, un progrès significatif a été accompli dans l'étude des gènes et des mécanismes de signalisation responsables de la formation secondaire de la paroi, la biosynthèse de la lignine et de la cellulose (Arioli *et al.*, 1998), et le développement du xylème (Fukuda, 1997 ; Ye, 2002).

L'étude de la formation du bois au niveau moléculaire a commencé ces dernières années. Une approche de génomique a été employée avec succès pour examiner les modèles globaux d'expression de gènes dans les tissus de xylème de locuste noire (Yang *et al.*, 2003), du pin (Lorenz et doyen, 2002) et du peuplier (Hertzberg *et al.*, 2001). Cependant, la compréhension courante des mécanismes moléculaires de la formation du bois dans les arbres est encore limitée. Récemment, *Arabidopsis* a été employée comme modèle pour l'étude de la production de bois et de fibres dans les arbres (Zhao *et al.*, 2000). Chaffey *et al.* (2002) ont démontré que les tissus secondaires de xylème d'*Arabidopsis* produits dans leur étude étaient structurellement semblables à ceux d'une angiosperme (peuplier).

En dépit de ces avancées dans l'étude des gènes de biosynthèse du xylème, les mécanismes moléculaires permettant l'expression coordonnée de ces gènes pendant la formation de bois sont peu connus. Les études génomiques récentes chez le peuplier et *Arabidopsis* ont identifié un certain nombre de facteurs de transcription qui sont potentiellement impliqués dans la différenciation du xylème et des fibres. Le profil de transcription des gènes différenciellement exprimés pendant la différenciation du xylème *in vitro* chez *Zinnia* (Demura *et al.*, 2002) et *Arabidopsis* (Kubo *et al.*, 2005) ou pendant la croissance secondaire (la formation du xylème secondaire et du phloème secondaire) des hampes florales et des racines d'*Arabidopsis* (Oh *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2005) a mené à l'identification de familles diverses de facteurs de transcription, qui sont les régulateurs possibles de la différenciation du xylème ou de la croissance secondaire. De même, l'analyse microarray a prouvé que 182 facteurs de transcription sont différenciellement exprimés pendant différentes étapes du développement des hampe florales d'*Arabidopsis* (Ehrling *et al.*, 2005). Bien que les fonctions exactes des facteurs de transcription associés aux croissances secondaires soient inconnues, elles fournissent les outils utiles pour disséquer les mécanismes moléculaires contrôlant le processus complexe de développement du xylème, y compris

l'initiation de la différenciation, l'élongation des cellules, l'épaississement de la paroi secondaire, et la mort programmée des cellules.

F. La régulation transcriptionnelle des gènes de la lignification

F.1 Régulation transcriptionnelle de la lignification

La qualité du bois se fonde sur la formation du xylème secondaire, et plus en particulier sur le dépôt de lignine dans les parois secondaires de ce tissu. Des efforts substantiels ont été mis sur la caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans le processus de lignification. La caractérisation des séquences promotrices de certains gènes de biosynthèse des lignines permet d'étudier l'expression *in situ* de ces gènes dans le xylème. Ces études ont fourni des informations considérables dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes pendant le développement, démontrant que l'expression vasculaire est un événement principal dans la régulation de la lignification.

Selon les espèces végétales, PAL, C4H, COMT, 4CL, CCoAOMT, CCR et CAD sont contrôlés au niveau transcriptionnel. Des éléments cis-action putatifs ont été identifiés *in vivo* dans les promoteurs de PAL2 (Hatton *et al.*, 1995), de 4CL1 (Hauffe *et al.*, 1993) de CCoAOMT (Grimming et Matern, 1997) de CCR (Lacombe *et al.*, 2000) et de CAD (Lauvergeat *et al.*, 2002). Ces études ont identifié les éléments cis-action riches en AC (AC-I et AC-II) qui sont conservés dans ces promoteurs.

L'expression spatiale et temporelle des gènes d'*EgCCR* et d'*EgCAD2* a été étudiée en utilisant la fusion du gène rapporteur GUS chez des plantes modèles transgéniques comme le peuplier, la vigne et le tabac et récemment chez *Arabidopsis* (Lacombe *et al.*, 2000 ; Lauvergeat *et al.*, 2002 ; Baghdady *et al.*, 2006). Les observations ont clairement prouvé que les deux enzymes sont préférentiellement exprimées dans les tissus vasculaires subissant la lignification et montrent ainsi le même modèle d'expression. Ces résultats sont très intéressants puisqu'ils soutiennent l'hypothèse que la régulation transcriptionnelle de biosynthèse de la lignine est un mécanisme commun dans les espèces végétales. Très probablement, cette régulation peut se produire par la liaison de facteurs de transcription communs sur des motifs riches en éléments AC. D'ailleurs, cette régulation semble être conservée parmi les plantes puisque les séquences cis-régulatrices des promoteurs CCR et CAD2 d'*Eucalyptus* sont activées chez d'autres plantes et peuvent lier des facteurs de tabac.

Plusieurs études ont montré que ces régions régulatrices sont riches en éléments AC nécessaires pour fixer des facteurs de transcription régulant le flux de carbone vers la lignine.

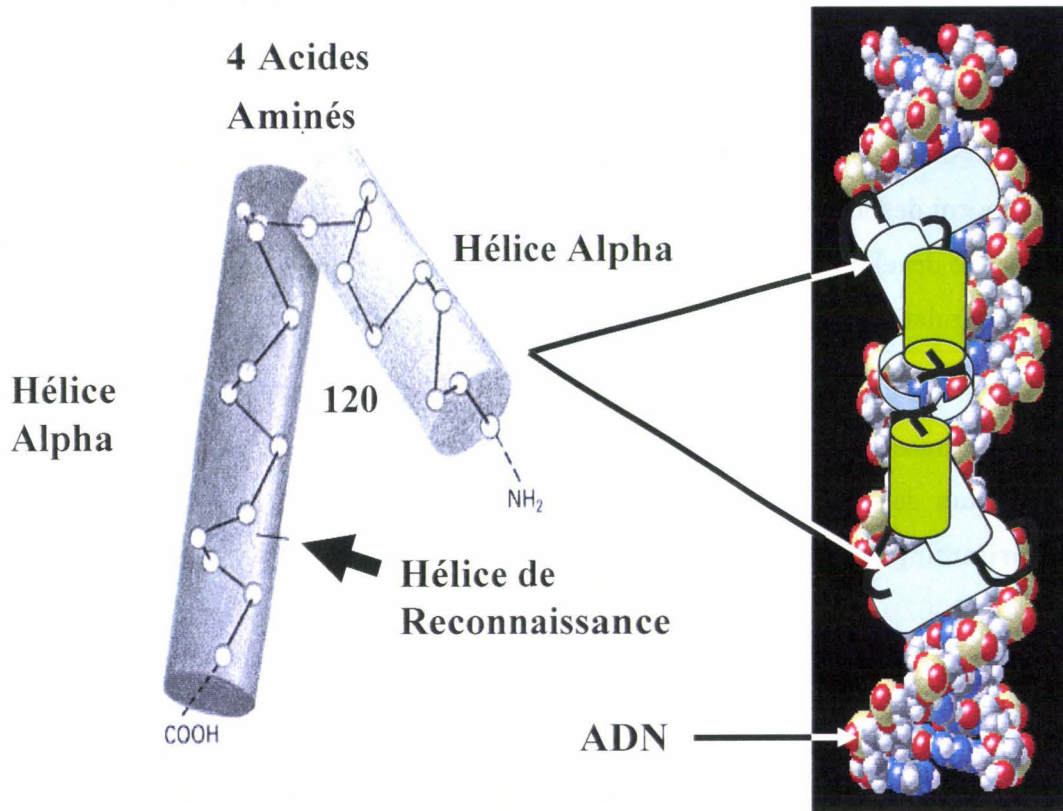


Figure 16 : A- Le Motif Hélice-Tour-Hélice est le motif le plus fréquent de reconnaissance de l'ADN. B- Myb - DNA L'interactions facteur de transcription HTH – ADN.

Tableau 4 : Quelques familles principales des protéines régulatrices de gène chez *Aarabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans* et *S. cerevisiae*

FAMILLE	NUMBER OF FAMILY MEMBERS PREDICTED FROM GENOMS ANALYSIS			
	<i>Aarabidopsis</i>	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Myb	190	6	3	10
AP2/EREBP *	144	0	0	0
bHLH (basic helix-loop-helix)	139	46	25	8
NAC	109	0	0	0
C2H2 (Zn finger)	105	291	139	53
Homeobox	89	103	84	9
MADs box	82	2	2	4
bZIP	81	21	25	21
WRKY (Zn finger)	72	0	0	0
GARP (Zn finger) / GATA	56	0	0	0
C2C2 (Zn finger) / GATA	104	6	9	10
Nuclear hormone receptor	0	21	25	0
C6 (Zn finger)	0	0	0	52
Estimated total (including many not listed above)	1.533	635	669	209
% of genes in genome	5.9	4.5	3.5	3.5

The table lists only those families that have at least 50 members in at least one organism. (Data from J.L. Riechmann et al., 2000; Science 290 : 2105-2110)

* AP2/EREBP (Apetala2 / ethylene-responsive-element binding protein)

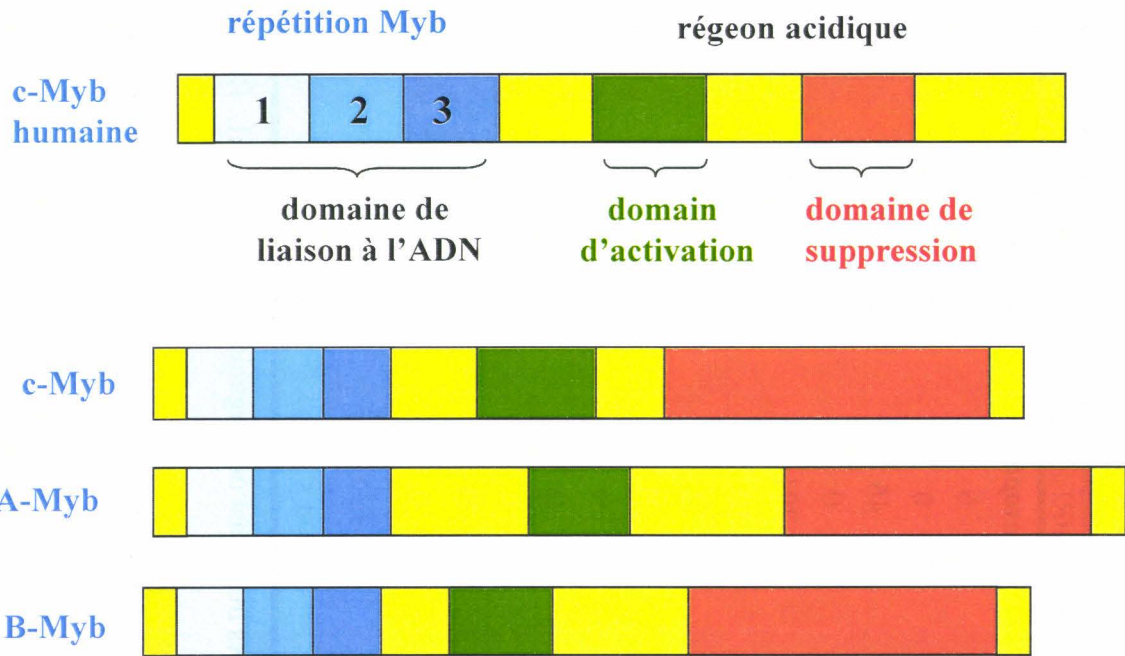


Figure 17 : l'oncogene de v-Myb du virus de myeloblastosis (*Avian myeloblastosis*), et sa version cellulaire c-Myb. Ces protéines modulaires comprennent deux régions distinctes : le domaine Myb dans la partie N terminale et se compose usuellement de trois répétitions, appelées R1, R2 et R3, et la région C terminale.

La compilation des études sur la spécificité de séquence a mené à l'identification de trois classes de sites de liaison Myb appelées MBSI, MBSII et le MBSIIG. Des séquences AC ont été trouvées sur des promoteurs des gènes des phénylpropanoïdes comme PAL2, 4CL1, *EgCCR* et *EgCAD2*. Ces séquences correspondent parfaitement à la séquence consensus de MBSIIG. L'expression vasculaire des gènes CCR et CAD2 d'*Eucalyptus* dépend de la présence des éléments cis riche en AC qui pourraient être la cible des facteurs de transcription Myb.

F.2 Les facteurs de transcription Myb

Il existe nombreux facteurs impliqués dans la régulation de la transcription. Le caractère distinctif entre ces protéines, facteurs de transcription, est une séquence spécifique d'acides aminés ou un domaine particulier qui leur permet de venir se fixer sur des régions spécifiques de l'ADN génomique et induire la transcription des gènes cibles. Les facteurs de transcription sont classés par familles en fonction de la séquence peptidique composant le domaine de reconnaissance de l'ADN. On parle de protéines à motif HTH, de protéines « leucine-zipper » (bZIP), de protéines « zinc-finger », de protéines de type Myb, etc. Les facteurs Mybs appartiennent à la super-famille HTH (Fig. 16; Tableau 4), caractérisée par la conservation des domaines de fixation à l'ADN, participent à la régulation de fonctions très importantes chez les animaux et surtout chez les végétaux.

F.3 Les Mybs chez les végétaux

Les membres de la famille des facteurs de transcription MYB ont été trouvés dans presque tous les eukaryotes. Le premier a été identifié à partir d'une protéine virale, ou l'oncogène de v-Myb du virus de myeloblastosis (*Avian myeloblastosis*), qui cause la leucémie dans les poulets (Klempnauer *et al.*, 1982; Majello *et al.*, 1986), ils ont en suite été mis en évidence chez tous les vertébrés (Lüscher et Eisenman, 1990). Il n'existe que trois protéines de type Myb chez les animaux (a-, b- et c-Myb) (Fig. 17), toutes trois impliquées dans le contrôle de la différenciation, la prolifération de cellules hématopoïques et dans la mort cellulaire programmée *via* le contrôle du gène *bcl2* (Weston, 1998). Ces protéines modulaires comprennent deux régions distinctes : le domaine de fixation à l'ADN, appelé domaine Myb, qui est localisé dans la partie N terminale, et la région C terminale qui est responsable de la modulation du niveau basal de transcription conféré par l'ARNpol II et les facteurs généraux de transcription.

Le domaine de liaison à l'ADN caractérise cette famille de facteur de transcription et se compose usuellement de trois répétitions de 50-53 acides aminés, appelées R1, R2 et R3 qui

lie à l'ADN d'une façon séquence-spécifique (Frampton *et al.*, 1989; Lipsick, 1996). Chaque répétition est formée de trois tryptophanes espacés régulièrement par dix-huit à dix-neuf acide aminé. Ces tryptophanes jouent un rôle dans la formation du noyau hydrophobe du domaine MYB exigé pour le pli de HTH (Klempnauer et Sippel, 1987). De nombreuses études ont montré que le domaine R1 n'est pas requis pour la liaison à l'ADN (Ogata *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002a) mais permettrait une stabilisation de la conformation des domaines R2 et R3 lors de leur interaction avec l'ADN (Howe et Watson, 1991; Robertson *et al.*, 2000). Les régions R2 et R3 ont été prédites pour former deux domaines HTH avec une connexion non conventionnelle (Fig. 16). Elles sont d'ailleurs responsables de la liaison à l'ADN de manière spécifique et notamment l'hélice alpha C-terminale des régions R2 et R3 qui seraient responsables de la reconnaissance de la séquence d'ADN (Di Croce *et al.*, 2002). Les régions R2 et R3 forment chez certaines protéines Myb un domaine suffisant pour donner une protéine fonctionnelle (Carty et Greenleaf 2002). À l'intérieur de chaque région, les tryptophanes seraient responsables du maintien de l'assemblage HTH en formant une structure hydrophobe. Cependant, plusieurs protéines dont la fonction dans la transcription a été démontrée possèdent des répétitions imparfaites où les tryptophanes peuvent être remplacés par des résidus phénylalanines ou tyrosines, de la même manière qu'une insertion de quelques acides aminés dans l'une des répétitions peut être observée (Okano *et al.*, 1998; Hermann *et al.*, 2003). De plus, une cystéine aussi conservée que les résidus tryptophanes semblent être important pour la fonctionnalité de la protéine et son interaction à l'ADN (Tang *et al.*, 2003). Les protéines appartenant à cette famille sont connues pour interagir avec une séquence cible caractéristique de l'ADN. Le site consensus de fixation des Mybs a été identifié comme étant séquence YAACNGHH (Y=C/T; H=A/C/T; N=A/C/T/G) (Ording *et al.*, 1996) ou C/TAACG/TG dans la majorité d'organismes. La première moitié du site YAAC et la deuxième NGHH sont reconnues principalement par R3 et R2 respectivement (Fig. 19; Tableau 5). De plus, la liaison à l'ADN pourrait être favorisée par la présence de séquences riches en AT à la périphérie de la séquence consensus (Chen, *et al.*, 2002b). Ces séquences riches en AT à la périphérie de la séquence consensus pourraient permettre une plus grande flexibilité de la molécule d'ADN et favoriser la liaison de la protéine Myb à l'ADN. De plus, ces séquences riches en AT semblent être indispensables à la transactivation, soit directement par la protéine Myb soit par le biais d'un partenaire (Chen *et al.*, 2002).

Bien que les protéines Myb comportent un des familles les plus nombreuses des facteurs de transcription chez les végétaux, peu est connu au sujet des fonctions de la plupart des

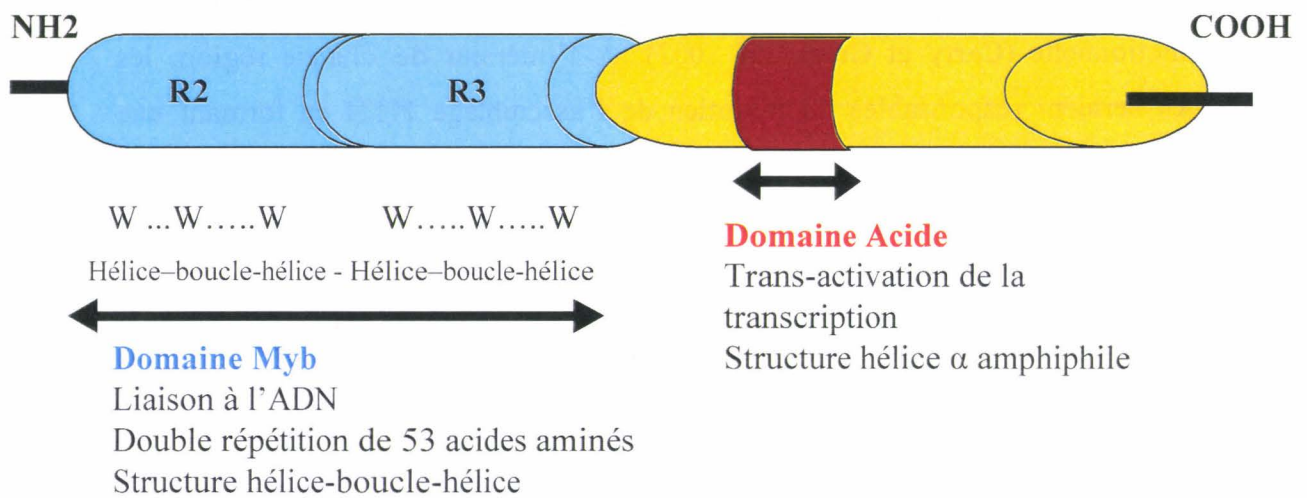


Figure 18 : Schéma représentant la structure de facteurs de transcription Myb chez les végétaux. Les répétitions R2 et R3 forment le domaine Myb, responsable de la fixation à l'ADN. Le domaine acide est impliqué dans la modulation de l'activité transcriptionnelle.

Tableau 5 : Sites de liaison (Binding Sites) de la famille MYB

Family	Subfamily or Domain	Cis-element name	Binding site	Reference
MYB	TBP	telomeric repeat	(GGTTTAG)8 (GGTTTAG)5	<i>Chen et al., (2001)</i>
MYB			GTAACGGTCTAC	<i>Jamin et al., (1996)</i>
MYB			G[GT]T[AT]G[GT]T	<i>Yinong and Klessig (1996)</i>

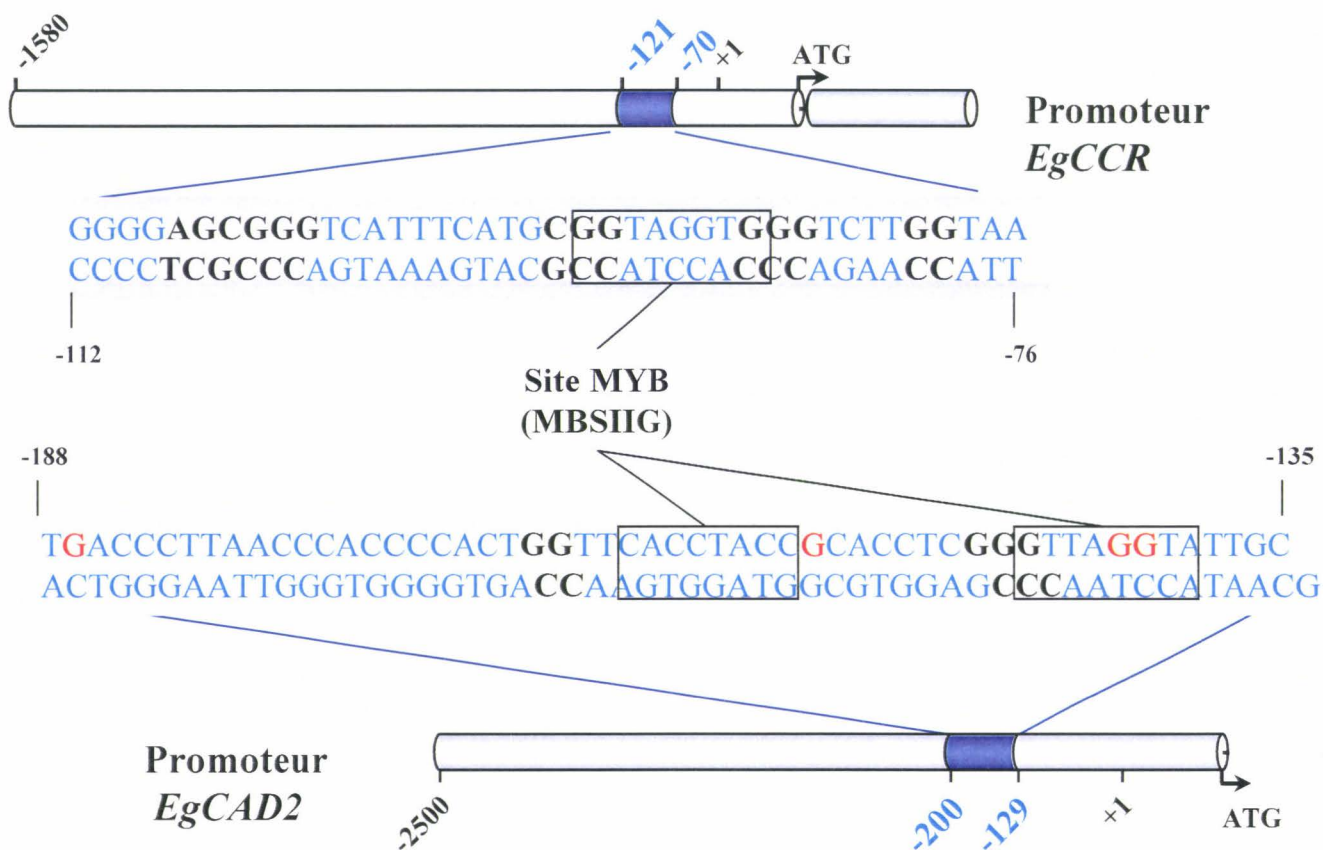


Figure 19 : Présence de sites de fixation de facteurs MYB de type MBSIIG dans les régions *cis* régulatrices des promoteurs *EgCCR* et *EgCAD2*. Représentations schématiques des promoteurs *EgCCR* et *EgCAD2* sur lesquelles sont positionnées les régions *cis* régulatrices conférant une expression tissu- et cellule-spécifique *in planta*, et notamment au niveau des systèmes vasculaires (régions de couleur bleue).

gènes de *Myb*. Chez les plantes, on l'a estimé qu'il pourrait y avoir plus de 80 loci différents de MYB dans chaque espèce (Martin et Paz-Ares, 1997), contrairement à seulement trois gènes de *MYB* dans les vertébrés (Rushton et Ness, 2001). Ceci est soutenu par la conclusion de 130, 85 et 80 gènes différents codant seules des protéines de R2R3-MYB dans *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Zea mays* respectivement (Rabinowicz *et al.*, 1999; Stracke *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004b). Les facteurs MYB chez les végétaux sont classifiés dans trois sousfamilles, appelés les facteurs MYB1R, facteurs R2R3-type MYB et facteurs de MYB3R (Stracke *et al.*, 2001). La classification dépend du nombre de répétitions imparfaites, R1, R2 et R3, a trouvé dans le domaine Myb. Les facteurs de transcription MYB avec une répétition simple sont assez divergents, et incluent les facteurs qui lient la séquence consensus de l'ADN telomérique végétale. On lui a également montré que les facteurs MYB1R peuvent agir en tant que des activateurs de transcription (Baranowskij *et al.*, 1994) et certains sont associés à l'activité de l'horloge circadienne (Schaffer *et al.*, 2001). En outre, on lui a récemment montré que des facteurs de MYB3R végétale semblables aux protéines de MYB chez les animaux sont impliqués en contrôle le cycle de cellules (Ito *et al.*, 2001), indiquant qu'il peut y avoir des degrés considérables de conservation fonctionnelle parmi des gènes de MYB3R des plantes et des animaux. Les gènes *MYB* contenant deux répétitions (R2R3-Mybs) comportent la plus grande famille de gène *MYB* chez les plantes (Fig. 18). Pour la majeure partie de 130 R2R3-type MYB les gènes ont trouvé dans *Arabidopsis thaliana*. qu'aucune donnée fonctionnelle n'est disponible. Cependant, des gènes de R2R3-type MYB ont été montrés pour régler le métabolisme de phénylpropanoïde chez *A. thaliana* (Borevitz *et al.*, 2000). L'analyse a également prouvé que les facteurs R2R3-type MYB peuvent agir en tant qu'activateurs de transcription aussi bien que des répresseurs (Jin *et al.*, 2000). Bender *et al.*, (1998) ont montré la participation d'une protéine MYB-related dans la biosynthèse de tryptophane, qui démontre que les voies contrôlées par de tels facteurs ne sont pas limitées au métabolisme secondaire. Une autre fonction importante pour des facteurs de transcription R2R3-type MYB est le contrôle du développement et de la détermination de la cellule fate/différentiation et de l'identité (Oppenheimer *et al.*, 1991; Lee et Schiefelbein, 1999). Les facteurs R2R3-type MYB participent également chez les plantes en réponse aux facteurs environnementaux et aux actions d'hormone de médiation : des exemples sont discutés en Jin et Martin, (1999). Dans d'autres cas, des gènes *Myb* ont été corrélés avec la mort de cellules pendant la réponse hypersensible sur l'attaque de microbe pathogène ou le traitement d'elicitor (Daniel, 1999 ; Sugimoto, 2000 ; Lee et Schiefelbein, 2001). De façon générale, les résultats suggèrent que des gènes R2R3-type MYB soient impliqués principalement dans contrôle des processus

"plante-spécifiques" (Martin et Paz-Ares, 1997). Cette observation est particulièrement intéressante puisque les gènes *Myb* du type R2R3 sont, du moins dans la mesure où nous savons aujourd'hui, seulement actuels présents chez les plantes (Riechmann, 2000).

F.4 Les répétitions des Mybs

Le domaine Myb comporte généralement jusqu'à trois répétitions imparfaites (désignées sous le nom de R1R2R3) dans une protéine simple de Myb (Frampton *et al.*, 1989). Bien que la plupart des gènes Myb de plante contiennent seulement deux répétitions (Fig. 18), il y a eu trois-répétitions Mybs rapporté chez *Arabidopsis* (Stracke *et al.*, 2001), chez maïs (Braun et Grotewold, 1999) et chez d'autres plantes (Jiang *et al.*, 2004a) ou une seule répétition chez *Arabidopsis* et d'autres espèces.

Jusqu'à présent, trois-répétitions seulement dans les gènes *Myb* ont été détectés chez les animaux (Jiang *et al.*, 2004a) chez les plants, les protéines MYB peuvent être classifiées dans trois sous-familles selon le nombre de répétitions adjacentes dans le domaine de MYB (un, deux ou trois) (Jin et Martin, 1999; Rosinski et Atchley 1998). Nous nous référons protéines MYB-like avec une répétition comme facteurs du MYB1R, avec deux répétitions des facteurs R2R3-type MYB, et avec trois répétitions des facteurs du MYB3R. Les protéines MYB-like avec une répétition simple (ou parfois juste partielle) sont assez divergents et incluent les facteurs qui lient une séquence consensus d'ADN télomérique de plante (TTTAGGG) (Yu *et al.*, 2000). On lui a également montré que les facteurs MYB1R (par exemple MYBST1 ou StMYB1R1) peuvent agir en tant qu'activateurs de transcription (Baranowskij *et al.*, 1994), et certains sont associés étroitement à l'activité de l'horloge circadienne (par exemple CCA1 et LHY) (Schaffer *et al.*, 2001). CCA1 et LHY1 lient l'ADN, indiquant qu'ils pourraient agir par la modulation de la transcription (Wang *et al.*, 1997; Schaffer *et al.*, 1998). Principalement par le génome séquencé, des gènes codant trois répétitions de Myb ont été détectés chez *A. thaliana* (Braun et Grotewold 1999). Des gènes de MYB3R ont été également détectés dans toutes les lignées principales des plantes (Kranz *et al.*, 2000). On a pensé ces données prouvant que les gènes codant des facteurs R2R3-MYB ne sont pas les équivalents du c-Myb des animaux, comme avant la détection des gènes MYB3R de végétaux. *A. thaliana* contient au moins cinq gènes d'AtMYB3R. On lui a montré récemment que des facteurs MYB3R chez les plantes semblables aux protéines de MYB chez les animaux sont impliqués en contrôlant le cycle de cellules (Ito, 2001). B-MYB-Like en cellules de sang (Muller *et al.*, 1999), des facteurs MYB3R sont impliqués en régulation de la transcription des gènes de cyclin *via* des éléments d'identification de MYB dans les promoteurs de cyclin (Ito, 2001). En utilisant la

recherche d'homologie dans la base de données non-superflue de GenBank, deux protéines Myb de trois-répétitions ont été identifiées chez *Oryza sativa* L. ssp. japonica. Cependant, aucun trois-répétitions Mybs ont été détectés en riz (indica) (Jiang *et al.*, 2004b). Ceci a pu être dû à l'imperfection de l'ensemble de données d'*O. indica*. Ceci peut indiquer la conservation fonctionnelle parmi des gènes de MYB3R des plantes aux humains. Cependant, la contribution exacte des facteurs MYB3R et des protéines telles que AtMYBCDC5 (Hirayama et Shinozaki, 1996) dans le contrôle de cycle de cellules chez les plantes exige davantage d'élucidation. AtMYBCDC5 est lié à la protéine CDC5+ de cycle de cellules de levure et au régulateur humain de l'entrée mitotique HsCDC5. Ce sont des protéines MYB potentiellement multifonctionnelles qui sont impliquées dans l'épissure de transcription (Burns *et al.*, 1999) et la régulation transcriptionnelle (Lei *et al.*, 2000). Les gènes AtMYB3R peuvent jouer un rôle dans le contrôle de cycle de cellules, et ainsi, il est possible que les mutations dans ces gènes soient mortelles, ainsi les allèles de mutant respectifs sont sous-représentés dans des populations de mutants (knock-out). Les positions de la carte des gènes MYB3R d'*A. thaliana* ont été comparées à ceux des mutations mortelles embryonnaires (emb), mais des candidats pour des allèles de mutant n'ont pas été indiqués d'une manière concluante. Ceci pourrait être en raison du nombre élevé de gènes d'emb et des difficultés impliquées en intégrant les cartes physiques et génétiques (Meinke *et al.*, 1998). La large présence de trois-répétitions gènes Myb dans des espèces diverses indique l'antiquité de ces gènes.

Les gènes MYB contenant deux répétitions (R2R3-type MYB) constituent la plus grande famille de gène de MYB chez les plantes (Tableau 4). Les répétitions de cette grande famille sont semblables à la deuxième et troisième répétitions du domaine Myb animal (Williams et Grotewold, 1997). Ces gènes dériveraient de la duplication d'un gène ancestral R1R2R3 (Kranz *et al.*, 2000). En plus de la perte du motif R1, la famille R2R3 a subi des modifications additionnelles, comme des changements dans la structure intron-exon (Romero *et al.*, 1998), et l'insertion ou la substitution de résidu dans la répétition R2 (Williams et Grotewold, 1997). Ces résidus s'avèrent cruciaux pour la reconnaissance de l'ADN et l'interaction coopérative entre les deux répétitions Myb (Williams et Grotewold, 1997), ce qui peut expliquer les différences dans les séquences de reconnaissance entre les protéines R2R3 et R1R2R3, et aussi entre les protéines R2R3 même (Solano *et al.*, 1997). La grande taille de cette famille de gène ressortait du travail de Romero et autres (Romero *et al.*, 1998) chez *A. thaliana* et a été également confirmée chez *Zea mays* (Rabinowicz *et al.*, 1999). AtMYB1 a

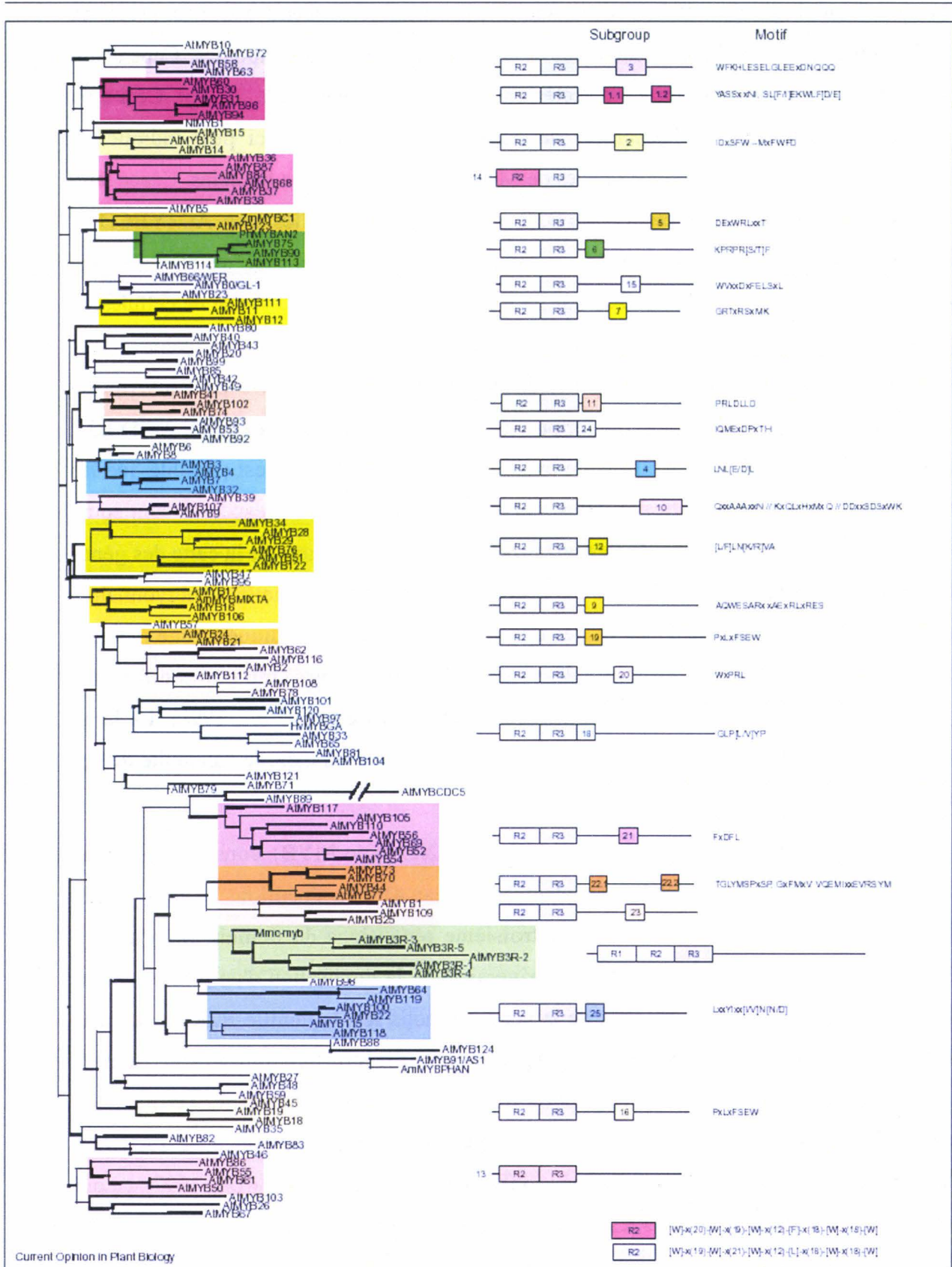


Figure 20 : La relation entre les protéines Myb d'*Arabidopsis thaliana* qui ont deux ou trois répétitions sont classées par catégorie dans 22 sous-groupes sur la base de motifs de séquence d'acide aminé conservé du carboxyterminale par rapport au domaine MYB (d'après Kranz *et al.*, 1998)

été assigné au premier gène d'*A. thaliana* R2R3-type MYB identifié par PCR (Shinozaki *et al.*, 1992). 130, 85 et 80 gènes distincts du type R2R3 qui ont été détectés sur la base de séquençage complet de génome d' *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* et *Zea mays* respectivement (Rabinowicz *et al.*, 1999; Stracke *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004).

F.5 La complexité et les sous-groupes de la famille R2R3-MYB

Les facteurs R2R3-type MYB codés par les gènes d'*AtMYB* ont été classés par catégorie dans 22 sous-groupes sur la base de motifs de séquence d'acide aminé conservé du carboxyterminale par rapport au domaine MYB (Fig. 20; Kranz *et al.*, 1998). La réévaluation de ces motifs, en utilisant l'ensemble de données nouvellement prolongé, a confirmé la plupart de ces sous-groupes. Des corrélations ont pu être réalisées entre cette nouvelle classification et les trois familles précédemment sur leurs spécificités de reconnaissance à l'ADN. Ainsi, les catégories 21 et 22 appartiennent à la famille A, la catégorie 18 à la famille B et toutes les autres catégoriels à la famille C. En dépit de la divergence de la séquence d'acide aminé en dehors du domaine MYB, il y a quelques motifs conservés qui peuvent contribuer à la fonction. L'évidence pour l'importance de ces motifs vient d'*AtMYB0/GL1* et de la protéine *gl1* non fonctionnelle codés par l'allèle *gl1-2* qui manque la motif-définissant du sous-groupe 15 (Larkin *et al.*, 1993; Kranz *et al.*, 1998). Les motifs conservés peuvent faciliter l'identification des domaines fonctionnels dehors du domaine de liaison à l'ADN des facteurs R2R3-type MYB. Il intéresse également pour noter qu'il y a plusieurs cas de la conservation fonctionnelle des gènes qui groupent ensemble dans le dendrogramme. *AtMYB91/AS1* et *AmMYBPHAN* tous les deux ont été montrés pour régler négativement l'expression de *KNOX (KNOTTED)* dans primordia (Byrne *et al.*, 2000). *AtMYB66/WER* et *AtMYB0/GL1*, tous les deux groupant ensemble dans le sous-groupe 15 (Fig. 20), peut fonctionnellement se compléter et montrer différentes fonctions biologiques seulement en raison de leurs différents modèles d'expression spatiaux (Lee et Schiefelbein, 2001). *AtMYB23* est étroitement lié à *AtMYB66/WER* et à *AtMYB0/GL1*, et il serait intéressant de voir si le gène *AtMYB23* peut également compléter les mutants *wer* et *gl1* une fois exprimé sous le contrôle de promoteur respectif. Un troisième point de droit pour la corrélation entre la similitude de séquence et la fonction pourrait être *AtMYB123*, parce que ce facteur est séquence-connexe à *ZmMBC1* et est identique au facteur de R2R3-type MYB codé par *TT2*. Tous les deux, *AtMYB123/TT2* et *ZmMYBC1*, contrôle la pigmentation de la graine ou des kernal, respectivement. *AtMYB75/PAP1* et *AtMYB90/PAP2* sont également étroitement liés à *ZmMYBC1* (Fig. 20) et semblent avoir une fonction de façon ou d'autre relative (Borevitz *et al.*, 2000).

A la lumière de sets de données, la fonction de gènes présents dans un même sous-groupe semble conservée dans le règne végétal. Ainsi, le sous-groupe 9 est défini par deux motifs de 10 et 22 acides aminés. *PhMyb1* de *Petunia hybrida* appartient à ce groupe, s'est avéré fonctionnellement homologue à *AmMLXTA*. Ce dernier contrôle le développement de cellules coniques ou multicellulaires des trichomes (Glover *et al.*, 1998). Le sous-groupe 4 représenterait des Myb répresseurs. Dans la partie C-terminal de *Zm38*, *AmMyb308*, *AmMyb330*, *AtMyb4*, *PhMyb27* et *FaMyb1*, se présente le motif pdLNLND/ELxiG/S qui semble jouer un rôle fondamental dans l'activité répressive de ces protéines régulatrices (Kranz *et al.*, 1998; Tamagnone *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000; Spelt *et al.*, 2000; Aharoni *et al.*, 2001).

Des études évolutives de Myb famille ont été gênées par la nature antique des duplications de gène (Dias *et al.*, 2003). Ils ont établi que les régions divergentes de C-terminale des protéines de R2R3 MYB sont sujettes au choix d'épuration et ont constaté que ces régions montrent parfois des nombres plus élevés de substitutions synonymes que le domaine de MYB. Ensemble, ces études fournissent l'analyse la plus détaillée de la divergence de séquence des gènes récemment dupliqué de R2R3 Myb et suggèrent des modèles nouveaux pour la fonction et l'évolution de ces gènes.

Dans une étude récente, Jiang *et al.*, (2004b) ont employé des techniques informatiques pour classifier des gènes Myb sur la base de la similitude de séquence et de la structure de gène, et pour identifier des rapports fonctionnels possibles parmi des sous-groupes de gènes Myb d'*Arabidopsis* et d'*Oryza sativa* L.indica. Cette étude a analysé 130 gènes Myb d'*Arabidopsis* et de 85 du riz. Les protéines rassemblées de Myb ont été groupées dans 42 sous-groupes basés sur la similitude et la phylogénie de séquence. Intéressant, la structure de exon-intron a différencié entre les sous-groupes, mais a été conservé dans le même sous-groupe. Des motifs conservés ont été détectés dans des régions de codage de carboxy-terminale des gènes Myb dans des sous-groupes. En revanche, aucun motif de normalisation commun n'a été identifié dans les régions noncodées. En plus, quelques gènes Myb avec les fonctions semblables ont été groupés dans les mêmes sous-groupes. Ils ont conclu que la distribution des introns dans l'arbre phylogénétique suggère que les domaines Myb aient à l'origine été compacte dans la taille ; des introns ont été insérés et les emplacements d'épissure ont été conservés pendant l'évolution. Les motifs conservés identifiés dans les régions de carboxy-terminale sont spécifiques pour des gènes Myb, et les sous-groupes identifiés de gène Myb peuvent refléter la conservation fonctionnelle.

F.6 Rôle des facteurs R2R3-Myb

Les protéines R2R3-Myb sont une superfamille nombreuse des facteurs de transcription qui règlent des facettes diverses de métabolisme et de développement de plante (Jin et Martin, 1999; Stracke *et al.*, 2001). Aucune donnée fonctionnelle n'est disponible pour la plupart des 130 gènes de R2R3-type *AtMyb*, 85 *OsMyb* et 80 *ZmMyb*. Cependant, des recherches systématiques des knockouts ont été lancées récemment (Meissner *et al.*, 1999) et le nombre de gènes de R2R3-type MYB pour lesquels l'information fonctionnelle est devenue disponible s'est développé de manière significative pendant les dernières années. Les membres de cette famille ont des rôles démontrables dans les processus s'étendant de la détermination du destin de cellules épidermiques (Glover *et al.*, 1998; Kirik *et al.*, 2001; Lee et Schiefelbein, 1999 et 2001) à la régulation du métabolisme de phénylpropanoïde (Borevitz *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2000; Tamagnone *et al.*, 1998), de développement de graine et de germination (Diaz *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 1995 et 1999; Penfield *et al.*, 2001) à des réponses aux stressés (Abe *et al.*, 1997, 2003; Denekamp et Smeekens, 2003; Vaillau *et al.*, 2002) et de développement d'anthère (Higginson *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2003; Steiner-Lange *et al.*, 2003) à photomorphogénèse (Ballesteros *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003).

Une fonction importante pour des facteurs R2R3-Myb est le contrôle du développement et de la détermination du destin et de l'identité de cellules. *AtMyb0* (*GL1*) (Oppenheimer *et al.*, 1991) et *AtMyb66* (*WER*) (Lee et Schiefelbein, 1999) sont impliqués dans modeler de cellules épidermiques. En fait, les deux gènes codent des protéines très semblables (sous-groupe 15, Fig. 20; Kranz *et al.*, 1998). Le locus génétique classique (Asymmetrical Leaves1; *ASI*) d'*A thaliana* a été montré pour coder un facteur Myb *AtMyb91/ASI* (Byrne *et al.*, 2000) et est un orthologues aux gènes *AmMybPHAN* d'*Anthirrhinum majus* et *ZmMybRS2* (Waites *et al.*, 1998) de différenciation de cellules (Tsiantis *et al.*, 1999; Timmermans *et al.*, 1999). *AtMyb0/GL1* agit avec un facteur bHLH codé par *AtbHLH1/GL3* (Payne *et al.*, 2000) semblable à l'action combinée de *ZmMybC1* et de *ZmR*, qui règlent ensemble la production d'anthocyanine dans *Zea mays* (Goff *et al.*, 1992). Cette évidence suggère que des facteurs de R2R3-Myb souvent soient impliqués dans l'interaction combinatoire des facteurs de transcription pour la génération des modèles fortement spécifiques d'expression. Les facteurs R2R3-Myb chez les plantes, participent également en réponse aux facteurs environnementaux et de médiation aux actions d'hormone, dont des exemples ont été discutés en détail récemment (Jin et Martin, 1999). Chez *A. thaliana*, *AtMyb2* s'est avéré pour régler le promoteur *AtADH1* (Alcohol Dehydrogenase1), et il pourrait également être impliqué en

réponse au bas oxygène (Hoeren *et al.*, 1998). L'expression *AtMyb30* est fortement corrélée avec la mort de cellules pendant la réponse hypersensible sur l'attaque de microbe pathogène ou le traitement d'eliciteur (Daniel *et al.*, 1999). L'eliciteur-sensible de gènes R2R3-Myb ont été également décrits de *Nicotiana tabacum* (Sugimoto *et al.*, 2000), et un gène d'*AtMyb78* a été montré pour être exprimé en réponse à l'attaque fongique (Lee *et al.*, 2001). Pris dans l'ensemble, il semble que les gènes R2R3-Myb sont impliqués principalement dans le contrôle des processus végétale-spécifiques (Jin et Martin, 1999; Martin et Paz-Ares, 1997). Des gènes R2R3-Myb ont été montrés pour régler le métabolisme de phénylpropanoïde dans l'*Arabidopsis thaliana*. La surexpression d'*AtMyb75/PAP1* (Production of Anthocyanin Pigment1) et d'*AtMyb90/PAP2* (Borevitz *et al.*, 2000) a amené à l'accumulation des anthocyanines, et *AtMyb4* réprime la synthèse du malate de sinapoyl (Jin *et al.*, 2000). L'analyse d'*AtMyb4* a également démontré que les protéines R2R3-Myb peuvent agir en tant qu'activateurs transcriptionnels aussi bien que des répresseurs. Récemment, le gène (Transparent Testa2; *TT2*) a été montré pour coder un facteur R2R3-Myb (*AtMyb123*; Nesi *et al.*, 2001). Ce n'est pas une surprise en tant que plusieurs gènes de R2R3-type *MYB*, tels que *ZmMybC1* de *Zea mays* (Paz-Ares *et al.*, 1986) ou *PhMybAN2* du *Petunia hybrida* (Quattrocchio *et al.*, 1999) qui contrôle également le métabolisme de phénylpropanoïde (Jin et Martin, 1999; Martin et Paz-Ares, 1997), sont connus pour être dérivés d'autres espèces végétales. *AtMyb34/ATR1* (Altered Tryptophan Regulation1) est un régulateur de la biosynthèse de tryptophane, qui démontre que la voie contrôle par de tels facteurs n'est pas limitée au métabolisme secondaire (Bender *et al.*, 1998). Récemment, (Mehrtens *et al.*, 2005) ont montré que *AtMyb12* est un membre de la famille R2R3-MYB qui s'est avéré un activateur flavonol-spécifique de biosynthèse flavonoïde avec les deux gènes de biosynthèse de flavonoïdes CHS (chalcone synthase) et FLS (synthase de flavonol) en tant que ses cibles primaires. L'activation transcriptionnelle par *AtMyb12* est coactivateur-indépendante, mais exige la présence de MREs (des éléments d'identification de MYB) fonctionnel chez des promoteurs cible.

Des éléments AC sont identifiés par le domaine de liaison à l'ADN de quelques facteurs de transcription R2R3-Myb chez les plantes (Sablowski *et al.*, 1994; Solano *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2000; Patzlaff *et al.*, 2003a; Patzlaff *et al.*, 2003b). Le potentiel des protéines R2R3-Myb de lier des éléments AC et de régler la lignification a été démontré la première fois avec un membre de famille d'*Antirrhinum majus*, *AmMyb308* et *AmMyb330* (Tamagnone *et al.*, 1998). Quand des protéines Myb étaient surexprimées dans le tabac transgénique, le dispositif

le plus remarquable du phénotype était que sénescence les feuilles étaient une couleur blanche pâle, par opposition à la couleur jaune-brune caractéristique de feuilles sauvages. Car la couleur brune des feuilles de tabac senescé normales est attribuable à l'oxydation des composés phénoliques, les résultats avec les plantes Myb-surexprimé ont suggéré qu'ils aient accumulé plus bas des quantités de composés phénoliques que normalement. Conformé à cette hypothèse, extraits de feuille des plantes surexprimé *AmMyb308* étaient déficients en 17 esters phénoliques solubles qui ont été trouvés dans les plantes de type sauvage. Des résultats semblables ont été trouvés avec des plantes surexprimé *AmMyb330*. Ces résultats ont suggéré que la surexpression de gène Myb ait réprimé le métabolisme acide phénolique. En accord avec ces résultats, les plantes surexprimé *AmMyb308* ont eu une réduction d'accumulation de lignine dans le tissu vasculaire. L'analyse d'oxydation de nitrobenzène de composition de lignine monomère a suggéré que des quantités de lignine aient été réduites d'au moins 17%. La réduction en lignine actuelle dans le tissu vasculaire était également évidente une fois examinée par la coloration de phloroglucinol.

L'impact de la surexpression *AmMyb308* ou *AmMyb330* aux niveaux équilibrés de transcription des gènes codant des enzymes de métabolisme de phénylpropanoïde a été évalué (Tamagnone *et al.*, 1998). L'expression de gène *PAL* était inchangée par la surexpression *AmMyb308* ou *AmMyb330*, avec l'accumulation de transcription de *PAL* étant semblable au type sauvage et aux plantes surexprimées. En revanche, l'accumulation des transcrits pour les gènes codant *C4H*, *CL4* et *CAD* a été notamment réduite dans les plantes surexprimé *AmMyb308*. Ainsi, *AmMyb308* pouvait empêcher des étapes multiples dans la voie de biosynthèse de monolignol. La surexpression de différentes régions de la séquence codée d'*AmMYB308* a indiqué que la suppression de l'expression de gènes *C4H*, *CL4* et *CAD* a exigé le domaine de liaison à l'ADN spécifique de MYB, aussi bien que son domaine de C-terminale. On l'a présumé qu'*AmMYB308* et *AmMYB330* codent des activateurs transcriptionnel faibles qui, quand surexprimé, dehors-concurrentent les activateurs forts endogènes et empêchent de ce fait compétitivement l'activation de gène. Ce travail suggère que les facteurs MYB a le potentiel co-ordinaire de régler l'expression des gènes de la voie de phénylpropanoïde, y compris ceux qui sont liés à la biosynthèse de lignine.

Le potentiel des facteurs de transcription MYB de régler la biosynthèse de lignine a été également justifié par la constatation que la surexpression d'un autre R2R3-MYB, *AtMybPAP1-D*, module l'accumulation de l'anthocyanine et de lignine dans l'*Arabidopsis* (Borevitz *et al.*, 2000). *AtMYBPAP1* est l'horloge circadienne réglée (Harmer *et al.*, 2000),

qui suggère que ce MYB puisse fonctionner en tant qu'élément des mécanismes qui modifie l'expression circadienne des gènes codant des enzymes qui sont impliquées dans la biosynthèse de phénylpropanoïde et/ou de monolignol. Ceci fournirait les moyens par lesquels pour réorienter le flux du carbone dans la biogenèse de phénylpropanoïde au-dessus du cycle journalier. Normalement, *AtMYBPAP1* est exprimé en tissus qui accumulent des flavonoïdes et leurs dérivés, et ne semble pas être lié aux tissus qui lignifient (Borevitz *et al.*, 2000). Par conséquent, de même que le point de droit pour *AmMYB308* et *AmMYB330* fleur-exprimés, alors qu'*AtMYBPAP1* a la capacité de régler la biosynthèse de lignine, et démontre de ce fait le potentiel pour que de telles protéines règlent la biosynthèse de lignine, il reste à déterminer s'il y a un membre de famille de R2R3-MYB qui accomplit cette fonction en cellules lignifiées.

Récemment, une protéine R2R3-MYB qui peut jouer un rôle direct dans la régulation de la biosynthèse de lignine en cellules lignifiées a été caractérisée. *PtMYB4* est un membre de la famille R2R3-MYB qui est exprimé en cellules lignifiées de *Pinus taeda* (Patzlaff *et al.*, 2003a). Ce MYB peut lier à et activer la transcription des mêmes éléments AC qui ont été impliqués dans l'expression xylème-localisée des gènes codant les enzymes biosynthétiques de lignine. La surexpression de *PtMYB4* dans le tabac transgénique a eu comme conséquence une augmentation de l'abondance de transcription de plusieurs gènes codant les enzymes biosynthétiques de lignine. En accord avec cette conclusion, la surexpression de *PtMYB4* a également provoqué la lignification ectopique étendue dans le tabac transgénique. Les cellules qui n'ont pas lignifiées normalement, y compris les cellules de phloème et le parenchyme de moelle, montrés la lignification étendue dans les plantes qui surexprimées *PtMYB4*. Également, Newman *et al.*, (2004) ont prouvé que la surexpression de *PtMyb4* chez plantes d'*Arabidopsis* transgéniques provoque un phénotype ressemble le mutant *det3*, y compris une déposition ectopique de lignine et une réponse foncée-photomorphogénique. Ils ont suggéré qu'un Myb d'*Arabidopsis* pourrait être impliqué en produisant au moins de quelques aspects du phénotype du mutant *det3*. Conformés à cette hypothèse, ils ont prouvé que R2R3-Myb, *AtMyb61* d'*Arabidopsis*, est suffisant et nécessaire pour expliquer des aspects du phénotype *det3*. Ces études étaient les premières pour prouver qu'un membre de famille de R2R3-MYB normalement exprimé en cellules lignifiées était suffisant pour provoquer la lignification, sans des effets évidents sur l'accumulation d'autres classes des phénylpropanoïdes.

G. Etude des profils d'expression transcriptionnelle des gènes par la technique des puces à ADN (microarray)

Le génome, ensemble du patrimoine génétique d'un individu, a été longtemps considéré comme un ensemble statique d'informations : la séquence d'ADN de ses chromosomes. La dynamique cellulaire est le reflet de l'expression concertée du génome. Le transcriptome, ensemble des transcrits d'une cellule, constitue un ensemble sans cesse en adaptation, résultant des réactions permanentes de la cellule aux informations qu'elle perçoit. Avoir accès aux modulations de l'expression du génome en fonction de la physiologie cellulaire ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du fonctionnement de la cellule. De récentes approches ont rendu possible l'étude simultanée de l'expression d'un grand nombre de gènes. Le regroupement de ces gènes par profils d'expression similaires permet alors la caractérisation de réseaux de gènes co-régulés (Ruan *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002a). Les approches de l'analyse du transcriptome dites « à grande échelle » mettent en œuvre différentes techniques. Les programmes de séquençage d'EST, d'étiquettes SAGE et la technique MPSS sont basés sur le recensement des transcrits via leur étiquetage. D'autres approches exploitent les variations de taille de fragments d'ADN pour distinguer les différents transcrits, par exemple la technique de ADNc-AFLP. Enfin, les « puces à ADN » ou encore *microarrays*, utilisent l'hybridation de sondes nucléiques marquées à des transcrits, en général partiels, immobilisés sur un support solide.

G.1 La notion d'expression génique

Les noyaux de cellules vivantes possèdent un génome, composé d'acides nucléiques. L'ensemble des acides nucléiques sont nécessaires pour fabriquer les gènes, chaque gène occupe une place, ou locus, sur le chromosome. Le matériel génétique est l'acide désoxyribonucléique, ou ADN, molécule du chromosome. Chaque gène est un segment de la molécule d'ADN du chromosome.

Les produits directs d'un gène sont des molécules d'ARN. En effet, lorsqu'un gène est actif, i.e. lorsqu'il s'exprime, il est recopié en un brin d'ARN messenger ou ARNm par un processus appelé transcription. Un ARNm est responsable de la synthèse d'une protéine, ou "traduction", qui est effectuée par une structure appelée ribosome. La relation entre la séquence des nucléotides d'un gène et la séquence des acides aminés dans la protéine correspondante est donnée par le code génétique.

Chez les organismes eucaryotes, une séquence de nucléotides codant pour une protéine peut être interrompue par des séquences non codantes, appelées introns. Pendant la transcription, les introns sont reproduits le long de l'ARN avec les séquences codantes,

produisant une molécule d'ARN géante, appelée ARN pré-messager. Les séquences correspondant aux introns sont ensuite extraites de l'ARN par un processus appelé excision-épissage. L'ARN pré-messager subit aussi deux autres modifications : (1) à l'une de ses extrémités (dite 5'), l'ARN reçoit une "coiffe". (2) à l'autre extrémité (dite 3'), sa séquence de nucléotides est allongée par une série de A appelée "queue polyA" (polyadénylation). Cet ajout protégerait l'ARN messager d'une dégradation trop rapide pendant la traduction. Ainsi, chez les eucaryotes, les ARN pré-messagers subissent une maturation avant de diriger la synthèse des protéines.

G.2 Les techniques d'étude des profils de l'expression transcriptionnelle

G.2.1 L'étiquetage des transcrits

G.2.1.1 Les ESTs : étiquettes de gènes exprimés

L'analyse de profil d'expression du génome a pris la forme de programmes de séquençage de transcrits à grande mesure. Des profils de transcrits ont été constitués à partir d'ARNm des matériels biologiques différents et de conditions physiologiques variés. Dans ces programmes, les extrémités de clones d'ADNc se sont attachés afin d'étiqueter un maximum de transcrits. Les séquences obtenues, appelées EST, sont de courtes séquences de 300 à 500 nucléotides. La qualité des analyses de l'expression du génome à partir des EST est directement liée au nombre de séquences (Audic et Claverie, 1997). La qualité de ces séquences est relativement mauvaise, car une EST peut comporter jusqu'à 5 % d'erreurs et d'incertitudes. Cette approche a été largement utilisée lors de l'analyse de différents génomes comme celui de l'Homme (Adams *et al.*, 1995; Ewing et Green, 2000) et de la drosophile (Stapleton *et al.*, 2002a; Stapleton *et al.*, 2002b). Chez les plantes, cette moyenne a permis de caractériser des milliers de gènes chez le Riz (De Los Reyes *et al.*, 2003), chez le tomate (Lemaire *et al.*, 2005) et *Arabidopsis* (Cooke *et al.*, 1996; Asamizu *et al.*, 2000), et d'autres espèces cultivées.

Cette approche a été utilisée pour identifier plusieurs familles des gènes impliquées dans la biosynthèse des lignines (Raes *et al.*, 2003). 11 catégories ont établis de 160.776 EST d'*A. thaliana* selon leur origine, comprenant différents organes et différents conditions. Raes *et al.*, a identifié 34 gènes dans cette étude, puis leur abondance relative dans les différentes catégories a été établie. L'abondance relative des EST a fourni des informations similaires aux données de RT-PCR semi-quantitative pour ces 34 gènes, même si des incohérences et des contradictions peuvent être relevées (Raes *et al.*, 2003).

L'utilisation de nouvelles méthodes de sélection des ARNm entiers par exemple, la coiffe des ARNm comme point d'ancrage au lieu de la queue poly-A, a permis d'améliorer et de compléter les approches EST par des programmes de séquençage de transcrits pleine longueur (Seki *et al.*, 2002a; Seki *et al.*, 2002b; Wu *et al.*, 2002).

G.2.1.2 Les étiquettes SAGE

Cette technique consiste également en l'étiquetage des transcrits mais avec des séquences plus courtes, des étiquettes d'une dizaine de à partir de l'extrémité 3' des ARNm. Leur séquençage après concaténation permet de déterminer leur abondance relative (Wang et Rowley, 1998; Velculescu *et al.*, 2000). Cette technique a été utilisée chez les plantes pour rechercher les profils d'expression dans différents organes et différentes conditions physiologiques. Chez *A. thaliana*, la SAGE a été utilisée pour étudier la modulation de l'expression des gènes en réponse au stress au froid (Jung *et al.*, 2003; Lee et Lee, 2003). Et cette méthode a permis de caractériser des gènes impliqués dans la formation du bois chez le pin *Pinus taeda* (Lorenz & Dean, 2002).

G.2.1.3 L'approche MPSS

Le MPSS s'agit en effet de dénombrer des étiquettes de 17 nucléotides obtenues après digestion enzymatique de l'extrémité 3' des ARNm. Les étiquettes sont fixées à des billes immobilisées sur une surface solide, chaque bille portant les mêmes étiquettes. Elles sont ensuite séquencées en parallèle via un système à quatre fluorochromes. À chaque cycle de séquençage, les billes sont marquées du fluorochrome correspondant au nucléotide séquencé. La fluorescence des billes est enregistrée à chaque cycle en quatre couleurs, générant une image proche de celles des puces à ADN. L'analyse des images successives permet de déterminer en parallèle la séquence des étiquettes fixées à chaque bille (Brenner *et al.*, 2000). Cette méthode est plus performante pour les gènes fortement exprimés. Pour étudier les gènes de faible expression, il faut augmenter la taille des banques et le nombre de séquences réalisées.

G.2.2 La technique ADNc-AFLP

L'ADNc-AFLP permet de caractériser le profil d'expression transcriptionnelle de génome. Son principe repose sur l'implification sélective de fragments d'ADN par PCR. Elle est utilisée pour identifier l'espèce. L'analyse de l'intensité des bandes dans les gels permet de quantifier l'expression. Chaque bande est identifiée d'abord par sa taille puis par séquençage ultérieur. Une revue compare la technique de ADNc-AFLP aux *microarrays* et

leur pertinence respective pour établir le profil d'expression de l'ensemble des gènes d'*A. thaliana* (Donson *et al.*, 2002).

G.2.3 Réseau d'ADN (Puces à ADN)

Les réseaux d'ADN (puces à ADN) constituent à déposer individuellement, ou à synthétiser *in situ*, un grand nombre de molécules d'ADN sur une toute petite surface (<1 cm²), et puis hybrider ces sondes d'ADN pour étudier l'expression des gènes. Comme il s'agit d'une miniaturisation, il n'est pas possible sur quelques mm² de déposer de grandes molécules d'ADN. Or, il est possible de réaliser des *microarrays* correspondant à l'ensemble des gènes d'un génome (Lashkari *et al.*, 1997). Cette technique a été appliquée sur génomes modèles comme ceux d'*Escherichia coli*, *S. cerevisiae*, *Mus musculus*, et *A. thaliana*. Il existe des types différents de puces à ADN. Elles diffèrent par la nature des séquences immobilisées : il s'agit soit de fragments d'ADN de plusieurs centaines de bases (ADNc ou produits PCR), soit d'oligonucléotides, et par la façon de les fixer à la puce : par synthèse *in situ* (oligonucléotides courts) ou par dépôt (ADNc, ou produits PCR et longs oligonucléotides).

G.2.3.1 Les puces d'ADNc

Le concept de biopuce (= puce à ADN) est né dans les années 1990. Les puces à ADN - aussi appelées biopuces, microréseaux, *microarrays*, chips ou biochips- sont désormais les plus souvent adoptées pour les études de transcriptome (Hilson *et al.*, 2004). Elles sont bien utilisées pour étudier l'expression des gènes d'un génome connu comme l'*Arabidopsis* ou le riz. Le principe de la puce à ADN est basé sur la technique d'hybridation. Le séquençage du génome entier d'*A. thaliana* est exploité pour faciliter l'annotation des autres génomes végétaux.

Le projet de recherche européen¹, (coordinateur P. Hilson, VIB, Gent), prépare une lame CATMA contenant 24577 spots par lame. Cette lame constituée des sondes d'ADN de taille 150 à 600 pb pour être les plus spécifiques possibles, amplifiés par PCR appelés GST représentant 24577 gènes² d'*A. thaliana* (Crowe *et al.*, 2003 ; Hilson *et al.*, 2004). Ces GST s'agissent le plus souvent des régions 3' UTR ou 5' UTR, les régions les plus divergentes de chaque gène (Thareau *et al.*, 2003). La puce CATMA permet de mesurer l'expression des gènes avec une meilleure spécificité par limiter au maximum les hybridations croisées des transcrits d'une même famille entre les séquences des différents paralogues fixées à la puce. Actuellement en France, au moins neuf projets de recherche utilisent cette technique³ (revoir les sites internet 1,2,3).

1 <http://www.catma.org/>

2 <http://www.forumlabo.com/2006/abstracts/2004/24mars/biopuces5/catma.htm>

3 http://www.evry.inra.fr/public/projects/transcriptome/collaborations_genoplante.html

Les puces d'ADNc sont partielles, la moitié du transcriptome (14.500 gènes environ) est représentée (Cartieaux *et al.*, 2003; Sawbridge *et al.*, 2003). Par exemple, le nombre de gènes est environ 7000 à 8000 pour les puces dédiées à *A. thaliana*, mais par contre 2000 à 3000 gènes pour les puces dédiées aux autres espèces végétales.

G.2.3.2 Les puces d'oligonucléotides

La puce basée sur des oligonucléotides synthétisés *in situ* (technologie Affymetrix par exemple). Dans ce cas, la construction des sondes se fait par dépôt de couches successives des quatre bases de l'ADN sur un support en verre. C'est un **masque** lithographique, dont la configuration varie à chaque dépôt d'une couche, qui permet aux bases de s'empiler correctement. Avec ce procédé, les sondes comportent au maximum 30 bases. Ce procédé permet de fabriquer indifféremment telle ou telle sorte de biopuce. L'adjonction successive de bases à la sonde s'effectue par adressage photochimique.

Deux modèles de puces des oligonucléotides ont été utilisé pour étudier l'expression du génome d'*A. thaliana*. La puce ATH1 contient 22500 jeux d'oligonucléotides correspondant à environ 24000 gènes (Wang *et al.*, 2003) et la puce AG1 est composée d'oligonucléotides de 25-mers représentant environ de 8300 gènes d'*A. thaliana* (Zhu *et al.*, 2001).

Plusieurs études basées sur ces puces à oligonucléotides chez *A. thaliana* ont été publiées pour étudier la modification du transcriptome en réponse aux stress biotiques (Puthoff *et al.*, 2003; Whitham *et al.*, 2003) ou abiotiques (Lechelt-Kunze *et al.*, 2003; Ulm *et al.*, 2004).

G.2.3.3 Les puces représentant le génome entier

L'énorme progrès réalisé dans la bio-puces à ADN (DNA microarray) et le séquençage de génome permet aujourd'hui de mesurer le niveau d'expression à l'échelle d'un génome entier. L'analyse de l'ensemble du génome permet une meilleure analyse du transcriptome que dans le cas des puces partielles. Cette analyse de ces données est précieuse pour la connaissance fondamentale de la vie au niveau moléculaire depuis la régulation de l'expression des gènes et leurs fonctions aux mécanismes cellulaires. Les puces apportent une vision d'ensemble de la régulation du transcriptome en réponse à divers stimuli ou en fonction

de différentes conditions physiologiques. C'est un outil intéressant pour caractériser des groupes de gènes co-régulé et ainsi identifier des éléments *cis*-régulateurs spécifiques présents dans les promoteurs de gènes de ces groupes (Pufky *et al.*, 2003 ; Overvoordea *et al.*, 2005 ; Thilmony *et al.*, 2006).

H. Objectifs du travail

La xylogénèse est un processus développement fondamental qui est spécifique des plantes vasculaires. Elle permet la formation du xylème, également appelée le bois dans les arbres, un tissu complexe de tridimensionnel composé de différents types de cellules. Ce processus se produit par le contrôle des mécanismes cellulaires fondamentaux comme la division et la différenciation cellulaire, la synthèse de paroi cellulaire secondaire, la déposition de lignine et la mort cellulaire programmée.

La xylogénèse est contrôlée spacieusement et temporellement par des programmes génétiques spécifiques qui impliquent des centaines de gènes. Par exemple, des gènes biosynthétiques de lignine, *CCR* et *CAD*, sont spécifiquement exprimés pendant la xylogénèse par des sites de liaison de facteur de transcription Myb, un processus qui semble être commun à toutes les plantes vasculaires. Cependant, les mécanismes par lesquels les facteurs de transcription Myb règlent la formation en bois sont encore mal compris.

L'objectif de ce travail d'une part, est d'étudier des facteurs de transcription impliqués dans la formation et la lignification des parois cellulaires secondaires. Deux facteurs Mybs, *EgMyb1* et *EgMyb2*, ont été isolés et caractérisés dans le xylème d'*Eucalyptus gunnii*. Sa localisation dans des tissus lignifiés a incité l'intérêt pour son rôle dans la formation et la lignification des parois secondaires. Intéressant, ils peuvent lier des séquences correspondant au motif de liaison consensus Myb des promoteurs *CCR* et *CAD in vitro* et moduler l'expression de *CCR* et *CAD in vivo*. Afin de déchiffrer *in planta*, le rôle des deux facteurs Myb d'Eucalyptus, des plantes du tabac et d'*Arabidopsis* ont été transformés avec des constructions permettant la sur-expression ou la sous-régulation de chacun des deux *Mybs*. Pour la sous-régulation, des constructions de mutants dominant négatives ont été produites, c.-à-d. seulement les domaines de liaison à l'ADN ont été placés sous contrôle d'un promoteur constitutif.

D'autre part, afin de suivre des changements d'expression des gènes d'*Arabidopsis* aux plantes transgéniques surexprimés *EgMyb1* et *EgMyb2* devrait nous aider à découvrir que les gènes pourraient être cible de ces facteurs de transcription. Ceci devrait nous aider à

déchiffrer le rôle réel de ces deux Myb dans la xylogénèse, deux nouveaux membres d'une superfamille de facteurs de transcription dans les plantes.

**MATERIEL
ET METHODES**

A. Matériel végétal

A.1 Les plantes

Les plantes des écotypes WS et Col-O d'*A. thaliana* L. (Heynh), ont été utilisées au cours de ce travail.

A.2 Description des conditions de culture utilisée

A.2.1 Pour créer des lignées transgéniques

Les graines d'*A. thaliana* L. (Heynh) (*Brassicaceae*) des sauvages WS et Col-0 sont semés directement en pot de terreau 10x10cm² à raison de 5 plantes par pot et placées en chambres de culture, en conditions contrôlées, soit en jours courts (9H/15H, 20-22°C, humidité 70%), Au bout de 30 jours, les jeunes plantes sont transférées en conditions de jours longues soit (16 heures d'éclairement, températures jour/nuit : 22°C/20°C, humidité 70%). jusqu'à la transformation. Après la transformation, les plantes sont mises en serre jusqu'à la maturation.

Les graines transgéniques sont mises à germer après stérilisation de surface sur milieu sélectif MS (Tableau. 6, Murashige *et al.*, 1962) gelosé à 0,8 g.ml⁻¹. Les boîtes de Petri sont placées en chambre de culture *in vitro* sous les conditions décrites dans tableau 7, puis vers 10 jours plus tard, les jeunes plantes transgéniques sont repiquées en pots de Jiffy® (Jiffy, Lyon, France) et placées en chambres de culture contrôlées.

A.2.2 Pour obtenir une paroi secondaire

Arabidopsis thaliana (écotype WS) a été développé en serre dans des conditions de jour-court (8h nuit/16 h d'éclairement) à 23°C pendant 7 semaines. Pour induire la hampe florale de croissance, les plantes ont été décalées de jour-court aux conditions de jour-long (16h d'éclairement /8h de nuit) pendant 10 jours selon la conception expérimentale comme décrit en Ko *et al.*, (2004). Après le traitement de jour-long, les plantes ont été déplacées de nouveau aux conditions de jour-court jusqu'au 5 à 10 jours.

A.3 Souches bactériennes

A.3.1 *Escherichia coli*

Tableau 6 : Milieux de culture d'*Arabidopsis* et la composition du milieu Murashige et skoog (MS) (Sigma # M6899)

Milieu MS solide	0.43% g/l MS (4.3 g/l)	4.3 g/l
	Vitamines B5	1 ml/l
	Fer EDTA (0.4%) :	10ml
	pH 5.7 à 5.8	
	Saccharose	30 g
	0.8% agar	8 g/l
	+/- Kanamycine	50 µg. ml ⁻¹
Macroéléments MS :	Nitrate d'ammonium	16.5 g
	Nitrate de potassium	19 g
	Chlorure de calcium (2H ₂ O)	4.4 g
	Sulfate de magnésium (5H ₂ O)	3.7 g
	Phosphate de potassium	1.7 g
Oligoéléments MS :	Acide borique	620mg
	Sulfate de manganèse (H ₂ O)	1690mg
	Sulfate de Zinc (7H ₂ O)	1060mg
	Iodure de potassium	83mg
	Sulfate de cuivre (5H ₂ O)	2.5mg
	Chlorure de cobalt (6H ₂ O)	2.5mg
	Molybdate de sodium (2H ₂ O)	25mg
Vitamines B5 (x100):	Thaimine	10 mg/l
	Pyridoxine	50 mg/l
	Acide nicotinique	50 mg/l
	Inositol	20 mg/l

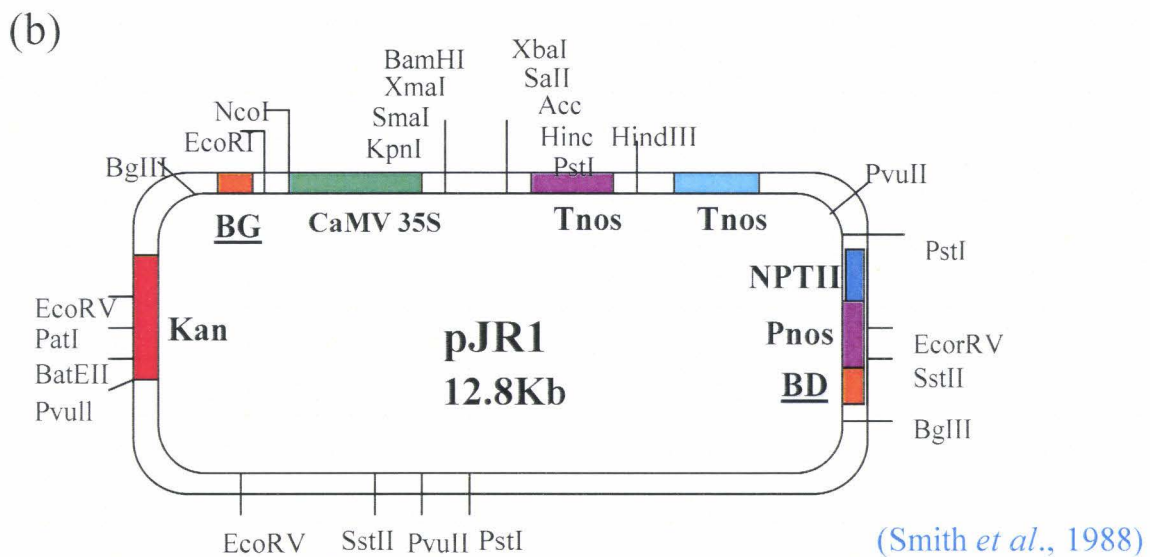
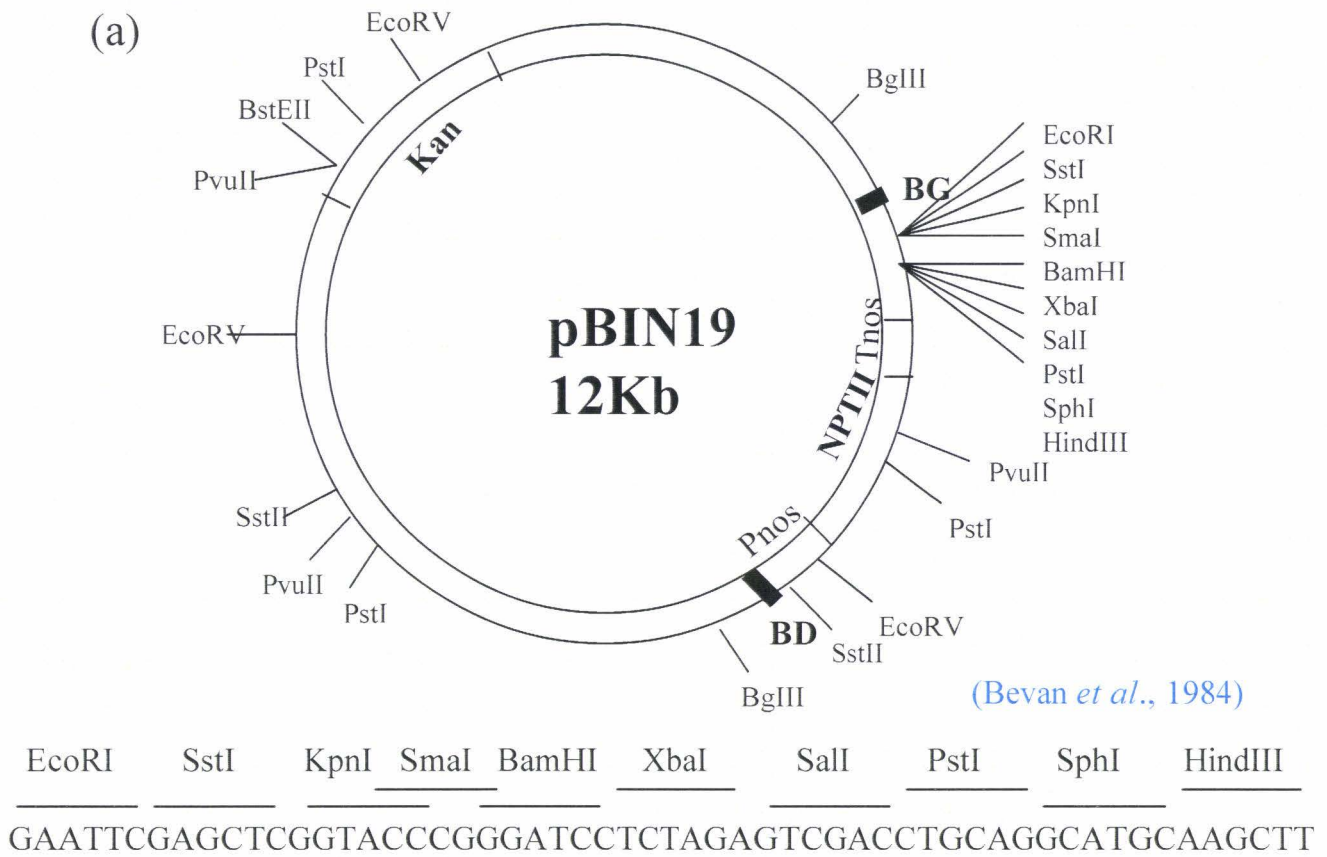


Figure 21 : (a) Vecteurs binaires pBIN19 et son site de clonage

(b) Vecteur binaire pJR1 et son site de clonage

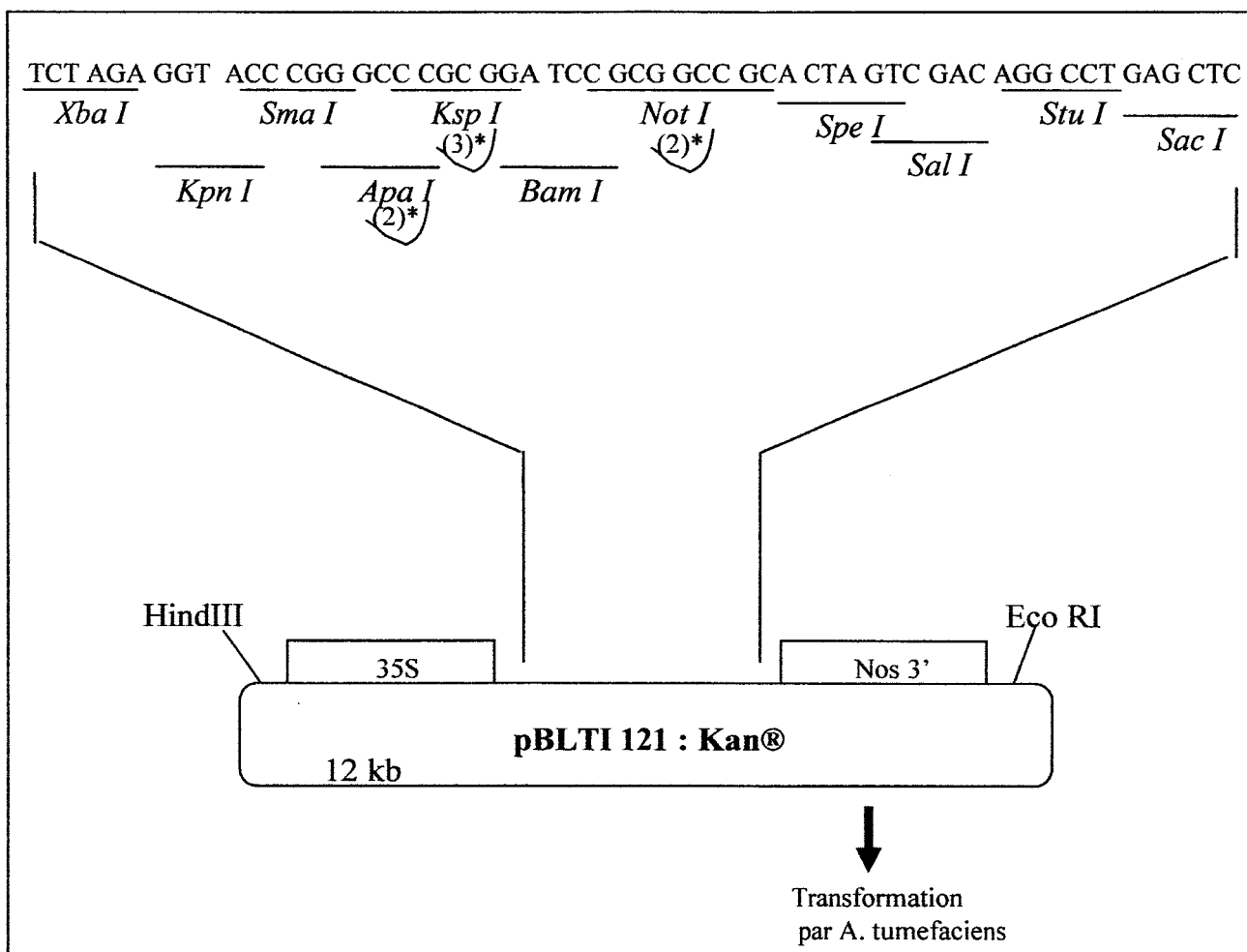
35S : promoteur 35S du CaMV

Tnos : terminateur du gène Nopaline synthèse d'Agrobacterium tumefaciens

NPTII : néomycine phosphotransférase II

BG : bord gauche de l'ADN-T

BD : bord droit de l'ADN-T



Les sites *ApaI*, *KspI* et *NotI* ne peuvent pas être utilisés dans le vecteur pBLTI221

•Nombre de site de coupure dans pBLTI 121

(Gomord et Kiefer-Meyer, 1996)

Figure 21c : Vecteur binaire pBLTI121 et son site de clonage

La souche *E.coli* DH5- α (Hanahan, 1983) a été utilisée pour amplifier les différents plasmides utilisés dans ce travail. Les différents clones ont été cultivés à 37°C sur milieu LB liquide (composition) ou solide (LB plus Agar 10 g/L) contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection (Ampicilline ou Kanamycine à 50 μ g/mL; Tableau 8).

A.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens est une agrobactérie Gram négatif vivant dans le sol et dont le type sauvage provoque des tumeurs au niveau des tissus végétaux par transfert d'oncogènes portés sur leur plasmide Ti (Tumor inducing).

La souche *Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation d'*Arabidopsis* est la souche GV3101 (Koncz et Scell., 1986). Elle est cultivée à 30° C sur milieu LB solide supplémenté par de la rifampycine à 50 μ g/mL.

A.3.3 Conservation des souches

Toutes les souches bactériennes sont conservées à -80 °C. A une culture liquide en phase exponentielle de croissance (absorbance à 600 nm comprise entre 1,0 et 2,0) en présence des antibiotiques de sélection, on ajoute du glycérol (concentration finale 15 % v/v). Après homogénéisation, les cultures sont congelées à - 80 °C.

A.4 Constructions plasmidiques utilisées pour la transformation d'*Arabidopsis*

Les vecteurs binaires utilisés pour la transformation d'*Arabidopsis* dérivent du vecteur binaire pBIN19 (Bevan, 1984). Il s'agit de pBIN19, pJR1 (Smith *et al.*, 1988) et pBLTI121 (Fig. 21; Gomord *et al.*, 1996). Ce vecteur (pBIN19) porte le gène II de la néomycine phosphotransférase (*nptII*), sous le contrôle de promoteur du gène de la nopaline synthase, qui confère la résistance à la kanamycine chez les eukaryotes. Cette propriété permet la sélection de plantes ayant intégré ce vecteur ou ses dérivés. Donc ces vecteurs possèdent une partie permettant leur sélection et leur propagation dans *E. coli* ou *Agrobacterium*, ainsi qu'une partie ADN-T limitée par les bords droit et gauche qui sera transférée dans le génome de la plante. Les différentes constructions réalisées, antérieurement à mon arrivée, avec les gènes *EgMYB1*, 2 et 4 ont été fabriquées puis insérées dans les vecteurs binaires pBIN19

Tableau 7 : conditions de culture *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana*

	Photopériode	Température	humidité
Jour	16H	22°C	70%
Nuit	8H	20°C	70%

Tableau 8 : Concentration des antibiotiques utilisés pour la sélection des bactéries et des transformants.

Antibiotique	Concentration usuelle pour la sélection chez <i>E. coli</i>	Concentration usuelle pour la sélection chez <i>A. tumefaciens</i> ou <i>Arabidopsis</i>
Kanamycine (Km)	50 µg. ml ⁻¹	50 µg. ml ⁻¹
Rifampicine (Rif)	50 µg. ml ⁻¹	

Tableau 9 : la composition pour réaliser la réaction de PCR

Composition	Concentration finale
ADN matrice	25 ng (plasmidique) à 100 ng (génomique)
Tampon PCR	1X (plasmique) à 10 X (5 µl) (génomique)
Désoxyribonucléotides phosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	200 µM de chaque
Amorces A et B	1 µM de chaque
Taq polymérase 10X (Invitrogen)	1-2 unités

(pBINMYB2⁺, pBINCCR-GUS), pJR1 (pJRMYP1⁺, pJRMYP1⁻, pJRMYP2⁺, pJRMYP4⁻) ou pBLTI121 (pBLTMYB4⁺).

B. Méthodes

B.1 Méthodes relatives à la transformation

B.1.1 Transformation des bactéries

B.1.1.1 Préparation des bactéries *E. coli* compétentes

Cinq cents µl d'une préculture des bactéries d'*E. coli* (DH5α) incubée toute la nuit à 37°C dans 5 ml de milieu LB sont ajoutés dans 100 ml de milieu LB et placés à 37°C sous agitation 200 rpm pendant environ 2h, jusqu'à ce que la DO à 600 nm soit située autour de 0.25.

Les 100 ml de culture sont ensuite versés dans 2 tubes coniques de 50 ml et refroidis pendant 10 min dans la glace. Après 10 min de centrifugation à 4000 rpm, à 4°C, le surnageant est éliminé et les culots sont repris délicatement dans 10 ml de 0.1 M CaCl₂ froid. Les bactéries sont placées dans la glace pendant 20 min puis centrifugées 10 min, à 4000 rpm, à 4°C. Chaque culot est repris par 2 ml de 0.1 M CaCl₂ (4 ml au total). La compétence augmente au cours du temps pendant les premières 24h puis diminue assez rapidement).

B.1.1.2 Transformation des bactéries CaCl₂ compétentes par choc thermique

Les bactéries compétentes (200 µl) et le plasmide (25 µl) sont placés dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, sont mélangés doucement et sont placés dans la glace pendant 20 min. Le tout est ensuite mis à incuber 1.5 min à 42°C puis replacé immédiatement dans la glace (5 min au moins), d'où le terme de choc thermique. 800 µl de milieu LB sont alors ajoutés, puis les bactéries sont mises à incuber sous une agitation de 250 rpm à 37°C pendant 1h. 200 µl de cette culture sont alors étalées sur une boîte de Petri contenant du milieu LB (+Agar 15 g/l) complémentées d'un antibiotique adéquat. Seules les bactéries ayant intégré la construction, et par conséquent le gène de résistance, pourront se développer.

B.1.1.3 Sélection des clones transformés (Extraction d'ADN plasmidique)

B.1.1.3.1 Minipréparation d'ADN : lyse alcaline (Birboim et Doly, 1979)

On utilise cette méthode pour vérifier rapidement la présence du plasmide contenant l'insert dans les bactéries transformées. Le principe est le suivant : l'ADN chromosomique et plasmidique libéré par les bactéries lors de la lyse est tout d'abord dénaturé par un traitement alcalin, puis rapidement renaturé en ajoutant de l'acide. L'ADN chromosomique ne se renature pas de façon ordonnée et se retrouve sous une forme insoluble alors que l'ADN plasmidique se renature correctement et reste soluble.

Une colonie bactérienne estensemencée dans 5 ml de milieu LB liquide contenant l'antibiotique adéquat et cultivé sous une agitation de 250 rpm à 37°C pendant 1 nuit. L'extraction est réalisée sur 3 ml de culture centrifugée 5 min à 12000 rpm dans un tube Eppendorf. Le culot est repris par 100 µl de milieu (25 mM Tris/HCl pH 8, 10mM EDTA) auxquels on ajoute 200 µl de solution 0.2N NaOH, 1% SDS. Après avoir agité au vortex, on laisse la lyse se réaliser pendant 5 min dans la glace. Les débris bactériens et l'ADN chromosomique sont précipités 10 min dans la glace par ajout de 150 µl de solution 3 M acétate de sodium pH 5.2. Après 5 min de centrifugation à 12000 rpm, le surnageant est transféré dans un tube propre pour subir une extraction phénol/chloroforme (1V/1V). L'ADN plasmidique est précipité 30 min à -20°C par 2.5 volumes d'éthanol en présence de 1/10V de 3M acétate de sodium pH 5.2. Après 10 min de centrifugation à 12000 rpm, le culot est lavé par 200 µl d'éthanol 70% et séché 2 min au dessiccateur sous vide et repris dans 50 µl d'eau pure. Après quantification spectrophotométrique cet ADN plasmidique est digéré par des enzymes de restriction et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans le tampon TAE (annexe 1).

B.1.1.3.2 Vérification par digestion enzymatique

L'ADN plasmidique est digéré par des enzymes de restriction suivant les recommandations du fournisseur, *Promega*. Les digestions ont généralement lieu, pendant 2 heures à 37°C, en présence 2 unités/ 1 µg d'ADN et de 0.1 mg/ml (concentration finale).

B.1.1.4 Transformation d'*A. tumefasciens* par congélation/décongélation

Une préculture d'*A. tumefasciens* GV3101 est réalisée dans 5 mL de milieu LB + Rif 50 µg/mL à 28°C, 200 rpm, pendant 24 H. Lorsque la DO à 600nm est comprise entre 0,5 et 1, les cellules sont centrifugées 6 min à 3000 rpm à 4°C. Le culot bactérien est alors repris avec

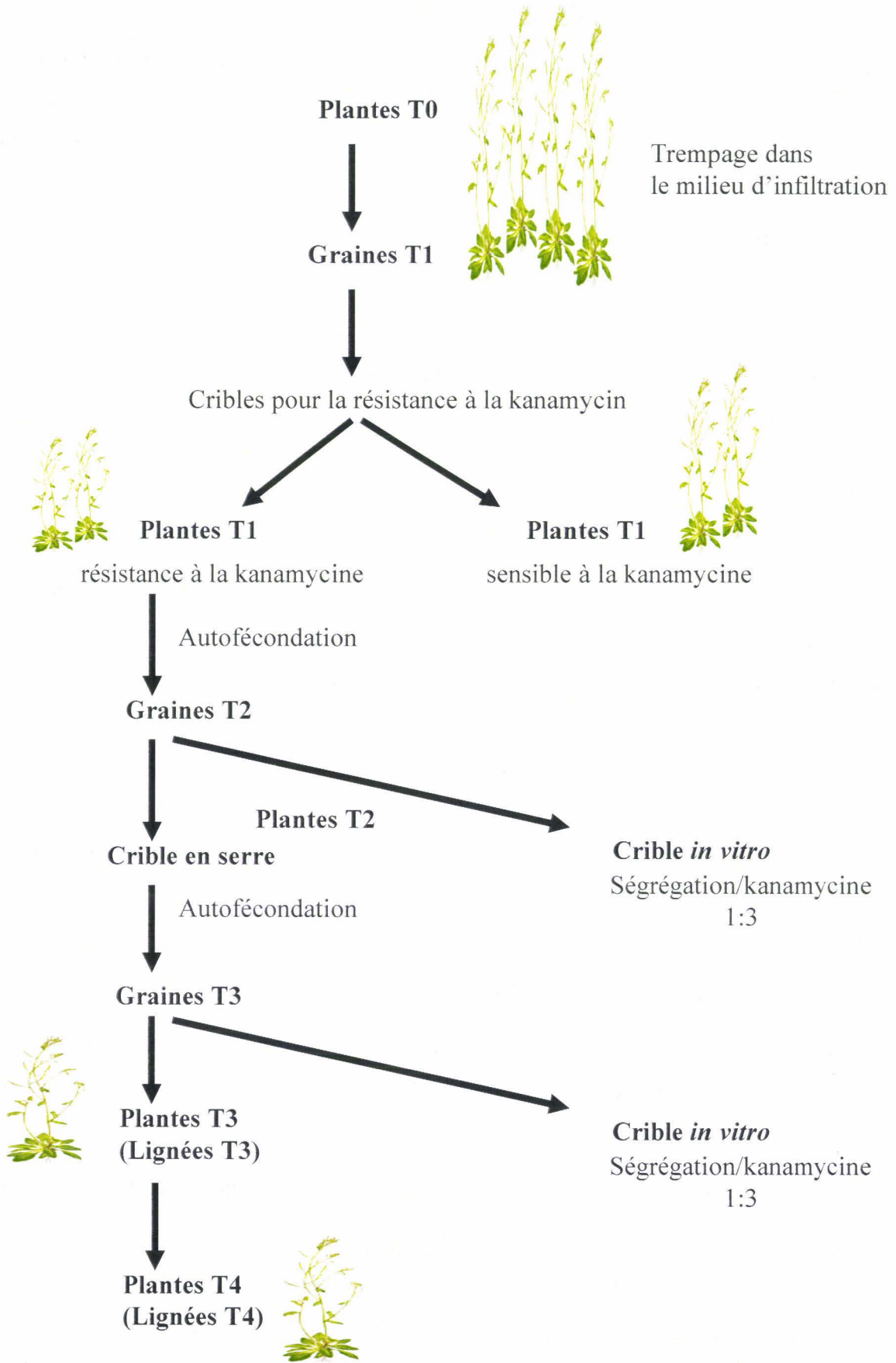


Figure 22 : Schéma représentant les différentes générations d'*Arabidopsis thaliana* transformées par des gènes Myb d'*Eucalyptus*.

300 μ L de CaCl₂ 20 mM froid. La suspension cellulaire est distribuée par volume de 100 μ L dans des tubes Eppendorf pré-refroidis. La transformation commence en ajoutant 2 μ g de plasmide aux 100 μ L de cellules et en plongeant le tube contenant le mélange cellules-ADN dans de l'azote liquide. L'ensemble est alors décongelé pendant 4 min à 37°C. Les cellules sont ensuite reprises avec 1 mL de LB préchauffé à 28°C et cultivées sous agitation (100 rpm) pendant 4 H à 28°C. Après une centrifugation de 30 sec, les cellules sont resuspendues dans 200 μ L de LB et étalées sur LB + Kan 50 μ g/mL. Les clones transformés sont visibles après 48 H à 28°C.

B.1.2 Transformation génétique d'*A. thaliana*

Les plantes T0 (Fig. 22) sont mises à pousser en jours courts jusqu'à obtenir une rosette d'une dizaine de feuilles puis sont transférées en jours longs pour provoquer la floraison. Lorsqu'elles ont formé une hampe florale avec 1 à 2 siliques, une préculture d'*Agrobacterium* portant le vecteur binaire utilisé pour la transformation est démarrée dans 10 mL de milieu LB + rifampycine 50 μ g/mL + Kanamycine 50 μ g/mL, et est incubée 16H à 28° C avec agitation (250 rpm). 200 mL de LB + Kan 50 μ g/mL sont ensuite inoculés avec 2 mL de la préculture et incubés dans les mêmes conditions jusqu'à obtenir une DO600nm de 4. Les cellules sont alors centrifugées 20 min à 5000 rpm. Le culot de bactéries est repris dans 0.5 à 1 litre de milieu d'infiltration (5.0 % Saccharose, 0.05% Silwet L-77) (Clough & Bent, 1998) pour obtenir une DO600nm de 1. Les plantes sont trempées dans la solution d'infiltration pendant 2 min avec une légère agitation. Les plantes infiltrées sont confinées dans une mini-serre pendant 24 H puis ramenées en chambre de culture jours longs jusqu'à la récolte des graines T1.

B.1.3 Stérilisation des graines et sélection des plantes transformées

La culture *in vitro* d'*Arabidopsis*, qui peut être associée à la sélection de plantes transformées et devenues résistantes à la kanamycine, commence par la stérilisation des graines. Environ 100 μ L de graines sont rassemblés dans un tube Eppendorf et mis en suspension dans 1 mL de solution fongicide (Benlate :2.5 g/L). Après 2 rinçages à l'eau UHQ stérile, elles sont remises en suspension pendant 2 min avec de l'éthanol 70%, puis 10 min dans de l'eau de javel 12°. Après 3 rinçages à l'eau UHQ stérile, les graines sont semées sur milieu MS solide (Tableau 6) en présence de Kanamycine 50 mg/L. Après un traitement au froid à 4° pendant 48 H pour favoriser et synchroniser la germination, les boîtes de Petri sont

transférées en chambre de culture de jours longs. Au bout de 15 jours environ, les plantules qui sont résistantes à l'antibiotique sont repiquées sur terreau et cultivées en chambre de culture jours longs.

B.2 Méthodes de biologie moléculaire

B.2.1 Extraction d'acides nucléiques

B.2.1.1 Extraction d'ADN génomique végétal :

La méthode ci-utilisée est adaptée de protocole utilisé par Klimyuk *et al.* (1993) comme décrit en paragraphe II.2.4.2.

La concentration pure en acides nucléiques est estimée par dosage au spectrophotométrique (Eppendorf Biophotometre). La lecture d'absorbance se fait à 260 nm, où une densité optique (DO_{260}) égale à 1 correspond à $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ADN. Pour évaluer la qualité de l'ADN, on effectue également des lectures d'absorbance à 230 et 280 nm, longueurs d'ondes auxquelles les sucres et les protéines ont respectivement leur maximum d'absorption, ces mesures permettant de calculer les rapports DO_{260}/DO_{230} nm d'une part et DO_{260}/DO_{280} nm d'autre part, rapports devant s'approcher de 2 en l'absence de contamination par des composés phénoliques pour le premier et de protéines pour le second. La concentration pure des ADNs est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Concentration ADN} = 50 \times A_{260} \times 500$$

$$A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}, \quad 500 : \text{la dilution}$$

B.2.1.2 Extraction ARNs totaux:

La technique d'extraction est dérivée de celle décrite par Kay *et al.*, (1987). L'extraction doit absolument être menée dans un environnement exempt de RNases car leur présence peut être la cause d'une dégradation des ARNs. L'activité de ces enzymes est inhibée par DEPC qui réagit avec les groupements histidine et tyrosine des nucléases. Toutes les solutions sont traitées pendant une nuit avec 0,1% de DEPC (v/v) sauf pour le Tris qui est préparé dans l'eau distillée déjà traitée. Le DEPC est ensuite éliminé par autoclavage. La verrerie est chauffée à l'étuve pendant une nuit à 200°C.

Le matériel végétal des lignées transgéniques Myb1+ et Myb2+ et des plantes sauvages WS et pJR1 (feuilles et hampes florales) sont prélevés et congelés immédiatement dans

l'azote liquide, puis ils sont stockés à -80°C . Environ 200 mg de tissus est broyé, dans un mortier dans l'azote liquide, en poudre, puis transvasé dans un tube Eppendorf 2ml, contenant 1ml de TRIZOL (Invitrogen - Cat. No. 15596-026, 200ml), après l'homogénéité, 0.2ml de chloroforme a été ajouté. Le mélange est agité vigoureusement 15 secondes puis centrifugé à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C . La phase aqueuse contenant les ARNs est transvasé dans un tube 2ml propre où ils sont précipités par l'addition de 0.6 volume d'isopropanol. Le mélange est laissé à température ambiante 5 à 10 min, ensuite centrifugé à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C . Les ARNs qui sont formés un précipité blanchâtre au fond de tube sont lavés une fois par 1 ml d'éthanol 75% en vortexant puis en centrifugeant à 7500 rpm pendant 5 minutes à 4°C . Une réprécipitation a été fait par dissoudre le culot par 500 μl de l'eau DEPC en ajoutant 1 ml EtOH 100% (2.5 vol) et 50 μl d'acétate de sodium (1/10 vol). Le tout est incubé 30 min à -20°C . Ensuite le mélange est centrifugé à 12000 rpm pendant 20 min à 4°C . Le culot est séché à l'air libre pendant 5 à 10 min. Le culot d'ARNs est résuspendu dans 50 à 100 μl d' H_2O -DEPC. Enfin, les ARNs sont conservés ainsi à -80°C jusqu'à leur utilisation. De même que pour l'ADN, le dosage des ARNs se fait par lecture de l'absorbance à 260 nm, où une densité optique (DO_{260}) égale à 1 correspond à 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ARN. La pureté de ces ARNs est réalisée par le calcul des mêmes rapports d'absorbance que pour l'ADN.

$$\text{Concentration ARN} = 40 \times A_{260} \times 500$$

$$A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}, \quad 500 : \text{la dilution}$$

B.2.2 Migrations électrophorétiques

B.2.2.1 Electrophorèse d'ADN

Les molécules d'ADN chargées négativement au niveau des groupements phosphates peuvent migrer dans un champ électrique et être séparées en fonction de leur taille dans un gel d'agarose. La concentration en agarose permet de séparer des fragments d'ADN de taille très variable, les grosses molécules étant davantage retenues dans les mailles du gel. On utilisera généralement une concentration de 1.0-1.5 % pour la migration d'ADN génomique digéré (contenant des fragments de petite et moyenne taille) et 1,5 % pour la visualisation de produits PCR.

Le gel d'électrophorèse (annexe 2) est préparé par dissolution de l'agarose dans 50 ml de tampon TAE (annexe 3) contenant du BEt (150 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). On ajoute aux échantillons

d'ADN 0,2 volumes de tampon de charge (annexe 4) et on procède aux dépôts dans les puits. Un marqueur de taille (annexe 5), contenant une gamme de fragments d'ADN de longueur connue, est également déposé. La migration a lieu dans le tampon TAE sous une tension de 100 V. Après migration, le gel est observé sous un rayonnement UV à 312 nm. La taille des bandes est déterminée par comparaison avec le marqueur de taille (annexe 5). L'intensité de la coloration des fragments à analyser est comparée à celle du marqueur de taille (annexe 5) et permet une estimation de la concentration en ADN des échantillons analysés.

B.2.2.2 Électrophorèse d'ARNs

Les ARNs totaux sont séparés selon leur taille dans un gel dénaturant d'agarose 1% contenant du tampon MOPS x1 (annexe 6). Les ARNs sont d'abord décongelés et 15 µg contenus dans 6 µl d'eau sont mélangés à 12 µl de formamide, 2 µl de tampon MOPS x10 et 4 µl de formaldéhyde avant d'être chauffés à 65°C pendant 15 min. Avant le dépôt dans les puits, 2 µl de tampon de charge (annexe 7) et 1 µg de BEt sont mélangés à l'échantillon. La migration a lieu à raison de 6V/cm et dure environ 3 heures. Le profil des ARNs est contrôlé par visualisation sur un banc UV à 312 nm. Ce profil est considéré comme bon si les ARNs ribosomiaux 25S et 18S sont clairement et distinctement visibles et qu'aucune dégradation n'est visible dans la partie inférieure du gel.

B.2.3 Amplification d'ADN par PCR

B.2.3.1 Amplification standard

La PCR est une technique permettant l'amplification exponentielle et spécifique *in vitro* d'une séquence d'intérêt à partir d'ADN en utilisant une polymérase et une paire d'amorces oligonucléotidiques (environ 20 pb) spécifiques de l'ADN à amplifier que l'on soumet à une série de cycles de températures dans un thermocycleur.

Un cycle de PCR comprend une étape de dénaturation (95°C) durant laquelle les brins complémentaires de l'ADN matrice vont se séparer, une étape d'hybridation (ou "annealing") des amorces sur chaque brin de la séquence à amplifier. La température d'hybridation (dépendante de la composition en bases des amorces, la teneur en GC notamment) joue un rôle primordial dans la spécificité de l'hybridation. Le maintien d'une température la plus élevée possible assure une plus forte astringence et limite les appariements non spécifiques. Enfin une étape de polymérisation (72°C) au cours de laquelle une ADN polymérase (la taq

Tableau 10 :Les programmes de PCR

N° de cycles	étape	température	temps
1 cycle	dénaturation de l'ADN matrice	95 °C	5 min.
30 cycles amplification comprenant	dénaturation	95 °C	30 sec.
	hybridation	58 °C	30 sec.
	polymérisation	72 °C	30 sec.
1 cycle	élongation	72 °C	10 min.

Tableau 11 : Liste des amorces employées lors des diverses réactions de PCR.

Nom	Séquence cible	Position sur matrice	Séquence
EM2 Up	<i>Eucalyptus</i> Myb2 cDNA	215-235	5' TTA ATT ACT TGA GGC CCG ACC- 3'
EM2 Down	<i>Eucalyptus</i> Myb2 cDNA	634-653	5' ATA CTG ACC GGT GCA ATG CC- 3'
EM1 Down	<i>Eucalyptus</i> Myb1 cDNA	831-849	5' ATA CTG ACC GGT GCA ATG CC- 3'
EM1Up	<i>Eucalyptus</i> Myb1 cDNA	262-280	5' TCA ATT ACC TGC GGC CGG ACC 3'
EM2DN	<i>Eucalyptus</i> Myb2 cDNA	418-427	5' CGC TCT CGT TTG ACG AAG AT 3'
EM1DN Down	<i>Eucalyptus</i> Myb1 cDNA	355-373	5' GCT CTG CGT TGT TCT TCA TCT 3'
EM4 Up	<i>Eucalyptus</i> Myb4 cDNA	130-149	5' CCC CCA TAG GCA ATC GGT GC 3'
EM4 Down	<i>Eucalyptus</i> Myb4 cDNA	790-811	5' AAA CAC TTG CCT TCA AGC CC 3'
CCR-GUSUp	Promoteur EgCCR	273-293	5' CTC CAA GTA CTA GAA TCT 3'
CCR-GUS Down	Promoteur EgCCR	273-293	5' AAA CAT TGT CTT TTT CCC CTT 3'
Kanamycine 5'	npt II	-	5' GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG G 3'
Kanamycine 3'	npt II	-	5' GGG AGC GGC GAT ACC GTA AAG 3'
Actine 5'	actne		5' -GGT AAC ATT GTG CTC AGT GG 3'
Actine 3'	actne		5' -CTC GGC CTT GGA GAT CCA CA 3'

polymérase) thermostable va synthétiser les brins complémentaires à partir des amorces. La durée de polymérisation varie avec la longueur de la séquence à amplifier (environ une minute pour 1 kb).

Les réactions sont réalisées en microtubes de 0.5ml dans un mélange (volume final 50 μ l) (Tableau 9). Les tubes sont alors placés dans le thermocycleur (Minicycler, Eppendorf) dans lequel des cycles ont été programmés pour l'amplification de séquences données. Les programmes de PCR sont dans tableau 10. Les différentes amorces utilisées au cours des diverses réactions PCR sont décrites dans tableau 11 ci-dessous.

B.2.3.2 Transcription inverse et polymérisation en chaîne d'ADNc (RT-PCR)

La RT-PCR consiste à réaliser une PCR après transcription inverse d'un ARNm en ADNc. Il s'agit donc d'une PCR « classique » réalisée sur des ADNc. Nous avons utilisé le kit « Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit » (Invitrogen). Le déroulement se fait en deux étapes :

- **i) Synthèse des ADNc**

La synthèse d'ADNc est réalisée par une transcriptase inverse, celle-ci est issue du AMV. Cette ADN polymérase utilise pour initier la synthèse d'ADNc une amorce d'Hexamer qui va s'hybrider avec la queue polyA des ARNm. Les ARNs sont extraits à l'aide du kit RNeasy (Invitrogen) et la synthèse d'ADNc est réalisée selon les instructions données par le fournisseur.

10 μ g d'ARN totaux, préalablement traités à la DNase selon le protocole RNase - Free DNase (Invitrogen), 300 ng final d'amorces d'Hexamer (a remplacé d'amorces poly dT) et des dNTP mix (10 mM chacun) sont dénaturés 5 minutes à 65°C. A ce mélange, le tampon de synthèse de la 1^{ère} brin (5X 1st Strand buffer), DDT 0.1M, RNaseIN 40 μ g/ μ l et l'enzyme SSII (200u) sont ajoutés dans un volume final de 20 μ l. Le mélange est incubé 10 min à 25°C, puis 40 min à 50°C pour désactiver cette transcription et la réaction est terminée par une incubation 5 min à 85°C.

- **ii) PCR**

La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR classique sont effectués dans un second temps par la Taq polymérase. 2 μ l ou 1 μ g d'ADNc sont utilisés pour réaliser la

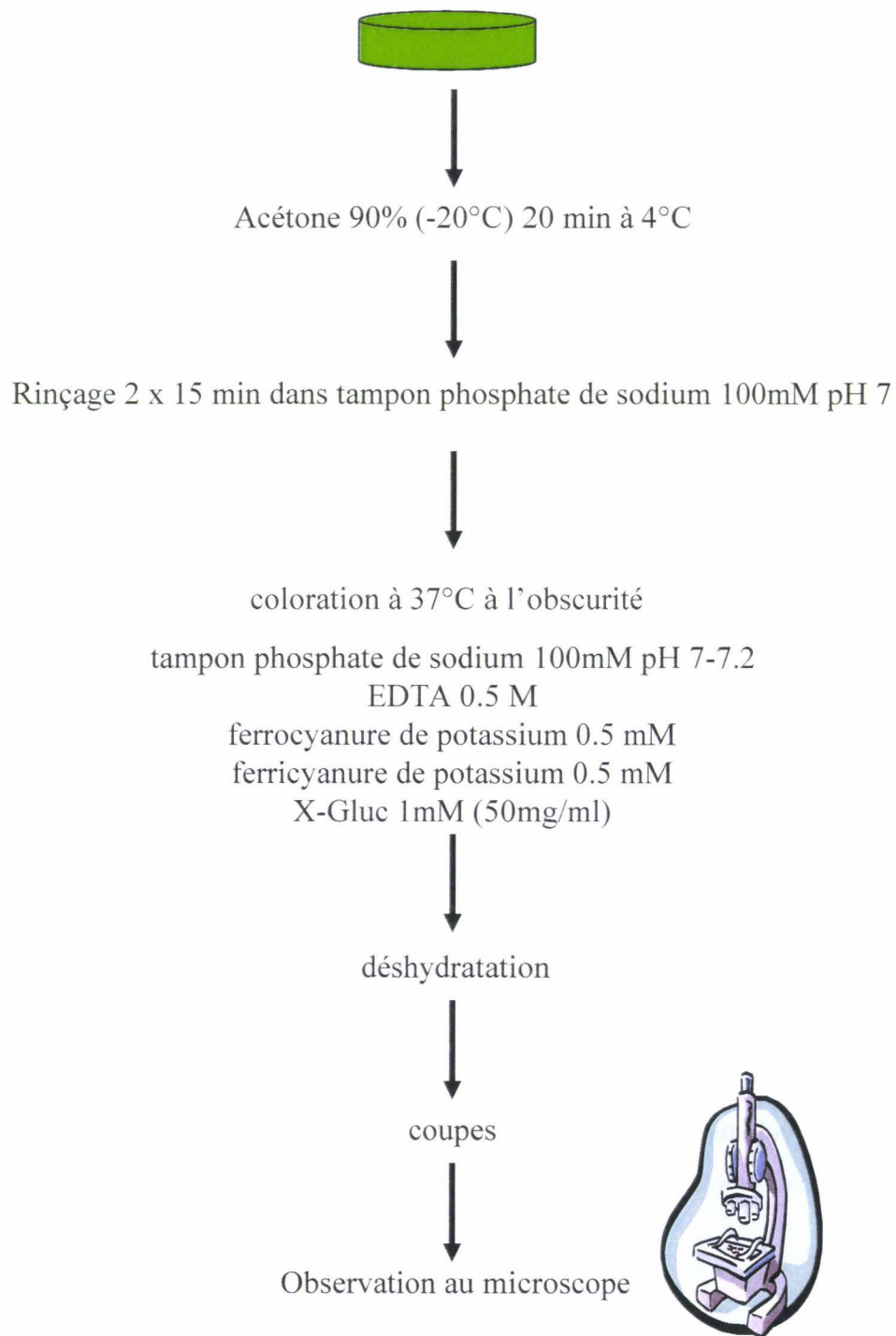


Figure 23 : Protocole de révélation histochimique de l'activité GUS dans les hampes florales, feuilles et racines d'*Arabidopsis* transformé

réaction PCR. Les amorces utilisées pour faire la PCR sont décrites dans tableau 11. Après 30 cycles de polymérisation, les produits sont déposés sur un gel d'électrophorèse agarose, ils sont observés à l'aide d'une table d'UV (BIOBLOCK SCIENTIFIC).

B.3 Analyse des transformants

B.3.1 Analyse de l'activité GUS (β -glucuronidase)

B.3.1.1 Révélation histochimique de l'activité GUS :

Le Substrat couramment utilisé pour les localisations histochimiques de l'activité β -glucuronidase dans les tissus et les cellules est l'X-Gluc. De très nombreuses variables affectent la qualité de la localisation histochimique, incluant tous les aspects de la fixation et de la préparation des tissus aussi bien que la réaction enzymatique elle même.

Le produit formé suite à l'action de la glucuronidase sur X-gluc n'est pas coloré. Ainsi, les dérivés indoxyls formés doivent subir une dimérisation oxydative pour engendrer le bleu indigo insoluble. Cette dimérisation est stimulée par l'oxygène atmosphérique, et peut être rehaussé par l'utilisation d'oxydant tel qu'un mélange K^+ ferricyanide/ferrocyanide. Aussi l'ajouté de tels catalyseurs, permettent d'accélérer la formation du bleu insoluble évitant la possibilité aux dérivés indoxyls de diffuser dans les tissus (Jefferson, 1987).

Le protocole utilisé est schématisé dans fig. 23. Des morceaux de hampes florales (0.5 cm), des racines (0.5 cm), de feuilles (1 cm²) et des fleurs et siliques d'*Arabidopsis* acclimatés en serre sont prélevés et préfixés 20 min dans l'acétone 90% (-20°C) à 4°C.

Ce prétraitement (préfixation) est réalisé notamment pour prévenir l'induction par la blessure du promoteur *CCR* ou *CAD* (Hemerly *et al.*, 1993), pour éviter tout phénomène de diffusion protéique et dans le cas des feuilles pour faciliter la pénétration du substrat. Les échantillons sont ensuite rincés 2 fois 15 min sur glace avec du tampon phosphate de sodium 100 mM pH7 (annexe 8). Après deux infiltrations dont une est sous-vide de 15 minutes, les échantillons sont transférés dans le tampon réactionnel X-Gluc (annexe 9) (X-GlcA, Duchefa). Les organes sont alors mis sous vide 15 min afin d'améliorer l'infiltration du substrat puis ils sont incubés à 37 °C pendant une nuit à l'obscurité. L'évolution de la coloration est suivie pendant 2 à 12 h. Les sections sont alors fixées pendant une durée minimum de 2 heures dans une solution d'éthanol 70%.

Les échantillons sont ensuite déshydratés par des bains successifs dans des solutions de concentration croissante en éthanol d'une durée minimum de 2 h. Ainsi, 4 bains successifs ont été réalisés : 70%, 80%, 90% et 100% éthanol. Les organes sont alors stockés dans ce dernier bain à température ambiante jusqu'à obtention d'une décoloration totale des pigments chlorophylliens. Les échantillons sont inclusés en résine de méthacrylate pour réaliser ensuite les coupes au vibratome et montées entre lame et lamelle avec un agent de montage, le EUKITT (O. Kindler GmbH & CO), avant observation au microscope (Olympus BH-2). Les images ont été acquises en utilisant une caméra dégitale (Olympus C-3030 Zoom).

B.4 Vérification de la présence des transgènes par PCR

B.4.1 Sur colonie d'*Agrobacterium tumefaciens*

La présence des vecteurs binaires et des transgènes dans les clones d'*Agrobacterium* sélectionnés après transformation a été vérifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 11) pour le gène NPTII de la résistance à la kanamycine et les différentes constructions réalisées avec les ADNc *EgMYB*. Chaque réaction de PCR est réalisée dans 100 μ L de tampon PCR. La PCR est effectuée sur une fraction de colonies bactériennes prélevées à l'aide de la pointe d'un cure-dent. La réaction PCR est commencée par 5 min à 95°C, l'amplification se déroule sur 30 cycles (1 min à 95°C ; 1 min à 58°C ; 1 min à 72°C), et la réaction est terminée par une phase d'élongation de 10 min à 72°C. 5 μ L de réaction sont déposés sur gel d'électrophorèse Agarose pour vérifier l'amplification.

B.4.2 Sur un disque foliaire d'*Arabidopsis*

La technique d'extraction est dérivée de celle décrite par Klimyuk *et al.*, (1993). La polymérase chaîne réaction est utilisée pour amplifier les morceaux d'ADN de transgènes dans thermocycleur (Mastercycler gradient) en présence de disque foliaire (1mm) comme matrice pour 50 μ l de réaction. Ces disques sont coupés par un cône jaune de pipette automatique, puis mis dans Eppendorf avec 40 μ l de 0.25M NaOH. Ils sont bouillis 30 sec exactement, puis refroidis à température ambiante. On a ajouté 40 μ l de 0.25 M HCL et 20 μ l de 0.5 M Tris-HCl (pH8.0), 0.25% Nonidet P-40, en agitant bien et placez les tubes dans un bain-marie de l'eau bouillante pendant 2 min. Enfin, ils sont enlevés et mis dans la glace, puis stockés à 4°C. La composition de la réaction PCR (50 μ l) présente dans tableau 9 en utilisant

des oligos spécifiques (Tableau 11). Une fois la réaction achevée (30 cycles d'amplification), 15 μ l est déposée sur un gel d'agarose pour la visualisation de produits PCR.

B.5 Techniques de cytologie

B.5.1 Inclusions en résine de méthacrylate et préparer les coupes

Après le test histoenzymatique pour les échantillons *CCR* et *CAD-GUS*, ces dernières et les plantes *EgMyb* sont fixées pendant 4 heures à 4°C dans un tampon phosphate de sodium 50mM pH = 7,2 contenant 1 % de glutaraldéhyde et 4 % de formaldéhyde. Les échantillons sont ensuite déshydratés progressivement à température ambiante dans un premier gradient d'éthanol (2 bains de 15 min d'éthanol 10%, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % et 70 %), puis dans 2 bains successifs de 15 minutes d'éthanol 80 %, 90 % et enfin par un bain d'1 heure dans de l'éthanol absolu.

Les échantillons subissent alors une préimprégnation dans de la résine JB4 (1,5 %) (Polyscience, Allemagne) : 2 bains de 30 min dans une cloche à vide suivis par un bain d'une nuit toujours sous vide.

Les échantillons sont ensuite inclus dans des plaquettes remplies de résine JB4 à 4°C et la polymérisation a lieu en anaérobiose dans une cloche à vide où ces plaquettes sont ensuite placées pendant 4 heures. Les plaquettes sont alors mises à l'étuve à 30°C pendant une nuit. Les blocs de résine sont conservés à 4°C avant d'être coupés.

Les coupes semi-fines (5-10 μ m) ont été réalisées à l'aide de couteaux de verre (Ultramicrotomy grade) sur un microtome Leica RM 6025. Les coupes sont déposées sur une goutte d'eau additionnée d'ammoniaque pour faciliter son déplissage, puis les lames sont séchées. Certaines coupes (*Myb*) sont colorées au bleu de toluidine (0,5 %), d'autres sont observés au microscope équipé d'un fond blanc pour visualiser la coloration GUS (de couleur bleue). Pour la prise de photos, nous avons utilisé un microscope Olympus BH-2 relié à une caméra digitale Olympus C-3030 Zoom.

B.5.2 Coloration au bleu de toluidine

Les coupes sont colorées dans une solution aqueuse de bleu de toluidine à 0,5 % pendant 20 secondes puis rincées avec de l'eau déminéralisée et les coupes sont enfin montées dans de l'EUKITT.

B.5.3 Détection histochimique des lignines en microscopie optique

Une réponse colorimétrique spécifique d'un tissu lignifié suite à un traitement d'un réactif inorganique est connue depuis le XIX^{ème} siècle par les travaux de Runge (1834). Depuis les réactions colorimétriques se sont multipliées et sont largement utilisées pour la détection et l'identification des lignines (Kutscha et Gray, 1972). Près de 200 méthodes sont connues ayant un degré variable de spécificité. Parmi celles-ci, deux sont très généralement utilisées:

- La réaction de Weisner (phloroglucinol-HCl) (Weisner, 1878) colore la lignine en rouge, plus précisément l'apparition du chromophore a été rapportée comme résultant de la condensation, catalysée par l'acide chlorhydrique, du phloroglucinol avec les unités coniféraldéhydes et sinapaldéhydes des lignines (Fig. 14 et 15) (Clifford, 1974).
- Le test de Maïle (permanganate de potassium-HCl-ammoniaque) (Mäule, 1901). Lors de ce test, les traitements successifs par le permanganate de potassium et l'acide chlorhydrique transforment les résidus gäiacyles et syringyles en catéchols et méthoxycatechols respectivement. Puis le traitement avec l'hydroxyde d'ammonium concentré convertit ces catéchols en 5-alkyl-o-quinone et 3-méthoxy-5-alkyl-o-quinone respectivement révélant ainsi une coloration orange-brune (lignines de type G) ou une coloration pourpre-rouge (lignines de type G-S) (Meshitsuka et Nakano, 1978 et 1979 ; Iiyama et Pant, 1988).

Pratiquement, des sections transversales semi-fines (5-10 µm) de hampes florales, feuilles et racines d'*Arabidopsis* des plantes *EgMyb* sont réalisées à l'aide de couteaux de verre (Ultramicrotomy grade) sur un microtome Leica RM 6025 (revoir la préparation des coupes). Ces coupes ont été aussitôt utilisées.

Lors de la réaction de Weisner, les coupes déposées sur une lame de verre ont été recouvertes d'une solution de phloroglucinol (Prolabo) à 2 % (p/v) dans de l'alcool à 95 %. Après évaporation quasi totale de l'alcool, ces sections de tiges sont montées entre lame et

lamelle dans une solution d'HCl, (Acros Organics) à 6 N puis observées et photographiées immédiatement, la coloration rouge n'étant stable que 15 min environ.

Lors de la réaction de Maïle, les coupes sont placées dans une solution de permanganate de potassium (Prolabo) à 1 % (p/v) dans de l'eau distillée pendant 5 min. Après 3 à 4 rinçages rapides à l'eau distillée, les coupes ont été traitées dans une solution d'acide chlorhydrique (Acros Organics) à 6 N jusqu'à la disparition de la couleur brunâtre. Puis les sections de tiges sont rincées 3 - 4 fois dans de l'eau distillée avant d'être montées entre lame et lamelle dans de l'hydroxyde d'ammonium (Acros Organics) concentré. Comme précédemment, cette coloration n'étant pas stable, les observations et les photographies sont réalisées immédiatement.

B.5.4 Observation microscopique du système vasculaire d'*A. thaliana*

Les observations microscopiques sont réalisées sur les hampes florales, feuilles et racines d'*Arabidopsis* des plantes *EgMyb* en fin de stade floraison. Les coupes sont réalisées à la main à l'aide d'une lame de rasoir. La qualité de la coupe est d'abord évaluée en lumière visible par microscopie photonique. Toutes les observations ont été réalisées sur un microscope Olympus BH-2. Les prises de vues ont été prises à l'aide d'une caméra digitale Olympus C-3030 Zoom.

B.6 Analyse chimique des parois de transformants

B.6.1 La méthode de Klason

Cette méthode de quantification de lignine est la plus couramment employée des méthodes directes. Elle est devenue un standard universel auquel les autres méthodes de quantification des lignines sont comparées. Le protocole utilisé et décrit ci-dessous est (selon Dence 1992) dérivé de l'adaptation du protocole originel (Klason, 1908). C'est une méthode basée sur la détermination de différence de masse des RP avant et après hydrolyse par l'acide sulfurique concentré des composés pariétaux, en particulier des polysaccharides, autres que les lignines. La lignine isolée par ce traitement est qualifiée de lignine insoluble et communément appelée « lignine Klason ». Entre 8 et 10 mg de RP sont traités par de l'acide sulfurique à 70 % 1h 30 à 35°C (15µl d'H₂SO₄/mg de RP). L'hydrolysate est alors transféré dans un ballon de 10 ml et l'acide y est dilué jusqu'à atteindre la concentration de 3 %.

L'hydrolyse se poursuit ainsi durant 3 heures sous une ébullition douce et à reflux. Le résidu d'hydrolyse insoluble dans l'acide est transformé sur un filtre pré-pesé, rincé abondamment et séché une nuit à l'étuve (40°C). Le filtre est ensuite repesé pour déterminer la masse exacte du résidu d'hydrolyse. La teneur en lignine est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Lignine Klason} = (\text{Masse (filtre+extrat)} - \text{Masse (filtre)} / \text{Masse RP}) \times 100$$

B.7 Analyse de polymères polysaccharidiques

B.7.1 Le principe

La chromatographie est une technique de séparation des substances chimiques qui repose sur des différences de comportement de séparation entre une phase mobile courante et une phase stationnaire pour séparer les composants d'un mélange. Différents modules spécialisés composent l'appareil CPG : l'injecteur, la colonne, le détecteur et un four permettant le chauffage de la colonne. Une petite quantité de l'échantillon est introduite sous forme gazeuse dans l'injecteur. Le composé à analyser est porté à l'état de vapeur dans l'injecteur qui l'amènera ensuite en tête de colonne, entraîné par le gaz vecteur. La colonne, de diamètre et de longueur variables, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et renfermant la phase stationnaire. On la place dans une enceinte à température réglable. Un détecteur permet le passage de la phase gazeuse de la sortie de colonne à l'air libre. Grâce à leur autonomie, on peut les employer sur le terrain.

B.7.2 Culture et préparation des parois

Quinze mg de graines des lignées sauvages et MYBs ont été semés sur milieu MS en boîte de Pétri puis mise 48H à 4°C. Afin d'obtenir des plantules étiolées, les graines sont ensuite protégées de la lumière en emballant les boîtes de Pétri dans du papier aluminium et gardées 7 jours en chambre de culture. Les parois analysées sont obtenues, pour les plantules et pour les plantes de la manière suivante : le matériel végétal est placé pendant 15 minutes à 70°C dans 5 mL d'EtOH 70% (v/v), afin d'inactiver les enzymes pariétales et de laver le contenu intracellulaire (Fry *et al.*, 1988). La phase éthanol-soluble est alors prélevée, et les plantules sont homogénéisées au potter dans 5 mL d'EtOH 70%, avant d'être placées une deuxième fois durant 15 minutes à 70°C. La phase éthanol est à nouveau éliminée, après une centrifugation de 10 minutes à 5000 \times g, puis le culot est traité une troisième fois par 5 mL d'EtOH 70%, pendant 15 minutes à 70°C. Une dernière fois le surnageant éthanol est éliminé

et le résidu éthanol-insoluble est assimilé à de la paroi brute. Cette paroi est lyophilisée et servira de base aux analyses pariétales.

B.7.3 Hydrolyse

Afin d'établir le contenu en monosaccharides issus de la paroi brute, de polysaccharides après extraction ou d'oligosaccharides, le résidu sec est hydrolysé par de TFA 2N (250 μ L à 1 mL, selon les quantités de matériel), pendant 2 heures à 110°C. Cinquante microlitres d'une solution d'inositol 2mM sont ajoutés à l'hydrolysât qui sera alors dilué, récupéré après une centrifugation de 10 minutes à 5000 \times g, puis lyophilisé en vue de la préparation des monosaccharides pour l'analyse en CPG.

B.8 Analyse les profils d'expression génétique chez les transformants MYB d'Arabidopsis par les puces à ADN

B.8.1 Prélèvements

Les différents organes (Feuilles et hampes florales) sont prélevés, en conditions "RNase-free" en utilisant les gants, du 14 à 16h des plantes cultivées dans la serre dans des conditions de culture selon Ko *et al.*, (2004). Ces échantillons sont placés directement dans l'azote liquide et sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les ARNs totaux sont extraits avec le kit RNeasy® et selon le protocole d'extraction au TRIZOL (Invitrogen). Les ARN sont précipités en culot dans l'éthanol 70% et envoyés rapidement à l'URGV pour faire les puces.

B.8.2 La technique :

Le transcriptome (puces à ADN) cherche à déterminer le niveau d'expression des gènes en ARN correspondants, à différents stades de développement et / ou dans différentes conditions environnementales. Les méthodes actuelles permettent de révéler l'expression de l'ensemble des gènes d'un organisme (plus de 25000 chez Arabidopsis), et d'apprécier les modifications de ce patron d'expression en fonction de moments ou de conditions différentes.

La puce CATMA est issue d'un projet de recherche européen¹ (Hilson *et al.*, 2004). Elle contient des fragments d'ADN de 150 à 500 pb amplifiés par PCR appelés GST

représentant 23038 gènes² d'*A. thaliana* (Crowe *et al.*, 2003). La puce CATMA a été développée pour limiter au maximum les hybridations croisées des transcrits d'une même famille entre les séquences des différents paralogues fixées à la puce. Elle permet donc de mesurer l'expression des gènes avec une meilleure spécificité. Aucune étude du transcriptome d'*A. thaliana* avec la puce CATMA n'est publiée à ce jour, mais en France, au moins neuf projets de recherche utilisant cette puce sont en cours.

B.8.3 Le principe

Les puces à ADN sont désormais les plus souvent adoptées pour les études de transcriptome. Les approches utilisant ces puces illustrent bien comment tirer parti des informations de séquence désormais disponibles pour concevoir des expériences à grande échelle dont les applications sont multiples. Le principe de base des puces à ADN est l'hybridation moléculaire (Fig. 46): le mélange complexe des ARN ou des ADN est marqué (fluorescence, biotinylation ou radioactivité), mis en solution et hybridé avec des ADN complémentaires de séquence connue, fixés sur la surface d'un support solide (silice, lame de verre, membrane de nylon) à des positions déterminées (pour revues : Lockhart et Winzeler, 2000 ; Freeman *et al.*, 2000). Les ADN fixés sont des oligonucléotides, des ADNc ou des fragments d'ADN génomique amplifiés par PCR. Grâce à la miniaturisation des techniques de dépôt ou de synthèse, des dizaines voire des centaines de milliers d'ADN de séquences différentes sont contenus dans des réseaux de quelques centimètres carrés.

On distingue essentiellement trois types de puces.

1. - **Les membranes.** Configuration classique,
2. - **Les genechips.**
3. - **Les lames de verre.** Configuration classique :
 - *support* : lame de verre « format microscope » (2,5 cm x 7,5 cm) ;
 - *dépôt* : ADN double brin ou oligonucléotides ;
 - *marquage* : fluorescence (fluorophores Cy3 et Cy5), les ADNc marqués provenant de deux échantillons étant hybridés simultanément ;
 - *lecture* : scanner ;
 - *densité* : haute (1000-30000 ADN par puce).

RESULTATS
CHAPITRE I

Transformation des plantes d'*Arabidopsis thaliana* avec promoteurs d'*Eucalyptus gunnii* *EgCCR* et *EgCAD*

I.1 Article 1 : *Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 Promoter activities are in lignifying cells during Primary and Secondary Xylem formation in *Arabidopsis thaliana*

Résumé de l'article

Des modèles Cellule-spécifiques d'expression des promoteurs, de la cinnamoyl coenzyme-A réductase (*EgCCR*) et de l'alcool cinnamylique déshydrogénase (*EgCAD2*), d'*Eucalyptus gunnii* ont été analysés par l'histochimie du promoteur-GUS dans les tissus primaires et secondaires de xylème des hampes florales et des racines d'*Arabidopsis thaliana*. Les modèles d'expression ont indiqué que les gènes *EgCCR* et *EgCAD2* ont été exprimés d'une façon coordonnée dans les tissus primaires et secondaires de xylème de la hampe florale et de la racine d'*A. thaliana*. Les deux gènes ont été exprimés dans toutes les cellules lignifiées (les éléments de vaisseau, les fibres de xylème et cellules parenchymateuses paratracheales) des tissus de xylème. La capacité pour la production à long terme de monolignol semble être liée aux processus développementaux cellule-spécifiques et aux rôles biologiques des différents types de cellules. Nos résultats ont suggéré que la lignification des éléments de vaisseau de courte durée de vie soit réalisée par un processus en deux étapes impliquant i) la production de monolignol par des éléments de vaisseau avant la mort cellulaire programmée de celui-ci et ii) la production subséquente de monolignol par les cellules parenchymateuses paratracheales vivantes vaisseaux-associées après la mort cellulaire de vaisseau. Les modèles d'expression des gènes *EgCCR* et *EgCAD2* ont suggéré que le processus de lignification de cellules de xylème est semblable dans les tissus primaires et secondaires de xylème dans les hampes florales et les racines d'*A. thaliana*.

Research article

Eucalyptus gunnii CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*

A. Baghdady^{a,c}, A.-S. Blervacq^a, L. Jouanin^b, J. Grima-Pettenati^c, P. Sivadon^c, S. Hawkins^{a,*}

^a *Stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés, UMR USTL-INRA 1281, université des sciences et technologies de Lille, bâtiment SN2, cité scientifique, 59655 Villeneuve-d'Ascq cedex, France*

^b *Laboratoire de biologie cellulaire, INRA, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles cedex, France*

^c *Pôle de biotechnologie végétale, UMR 5546 CNRS, université Paul-Sabatier Toulouse-III, 24, chemin de Borde-Rouge, BP 42617, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France*

Received 11 July 2006; accepted 10 October 2006

Available online 02 November 2006

Abstract

Cell-specific expression patterns of the *Eucalyptus gunnii* cinnamoyl coenzymeA reductase (*EgCCR*) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (*EgCAD2*) promoters were analyzed by promoter-GUS histochemistry in the primary and secondary xylem tissues from floral stems and roots of *Arabidopsis thaliana*. Expression patterns indicated that the *EgCCR* and *EgCAD2* genes were expressed in a coordinated manner in primary and secondary xylem tissues of the *Arabidopsis* floral stem and root. Both genes were expressed in all lignifying cells (vessel elements, xylem fibers and paratracheal parenchyma cells) of xylem tissues. The capacity for long-term monolignol production appeared to be related to the cell-specific developmental processes and biological roles of different cell types. Our results suggested that lignification of short-lived vessel elements was achieved by a two-step process involving (i) monolignol production by vessel elements prior to vessel programmed cell death and (ii) subsequent monolignol production by vessel-associated living paratracheal parenchyma cells following vessel element cell death. *EgCCR* and *EgCAD2* gene expression patterns suggested that the process of xylem cell lignification was similar in both primary and secondary xylem tissues in *Arabidopsis* floral stems and roots.

© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD); Cinnamoyl CoA reductase (CCR); Lignin; Monolignols; Xylem

1. Introduction

The phenolic polymer lignin is the second most abundant plant compound after cellulose. It represents a quarter of the terrestrial biomass and can account for up to 35% of the dry matter of wood in certain tree species [21]. Wood, or secondary xylem, is responsible for the conduction of water and mineral elements, and the mechanical support of the plant. These biological roles depend upon the presence of the lignin polymer that is mainly responsible for the hydrophobicity and rigidity of xylem cell walls. In addition, lignin also plays an

important role in the defense mechanisms of the plant against pathogens and abiotic stress [1,5,28,33,39].

Lignin is formed by the oxidative polymerization of hydroxycinnamoyl alcohols, or 'monolignols', under the action of peroxidases and/or laccases [14,38]. Monolignols themselves are synthesized from phenylalanine via the general phenylpropanoid biosynthetic pathway and the monolignol-specific pathway. The latter pathway is composed of two enzymes: (i) cinnamoyl coenzymeA reductase (CCR: EC 1.2.1.44) that catalyses the formation of three hydroxycinnamaldehydes (*p*-coumaraldehyde, coniferaldehyde and sinapaldehyde) from the corresponding hydroxycinnamoyl CoA-esters and (ii) cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD: EC 1.1.1.195) that catalyses the conversion of hydroxycinnamaldehydes into the corresponding hydroxycinnamyl alcohols (monolignols) [3,21]. Three different types of monolignol can be distinguished depending upon the degree of aromatic ring methoxylation.

Abbreviations: CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; G, guaiacyl; GUS, β -glucuronidase; S, syringyl.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 43 40 30; fax: +33 3 20 33 63 02.

E-mail address: simon.hawkins@univ-lille1.fr (S. Hawkins).

When incorporated into the lignin polymer, the residues of the three monolignols are described, respectively, as H-units, G-units and S-units and their relative abundance is used to describe the lignin type. For example, typical angiosperm lignin contains high proportions of both G- and S-units and is therefore described as a G–S lignin.

As a consequence of the biological importance of lignin, its biosynthesis has been extensively investigated, the general biosynthetic pathway has been established and the majority of structural genes have been cloned. In addition, the use of global- and functional-genomic approaches has greatly contributed to a better understanding of this important physiological process [2,3,17,18,36,39].

A number of studies have confirmed that lignification gene expression is spatially associated with lignifying tissues (for review see [44]). Certain of these works have also investigated the expression of individual lignification genes at the cellular level. For example, the promoters of two poplar *Caffeoyl Coenzyme A O-Methyltransferase* (*CCoAOMT*) genes were shown to be active in differentiating primary xylem vessels and associated xylem parenchyma cells, as well as in secondary xylem tissue of poplar plants [7]. In situ hybridization studies have shown that the *Eucalyptus gunnii* *CCR* gene is expressed in differentiating poplar secondary xylem tissue [27], and that *Eucalyptus gunnii* *COMT* (*EgCOMT*) and *CAD2* (*EgCAD2*) gene expression can be observed in differentiating xylem vessels of *Eucalyptus* stem tissues [20]. Other studies using the GUS reporter gene [13,19,29] have shown that the *EgCAD2* promoter drives very similar cell-specific expression patterns in tobacco, poplar and grapevine xylem tissues. These last observations would suggest that the mechanisms regulating the transcriptional activation of the *EgCAD2* gene is conserved between different higher plant species. Detailed studies of a number of lignification gene expression patterns—at the cellular level—have therefore been undertaken in different model plants. Somewhat surprisingly however, to the authors' knowledge, no detailed studies of lignification gene expression have been conducted in the model plant *Arabidopsis thaliana*. For example, previous studies [42,43] have demonstrated that the *AtCAD-C*, *AtCAD-D* and *AtCAD-1* promoters are active in *Arabidopsis* xylem tissue, but their cell-specific expression patterns have not yet been investigated.

The use of this model plant has greatly contributed to our present knowledge of the process of lignification [37,46], not only in primary xylem tissues, but also in secondary xylem tissues, or wood. Although *Arabidopsis* is not a tree, the floral stem is capable of forming secondary xylem under certain conditions [6,25]. In *Arabidopsis*, prior to the development of secondary xylem, the young floral stem typically contains between five and eight vascular bundles separated by interfascicular fibers [48]. The vascular bundles show a collateral pattern with primary xylem developing on the inside of the bundle, and primary phloem on the outside. At this stage, primary xylem (derived from the procambium) is composed of both protoxylem vessel elements (characterized by annular/spiral secondary cell wall thickenings) and metaxylem vessel elements (characterized by more complex wall thickenings) [4].

Both protoxylem and metaxylem vessel elements are associated with xylem parenchyma cells that are relatively short living cells with uniformly thickened cell walls [48,49]. The cellular constitution of *Arabidopsis* secondary xylem is more complex and corresponds to that of a typical Angiosperm dicotyledon in that it is composed of three main cell types: vessel elements, fibers and parenchyma cells [6,25], even if the distinction between fibers and axial parenchyma cells is not always easy. In addition, interfascicular fibers become incorporated into the secondary xylem zone thereby constituting a fourth cellular type. As in other dicotyledons, these different cell types (with the exception of interfascicular fibers) are derived from the meristematic initial cells of the vascular cambium.

Cellular identity is important with regards to the lignification process for a number of reasons. Firstly, differences exist in the quantity/chemical composition of the lignin associated with different secondary xylem cell types. For example, in Angiosperms, vessel elements are generally poor in lignin S units as compared to fiber cells [7]. However, little is known concerning the cellular mechanisms responsible for such differences and a more thorough understanding of the cell-specific lignification process is necessary. Secondly, it has been observed [22] that lignification of tracheary elements (TEs) in the *Zinnia* cell culture system continues even after TE death, thereby suggesting that cellular lignification involves cell–cell cooperation. Such observations indicate that a better understanding of lignification gene expression at the cellular level is required.

In order to address these questions, and to provide a detailed picture of monolignol-specific gene expression in *Arabidopsis*, we have used promoter-*GUS* histochemistry to study the cellular expression patterns of the two *Eucalyptus* lignification genes of the monolignol-specific pathway (*EgCCR*: *cinnamoyl coenzyme A reductase*; *EgCAD2*: *cinnamyl alcohol dehydrogenase*) in *Arabidopsis* floral stem and root xylem tissues.

2. Results

2.1. *EgCCR* and *EgCAD2* promoters are active in lignifying immature vessels and parenchyma of *Arabidopsis* primary xylem

In order to choose suitable plants for detailed expression studies, 15 independent homozygous T4 lines per construct (*EgCCR*-GUS, *EgCAD2*-GUS) were screened for GUS activity and three representative homozygous T4 lines per construct were selected for further detailed study. Microscopic examination of the three *EgCCR*-GUS and three *EgCAD2*-GUS lines revealed that all lines showed very similar expression patterns suggesting that the observed patterns indicate 'real promoter activity'. Expression patterns are therefore described in the following paragraphs in terms of *EgCCR*/*EgCAD2* promoter activity independently of the actual line examined. The absence of endogenous GUS activity was verified in four independent

lines transformed with the vector pJR1 that does not contain the GUS gene.

Fig. 1a shows that a blue coloration indicative of EgCCR promoter activity could be clearly associated with the ring of primary vascular tissues and interfascicular fibers in the developing floral stem (mature metaxylem vessels, seven-vascular bundle stage). Staining with the Weisner reagent (phloroglucinol–HCl) gave a red coloration of cell walls in these tissues indicating the presence of lignin. EgCCR promoter activity could not be observed in other (non-lignified) tissues. Fig. 1b shows that the GUS expression pattern resulting from EgCAD2 promoter activity was very similar to that obtained with the EgCCR promoter suggesting that these two genes might be co-regulated.

While such general views of EgCCR/EgCAD2 promoter activity suggest that both genes are expressed in lignified (or lignifying) primary xylem tissues, closer examination of EgCAD2 promoter activity (Fig. 1c) revealed that the blue coloration was mainly associated with lignifying interfascicular fiber cells. However, in primary vascular bundles that are composed of both vessels and associated xylem parenchyma, the expression pattern was more difficult to interpret. In vascular bundles, metaxylem vessel elements could be clearly identified by their size, position and by their thickened lignified cell walls that gave a more intense red coloration with the Weisner reagent. Despite examination of many sections, we never observed EgCAD2 promoter activity in clearly identifiable metaxylem vessel elements. In contrast, however, promoter activity was often observed in smaller cells, spatially associated with vessel elements and which most likely corresponded to xylem parenchyma cells. Observation of comparable sections of EgCCR-GUS transformed plants (data not shown) showed that the EgCCR promoter was active in the same cell types as the EgCAD2 promoter.

These observations led us to establish two hypotheses with regards to EgCCR/EgCAD2 promoter activity and lignification in primary xylem vessels: (1) the *EgCCR/EgCAD2* genes responsible for the production of monolignols necessary for vessel lignification are uniquely expressed in spatially associated xylem parenchyma cells, or (2) the *EgCCR/EgCAD2* genes are also expressed in the immature vessel elements themselves prior to cell autolysis and that, at the developmental stage (seven-vascular bundles) examined, vessel lignification and autolysis have already occurred which could explain the absence of blue coloration in vessels.

In order to verify which of these hypotheses were correct, we decided to look at EgCCR/EgCAD2 promoter activity at a more immature stage in floral stem development. Examination of EgCCR promoter activity (Fig. 1d) and EgCAD2 promoter activity (Fig. 1e) allowed us to unambiguously identify developing metaxylem vessel elements prior to cell autolysis and which showed a cell-specific blue coloration indicating that the *EgCCR/EgCAD2* genes are also expressed in these cells. Statistical analyses of a number of different floral stem sections (Fig. 2a) indicated that the percentage of clearly identifiable primary xylem vessels showing promoter activity varied

between approximately 7% (EgCCR) and 17% (EgCAD2). Our results (Fig. 1d) also show that the cell walls of interfascicular fibers are less heavily lignified at this developmental stage, as compared to the samples examined in Fig. 1a–c. Interestingly, the blue GUS coloration in these fiber cells is also less intense at this stage, which might suggest a lower level of expression.

In conclusion, our results show that both promoters were active in differentiating vessel elements and parenchyma in the primary xylem of *Arabidopsis* floral stems. In addition, both promoters are also active in interfascicular fibers.

2.2. *EgCCR* and *EgCAD2* promoter activities define different cell-types with putative different functions in lignification during secondary xylem formation

Given the importance of secondary xylem in higher plants, as well as the more complex cellular composition and developmental pattern of this tissue, we decided to investigate EgCCR/EgCAD2 promoter activity in the secondary xylem of the *Arabidopsis* floral stem. Fig. 1f (and Fig. 3c) shows the appearance of the vascular tissues at the start of secondary xylem formation in an EgCAD2-GUS line. No/very little blue coloration can be detected in the interfascicular fibers that have now been incorporated into the developing ring of secondary xylem tissue. The lack of blue coloration in these cells would suggest that the lignification of interfascicular fiber cells is terminated at this stage. Closer examination of the secondary xylem tissue at this stage showed that it is composed of two main cell types: (1) clearly identifiable large xylem vessels and (2) smaller cells that have been previously identified as xylem fibers [49]. At this stage, the blue GUS coloration appears to be mainly present in those small cells that are spatially associated with vessel elements, but not in other smaller cells spatially distant from vessel elements.

These observations led us to hypothesize that the ‘smaller cells’ may be, in fact, be composed of two different cell types: (1) lignified parenchyma cells spatially associated with vessels (paratracheal parenchyma) and (2) lignified fiber cells less closely associated with vessels. This hypothesis was supported by the utilization of different histochemical stains that indicated differences in the cell wall composition of the two cell types. The coloration of fresh, freehand sections of non-transformed plants with the Maüle reagent (Fig. 1g) showed that those small cells spatially associated with vessels, and that we supposed to be paratracheal parenchyma cells, gave a negative reaction (brown coloration). In contrast, other small cells spatially distant from vessels, and that we supposed to be xylem fiber cells, gave a positive reaction (red coloration). The use of the Weisner reagent (Fig. 1h) did not allow us to distinguish the two cell types. Observation of EgCAD2-GUS samples colored with Ruthenium red (Fig. 3a), and EgCCR-GUS samples colored with Toudine Blue O (Fig. 3b) also tended to confirm the existence of two ‘non-vessel’ cell populations in *Arabidopsis* secondary xylem.

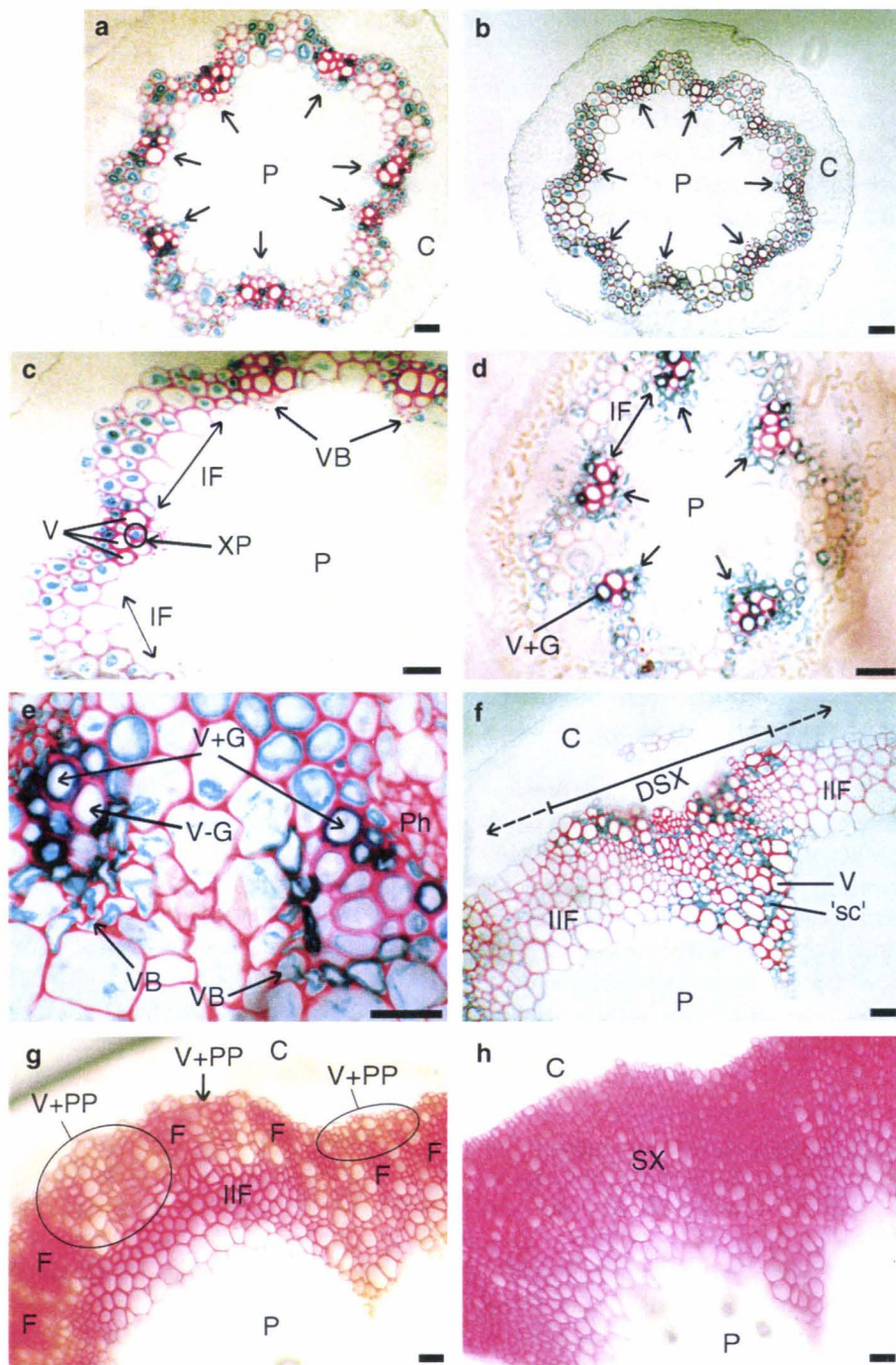


Fig. 1. GUS histochemistry of 25-cm-tall floral stems from *A. thaliana* wild-type and EgCCR-/EgCAD-GUS-transformed plants grown as described in Section 4 to induce secondary xylem production. *a*) General view of vascular tissues in cross-section taken from the middle/lower region of floral stems of EgCCR-GUS plants (seven to eight vascular bundle stage). Semi-thin (5 μ m) section stained with Weisner reagent (phloroglucinol-HCl). Lignified cell walls are colored red, EgCCR promoter activity is revealed by blue coloration of cell content indicating GUS activity in that cell. P: pith, C: cortex, arrows indicate vascular bundles (7) separated by interfascicular fibers. Scale bar: 20 μ m. *b*) As in *a*) but with sections taken from EgCAD-GUS plants. *c*) Medium-powered view of vascular tissues in cross-section taken from the middle/lower region of floral stems of EgCCR-GUS plants (seven to eight vascular bundle stage). Semi-thin (5 μ m) section stained with Weisner reagent (phloroglucinol-HCl). VB: vascular bundle, IF: interfascicular fibers, V: vessel elements, XP: xylem parenchyma, P: pith. Scale bar: 20 μ m. *d*) Medium-powered view of vascular tissues in cross-section taken from the upper region of floral stems of EgCCR-GUS plants (five vascular bundle stage). Semi-thin (5 μ m) section stained with Weisner reagent (phloroglucinol-HCl). Arrows indicate vascular bundles, P: pith, V + G: vessel element showing GUS activity, IF: interfascicular fibers. Scale bar: 20 μ m. *e*) High-powered view of vascular tissues in cross-section taken from the upper region of the floral stem of 7-week-old EgCAD-GUS plants (five vascular bundle stage). Semi-thin (5 μ m) section stained with safranin-O and Weisner reagent. VB: vascular bundle, V + G: vessel element showing GUS activity, Ph: phloem. Scale bar: 20 μ m. *f*) General view of secondary vascular tissues in cross-section taken from the lower region of the floral stem of 10-week-old EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Weisner reagent (phloroglucinol-HCl). C: cortex, p: pith, V: vessel, 'sc': smaller cell, DSX: developing secondary xylem, dotted arrows indicate spread of secondary tissue formation. Scale bar: 20 μ m. *g*) Lignin histochemistry (Maüle reagent) of secondary vascular tissues in freehand cross-section taken from the lower region of floral stem of wild-type plants. Lignified cell walls in secondary xylem tissue are colored red

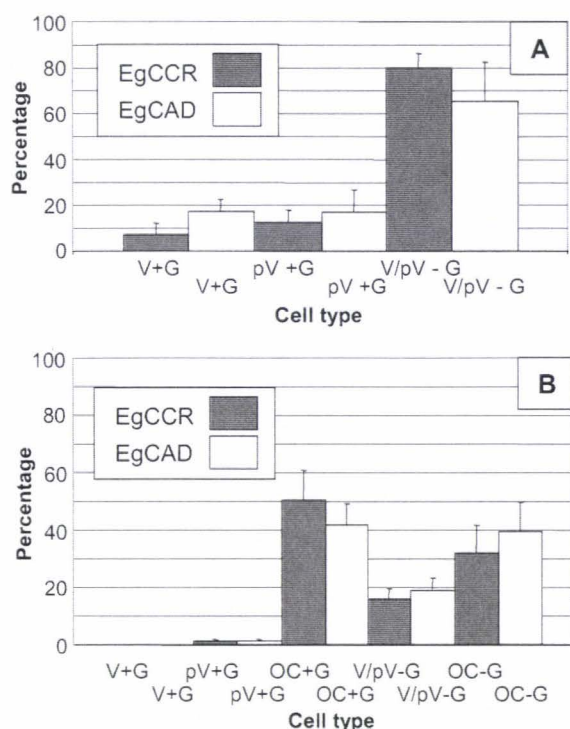


Fig. 2. Quantification of different cell types showing GUS activity in primary xylem (A) and secondary xylem (B). A) Relative quantity of (i) clearly identifiable vessels with EgCCR-/EgCAD-driven GUS activity (V + G), (ii) potential vessels with GUS activity (pV + G), and (iii) clearly identifiable vessels and potential vessels without GUS activity (V/pV - G) expressed as a percentage of clearly identifiable vessels and potential vessels in primary xylem vascular bundles. Data are expressed as means and bars indicate 95% confidence limits. B) Relative quantity of (i) clearly identifiable vessels with EgCCR-/EgCAD-driven GUS activity (V + G), (ii) potential vessels with GUS activity (pV + G), (iii) 'other cell types' with GUS activity (OC + G), (iv) clearly identifiable vessels and potential vessels without GUS activity (V/pV - G), and (v) 'other cell types' without GUS activity (OC - G) expressed as a percentage of all cells in the two cell layers of the vascular cambium/differentiating xylem zone. Data are expressed as means and bars indicate 95% confidence limits.

Ruthenium Red is generally considered to be a stain for primary cell walls [6] and Fig. 3a shows that the primary cell walls of the vascular cambium zone and phloem gave a strong positive reaction (red coloration), while the lignified secondary walls of vessel elements gave a negative (no coloration) reaction. Xylem fibers tended to give a weak reaction (diffuse pink coloration), while xylem parenchyma cells generally gave a stronger reaction (localized scarlet red coloration). These observations would also seem to suggest differences in the cell wall structure/composition between the different secondary xylem 'small cell' populations. Interestingly, in many cases, GUS expression was observed in those cells whose walls give a red coloration characteristic of xylem parenchyma

cells, thereby supporting the idea that the *EgCCR/EgCAD2* genes are expressed preferentially in these cells. These results were further supported by the use of Toluidine Blue O (Fig. 3b) that also gave a differential coloration with cell walls from parenchyma (discrete purple coloration) and fibers/vessel elements (blue/turquoise coloration). Once again, GUS expression appeared to be preferentially associated with the paratracheal parenchyma cells.

In all sections examined, a blue coloration was never observed in clearly identifiable secondary xylem vessels. This situation is clearly similar to that encountered with primary xylem vessel development and we therefore hypothesized that, once again, secondary cell wall thickening, lignification and cell death occur rapidly in maturing xylem vessels and that if we wanted to detect promoter activity we would have to examine the vascular cambium zone more thoroughly. As revealed by Fig. 3c (*EgCAD2*-GUS) and Fig. 3d (*EgCCR*-GUS), both promoters are active in cells from the vascular cambium zone, but not in recently formed vessel elements. However, while GUS expression can be detected in initial cells, it is very difficult to determine whether these cells will form vessel elements, fibers or parenchyma cells. These observations were confirmed by a statistical analysis (Fig. 2b) of the first two cell layers on the xylem side of the vascular cambium. These results show that no cells in this zone could be positively identified as immature vessels showing GUS activity.

Given the difficulty of clearly identifying immature living vessel elements in transverse sections, we decided to make longitudinal sections of the cambial zone in order to see whether we could detect clearly identifiable vessel elements showing *EgCCR/EgCAD2* promoter activity. Fig. 3e shows a developing vessel element next to the vascular cambium and containing a blue coloration indicative of promoter activity. This cell can be positively identified as a vessel element by the presence of bordered pits in its cell wall. This figure also shows a mature lignified vessel element (showing no blue coloration) adjacent to the developing vessel element, as well as a GUS-expressing xylem paratracheal parenchyma cell that can be identified by the lack of bordered pits. This observation confirms that the *EgCCR/EgCAD2* genes are also expressed in developing *Arabidopsis* secondary vessel elements. Considered together, our results would suggest that the *EgCCR/EgCAD2* promoters are expressed in all cell types (vessel elements, paratracheal parenchyma, fibers) making up the secondary xylem of the *Arabidopsis* floral stem.

In order to compare the lignification process in *Arabidopsis* primary and secondary root xylem tissues we also decided to determine the expression patterns of the *EgCCR/EgCAD2* promoters in *Arabidopsis* roots. Our analyses revealed a very similar pattern to that observed in the floral stem. Fig. 3f shows the

(rich in lignin S-units) or brown (poor in lignin S-units). C: cortex, P: pith, F: xylem fibers, IIF: incorporated interfascicular fibers, V + PP: zone containing vessel and paratracheal parenchyma cells. Scale bar: 20 μ m. h) Lignin histochemistry (Weisner reagent) of secondary vascular tissues in freehand cross-section taken from the lower region of floral stems of wild-type plants. Lignified cell walls in secondary xylem tissue are colored red. C: cortex, SX: secondary xylem, P: pith. Scale bar: 20 μ m.

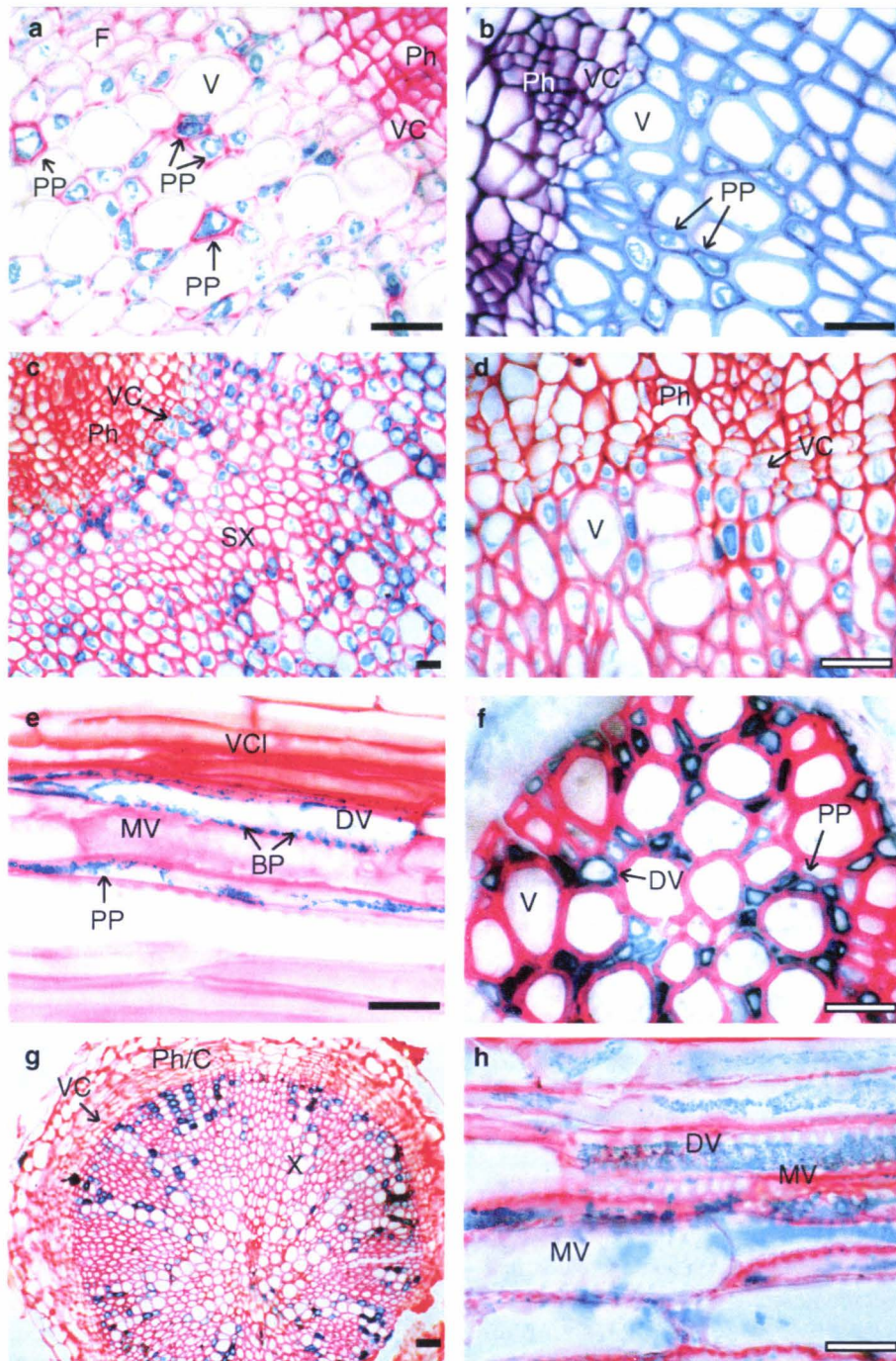


Fig. 3. Secondary xylem microscopic observation of 25-cm-tall floral stems from *A. thaliana* wild-type and EgCCR-/EgCAD-GUS-transformed plants grown as described in Section 4. *a*) High-powered view of secondary xylem in cross-section taken from the lower region of floral stem of EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Ruthenium red. F: xylem fibers, V: vessel, PP: paratracheal parenchyma, VC: vascular cambium, Ph: phloem. Scale bar: 20 μ m. *b*) High-powered view of secondary xylem in cross-section taken from the lower region of the floral stem of EgCCR-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Toluidine blue O. Ph: phloem, VC: vascular cambium, V: vessel, PP: paratracheal parenchyma. Scale bar: 20 μ m. *c*) Medium-powered view of vascular cambium and secondary xylem in cross-section taken from the lower region of the floral stem of EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Safranin O and phloroglucinol-HCl. Ph: phloem, VC: vascular cambium, SX: secondary xylem. Scale bar: 20 μ m. *d*) High-powered view of vascular cambium and secondary xylem in cross-section taken from the lower region of the floral stem of EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Safranin O and phloroglucinol-HCl. Ph: phloem, VC: vascular cambium, V: vessel. Scale bar: 20 μ m. *e*) High-powered view of vascular cambium and secondary xylem in longitudinal-section taken from the lower region of the floral stem of EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Safranin O and phloroglucinol-HCl. VCI: vascular cambium initials, DV: developing vessel element, MV: mature vessel element, BP: bordered pits, PP: paratracheal parenchyma cell. Scale bar: 20 μ m. *f*) High-powered view of xylem in a cross section from a lateral root of 7-week-old EgCCR-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Safranin O and phloroglucinol-HCl. V: vessel, DV: probable developing vessel, PP: paratracheal parenchyma cell. Scale bar: 20 μ m. *g*) General view of xylem tissue in a cross section from the main root of 7-week-old EgCAD-GUS plants. Semi-thin (5 μ m) section stained with Safranin O and phloroglucinol-HCl. Ph/C: phloem/cortex, VC: vascular cambium, X: xylem. Scale bar: 20 μ m. *h*) High-powered view of secondary xylem in a longitudinal section from the main root of 7-week-old EgCCR-GUS plants. DV: developing vessel element, MV: mature vessel element. Scale bar: 20 μ m.

expression pattern of the EgCCR promoter in the xylem from a lateral root. GUS activity could be detected in both xylem parenchyma cells as well as in a probable developing vessel element. Fig. 3g shows the expression pattern of the EgCAD2 promoter in secondary xylem from the main root. GUS activity was observed in paratracheal parenchyma cells, in unidentified cells in the vascular cambium zone, but not in clearly identifiable vessel elements. In order to see whether the EgCCR/EgCAD promoters were also active in differentiating xylem vessels we decided to make longitudinal sections of the root cambial zone. Fig. 3h shows EgCCR promoter activity in a longitudinal section from the secondary xylem of the main root. GUS activity can be seen in a developing vessel element clearly identifiable by the scalariform patterning of bordered pits. Similar results (data not shown) were also obtained with EgCAD2-GUS samples. These results suggest that the two promoters are active in differentiating vessel elements, xylem parenchyma and fiber cells of *Arabidopsis* primary and secondary root xylem. Altogether, these results would indicate that the lignification process is similar in *Arabidopsis* floral stem and root xylem.

3. Discussion

As part of one of our laboratories (UMR 5546 CNRS) ongoing investigation into the molecular regulation of the lignification process we have previously cloned the CCR and CAD2 genes from *E. gunnii* [16,27] and investigated the expression patterns of these genes in tobacco, poplar and grapevine [13, 19,29]. However, given the widespread use of *A. thaliana* as an important model plant for studying the molecular regulation of lignification [40] we decided to investigate the cell-specific expression patterns of the EgCCR/EgCAD2 promoters in this plant. As well as providing information about lignification in *Arabidopsis* per se, this study also permits comparisons about this important physiological process to be made between *Arabidopsis* and other plant species.

Our results show that the expression pattern of the EgCCR and EgCAD2 promoters in *Arabidopsis* is very similar to that previously observed for the EgCAD2 promoter in tobacco, poplar and grapevine [13,19,29]. Interestingly, the cell-specific expression pattern of the EgCCR/EgCAD2 promoters in *Arabidopsis* was also very similar to that observed for another lignification gene (*CCoAOMT*) in poplar [7]. Such observations would seem to support the idea that the mechanisms controlling transcriptional regulation of the CAD gene, and probably other lignification genes, are conserved in higher plant species. The results of in situ hybridization and immunolocalization studies [20,27,41] would also seem to support this idea. Our results are also important since they confirm the validity of using *Arabidopsis* to study lignification.

Our observation that the EgCCR and EgCAD2 promoters show highly similar spatial and temporal expression patterns in *Arabidopsis* could also suggest that the expression of these two genes is coordinated. To the authors' knowledge, this is the first time that a detailed comparative study of the expres-

sion patterns of both genes has been undertaken in the same species. With regards to the transcriptional regulation of lignification gene expression, numerous studies [15,23,36,37] have indicated the presence of Myb transcription factor binding sites (AC elements) in lignification gene promoters, and underlined their potential role in regulating lignin gene expression. Both the EgCCR and EgCAD2 promoters contain AC elements that could contribute to the coordinated spatial and temporal expression of these two genes. Interestingly, the promoters of the *Arabidopsis* *AtCAD-C*, *AtCAD-D* and *AtCAD-I* genes that have all been associated with lignification [37,42,43], as well as the *AtCCR1* gene also contain AC elements. Such an observation could also suggest that the expression patterns of the *Eucalyptus* EgCCR and EgCAD2 genes reflect that of the *Arabidopsis* monolignol-specific lignification genes.

Our results indicated that the EgCCR/EgCAD promoters are active in the lignifying cells of primary and secondary xylem tissues in both the floral stem and root of *Arabidopsis*. In order to address the question of gene expression at the cellular level it was necessary to characterize the different cell types present in secondary xylem tissues. While the composition of primary xylem tissue is relatively simple (vessels and parenchyma cells), secondary xylem structure is more complex. In addition, the identification of differentiating cambial cells/vessel elements is difficult in *Arabidopsis* since, in contrast to the cambial zone of woody angiosperms where fusiform initials and ray initials can be relatively easily distinguished in cross sections, we were unable to clearly differentiate two types of initials. These results are in agreement with those observed for the vascular cambium in *Arabidopsis* hypocotyls where detailed electron microscopy studies of this zone revealed that only fusiform initials were present [6]. While previous studies [48, 49] of *Arabidopsis* floral stem secondary xylem have reported that this tissue is composed of (in addition to incorporated interfascicular fibers) two main cell types: vessels elements and fibers, another detailed study [6] indicated that the secondary xylem is composed of three main cell types: vessel elements, fibers and paratracheal parenchyma cells. Our results using a combination of different histochemical stains would seem to support the latter observation suggesting that the secondary xylem of *Arabidopsis* contains paratracheal parenchyma cells as well as vessel elements and fibers. In conclusion, our results suggested that the secondary xylem in *Arabidopsis* floral stems is composed of four main cell types (vessel elements, paratracheal parenchyma, fibers and included interfascicular fibers).

When considered together, our GUS-histochemistry results indicated that the EgCCR/EgCAD2 promoters are active in all cell types of both primary and secondary xylem tissues. Clear evidence of promoter activity in differentiating secondary xylem vessel elements was provided by the positive identification of these cells in longitudinal sections of the cambial zone. Vessel elements can be distinguished from parenchyma cells and fibers by the presence of bordered pits organized in an opposite/scalariform pattern [6,12,32]. Therefore, at the cellular level, EgCCR/EgCAD2 promoter activity is not restricted to a particular cell type and all cells are presumably capable of pro-

ducing monolignols necessary for lignification. Despite this apparent homogeneity in gene expression, the different cell types show clear differences in their capacity for long-term monolignol production that are related to the cell-specific development and biological role of each cell type. For example, vessel element formation involves rapid cell enlargement, secondary cell wall formation and programmed cell death [10–12,30] necessary for the formation of a functional water-conducting structure. In such a situation the developmental window available for lignification of the vessel element cell wall—using monolignols produced by this cell—is limited [17,34]. One possible result of such a process is that the vessel element cell wall could be insufficiently lignified to support the increasing mechanical pressure building-up in developing xylem tissues. Sufficient mechanical strength could however be provided by continued lignification of the vessel element wall fueled by monolignols produced in spatially associated paratracheal xylem parenchyma cells.

According to this idea of ‘cell-cooperation’ [13,19], lignification of vessel cell walls is accomplished by two complementary processes. Prior to programmed cell death of vessel elements, both vessel-associated xylem parenchyma cells and vessel elements are capable of producing monolignols that can be incorporated into the cell wall of vessel elements. Following vessel element autolysis and cell death, further lignification of the vessel element wall can only be achieved via the incorporation of monolignols produced by the associated xylem parenchyma cells. Support for the theory of cell-cooperation has also been provided by studies [22,47] on the differentiation of TEs in the *Zinnia* cell culture system. Under appropriate conditions, cell cultures contain both differentiating TEs and non-differentiating parenchyma cells, and monolignols and dilignols are excreted into the extracellular medium. In this system, lignification of TEs continues even after their death, thereby suggesting that the non-differentiating parenchyma cells produce monolignols that are incorporated into TE cell walls. Our observations of *EgCCR* and *EgCAD2* promoter activity in clearly identifiable differentiating vessels, as well as in associated xylem parenchyma cells would tend to confirm the idea of vessel/TE lignification by ‘cell-cooperation’ in vivo [13,19] and in vitro [22].

As opposed to xylem vessel elements, both interfascicular fibers and xylem fibers are only involved in mechanical support and do not have a conducting role. These functional differences are reflected in the developmental programs of these two cell types—vessel formation requires rapid programmed cell death whereas fiber formation does not. Such differences are also reflected in the lignification process of the two cell types. For example, our results show that, in interfascicular fibers: (i) lignification of the interfascicular fiber cell wall (as indicated by phloroglucinol-staining) increases over a relatively long time period, (ii) *EgCCR/EgCAD2* promoter activity can be detected in individual fiber cells during this period, and (iii) promoter activity is present in fiber cells but not in surrounding parenchyma cells. These observations would suggest that these fibers, as previously observed for poplar phloem fibers [7,19] are capable of producing all the monolignols

necessary for the lignification of their own wall and do not lignify through a process of cell-cooperation as would seem to be the case for vessel elements.

Our investigation into *EgCCR* and *EgCAD2* promoter activity in both primary and secondary xylem from *Arabidopsis* roots would suggest that the process of lignification in these tissues is very similar to that observed in floral stem tissues.

Altogether, our results could suggest that cell-specific lignification in primary and secondary xylem of *Arabidopsis* floral stems and roots is a comparatively simple process whereby once initiated, monolignol-specific genes are expressed, in a coordinated manner, in all living lignifying cells. In this system the capacity for long-term monolignol production and the cessation of lignification gene expression appear to be related with the cell-specific developmental processes of the different cells making up the xylem tissues that are in turn, associated with the biological function of the different cell types. In addition, our results showing that the expression patterns of the *EgCCR/EgCAD2* promoters in *Arabidopsis* are similar to those observed in other higher plant species confirms the validity of using *Arabidopsis* as a model plant for studying lignification.

4. Materials and methods

4.1. *CCR/CAD2-GUS* reporter constructs and transformation

The *EgCCR-GUS* and *EgCAD2-GUS* reporter constructs used in this study were generated as described previously [13, 27] and contained, respectively, a 1.3 kb *EgCCR* promoter fragment and a 1 kb *EgCAD2* promoter fragment. *EgCAD2-GUS* constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58pMP90 [26] and *EgCCR-GUS* constructs were introduced into *A. tumefaciens* strain GV310. *A. thaliana* (ecotype Wassilewskija, WS) was transformed by infiltration [9] and potential T1 transformants selected by germination on sterile MS medium containing kanamycin (50 µg ml⁻¹). Control lines were generated by transformation with the vector pJRI [45] that did not contain the GUS gene. Transformation was confirmed by PCR and homozygous T4 lines were used for all analyses.

4.2. Plant growth

To obtain secondary xylem formation in the inflorescence stem, *Arabidopsis* transformants (ecotype WS) were grown in the greenhouse under short-day conditions (8 h light/16 h dark) at 21 °C for 7 weeks as described previously [24]. Then, the short-day grown plants were shifted to long-day conditions (16 h light/8 h dark) for 7 days. Finally, plants were moved back to the short-day conditions and were grown until inflorescences were 25-cm tall. Primary xylem samples were obtained from two different regions of the floral stem: (1) stem sample immediately below the apex of the floral stem (developing metaxylem vessels, “five-vascular bundle stage”); (2) stem sample from the middle region of the floral stem (mature metaxylem vessels, “seven-vascular bundle stage”).

Secondary xylem samples were obtained from the basal region of the floral stem. Root xylem samples were obtained from the primary and secondary roots of these plants.

4.3. Sample preparation and microscopy

Histochemical staining for GUS enzyme activity was performed as described previously [29]. Briefly, fragments of inflorescence stems, roots and leaves were pre-fixed in 90% acetone (–20 °C) for 20 min. Following pre-fixation, samples were rinsed (2 × 15 min) in 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) and stained for GUS activity for 4–18 h, using 5-bromo-4-chloro-3-indole glucuronide (X-gluc, KALYS) at 0.5 mg ml⁻¹ in 1 M sodium phosphate (pH 7.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0), 0.5 mM ferricyanide and 0.5 mM ferrocyanide. Samples were then postfixed (4 h—overnight) in 4% neutral buffered formaldehyde at 4 °C in the dark prior to dehydration in a graded ethanol series at room temperature and fixation in Glycol Methacrylate JB-4 resin (Polyscience, Germany) according to the manufacturer's instructions. Semi-thin sections (5–10 µm) were cut with glass knives, mounted on glass slides and stained with aqueous 0.05% (w/v) Safranin O; aqueous 0.1% (w/v) Toluidine Blue O [35], aqueous 0.01% (w/v) Ruthenium Red [6] and the Weisner reagent (1% phloroglucinol–HCl, [8]). Free-hand sections of floral stems were also stained with the Weisner reagent and the Mäule reagent [31]. Samples were observed and photographed using a Nikon Eclipse TS100 light microscope.

References

- [1] A.M. Anterola, N.G. Lewis, Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity, *Phytochem.* 61 (2002) 221–294.
- [2] M. Baucher, C. Halpin, M. Petit-Conil, W. Boerjan, Lignin: genetic engineering and impact on pulping, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2003) 305–350.
- [3] W. Boerjan, J. Ralph, M. Baucher, Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 519–546.
- [4] J.S. Busse, R.F. Evert, Pattern of differentiation of the first vascular elements in the embryo and seedling of *Arabidopsis thaliana*, *Int. J. Plant Sci.* 160 (1999) 1–13.
- [5] M.M. Campbell, B.E. Ellis, Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures I. Induction of phenylpropanoid metabolism, *Planta* 186 (1992) 409–417.
- [6] N. Chaffey, E. Cholewa, S. Regan, B. Sundberg, Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation, *Physiol. Plant.* 114 (2002) 594–600.
- [7] C. Chen, H. Meyermans, B. Burggraef, R. De Rycke, K. Inoue, V. De Vlesschauer, M. Steennackers, M. Van Montagu, G. Engler, W. Boerjan, Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-coenzyme A-3-O-methyltransferase in poplar, *Plant Physiol.* 123 (2000) 853–867.
- [8] M.N. Clifford, Specificity of acidic phloroglucinol reagents, *J. Chromatogr.* 94 (1974) 321–324.
- [9] S.J. Clough, A.F. Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 16 (1998) 735–743.
- [10] P. Dahiya, Role of death in providing lifeline to plants, *Trends Plant Sci.* 8 (10) (2003) 462–465.
- [11] L.A. Donaldson, Lignification and lignin topochemistry: an ultrastructural view, *Phytochem.* 57 (2001) 859–873.
- [12] K. Esau, *Vascular Differentiation in Plants*, J. Wiley and Sons, New York: Holt, Rinehart and Winston, 1977.
- [13] C. Feuillet, V. Lauvergeat, C. Deswarte, G. Pilate, A. Boudet, J. Grima-Pettenati, Tissue and cell specific expression of a cinamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants, *Plant Mol. Biol.* 27 (1995) 651–667.
- [14] B. Gavnohl, K. Larsen, Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation, *Physiol. Plant.* 116 (2002) 273–280.
- [15] M. Goicoechea, E. Lacombe, S. Legay, S. Mihaljevic, P. Rech, A. Jauneau, C. Lapiere, B. Pollet, D. Verhaegen, N. Cheubert-Gigot, J. Grima-Pettenati, EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis, *Plant J.* 43 (2005) 553–567.
- [16] J. Grima-Pettenati, C. Feuillet, D. Goffner, G. Borderies, A.M. Boudet, Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase, *Plant Mol. Biol.* 21 (1993) 1085–1095.
- [17] A. Groover, N. DeWitt, A. Heidel, A. Jones, Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro, *Protoplasma* 196 (1997) 197–211.
- [18] R. Hatfield, W. Vermerris, Lignin formation in plants, *Dilemma Linkage Specificity Plant Physiol.* 126 (2001) 1351–1357.
- [19] S. Hawkins, J. Samaj, V. Lauvergeat, A. Boudet, J. Grima-Pettenati, Cinnamyl alcohol dehydrogenase: identification of new sites of promoter activity in transgenic poplar, *Plant Physiol.* 113 (1997) 321–325.
- [20] S. Hawkins, A. Boudet, J. Grima-Pettenati, Characterization of caffeic acid O-methyltransferase (C-OMT) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) gene expression patterns by in situ hybridization in *Eucalyptus gunnii* Hook, *Plantlets Plant Sci.* 164 (2003) 165–173.
- [21] T. Higuchi, Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation, *Wood Sci. Technol.* 24 (1990) 23–63.
- [22] M. Hosokawa, S. Suzuki, T. Umezawa, Y. Sato, Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols, *Plant Cell Physiol.* 42 (2001) 959–968.
- [23] B. Karpinska, M. Karlsson, M. Srivastava, A. Stenberg, J. Schrader, F. Sterky, R. Bhalaerao, G. Wingsle, MYB transcription factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular tissue development in hybrid aspen, *Plant Mol. Biol.* 56 (2004) 255–270.
- [24] J.H. Ko, K.-H. Han, S. Park, J. Yang, Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling, *Plant Physiol.* 135 (2004) 1069–1083.
- [25] J.H. Ko, K.H. Han, *Arabidopsis* whole-transcriptome profiling defines the features of coordinated regulations that occur during secondary growth, *Plant Mol. Biol.* 55 (2004) 433–453.
- [26] C. Koncz, J. Scell, The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chemiric genes carried by novel type of *Agrobacterium* binary vector, *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383–396.
- [27] E. Lacombe, S. Hawkins, J. Van Doorslaere, J. Piquemal, D. Goffner, O. Poeydomenge, A.M. Boudet, J. Grima-Pettenati, Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships, *Plant J.* 11 (1997) 429–441.
- [28] B.M. Lange, C. Lapiere, H. Sandermann Jr., Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins), *Plant Physiol.* 108 (1995) 1277–1287.
- [29] V. Lauvergeat, P. Rech, A. Jauneau, C. Guez, P. Coutos-Thevenot, J. Grima-Pettenati, The vascular expression pattern directed by the *Eucalyptus gunnii* cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species, *Plant Mol. Biol.* 50 (2002) 497–509.
- [30] M. McCann, Tracheary element formation: building up to a dead end, *Trends Plant Sci.* 2 (9) (1997) 333–338.
- [31] G. Meshitsuka, J. Nakano, Studies on the Mechanism of Lignin Color Reaction (XIII). Mäule color reaction, *Mokuzai Gakkaishi* 25 (1979) 588–594.
- [32] C.R. Metcalf, L. Chalk, *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. 2, second ed, Oxford University Press, Oxford, 1983 (pp. 297).

- [33] B.M. Moerschbacher, U. Noll, L. Gorrichon, H.J. Reisener, Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust, *Plant Physiol.* 93 (1990) 465–470.
- [34] G. Müsel, T. Schindler, R. Bergfeld, K. Ruel, G. Jacquet, C. Lapierre, V. Speth, P. Schopfer, Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes, *Planta* 201 (1997) 146–159.
- [35] T.P. O'Brian, N. Feder, M.E. McCully, Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O, *Protoplasma* 59 (1964) 368–373.
- [36] A. Patzlaff, S. McInnis, A. Courtenay, C. Surman, L.J. Newman, C. Smith, M.W. Bevan, S. Mansfield, R.W. Whetten, R.R. Sederoff, M.M. Campbell, Characterisation of a pine MYB that regulates lignification, *Plant J.* 36 (2003) 743–754.
- [37] J. Raes, A. Rohde, J. Holst-Christensen, Y. Van de Peer, W. Boerjan, Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 133 (2003) 1051–1071.
- [38] P. Ranocha, M. Chabannes, S. Chamayou, S. Danoun, A. Jauncau, A.-M. Boudet, D. Goffner, Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar, *Plant Physiol.* 129 (2002) 145–155.
- [39] P.J. Reimers, J.E. Leach, Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene Xa-10 in rice *Oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38 (1991) 39–55.
- [40] L. Rogers, M. Campbell, The genetic control of lignin deposition during plant growth and development, *New Phytol.* 164 (2004) 17–30.
- [41] J. Samaj, S. Hawkins, V. Lauvergeat, J. Grima-Pettenati, A. Boudet, Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of CAD 2 promoter in transgenic poplar shoots, *Planta* 204 (1998) 437–443.
- [42] R. Sibout, A. Eudes, B. Pollet, T. Goujon, I. Mila, F. Granier, A. Séguin, C. Lapierre, L. Jouanin, Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*, Isolation Characterization Corresponding Mutants *Plant Physiol.* 132 (2003) 848–860.
- [43] R. Sibout, A. Eudes, G. Mouille, B. Pollet, C. Lapierre, L. Jouanin, A. Séguin, Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and -D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17 (2005) 2059–2076.
- [44] P. Sivadon, J. Grima-Pettenati, Transcription control of genes involved in lignin biosyntheses, *Plantation Forest Biotech.* (2004) 203–218.
- [45] C.J.S. Smith, C.F. Watson, J. Ray, C.R. Bird, P.C. Morris, W. Schuch, D. Grierson, Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes, *Nature* 334 (1988) 724–726.
- [46] B. Soltani, J. Ehrling, B. Hamberger, C. Douglas, Multiple *cis*-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members, *Planta* 224 (2006) 1226–1238.
- [47] N. Tokunaga, N. Sakakibara, T. Umezawa, Y. Ito, H. Fukuda, Y. Sato, Involvement of extracellular dilignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells, *Plant Cell Physiol.* 46 (2005) 224–232.
- [48] S. Turner, L.E. Sieburth, Vascular patterning, *Arabidopsis Book* 5 (2002) 1–23.
- [49] Z.-H. Ye, G. Freshour, M.G. Hahn, D.H. Burk, R. Zhong, Vascular development in *Arabidopsis*, *Int. Rev. Cytol.* 220 (2002) 225–256.

RESULTATS
CHAPITRE II

A. Obtention des lignées *Arabidopsis* transgéniques surexprimant *EgMYB* et leurs versions dominantes négatives

Deux écotypes d'*A. thaliana*, WS et Col-0, ont été utilisés pour la transformation. Ces deux écotypes ont été choisis pour deux raisons : augmenter les chances d'obtenir des transformants sachant que l'efficacité de transformation peut varier en fonction de l'écotype, et augmenter la possibilité d'obtenir des phénotypes par la variabilité génotypique et morphologique observée entre ces écotypes.

Les transformations ont été réalisées avec six constructions différentes (Fig. 24). Trois constructions, appelées *EgMYB1*⁺, *EgMYB2*⁺ et *EgMYB4*⁺, doivent permettre la surexpression des gènes d'*Eucalyptus* *EgMYB1*, *EgMYB2* et *EgMYB4* chez *A. thaliana*. Les trois autres constructions, appelées *EgMYB1*⁻, *EgMYB2*⁻ et *EgMYB4*⁻, correspondent aux versions tronquées ne contenant plus que le domaine de fixation à l'ADN. Ces constructions sont utilisées dans l'objectif d'empêcher la fixation de facteurs Myb endogènes (mutants dominants négatifs). Une transformation témoin a également été réalisée avec le vecteur pJR1 afin d'écartier la possibilité d'un effet provoqué par la présence de l'ADN-T.

Des analyses phénotypiques précoces des plantes transgéniques T1 et T2 (écotypes WS et Col-0) ont montré que seules les lignées *EgMYB1*⁺ et *EgMYB2*⁺ sont associées avec un phénotype différent du type sauvage, et ceci pour les deux écotypes utilisés. Du fait que des différences phénotypiques semblables aient été observées pour les deux écotypes, nous avons décidé de continuer nos analyses en utilisant l'écotype WS. La production des générations de lignées transgéniques homozygotes T4 d'*A. thaliana* a été réalisée uniquement pour ces constructions : *EgMyb1*⁺, *EgMyb2*⁺ (Myb constitutivement transcrit) et le vecteur vide pJR1. Nous avons généré 20 lignées de plantes *EgMyb1*⁺, 18 lignées de plantes *EgMyb2*⁺ et 4 lignées de pJR1.

La présence du transgène dans chacune des lignes transgéniques T4 a été confirmée par PCR (données non montrées) en utilisant des amorces (voir annexe) correspondant à *EgMyb1*⁺, *EgMyb2*⁺ et le gène de résistance à la kanamycine. Une inspection visuelle des plantes a indiqué que 19/20 lignées *EgMyb1*⁺ et 16/18 lignées *EgMyb2*⁺ montraient un phénotype marqué (phénotype nain et voir ci-dessous). Nous avons décidé de retenir quatre lignées d'*EgMyb1*⁺ (lignées 5, 9, 11, 20), quatre lignées d'*EgMyb2*⁺ (lignées 4, 12, 14, 16) et deux lignées de pJR1 pour des études plus approfondies. L'expression du transgène dans ces lignées a été vérifiée par RT-PCR semi-quantitative (Fig. 25). Ces résultats révèlent la

(A) Surexpression

(B) Mutants dominant négatifs

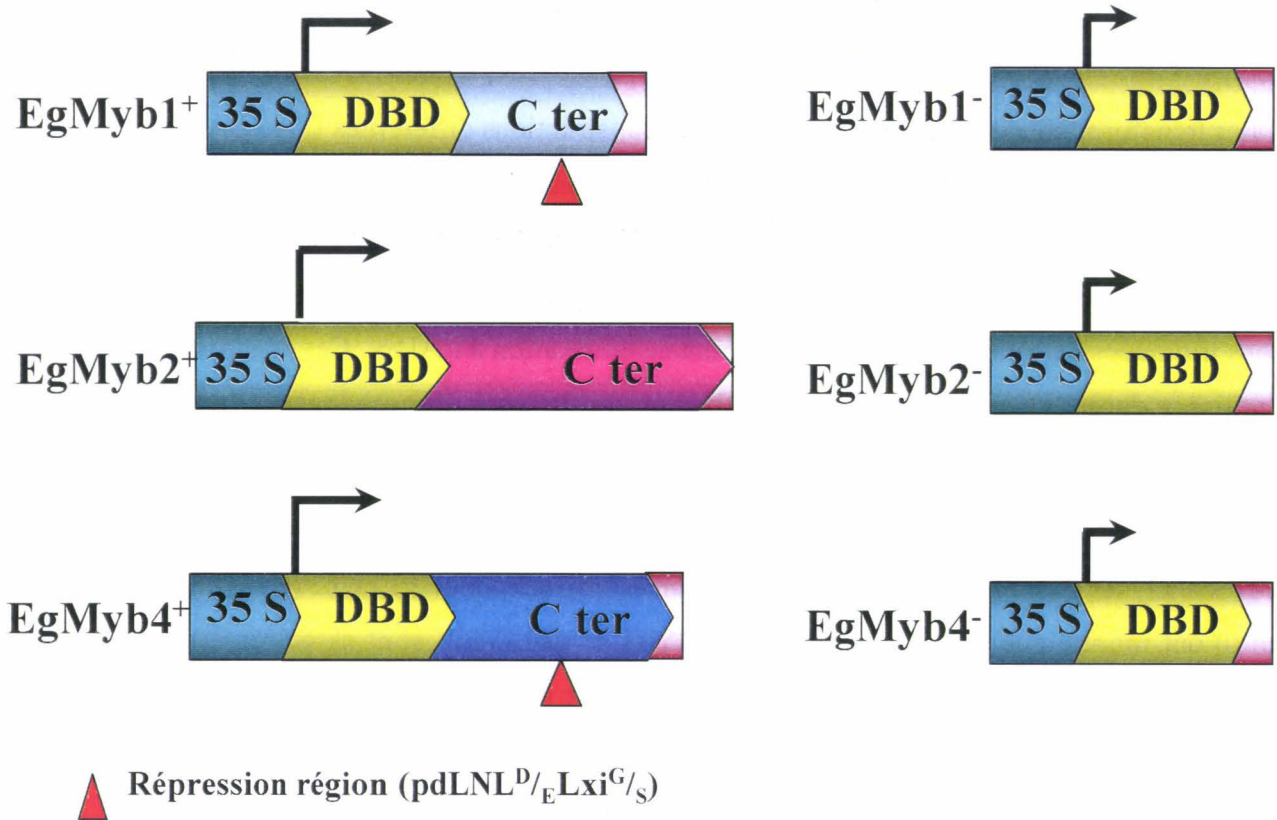


Figure 24: Les constructions de facteurs *EgMybs* d'*Eucalyptus* sous contrôle de promoteur 35S utilisées dans la transformation d'*A. thaliana*. A. Constructions utilisées pour la surexpression. B. Constructions utilisées pour le mutant dominant négatif.

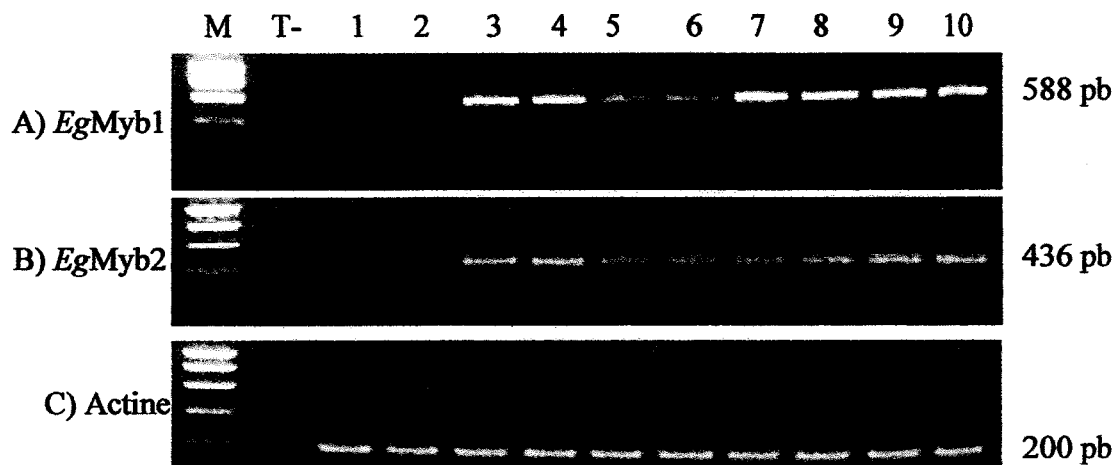


Figure 25 : Expression des gènes *EgMyb1* et *EgMyb2* par RT-PCR. Les ARNs totaux étaient extraits des plantes cultivées à la serre et âgées deux mois. Les ADNc, ainsi obtenus par la transcription inverse, ont été amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques de gènes Myb et actine- β (utilisée pour normalisation; tableau 11). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. A : Avec des amorces de Myb1 .B : Avec des amorces de Myb2. C : Avec des amorces de l'actine.

Piste T- : Témoin négatif (sans ADNc)

Piste 1 : Hampe florale plantes pJR1

Piste 2 : Feuille plantes pJR1

Piste 3 : Hampe florale plantes *EgMyb1*⁺, lignées 5+9

Piste 4 : Feuille plantes *EgMyb1*⁺, lignées 5+9

Piste 5 : Hampe florale plantes *EgMyb1*⁺, lignées 11+20

Piste 6 : Feuille plantes *EgMyb1*⁺, lignées 11+20

Piste 7 : Hampe florale plantes *EgMyb2*⁺, lignées 4+12

Piste 8 : Feuille plantes *EgMyb2*⁺, lignées 4+12

Piste 9 : Hampe florale plantes *EgMyb2*⁺, lignées 14+16

Piste 10 : Feuille plantes *EgMyb2*⁺, lignées 14+16

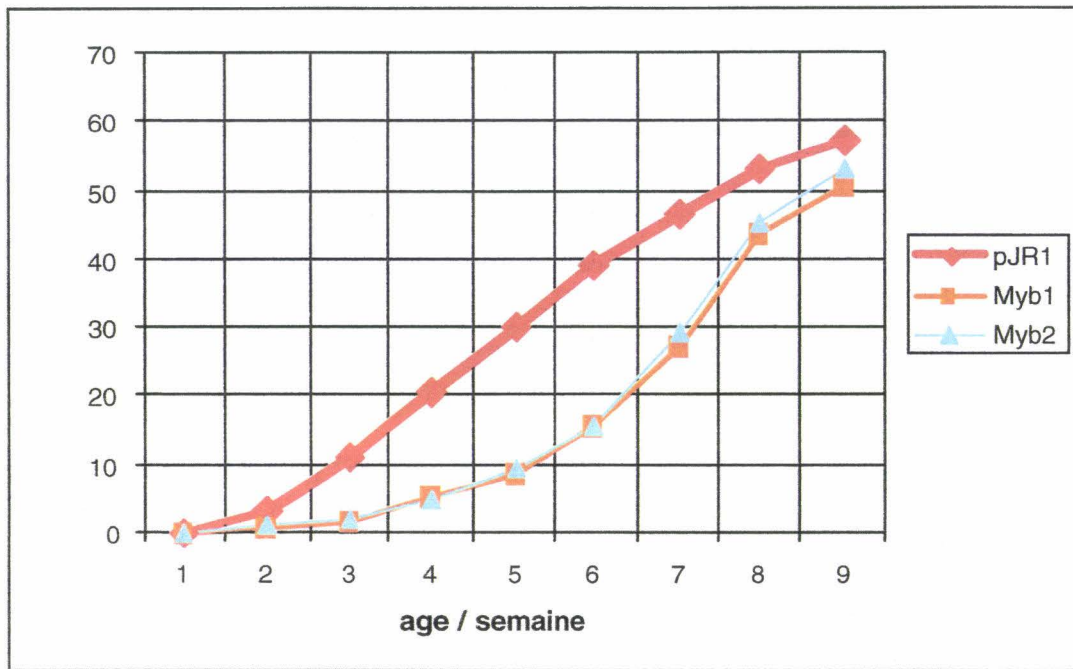


Figure 26: La croissance de la hampe florale en hauteur pour les plantes témoins pJR1 et les lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺

présence de transcrits de 588 pb et 436 pb correspondant aux transcrits des gènes *EgMyb1* et *EgMyb2* respectivement. Ces résultats montrent que les deux gènes sont bien exprimés à la fois dans les feuilles et les hampes florales des lignées homozygotes.

B. Caractérisation phénotypique des plantes *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺

B1 – Analyses phénotypiques

Un suivi détaillé de la germination et de la croissance de lignées transformées par le vecteur vide (plantes pJR1) a indiqué que ces plantes se comportent d'une façon identique aux plantes sauvages. En revanche, les quatre lignées *EgMyb1*⁺ et les 4 lignées *EgMyb2*⁺ montrent plusieurs différences de comportement par rapport aux plantes pJR1 et aux plantes sauvages.

Premièrement, les graines des plantes Myb (2 constructions) germent, en règle générale, 2 à 3 jours plus tard que les graines des plantes pJRA/sauvages. Ce phénomène était plus marqué pour les plantes *EgMyb1*⁺. Le retard dans la germination était également associé à une croissance et un développement moins rapides en comparaison avec les plantes pJR1/sauvages. Un suivi de la hauteur de la hampe florale (Fig. 26) a permis de mettre en évidence que le retard peut être détecté à partir de la première semaine et qu'il continue jusqu'à la fin du suivi (10 semaines). La différence en hauteur de la hampe florale est la plus marquée entre les semaines 4 et 6 (hauteur de la hampe florale de plantes pJR1 = approximativement 3 fois celle des plantes *EgMyb1*⁺/*EgMyb2*⁺). D'une façon intéressante, la croissance de la hampe florale chez les plantes Myb rattrape celle des plantes pJR1 vers la huitième/neuvième semaine. Ceci pourrait suggérer que la croissance et le développement, chez les plantes Myb, ne sont pas arrêtées, mais simplement retardées pendant les 6 premières semaines.

Le retard important dans la croissance de la hampe florale noté vers un mois est également associé à d'autres modifications phénotypiques (Fig. 27). Par exemple, le diamètre de la rosette de feuilles (Fig. 27b, Figs. 28, 29) et la taille des feuilles (Fig. 27c, Figs. 28, 29) sont également diminués. D'une façon intéressante, le développement des feuilles chez les plantes Myb ne rattrape pas celui des plantes pJR1 comme observé pour la hampe florale. Les plantes Myb montraient parfois également une perte de dominance apicale caractérisée par la production d'un nombre élevé de hampes florales secondaires (Fig. 27d). Le développement floral était également caractérisé, pour les deux plantes Myb, par la perte d'une structure florale ce qui est probablement responsable de la production de siliques sans graine (Fig. 27c).

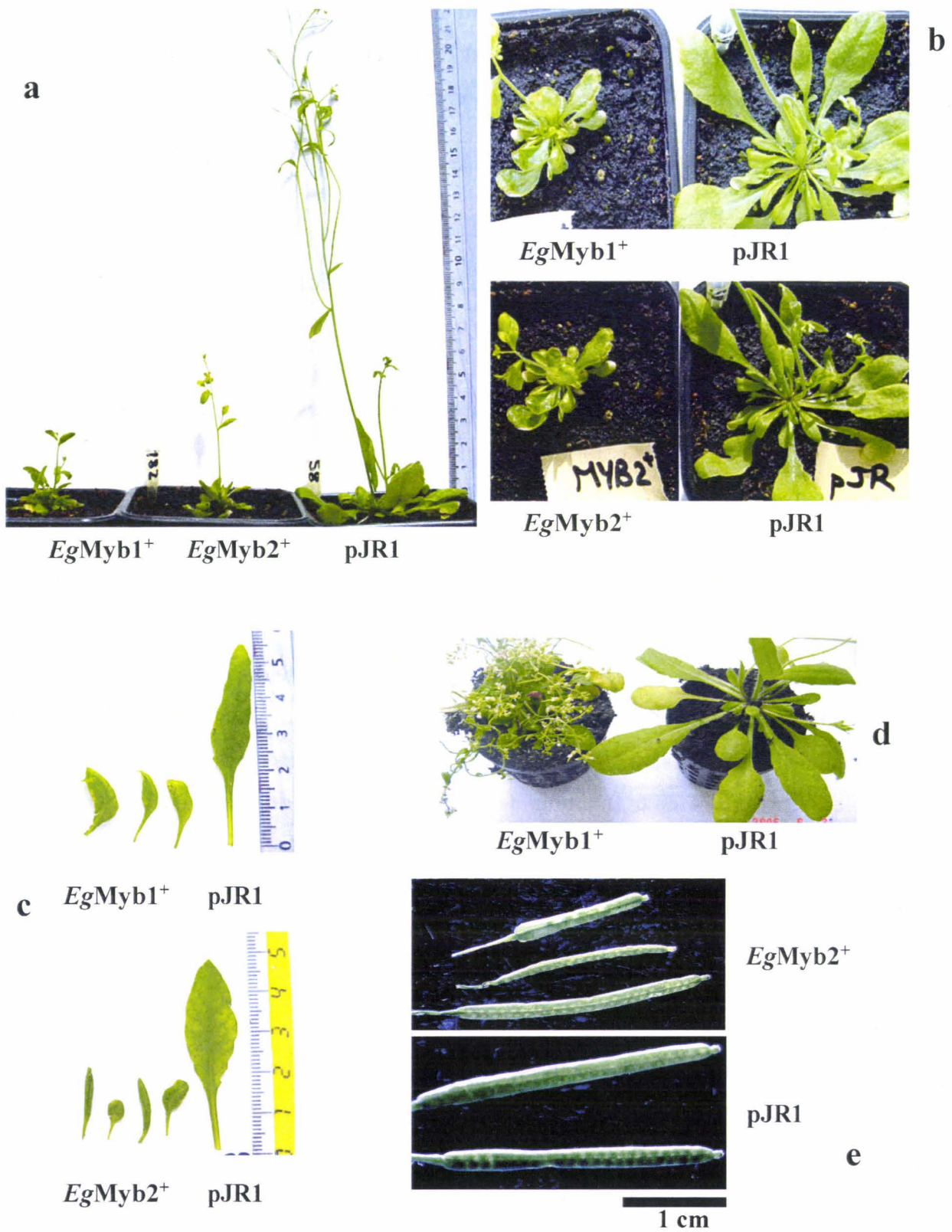


Figure 27: Phénotypes des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* écotype (WS) transformées par pJR1, 35S::MYB2+ et 35S::MYB2+. Les plantes sont âgées d'un mois sauf les siliques proviennent des plantes âgées de deux mois. Le retard de croissance a observé en forme des plantes nains sur la hampe florale (A), la rosette (B) les feuilles (C) et les siliques (E) et accompagné avec une perte de la dominance apicale (D).

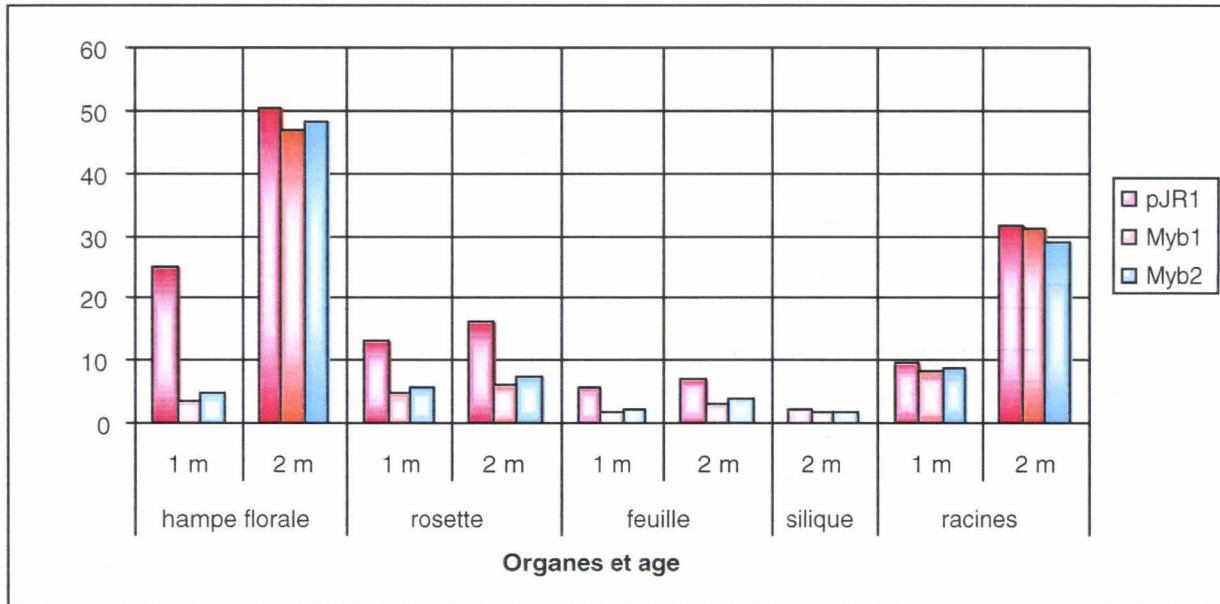
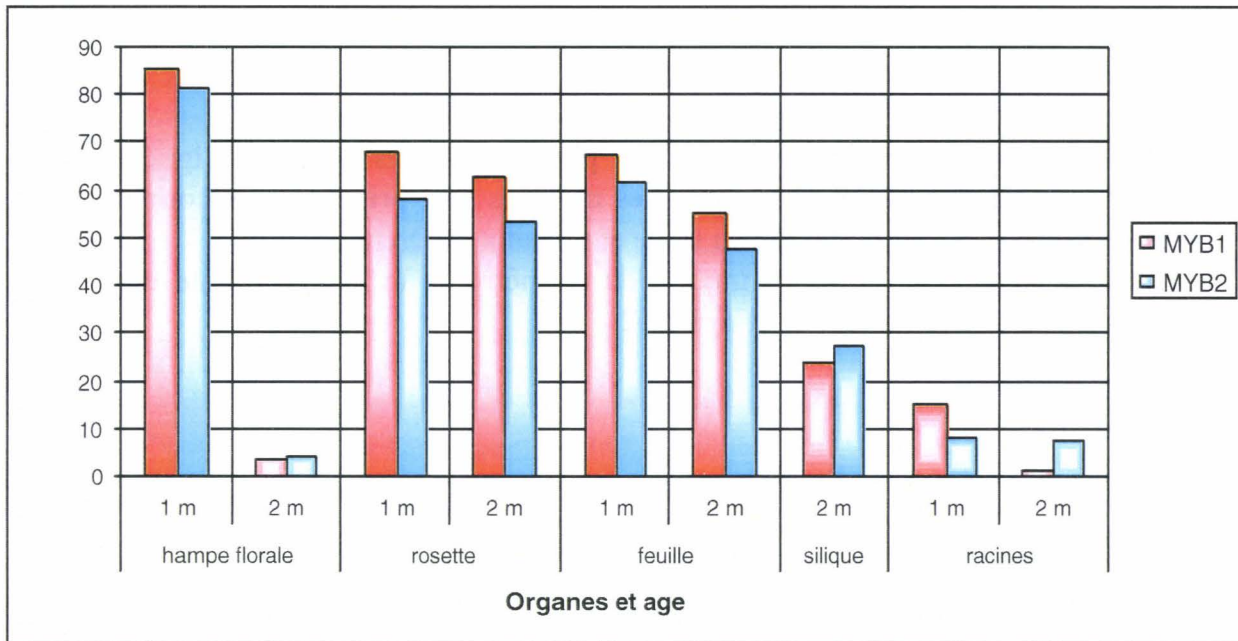
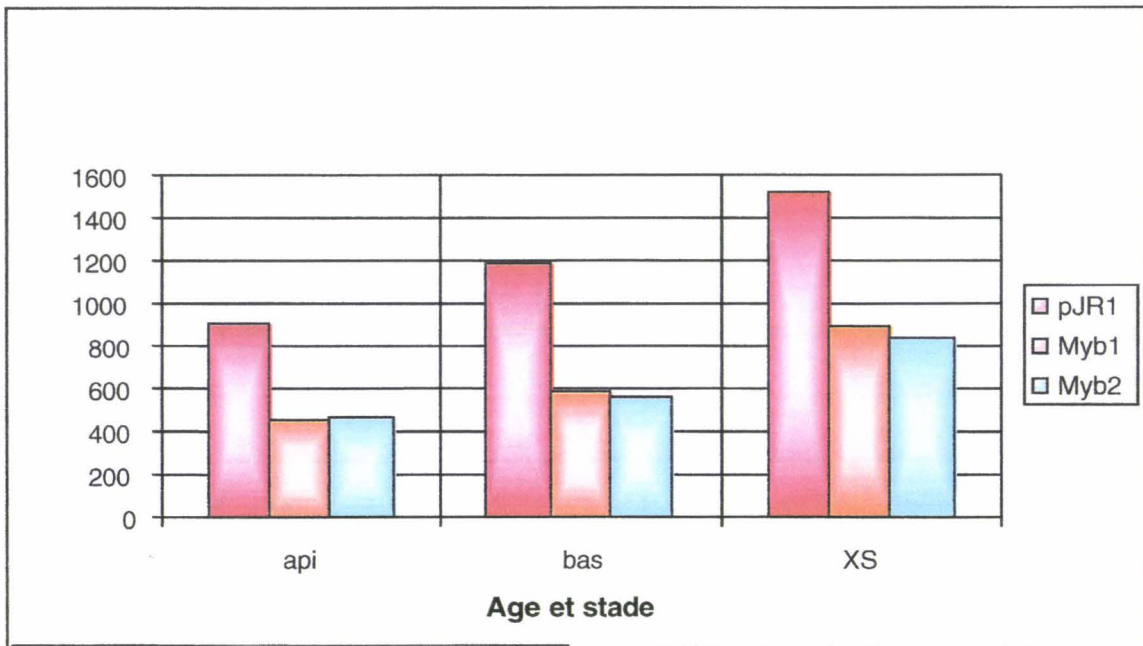


Figure 28: La taille des organes de plantes témoins pJR1 et les lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺.



age	echantillon	H. florale	Rosette	Feuille	Silique	Racine
1 mois	Myb1	85,58	67,72	67,15	0	NS
	Myb2	81,55	58,27	61,37	0	NS
2 mois	Myb1	NS	62,64	55,15	23,57	NS
	Myb2	NS	53,61	47,35	27,21	NS

Figure 29: Le pourcentage de diminution de tailles des organes des lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺ par rapport aux plantes témoins pJR1.
NS = Différence non significative



		di
Myb1	api	49,7
Myb2	api	48,2
Myb1	bas	51,46
Myb2	bas	49,56
Myb1	XS	41,6
Myb2	XS	44,31

Figure 30 : Le diamètre de la h. florale des plantes témoins pJR1 et Lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺. Ces mesures sont pris dans des coupes transversales de la hampe florale au stade et niveaux différents.

Le tableau montre le % de diminution du diamètre de la hampe florale des lignées transgénique *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺.

De plus, les siliques des plantes Myb étaient plus petites avec une surface plus rugueuse que dans le cas des plantes pJR1 (Fig. 27c).

B2 – Analyses histologiques.

La diminution, chez les plantes Myb, de la hauteur de la hampe florale était également associée à une diminution de son diamètre. Afin de vérifier si cette réduction était répartie d'une façon égale dans la hampe florale, nous avons mesuré le diamètre à deux niveaux (apical et basal) dans les plantes âgées d'un mois, et au niveau basal (caractérisé par la présence du xylème secondaire chez les plantes pJR1) dans les plantes âgées de deux mois. Ces résultats (Fig. 30) montrent que la diminution du diamètre de la hampe florale dans les plantes Myb âgées d'un mois était de l'ordre de 50 %, et ceci aux deux niveaux analysés. Malgré le fait que les hauteurs des hampes florales des plantes Myb âgées de deux mois rattrapent celles des plantes pJR1, les diamètres des ces hampes florales restent inférieurs (de l'ordre de 42 %) à ceux des plantes pJR1.

Ayant mis en évidence une diminution très importante dans le diamètre de la hampe florale chez les plantes Myb, nous avons décidé d'examiner la structure générale et l'organisation des différents tissus de la hampe florale. Est ce que la diminution du diamètre est liée à une diminution dans tous les tissus, ou est ce que certains tissus sont plus affectés que d'autres ? Afin de répondre à ces questions et d'examiner l'organisation générale des tissus dans les plantes Myb, nous avons fait des inclusions et réalisé des coupes transversales semi-fines (5µm) d'échantillons de hampe florale de plantes âgées d'un mois (niveaux apical et basal) et de plantes âgées de deux mois (niveau basal). Les coupes étaient colorées au Toluidine-Blue-O (TBO) pour visualiser la structure générale et au réactif de Weisner (Phloroglucinol-HCl) pour apporter des informations histochimiques sur la distribution de tissus lignifiés.

Une première observation (données non montrées) a révélé qu'aucune différence dans l'organisation générale des tissus, ni dans la distribution des tissus lignifiés, n'a pu être détectée entre les plantes non-transformées et les plantes transformées par le vecteur vide (pJR1). Ainsi, nous avons comparé directement les plantes pJR1 avec les plantes Myb. Ensuite, la comparaison des hampes florales (niveau apical) des plantes pJR1, *EgMyb1⁺* et *EgMyb2⁺* (Fig. 31) a montré que l'organisation générale des différents tissus (épiderme, cortex, phloème, xylème, moëlle) était assez comparable dans tous les cas. Cependant la coloration au TBO (Fig. 31 a, c, e) suggère que le xylème et les fibres interfasciculaires sont

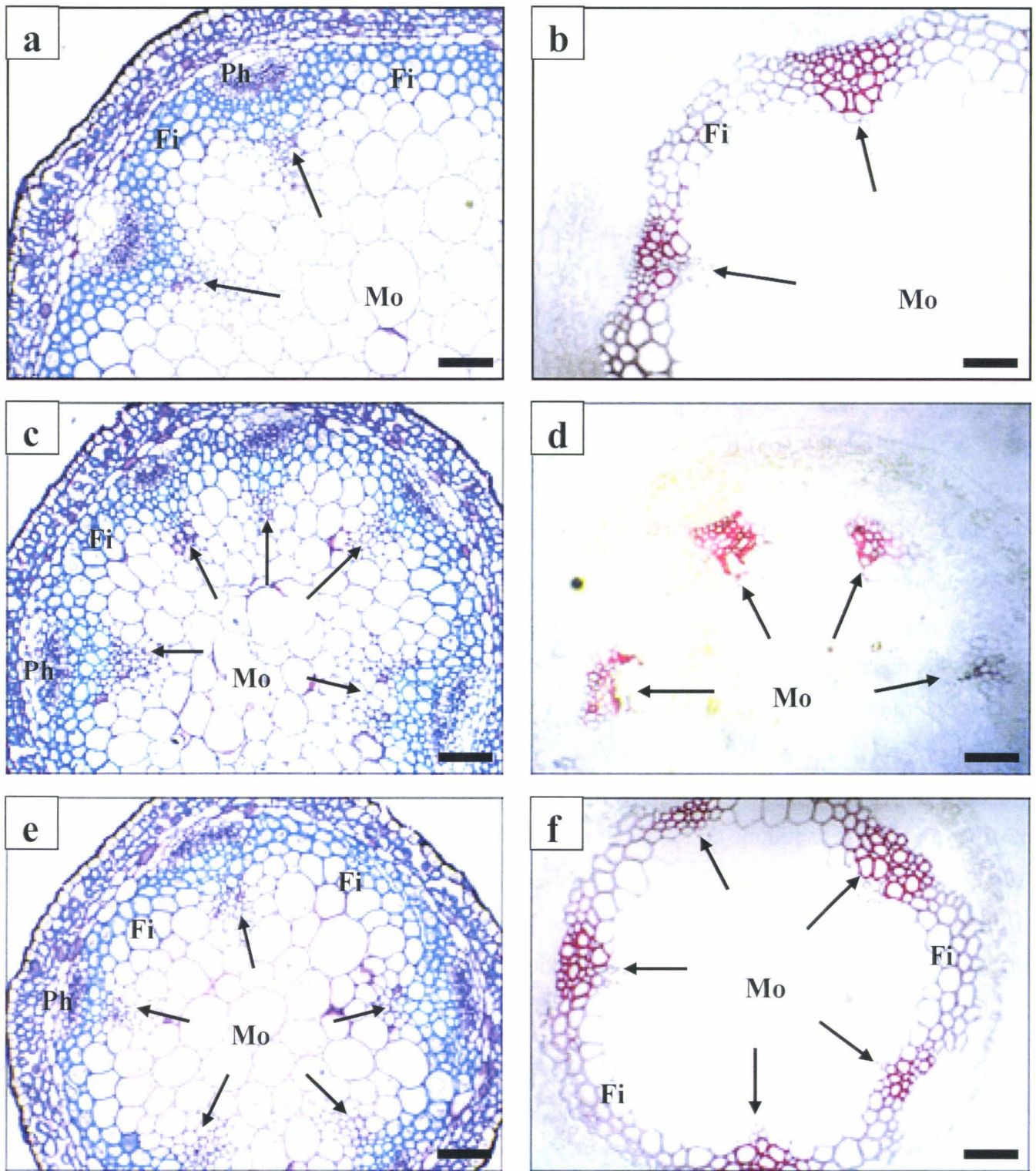


Figure 31 : Vue générale des coupes transversales de la zone apicale de la hampe florale de jeunes plantes (1mois) d'*A. thaliana* transformées par pJR1 (a,b), *EgMyb1*⁺ (c,d) et *EgMy2*⁺ (e,f) développée comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Les coupes semi-fines (5μm) sont colorées par le bleu de toluidine (TBO) (a,c et e) et par le phloroglucinol-HCl (b,d et f). Les flèches indiquent les paquets du xylème primaire. Fi = Fibres interfasciculaires, Mo = Moëlle, Ph = Phloème. Bar d'échelle = 20 μm.

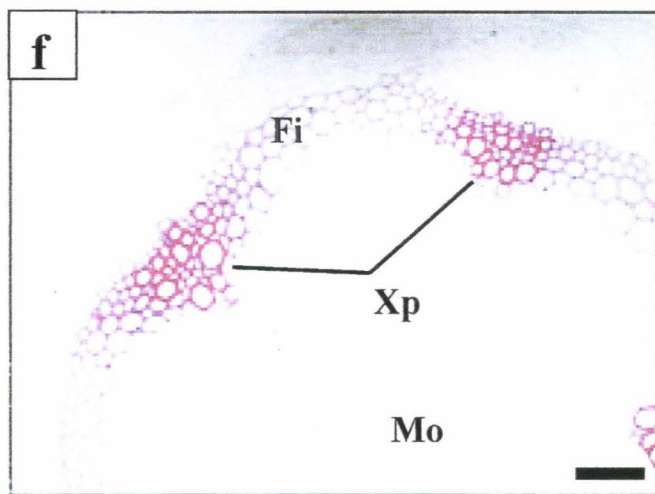
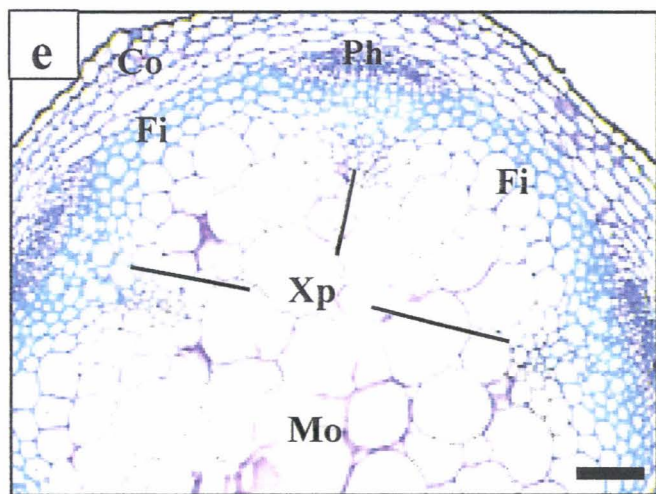
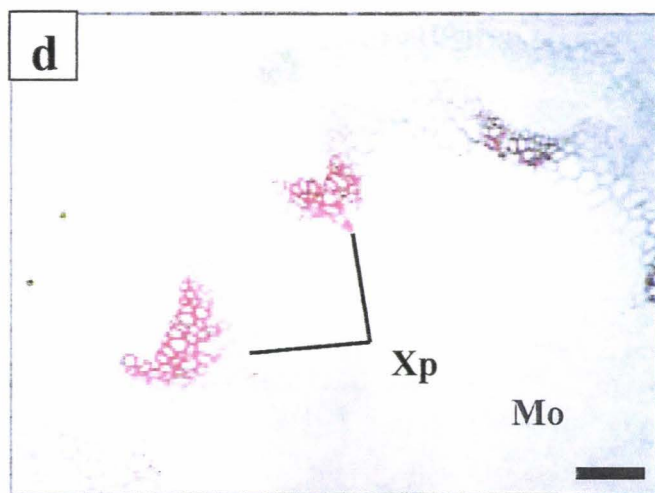
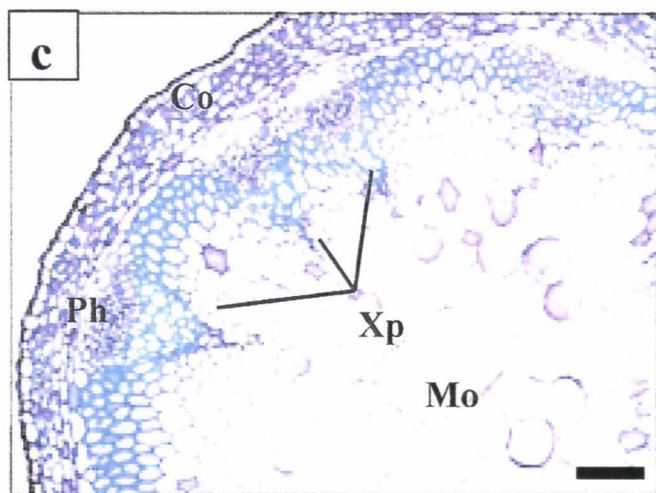
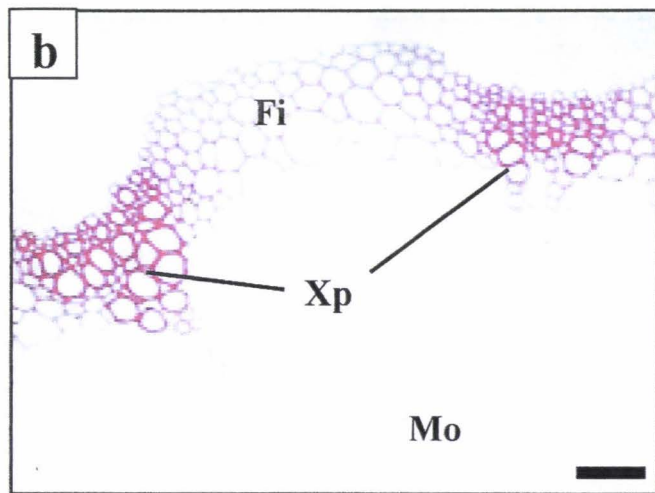
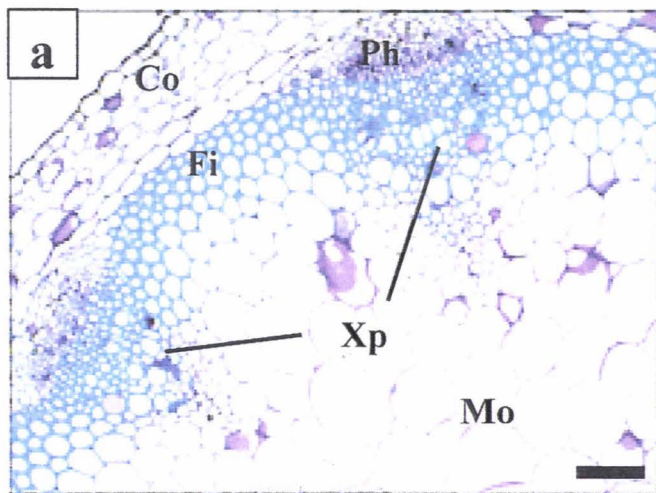


Figure 32 : Coupes transversales de la zone basale de la hampe florale des plantes âgées 1 mois d'*A. thaliana* transformées par pJR1 (a,b), EgMyb1⁺ (c,d) et EgMyb2⁺ (e,f). Les coupes semi-fines (5µm) ont colorées par le bleu de toluidine (TBO) (a,c et e) et par phloroglucinol-HCl (b,d et f). Co = Cortex, Fi = Fibres interfasciculaires, Mo = Moëlle, Ph = Phloème, Xp = Xylème primaire. Bar d'échelle = 20 µm.

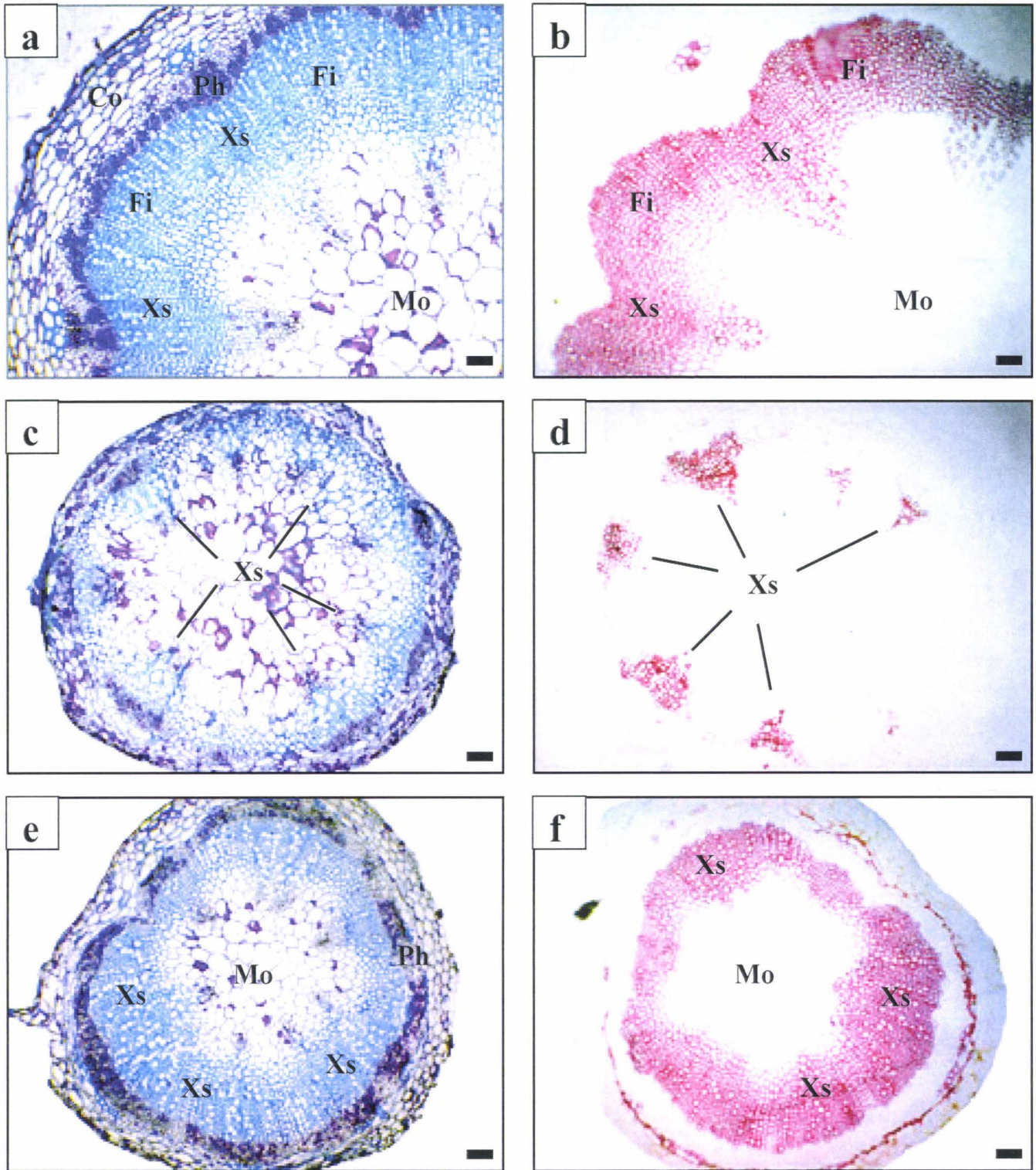


Figure 33 : Vue générale des coupes transversales de la hampe florale des plantes âgées 2 mois d'*A. thaliana*, transformées par pJR1 (a,b), *EgMyb1*⁺ (c,d) et *EgMy2*⁺ (e,f). Les coupes semi-fines (5 μm) sont colorées par le bleu de toluidine (TBO) (a,c et e) et par le phloroglucinol-HCl (b,d et f). Co = Cortex, Fi = Fibres interfasciculaires, Mo = Moëlle, Ph = Phloème, Xs = Xylème secondaire. Bar d'échelle = 20 μm.

moins développés dans les plantes *EgMyb1*⁺ que dans les plantes *pJR1* et *EgMyb2*⁺. Ce manque de développement est caractérisé par la forme plus « étoilée » de la moëlle chez les plantes *EgMyb1*⁺ (Fig. 31 c). Cependant, la coloration au réactif de Weisner (Fig. 31 b, d, f) a pu confirmer cette modification chez les plantes *EgMyb1*⁺. En effet, les fibres interfasciculaires, chez les plantes *EgMyb1*⁺, donnent une réaction négative (pas de coloration rouge) avec le phloroglucinol indiquant que leurs parois ne sont pas lignifiées au contraire des fibres des plantes *pJR1* et *EgMyb2*⁺. De plus, le xylème primaire semble montrer une diminution dans la taille de cellules xylémiennes des faisceaux vasculaires avec, dans certains cas, une diminution très marquée du nombre de cellules ayant des parois lignifiées. En revanche, la coloration au Phloroglucinol-HCl des plantes *EgMyb2*⁺ ne montre pas de différence majeure avec les plantes *pJR1*.

L'examen du niveau basal des hampes florales de plantes âgées d'un mois (Fig. 32) confirme ces différences. Bien que la coloration au TBO (Fig. 32 c) suggèrerait que la quantité de fibres interfasciculaires chez les plantes *EgMyb1*⁺ soit comparable à celle des plantes *pJR1* (Fig. 32 a), la coloration au réactif de Weisner (Fig. 32 d) indique clairement que les parois de ces cellules ne sont pas ou peu lignifiées. De plus, le développement du xylème primaire (Fig. 40 d) semblerait retardé en comparaison avec celui du xylème primaire chez les plantes *pJR1* (Fig. 32 b). Encore une fois, les cellules du xylème primaire sembleraient plus petites chez les plantes *EgMyb1*⁺. En comparaison, les tissus vasculaires des plantes *EgMyb2*⁺ (Fig. 32 e, f) sembleraient beaucoup plus comparables à ceux des plantes *pJR1* (Fig. 32 a, b). Cependant, la quantité de xylème primaire et de fibres interfasciculaires sembleraient moins importante chez ces plantes en comparaison avec les plantes *pJR1*.

Dans les plantes âgées de deux mois (Fig. 33), les différences au niveau des tissus vasculaires sont plus flagrantes. En effet, bien que la quantité de xylème primaire chez les plantes *EgMyb1*⁺ (Figs. 33 c, d ; 34 b, d) soit plus importante que chez les plantes âgées d'un mois (Figs. 31, 32), les hampes florales des plantes *EgMyb1*⁺ sont caractérisées par l'absence de xylème secondaire – tissu qui est présent chez les plantes *pJR1* (Figs. 33 a, b ; 34 a, c) et *EgMyb2*⁺ (Fig. 33 e, f). A ce stade, les faisceaux vasculaires primaires chez les plantes *EgMyb1*⁺ sont séparés par des fibres interfasciculaires qui se lignifient faiblement (coloration rose pâle : Fig. 33 d), mais des vaisseaux caractéristiques du xylème ne peuvent pas être détectés. L'absence de xylème secondaire chez les plantes *EgMyb1*⁺ est également associée à une faible quantité de phloème secondaire (Figs. 33 c, d ; 34 b, d) en comparaison avec les plantes *pJR1* (Figs. 33 a, b ; 34 a, c) et *EgMyb2*⁺ (Fig. 33 e, f). En revanche, les hampes

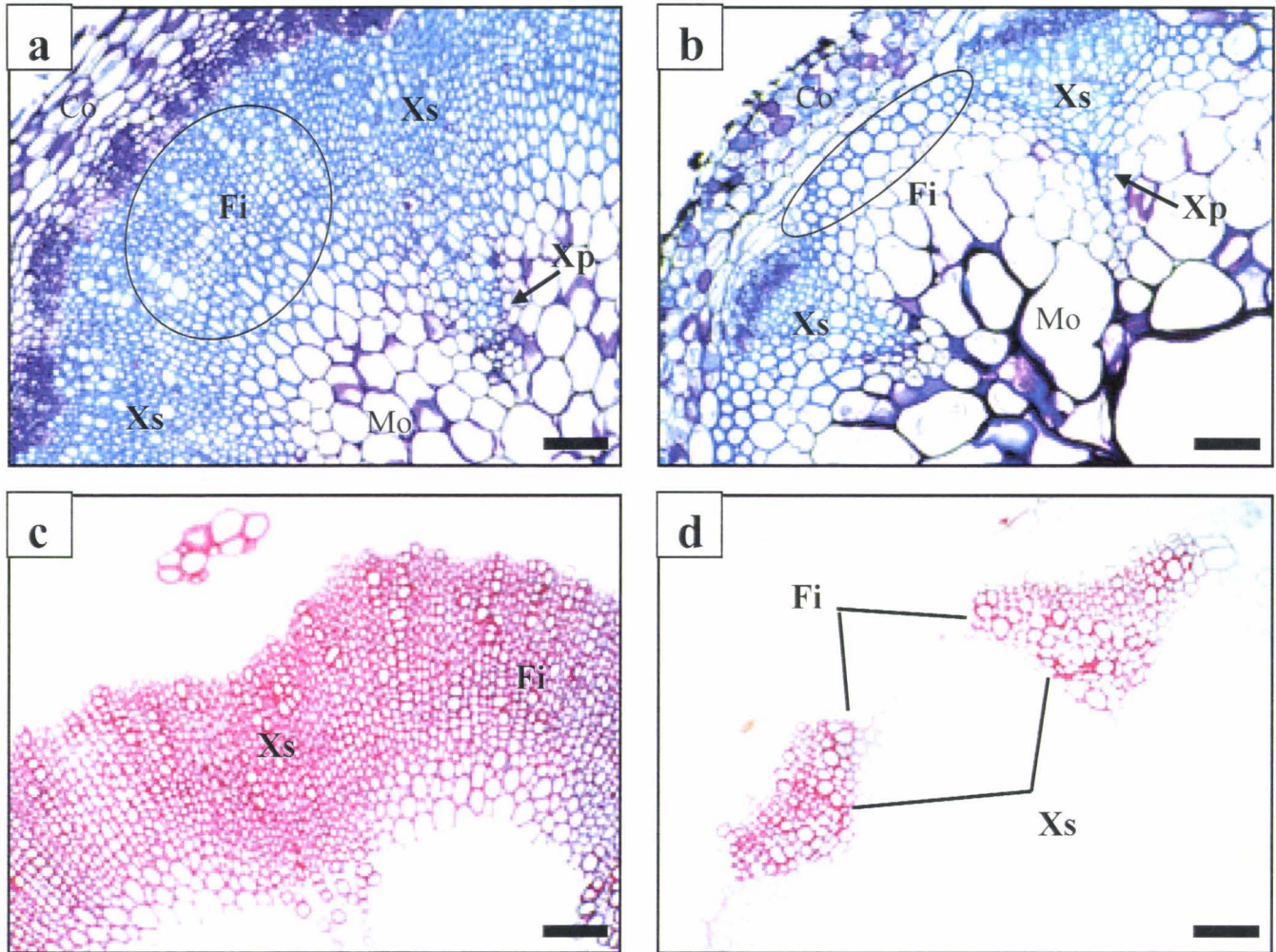


Figure 34 : Le phénotype transgénique d'*EgMyb1*⁺ et l'analyse histochimique des tissus vasculaires. Coupes transversales dans la hampe florale des lignées témoins (a,c) et des lignées transgéniques d'*EgMyb1*⁺ (b,d) d'*A. thaliana*. Les coupes sont colorées au TBO (a,b) et au test de Weisner (phloroglucinol-HCl) (c,d). Toutes les coupes proviennent de plantes âgées de deux mois. Les cercles indiquent les zones des fibres interfasciculaires (Fi). Co = Cortex, Mo = Moëlle, Xp = Xylème primaire, Xs = Xylème secondaire. Barre d'échelle = 20 μm.

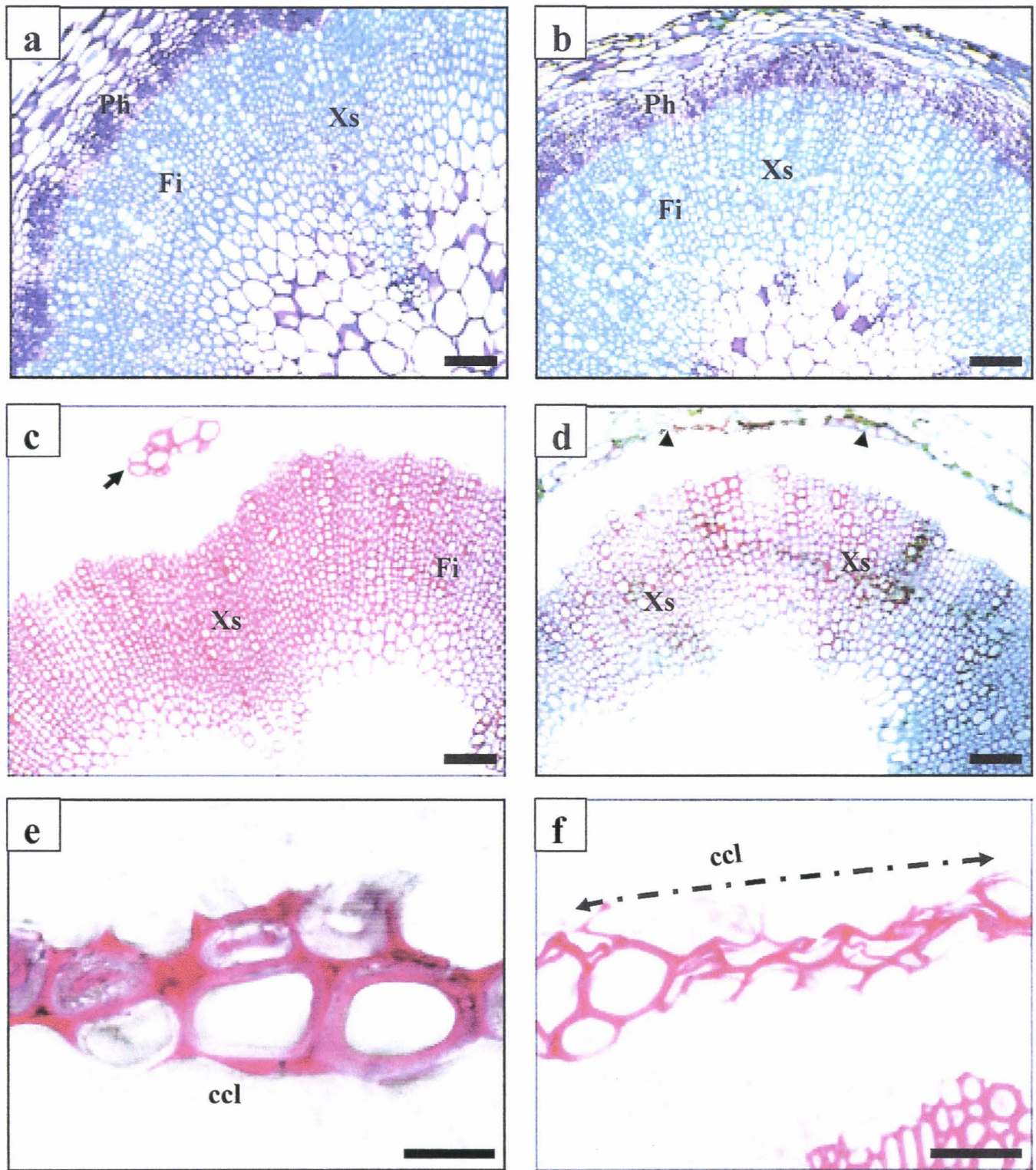


Figure 35: Le phénotype transgénique d'*EgMyb2*⁺ et l'analyse histochemique des tissus constitutifs de la hampe florale d'*A. thaliana*. Coupes transversales représentant des lignées témoins (a,c,e) et des lignées transgéniques d'*EgMyb2*⁺ (b,d,f). Les coupes (a,b) sont colorées par TBO et par phloroglucinol-HCl (c,d,e,f). Les coupes proviennent de plantes âgées de deux mois. Les têtes de flèches indiquent les cellules corticales lignifiées (ccl). Fi = Fibres interfasciculaire, Ph = Phloème, Xs = Xylème secondaire. Barre d'échelle = 20 μm (a,b,c,d) et = 10μm (e,f).

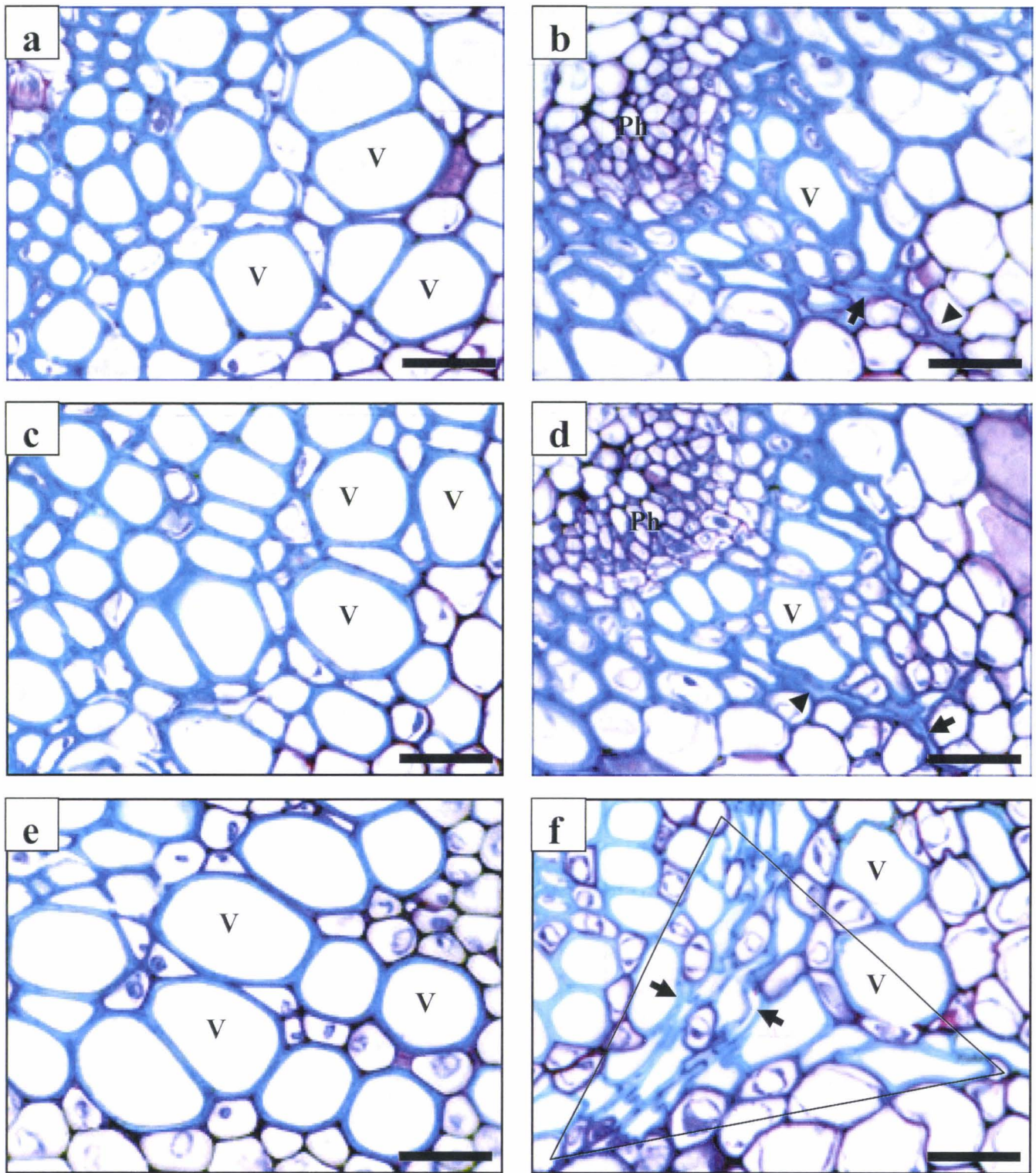


Figure 36 : Tissus vasculaires du phénotype transgénique d'*EgMyb1*⁺. Coupes transversales colorées par TBO avec objective élevé de système vasculaire de la hampe florale d'*A. thaliana*. Ces coupes transversales proviennent des lignées témoins (a,c,e) et des lignées transgéniques d'*EgMyb1*⁺ (b,d,f). Les coupes (a,b,c,d) proviennent des plantes âgées (1 mois) à deux niveaux, apical (a,b) et basal (c,d) et des plantes âgées de 2 mois (e,f). Le triangle indique le xylème primaire chez les plantes âgées et les têtes de flèches indiquent les vaisseaux écrasés. Ph = Phloème, V = Vaisseaux. Barre d'échelle = 10 um.

florales des plantes *EgMyb2*⁺ (Figs. 33 e, f ; 34 b, d) contiennent une quantité de xylème et de phloème secondaire comparable à celle des plantes pJR1 (Figs. 33 a, b ; 34 a, c), même si leur développement semble plus hétérogène. Cependant, les hampes florales de plantes *EgMyb2*⁺ (Fig. 33 f) se distinguent également des plantes pJR1 (Fig. 33 b) (et des plantes *EgMyb1*⁺) par la présence d'un cerne de cellules corticales lignifiées.

Bien que les cellules corticales lignifiées soient présentes dans les plantes pJR1 (Fig. 35 c), ces cellules sont associées en petits groupes isolés correspondant probablement à des fibres périphloémiennes. Un agrandissement de cette zone (Fig. 35 e) permet de confirmer cette hypothèse. En effet, les parois de ces cellules sont épaisses et bien lignifiées ce qui est caractéristique de ce tissu sclérenchymateux chez *Arabidopsis*. En revanche, un agrandissement des cellules corticales des plantes *EgMyb2*⁺ (Fig. 35 f) révèle que les parois sont généralement moins épaisses. D'une façon intéressante, quelques cellules montrent un phénotype « collapsé » suggérant que leurs parois sont (par endroit) mécaniquement plus faible, malgré la présence de lignine (coloration rouge).

Des agrandissements du xylème primaire de plantes *EgMyb1*⁺ (Figs. 36 b, d, f ; 37 b, d, f) ont également permis de mettre en évidence des différences importantes entre ces plantes et les plantes pJR1 (Figs. 36 a, c, e ; 37 a, c, e). En effet, ces images montrent que la formation de ce tissu est perturbée chez les plantes *EgMyb1*⁺. Premièrement, les cellules de plantes *EgMyb1*⁺ apparaissent plus petites et, d'une façon générale, il est moins facile de distinguer, d'une façon certaine, les vaisseaux des autres cellules xylémiennes – surtout dans les plantes âgées d'un mois (niveaux apical et basal). La coloration due au réactif de Weisner est également moins intense dans les plantes *EgMyb1*⁺ âgées d'un mois (Fig. 37 b, d), suggérant une plus faible lignification. Ce phénomène est également associé à un phénotype de cellules collapsées (Figs. 36 b, d ; 37 b, d) suggérant une plus faible résistance mécanique, même si la paroi secondaire de ces cellules semble aussi épaisse que chez les plantes pJR1 (Figs. 36 a, c ; 37 a, c). A deux mois, le niveau de lignification (évalué par l'intensité de la coloration rouge) dans le xylème primaire plus âgé des plantes *EgMyb1*⁺ (Fig. 37 f) semble comparable à celui des plantes pJR1 (Fig. 37 e). De même, des vaisseaux peuvent être identifiés de façon claire. Cependant, le plus jeune xylème est toujours caractérisé par la présence de cellules collapsées (Figs. 36 f, 37 f) et, dans certains cas, il semblerait que le lumen de certaines cellules soit rempli avec un dépôt de matériel polyphénolique (réaction positive avec le réactif de Weisner).

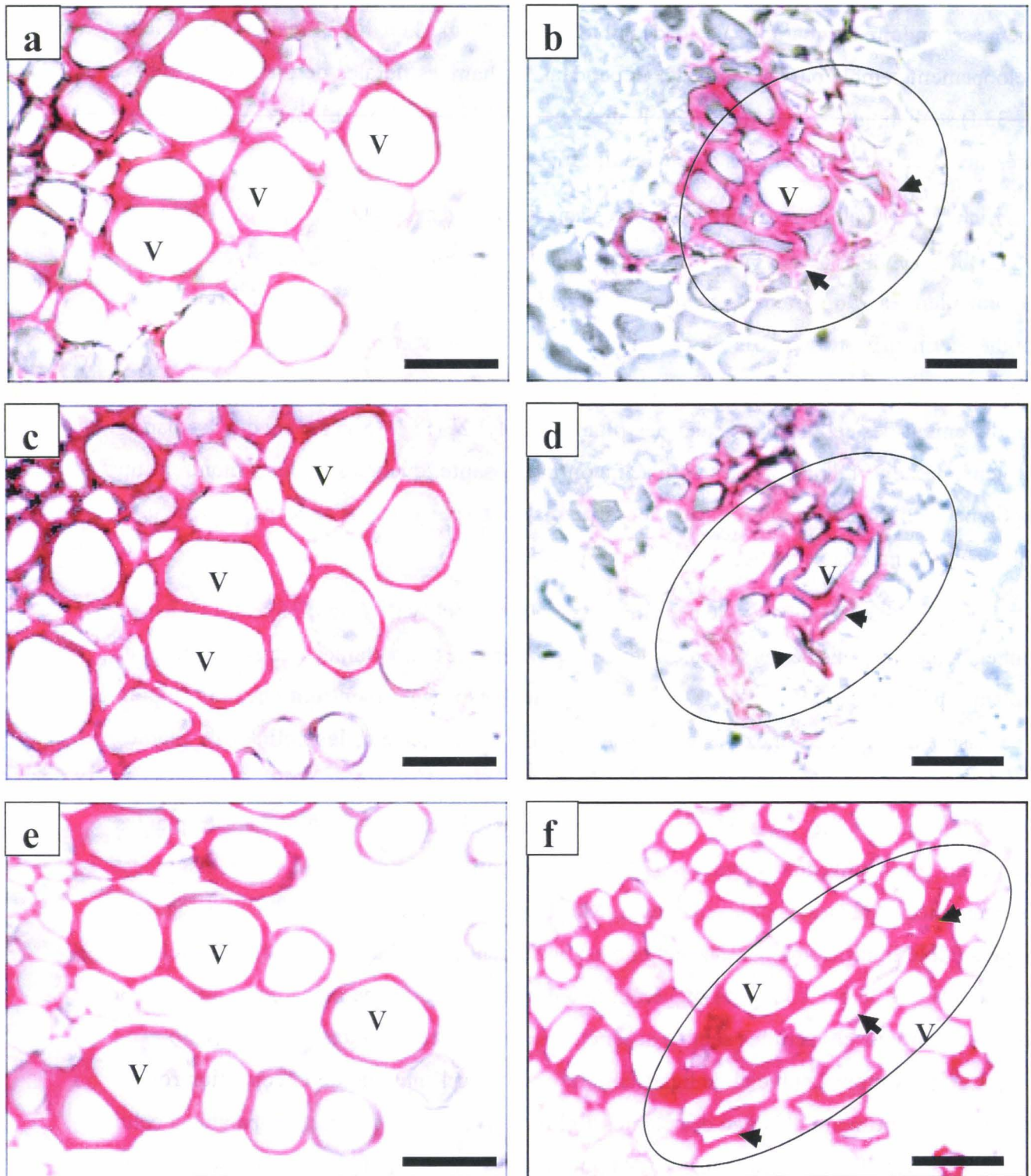


Figure 37 : Les tissus constitutifs lignifiés de la hampe florale d'*A. thaliana* du phénotype transgénique d'*EgMyb1*⁺ testé au phloroglucinol-HCl. Coupes transversales représentent des lignées témoins (a,c,e) et des lignées transgéniques d'*EgMyb1*⁺ (b,d,f). Les coupes (a,b,c,d) proviennent des plantes âgées d'un mois à de deux niveaux, apical (a,b) et basal (c,d) et des plantes âgées de deux mois (e,f). Les cercles indiquent la zone du xylème et les têtes de flèches indiquent les vaisseaux de xylème. V = Vaisseaux. Barre d'échelle = 10 μm.

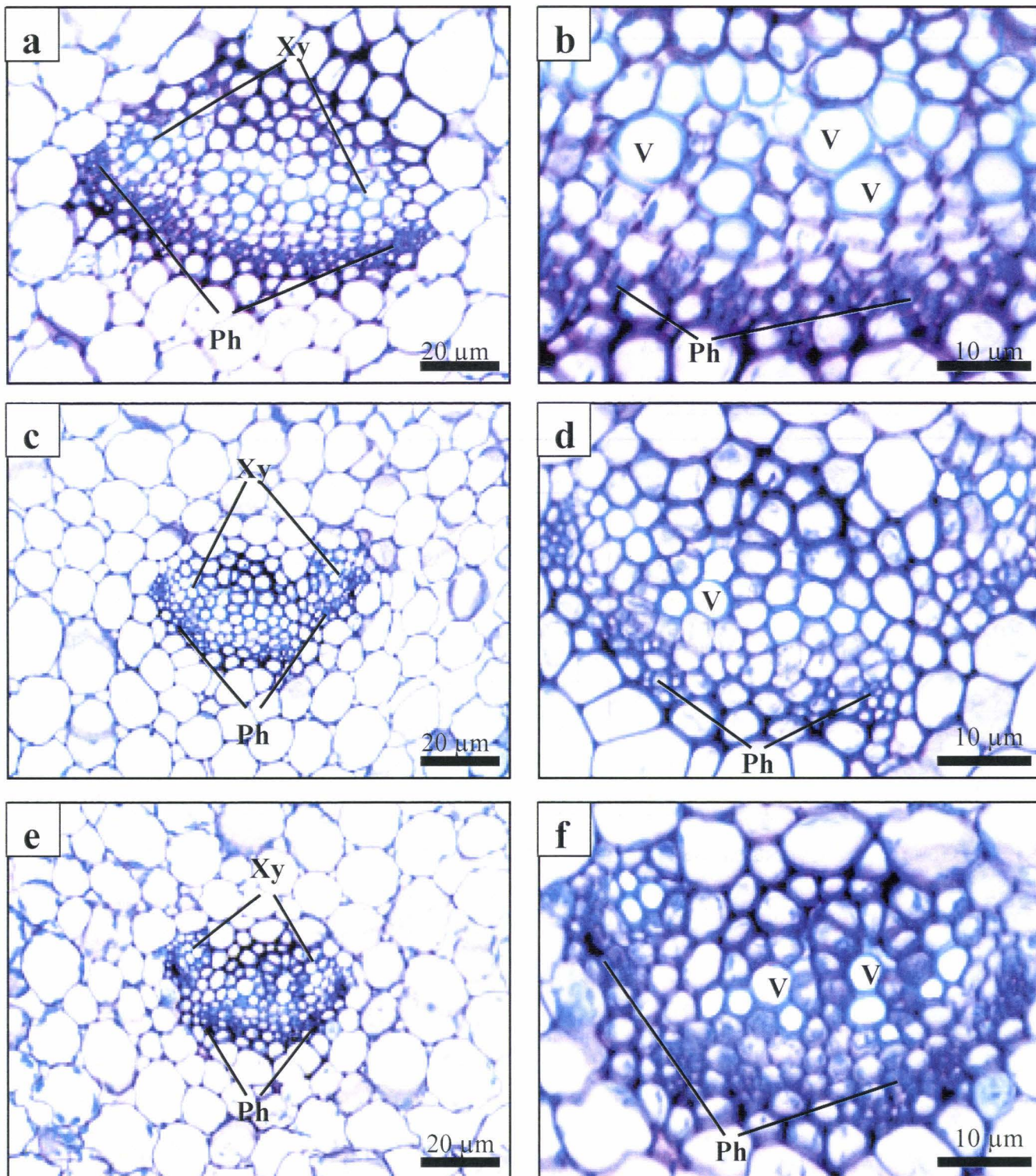


Figure 38 : Coupes transversales dans les feuilles de lignées témoins (a,b) et des lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ (c,d) et *EgMyb2*⁺ (e,f) d'*A. thaliana*. Les coupes colorées au TBO proviennent de plantes âgées (2 mois). Ph = Phloème, Xy = Xylème, V= vaisseau. Barre d'échelle = 20 µm.

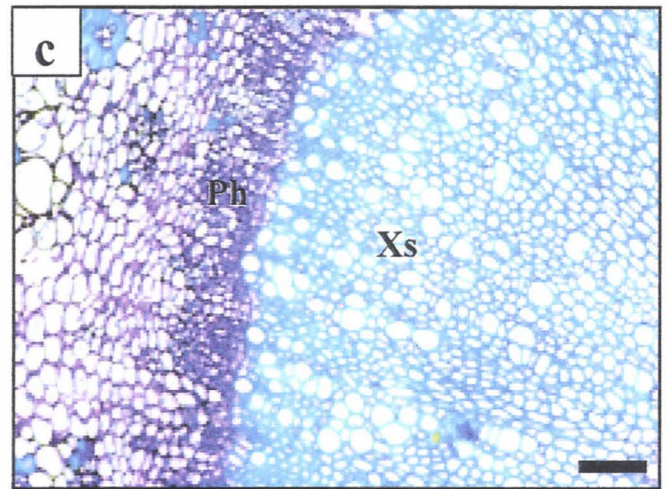
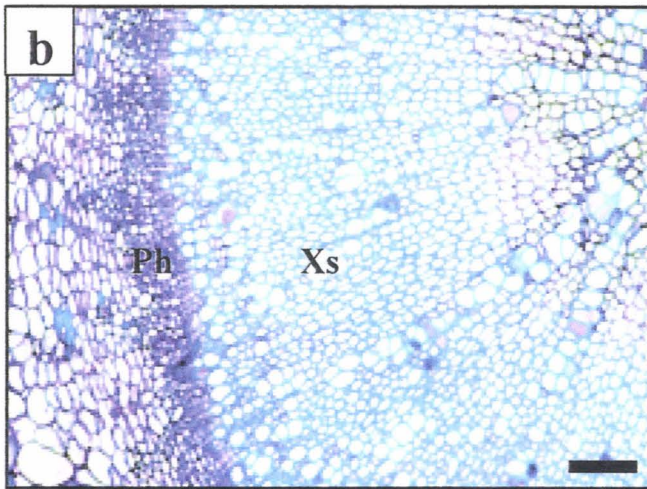
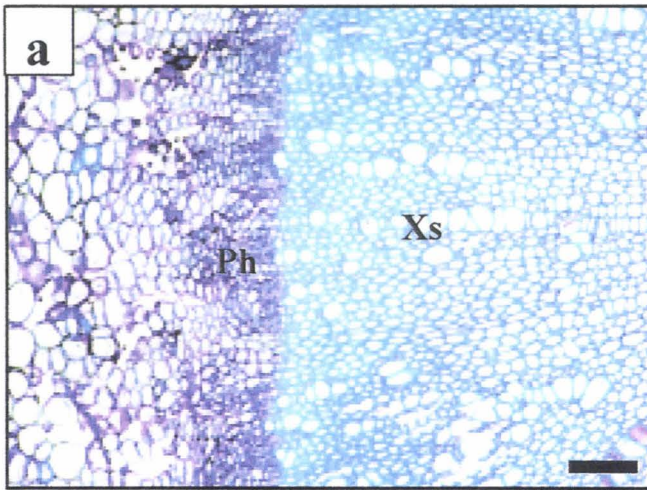


Figure 39 : Coupes transversales de la racine des lignées témoins (a) et des lignées transgéniques *EgMyb1⁺* et *EgMyb1⁺* (b,c) d'*A. thaliana*. Les coupes colorées au TBO proviennent de plantes âgées (2 mois). Ph = Phloème, Xs = Xylème secondaire. Barre d'échelle = 20 um.

Les observations phénotypiques (Fig. 27c) ont indiqué que l'expression des deux transgènes était associée à une diminution de la taille des feuilles. Des analyses préliminaires (Fig. 38) de coupes transversales réalisées dans la zone de la nervure centrale et colorées au TBO montrent que cette diminution en taille est associée à une diminution dans la quantité des tissus vasculaires des feuilles des plantes *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺. Bien que les analyses statistiques n'ont pas été réalisées, l'observation des images semblerait indiquer que cette diminution soit due à une diminution du nombre de cellules et à une diminution de la taille de cellules individuelles. Au contraire de la situation observée dans les hampes florales, ce phénomène concerne les feuilles de plantes *EgMyb1*⁺ et de plantes *EgMyb2*⁺. Cependant, des analyses plus approfondies sont nécessaires.

Nous avons également fait des analyses préliminaires sur les racines de plantes âgées de deux mois (Fig. 39). D'une façon fort intéressante, et au contraire de la situation observée dans les hampes florales, il semblerait que la formation du xylème et du phloème secondaires chez les plantes Myb soit très comparable à celle des plantes pJR1. Cette observation pourrait suggérer que la régulation transcriptionnelle de la xylogénèse dans les racines d'*Arabidopsis* ne fonctionne pas exactement de la même façon que dans les hampes florales (et dans les feuilles). Cependant, des analyses complémentaires et plus détaillées seront nécessaires avant d'arriver à une vision plus claire.

Comme indiqué ci-dessus (et Fig. 30), le diamètre des hampes florales chez les plantes *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺ montre une diminution importante (de l'ordre de 42 – 50 %) par rapport aux plantes pJR1. Afin de voir si tous les tissus étaient affectés de la même façon nous avons mesuré la « taille » des différents tissus dans les hampes florales aux 3 stades examinés préalablement. La figure 40 indique comment ces mesures ont été effectuées. Les analyses statistiques (Figs. 41, 42) montrent que, d'une façon générale, tous les tissus ne sont pas modifiés de la même façon.

Ce sont les tissus parenchymateux (cortex et moëlle) qui montrent la plus importante diminution de taille (cortex : 22 – 45 % ; moëlle : 21 – 33 %). En revanche, les tissus vasculaires (phloème, xylème) sembleraient moins affectés (phloème : 0 – 11 % ; xylème : 0 – 28 %). Cependant, il faut souligner que les valeurs affichées pour les tissus vasculaires chez les plantes âgées de deux mois ne sont pas totalement représentatives des tissus vasculaires secondaires. En effet, comme indiqué sur la figure 50, la mesure du xylème (et du phloème) est effectuée à l'emplacement d'un faisceau vasculaire. Ainsi, la mesure du « xylème », par exemple, dans les plantes âgées de deux mois ne comprend pas seulement le xylème

100 um

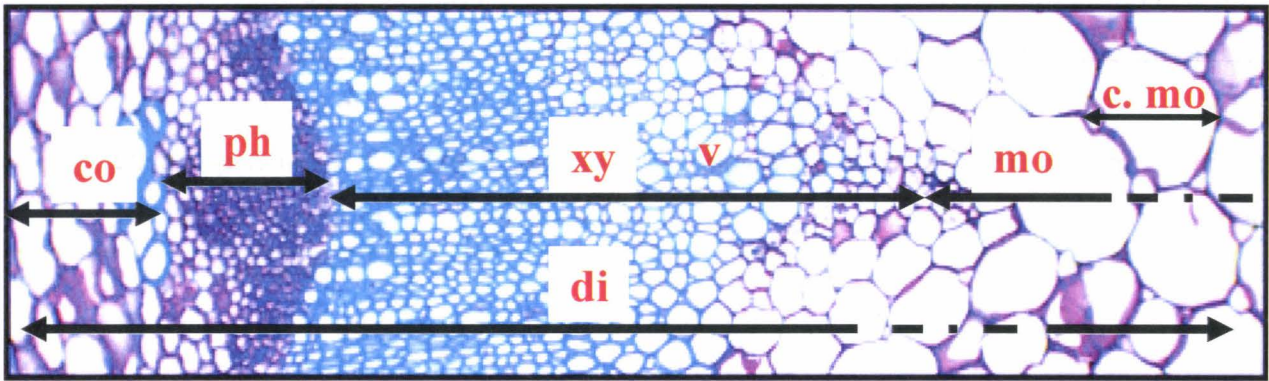


Figure 40 : Méthodes de mesures dans une coupe transversale d'une hampe florale d '*Arabidopsis thaliana*. Les flèches indiquent les mesures effectuées sur les tissus et les cellules. cortex (co); phloème (ph); xylème (xy); moëlle (mo); vaisseaux (v); faisceaux interfasciculaire (fi). Barres de taille : =100 μ m.

secondaire, mais également le xylème primaire. Or, nous avons vu dans les analyses histologiques précédentes (Figs. 33, 34) que les plantes EgMyb1⁺ sont caractérisées, à deux mois, par l'absence de xylème secondaire dans les régions interfasciculaires. Cette absence n'est pas reflétée par les valeurs données dans les figures 41 et 42. De ce fait, les chiffres avancés pour les plantes âgées de deux mois doivent être manipulés avec prudence.

Les figures 37 et 38 montrent que la différence entre la quantité de cortex chez les plantes EgMyb1⁺ et les plantes pJR1 devient moins importante en fonction du stade de développement de la hampe florale. Par exemple, pour les plantes EgMyb1⁺ âgées d'un mois, la différence est de l'ordre de 44 % au niveau apical et de 34 % au niveau basal. Cette tendance continue chez les plantes EgMyb1⁺ âgées de deux mois où l'écart est réduit à 22 %. Ces résultats suggèrent que le développement de ce tissu est plus affecté aux stades jeunes. En revanche, l'écart entre la quantité de moëlle chez les plantes EgMyb1⁺ et les plantes pJR1 reste constant (de l'ordre de 22 %) suggérant que le développement de ce tissu ne change pas en fonction du stade du développement.

L'écart entre la quantité de phloème chez les plantes EgMyb1⁺ et les plantes pJR1 est similaire (de l'ordre de 6 %) aux deux niveaux des hampes florales âgées d'un mois. Dans les hampes florales âgées de deux mois, cet écart se creuse donnant lieu à une valeur d'environ 11 %. Cependant, comme indiqué ci-dessus ce chiffre ne prend pas en compte l'organisation tissulaire des hampes florales qui est hautement modifiée chez les plantes EgMyb1⁺ (absence de phloème secondaire dans les régions interfasciculaires). En ce qui concerne le xylème, les résultats (Figs. 41, 42) montrent une différence importante (de l'ordre de 20 %) dans la quantité de ce tissu dans les hampes florales des plantes EgMyb1⁺ âgées d'un mois en comparaison avec les plantes pJR1. Cet écart devient plus important chez les plantes âgées de deux mois. Cependant, comme c'est le cas pour le phloème secondaire, cette valeur ne prend pas en compte l'absence du xylème secondaire dans les régions interfasciculaires de la hampe florale de plantes EgMyb1⁺ âgées de deux mois. Ces résultats confirment les observations histologiques montrant l'incapacité des plantes EgMyb1⁺ à développer des tissus vasculaires secondaires.

Des analyses comparables des plantes EgMyb2⁺ (Figs. 41, 42) montrent, d'abord, que les hampes florales de ces plantes sont caractérisées par une diminution de diamètre (de l'ordre de 44 à 50 %) comparable à celle observée chez les plantes EgMyb1⁺. Cependant, des analyses plus approfondies de l'évolution de la quantité de tissus internes chez les plantes EgMyb2⁺ indiquent que le développement de ces tissus se distingue de celui des plantes

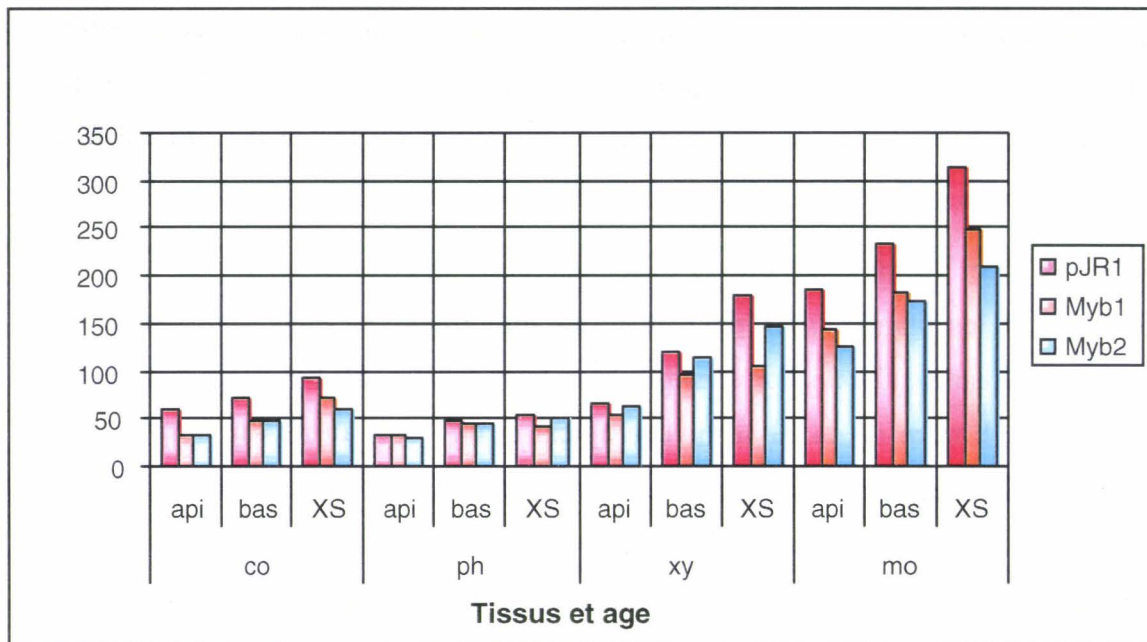
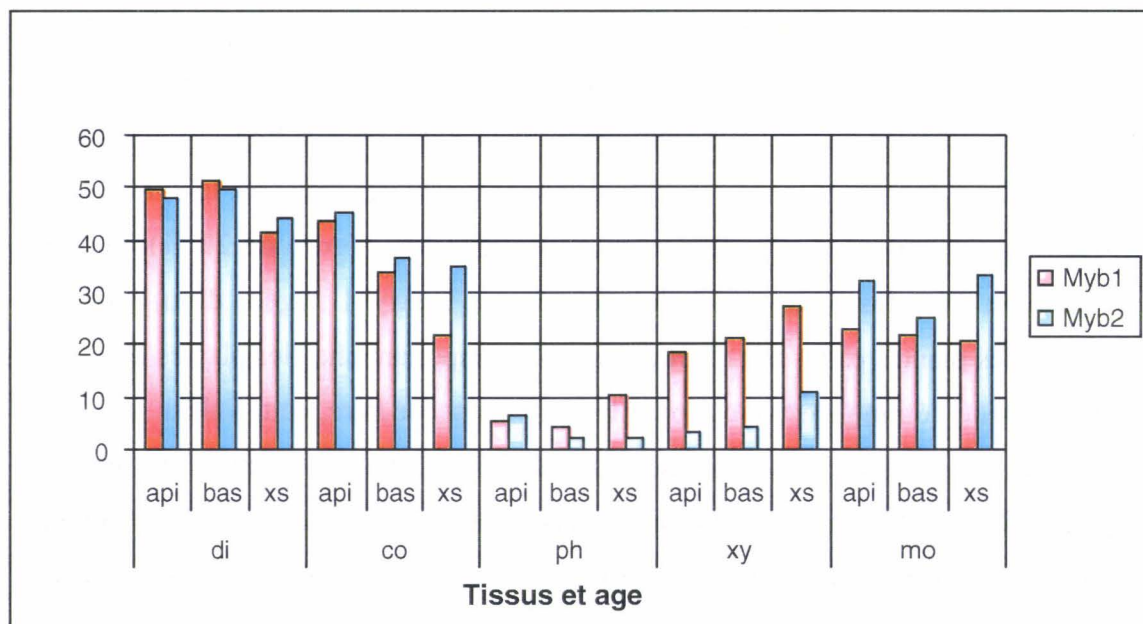


Figure 41: La taille des tissus des plantes témoins pJR1 et les lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺. Ces mesures sont pris dans des coupes transversales de la hampe florale au stade et niveaux différents.



		di	co	ph	xy	mo
Myb1	api	49,7	43,56	5,3	18,6	23
Myb2	api	48,2	45,46	6,8	NS	32
Myb1	bas	51,46	33,6	4,2	21,38	22
Myb2	bas	49,56	36,36	NS	NS	25
Myb1	XS	41,6	22	10,93	27,93	21
Myb2	XS	44,31	35	NS	10,93	33,3

Figure 42 : Le % de diminution de taille de tissus des lignées transgénique *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺.

EgMyb1⁺. En effet, l'écart entre la quantité de tissus parenchymateux (cortex et moëlle) présents dans les hampes florales de plantes EgMyb2⁺ et de plantes pJR1 est plus élevée qu'entre les plantes EgMyb1⁺ et les plantes pJR1. De plus, bien que la différence au niveau du cortex se diminue en fonction du développement de la hampe florale, cette diminution est moins importante que dans le cas des plantes EgMyb1⁺. En revanche, il n'y a pas de différences significatives entre les quantités de phloème secondaire dans les hampes florales de plantes EgMyb2⁺ âgées d'un mois (niveau basal) et de deux mois en comparaison avec les plantes pJR1. D'une façon similaire, pour le xylème, il n'y a pas de différences significatives entre les hampes florales de plantes EgMyb2⁺ âgées d'un mois (niveaux apical et basal) et les plantes pJR1. Néanmoins, on constate un léger écart (d'environ 11 %) entre les hampes florales de plantes EgMyb2⁺ âgées de deux mois et celles des plantes pJR1. Cependant, cette différence est beaucoup moins dramatique que dans le cas des plantes EgMyb1⁺ caractérisées par l'absence de xylème secondaire.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'expression des deux transgènes Myb se traduit par une diminution comparable du diamètre de la hampe florale par rapport aux plantes pJR1. Cependant, des analyses plus approfondies de l'organisation générale des tissus internes montrent que ces diminutions similaires n'ont pas la même origine. D'une façon simpliste, le développement des tissus vasculaires est plus affecté chez les plantes EgMyb1⁺ que chez les plantes EgMyb2⁺ (en comparaison avec les plantes pJR1). Le contraire étant vrai en ce qui concerne le développement des tissus parenchymateux(cortex et moëlle).

Ayant constaté des différences importantes au niveau du développement de différents tissus chez les plantes Myb en comparaison avec les plantes pJR1, nous avons décidé de regarder la taille de cellules. En effet, la diminution de la quantité d'un tissu peut être liée à une diminution dans le nombre de cellules ou dans la taille des cellules individuelles, ou bien les deux. Pour savoir ce qui se passe dans notre cas, nous avons choisi de mesurer la taille de cellules xylémiennes (exemple de tissu vasculaire) et la taille des cellules parenchymateuses de la moëlle (exemple de tissu parenchymateuse). Les résultats sont présentés dans les figures 43 et 44.

Ces résultats montrent, premièrement, que la taille des cellules parenchymateuses de la moëlle des plantes Myb n'est pas significativement différente de celle des plantes pJR1. En revanche, on constate une diminution (de l'ordre de 20 %) de la taille des cellules xylémiennes présentes dans la hampe florale des plantes EgMyb1⁺. Ce résultat confirme les observations histologiques présentées auparavant. Concernant les plantes EgMyb2⁺, aucune

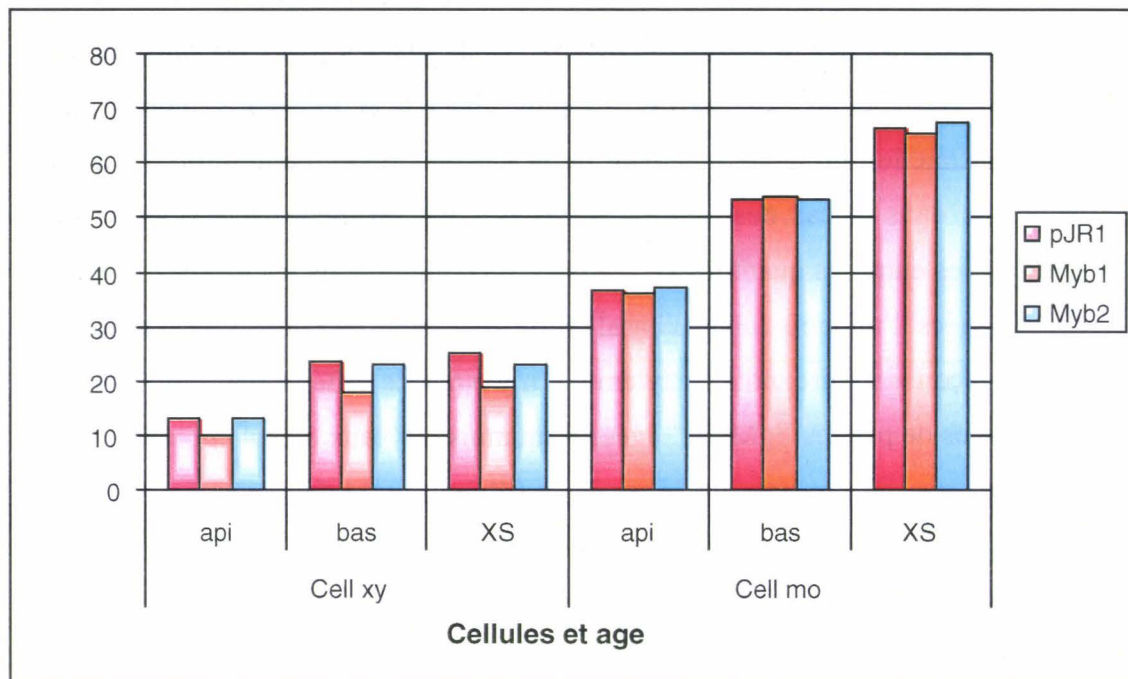
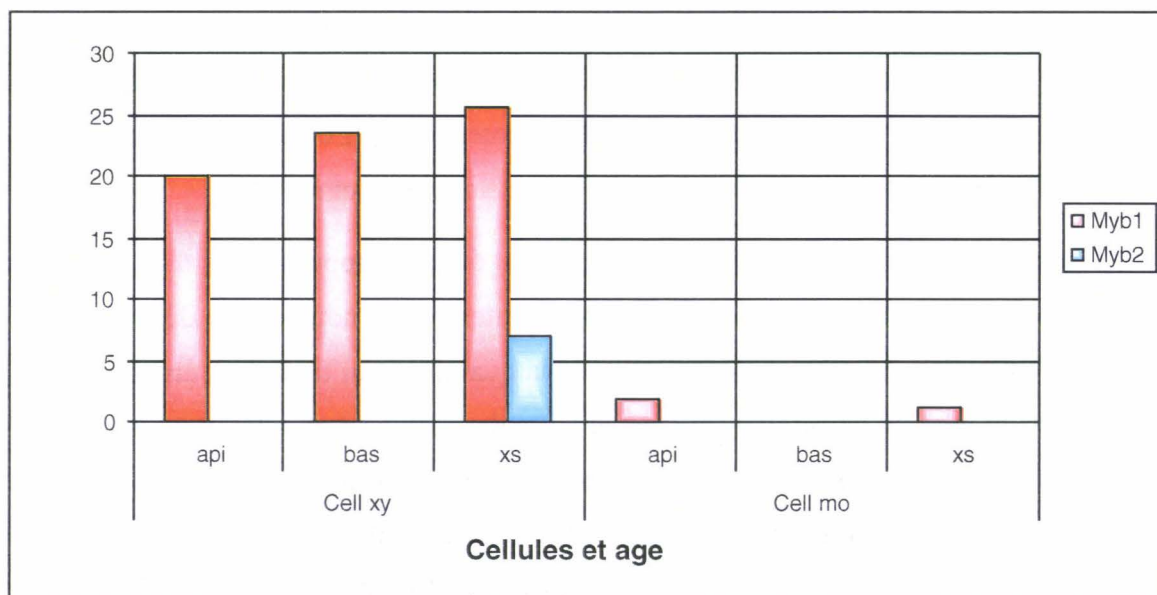


Figure 43: Le diamètre des cellules de plantes témoins pJR1 et Lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺. Ces mesures sont pris dans des coupes transversales de la hampe florale au stade et niveaux différents.



		Cell xy	Cell mo
Myb1	api	20	NS
Myb2		NS	NS
Myb1	bas	23,4	NS
Myb2		NS	NS
Myb1	xs	25,6	NS
Myb2		7	NS

Figure 44: Le % de diminution du diamètre de cellules des lignées transgéniques *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺.

différence significative n'a pu être détectée entre les cellules xylémiennes des hampes florales âgées d'un mois et des cellules comparables chez les plantes pJR1. Cependant, une légère diminution de taille (de l'ordre de 7 %) a été observée dans les hampes florales âgées de deux mois.

Malgré la diminution importante (de l'ordre de 20 %) de la taille des cellules xylémiennes chez les plantes *EgMyb1⁺*, cette différence n'est pas suffisante pour expliquer la diminution totale (de l'ordre de 50 %) du diamètre des hampes florales. Une telle observation suggère que l'expression du transgène n'a pas seulement un effet sur le développement cellulaire (taille de cellules) mais également sur la production de nouvelles cellules. Cependant, des analyses approfondies seront nécessaires pour comprendre les effets d'une façon plus complète.

B 3 – Analyses chimiques des parois des plantes *EgMyb1⁺* et *EgMyb2⁺*

Les analyses histologiques des plantes *EgMyb1⁺* et *EgMyb2⁺* ont montré que l'expression des transgènes correspondants était associée à des modifications importantes du développement des plantes. Par exemple, les plantes *EgMyb1⁺* sont caractérisées par l'absence de xylème et de phloème secondaires, l'absence de fibres interfasciculaires lignifiées et la présence de cellules « collapsées » dans le xylème primaire. Ce dernier phénomène est témoin de la résistance mécanique réduite des parois cellulaires et suggère que le métabolisme pariétal est largement modifié chez les plantes *EgMyb1⁺*. La présence de quantités de xylème et de phloème secondaires, chez les plantes *EgMyb2⁺*, comparables aux plantes pJR1 suggère que l'expression du transgène a moins d'effet sur la formation des tissus vasculaires. Cependant, la lignification atypique des cellules corticales chez ces plantes indique que le métabolisme pariétal est également modifié. Dans les deux cas, il semble que le processus de la lignification soit perturbé – ce qui est assez logique étant donné l'effet des facteurs Myb (en général) sur le métabolisme des phénylpropanoïdes.

B3.1. Analyses de la lignine

Afin de préciser et de quantifier ces modifications nous avons décidé de faire des analyses chimiques de la quantité et de la structure des lignines présentes chez les plantes Myb en comparaison avec les plantes pJR1. Ces analyses ont été réalisées par Mme B. Pollet dans le laboratoire du Professeur Cathérine Lapierre (LBC INAPG, Paris Grignon). Les analyses ont été réalisées sur des résidus pariétaux extraits des hampes florales et des feuilles à partir de plantes âgées d'un mois et des plantes âgées de deux mois.

Lignée	hampes de 1 mois			hampes de 2 mois		
	% RP	% LK moyen	écart moyen LK	% RP	% LK moyen	écart moyen LK
Sauvage WS	63.4	15.62	0.02	65.3	16.15	0.02
Vecteur vide	65.6	15.08	0.13	66.2	15.67	0.08
Myb-1, lignée 5	60.9	13.49	0.12	65.2	13.95	0.01
Myb-1, lignée 9	64.4	13.78	0.08	66.7	14.32	0.02
Myb-2, lignée 14	63.2	14.75	0.10	65.6	17.95	0.11
Myb-2, lignée 16	65.0	15.01	0.00	63.2	17.98	0.21

Tableau 12. Dosage de la lignine Klason (LK) dans les hampes florales
Résultats simplifiés pour le dosage lignine Klason (en % RP)

Lignée	Feuilles de 1 mois		Feuilles de 2 mois	
	% LK moyen	écart moyen LK	% LK moyen	écart moyen LK
Sauvage WS	8.48	0.15	7.69	0.01
Vecteur vide	8.75	0.08	8.00	0.05
Myb-1, lignée 5	7.63	0.24	7.06	0.03
Myb-1, lignée 9	7.92	0.08	7.36	0.05
Myb-2, lignée 14	7.85	0.03	7.39	0.02
Myb-2, lignée 16	8.03	0.05	7.47	0.20

Tableau 13. Dosage de la lignine Klason (LK) dans les feuilles.

La quantification de la lignine a été déterminée par la méthode de Klason (Dence, 1992). Les résultats pour les hampes florales et pour les feuilles sont présentés dans les Tableaux 12 et 13. Les résultats pour les hampes florales (Tableau 12) montrent que, à un et deux mois, les hampes florales des plantes *EgMyb1*⁺ sont significativement moins lignifiées que les hampes florales des plantes sauvages/pJR1. Ce résultat est en accord avec les observations histochimiques (réactif de Weisner) présentées ci-dessus montrant l'absence de fibres interfasciculaires lignifiées et une lignification réduite au niveau de xylème primaire et secondaire.

En ce qui concerne les hampes florales des plantes *EgMyb2*⁺ âgées d'un mois, la teneur en lignine Klason ne présente pas de différence significative avec les plantes sauvages/pJR1 à un mois. Encore une fois, cette observation est en accord avec les observations histochimiques qui avaient indiqué que la lignification du xylème primaire et des fibres interfasciculaires est comparable à celle chez les plantes sauvages/pJR1. Cependant, la teneur en lignine (de l'ordre de 17,96 %) dans les hampes florales de plantes *EgMyb2*⁺ âgées de deux mois présente une différence significative avec les plantes sauvages/pJR1 (teneur moyenne de 15,91 %). Il est possible que cette différence soit le résultat d'une lignification ectopique des cellules corticales présentes dans les plantes *EgMyb2*⁺ mais absentes dans les plantes témoins, cependant des analyses plus poussées seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. D'une façon intéressante, les teneurs en lignine Klason (de l'ordre de 15 %) sont supérieures à celles habituellement rencontrées chez les plantes d'*Arabidopsis* âgées d'un mois (Eudes *et al.*, 2006, Lapière commentaire personnel). Cependant, il est possible que ces différences soient dues aux conditions de culture.

Les résultats obtenus pour les feuilles de plantes âgées d'un et deux mois (Tableau 13) indiquent que les teneurs en lignine Klason ne montrent pas de différences significatives entre les deux plantes *Myb* et les plantes sauvages/pJR1. Cependant, la quantité de lignine observée (de l'ordre de 8 %) semble très élevée par rapport aux valeurs obtenues pour les hampes florales. Ceci est peut-être dû à la technique d'analyse utilisée. En effet, la méthode Klason est bien adaptée pour la détermination de la teneur en lignine dans les tissus bien lignifiés tel que le bois, en revanche, cette méthode peut donner des résultats contradictoires quand elle est utilisée pour évaluer la teneur en lignine dans les tissus faiblement lignifiés (Morrison, 1976, Dence, 1992, Day *et al.*, 2005). Dans ce cas, il est possible que la présence d'autres composés contaminants aurait pu donné lieu à un surdosage de la quantité de lignine. Les

Echantillon RP de Hampe florale 1 mois	Rdt (H+G+S) $\mu\text{mol/g LK}$	S/G molaire	%H	%G	%S
Moyenne sauvage	1445	0.36	0.49	73.3	26.2
Ecart moyen	+/- 41	+/- 0.00	+/- 0.01	+/- 0.2	+/- 0.2
Moyenne vecteur vide	1396	0.36	0.50	73.3	26.2
Ecart moyen	+/- 118	+/- 0.01	+/- 0.01	+/- 0.7	+/- 0.7
Moyenne Myb-1, lignée 5	1358	0.36	0.53	73.3	26.2
Ecart moyen	+/- 140	+/- 0.01	+/- 0.03	+/- 0.5	+/- 0.4
Moyenne Myb-1, lignée 9	1478	0.38	0.46	72.2	27.3
Ecart moyen	+/- 48	+/- 0.01	+/- 0.01	+/- 0.7	+/- 0.8
Moyenne Myb-2, lignée 14	1414	0.35	0.58	73.9	25.6
Ecart moyen	+/- 75	+/- 0.01	+/- 0.04	+/- 0.3	+/- 0.3
Moyenne Myb-2, lignée 16	1559	0.37	0.52	72.4	27.0
Ecart moyen	+/- 44	+/- 0.02	+/- 0.02	+/- 0.8	+/- 0.9

Tableau 14. Résultats des analyses par thioacidolyse des hampes florales âgées d'un mois.

Echantillon RP de Hampe florale 2 mois	rdt (H+G+S) $\mu\text{mol/g LK}$	S/G molaire	%H	%G	%S
Moyenne Sauvage	1302	0.34	0.51	74.1	25.4
Ecart moyen	+/- 48	+/- 0.01	+/- 0.02	+/- 0.4	+/- 0.3
Moyenne Vecteur vide	1435	0.37	0.74	72.4	26.9
Ecart moyen	+/- 80	+/- 0.01	+/- 0.02	+/- 0.5	+/- 0.5
Moyenne Myb-1, lignée 5	1086	0.32	1.12	74.8	24.0
Ecart moyen	+/- 42	+/- 0.00	+/- 0.02	+/- 0.1	+/- 0.1
Moyenne Myb-1, lignée 9	1256	0.34	0.82	73.8	25.4
Ecart moyen	+/- 23	+/- 0.00	+/- 0.04	+/- 0.1	+/- 0.1
Moyenne Myb-2, lignée 14	1466	0.35	0.89	73.2	25.9
Ecart moyen	+/- 79	+/- 0.01	+/- 0.01	+/- 0.5	+/- 0.5
Moyenne Myb-2, lignée 16	1359	0.36	0.91	72.8	26.3
Ecart moyen	+/- 28	+/- 0.00	+/- 0.01	+/- 0.3	+/- 0.3

Tableau 15. Résultats des analyses par thioacidolyse des hampes florales âgées de deux mois. Résultats sur hampes extraites (2 thio par lignées et 2 injections par thio, soient 4 analyses CPG-SM par échantillon). Résultats simplifiés (moyenne et écart-moyen)

résultats des dosages par thioacidolyse (ci-dessous) montrant un très faible rendement sembleraient conforter cette hypothèse.

Afin de déterminer si la structure de la lignine a été modifiée chez les plantes Myb en comparaison avec les plantes pJR1, nous avons utilisé la technique de thioacidolyse (Lapierre *et al.*, 1986 et 1993). Les analyses ont été réalisées sur les mêmes échantillons, dérivés de plantes âgées d'un et deux mois (résidu pariétal des hampes florales et des feuilles), que ceux utilisés pour la quantification. Les résultats pour les hampes florales sont présentés dans les tableaux 14 et 15.

Globalement, ces résultats montrent que la structure de la lignine (au moins la partie non-condensée) chez les plantes Myb âgées d'un mois ne présente pas des différences significatives en comparaison avec la lignine présente dans les hampes florales de plantes sauvages/pJR1. En effet, le « rendement », qui fournit des informations sur le niveau de condensation de la molécule de la lignine, est de l'ordre de 1480 $\mu\text{mol/g}$ de lignine pour toutes les plantes (Myb et pJR1). De même, le rapport S/G est de l'ordre de 0,36 pour toutes les plantes avec un pourcentage d'unités G d'environ 73 % et un pourcentage d'unités S d'environ 26 %. Dans tous les cas, la teneur en unités H reste très faible avec une valeur d'environ 0,5 %. Ces résultats sembleraient indiquer que l'expression des deux transgènes n'a pas d'impact sur la structure de la molécule de lignine dans les plantes âgées d'un mois. D'une façon intéressante, le rapport S/G (0,36) est relativement élevé et plutôt caractéristique des hampes florales d'*Arabidopsis* âgées de deux mois (C. Lapierre, commentaire personnel). Cette observation est peut-être à mettre en rapport avec les résultats du dosage de lignine Klason montrant une teneur relativement élevée en lignine. Dans ce cas, il est possible que les conditions de culture utilisées favorisent la formation de lignine avec pour conséquence la présence d'une lignine plus typiquement associée à des plantes plus âgées et donc plus riches en unités S.

Des analyses comparables des hampes florales de plantes âgées de deux mois (Tableau 15) ont indiqué que la structure de la lignine (niveau de condensation, rapport S/G, pourcentage relatif des monomères) des plantes *EgMyb2⁺* était comparable à celle des plantes témoins. En revanche, les résultats suggèrent que la lignine des plantes *EgMyb1⁺* est plus condensée (rendement moyen de 1171 $\mu\text{mol/g}$ de lignine) que la lignine des plantes témoins (rendement moyen de 1369 $\mu\text{mol/g}$ de lignine). Les résultats également suggèrent que la lignine des plantes *EgMyb1⁺* est légèrement plus riche en unités H (0,97 % vs 0,63 %). Cependant des analyses supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette tendance.

Echantillon feuilles 1 mois	rdt H+G+S nanomoles/g RP	S/G	%H	%G	%S
Moyenne sauvage	4433	0.19	1.49	82.6	15.9
Ecart moyen	+/- 229	+/- 0.01	+/- 0.14	+/- 0.7	+/- 0.5
Moyenne vecteur vide	5430	0.23	1.55	79.9	18.5
Ecart moyen	+/- 448	+/- 0.02	+/- 0.09	+/- 1.1	+/- 1.1
Moyenne Myb-1, lignée 5	3750	0.20	1.48	82.1	16.4
Ecart moyen	+/- 328	+/- 0.01	+/- 0.07	+/- 0.7	+/- 0.7
Moyenne Myb-1, lignée 9	7042	0.24	1.10	79.6	19.3
Ecart moyen	+/- 315	+/- 0.01	+/- 0.06	+/- 0.6	+/- 0.7
Moyenne Myb-2, lignée 14	4417	0.27	1.42	77.4	21.1
Ecart moyen	+/- 521	+/- 0.01	+/- 0.10	+/- 0.8	+/- 0.8
Moyenne Myb-2, lignée 16	3983	0.25	1.51	78.9	19.6
Ecart moyen	+/- 912	+/- 0.01	+/- 0.1	+/- 0.6	+/- 0.7

Tableau 16. Résultats des analyses par thioacidolyse des feuilles âgées d'un mois. La mauvaise reproductibilité de certains résultats est liée à la mauvaise repro des doubles de thioacidolyse, les doubles d'injection étant satisfaisants. Il est probable que ce soit lié à un problème d'échantillonnage quand on pèse 25 à 30 mg d'échantillon contenant 0.1 à 0.2% de lignines.

Echantillon feuilles 2 mois	rdt H+G+S nanomoles/g RP	S/G	%H	%G	%S
Moyenne Sauvage	2215	0.20	1.6	82.1	16.3
Ecart moyen	+/- 314	+/- 0.01	+/- 0.0	+/- 0.3	+/- 0.4
Moyenne Vecteur vide	2306	0.26	2.2	77.9	19.9
Ecart moyen	+/- 425	+/- 0.02	+/- 0.3	+/- 1.3	+/- 1.6
Moyenne Myb-1, lignée 5	1565	0.23	2.2	79.5	18.3
Ecart moyen	+/- 37	+/- 0.00	+/- 0.2	+/- 0.5	+/- 0.2
Moyenne Myb-1, lignée 9	2657	0.24	2.6	78.8	18.6
Ecart moyen	+/- 170	+/- 0.02	+/- 0.3	+/- 1.0	+/- 1.3
Moyenne Myb-2, lignée 14	2048	0.30	2.8	74.9	22.3
Ecart moyen	+/- 43	+/- 0.00	+/- 0.2	+/- 0.4	+/- 0.2
Moyenne Myb-2, lignée 16	1530	0.31	2.8	74.0	23.2
Ecart moyen	+/- 85	+/- 0.03	+/- 0.2	+/- 1.9	+/- 1.8

Tableau 17. Résultats des analyses par thioacidolyse des feuilles âgées de deux mois.

Les tableaux 16 et 17 montrent les résultats de la thioacidolyse sur les feuilles provenant des plantes âgées d'un et deux mois. En comparaison avec les hampes florales, le rendement est très faible. En effet, pour pouvoir présenter des différences compréhensibles, nous avons choisi d'exprimer les valeurs en nanomol/g de résidu pariétal (et non pas en $\mu\text{mol/g}$ de lignine Klason). Ce rendement, extrêmement faible, semblerait conforter l'hypothèse (voir ci-dessus) que la quantité de lignine présente dans les feuilles a été surestimée. Le rapport S/G (0,2) est plus faible que celui des hampes florales (0,36) suggérant que, comme observé dans d'autres études (Kajita *et al.*, 1996 et 1997 ; Selwat *et al.*, 1997 ; Tamagnone *et al.*, 1998), la lignine présente dans les feuilles est plus riche en unités G. Les résultats montrent que, dans toutes les plantes, le pourcentage d'unités G est de l'ordre de 80 % (cf 73 % dans les hampes florales) et le pourcentage de S est de l'ordre de 18 % (cf 26 % dans les hampes florales).

Globalement, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour les hampes florales indiquant que l'expression des deux transgènes ne modifie pas la structure de la lignine dans ces deux organes provenant des plantes âgées d'un et deux mois.

B3.2. Analyses de polymères polysaccharidiques

Lors des analyses histologiques précédentes, nous avons observé des changements de la structure de la paroi, probablement liés aux modifications du métabolisme pariétal. Bien que le polymère de la lignine (d'après les résultats histochimiques) reste une cible privilégiée pour des telles modifications, il est possible que d'autres polymères pariétaux (polysaccharides ou protéines) pourraient également être modifiés. Par exemple, Laigeng *et al.*, (2003) ont montré qu'une réduction dans la teneur en lignine de 60% était associée à une augmentation de la quantité de cellulose de 14% chez le peuplier. Dans ce contexte, nous avons entrepris des analyses préliminaires de la partie polysaccharidique de la paroi dans les plantes Myb en comparaison avec les plantes pJR1.

Suite à une hydrolyse acide complète des résidus pariétaux obtenus à partir de plantules étiolées âgées de 7 jours, la séparation des monosaccharides par CPG a permis une évaluation de leurs quantités (Fig. 45). Des analyses statistiques (ANOVA) ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les plantes Myb et les plantes pJR1. Cependant, ces analyses étaient réalisées sur des plantules et ça serait nécessaire de faire des comparaisons sur les organes (hampes florales, feuilles) de plantes plus âgées.

C. DISCUSSION

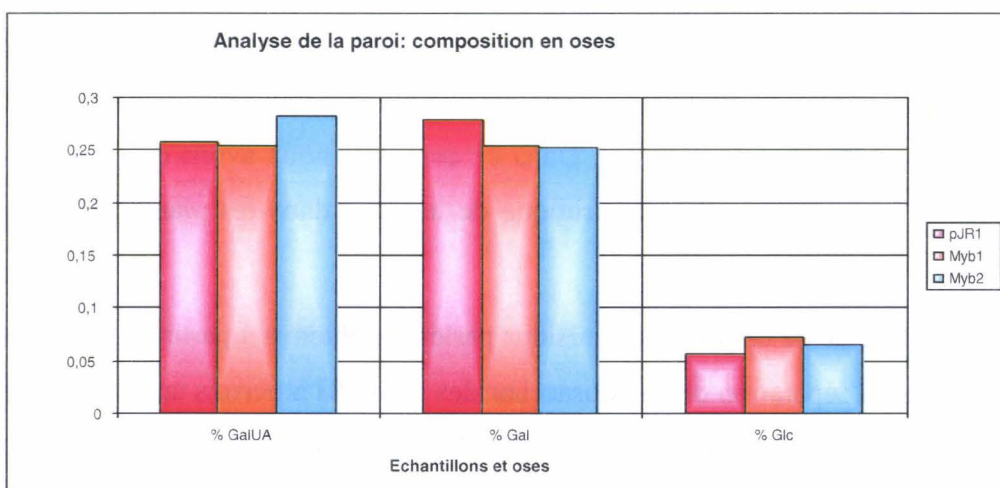
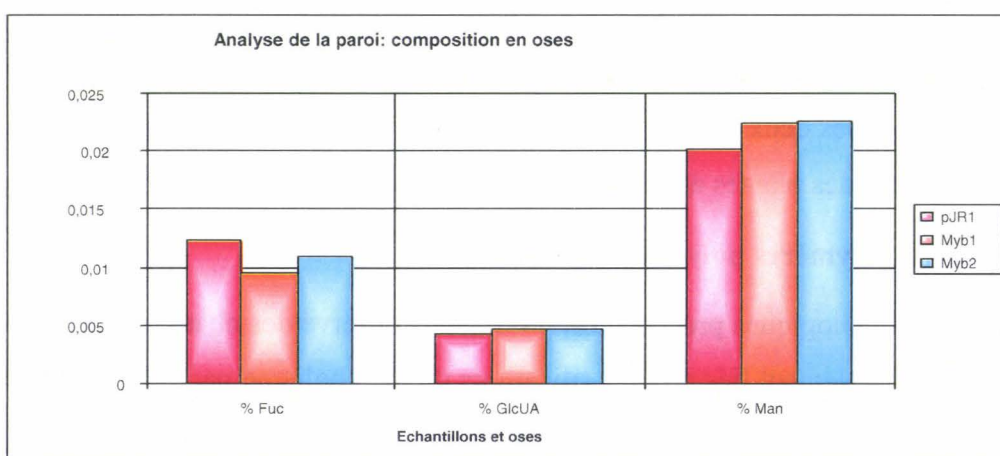
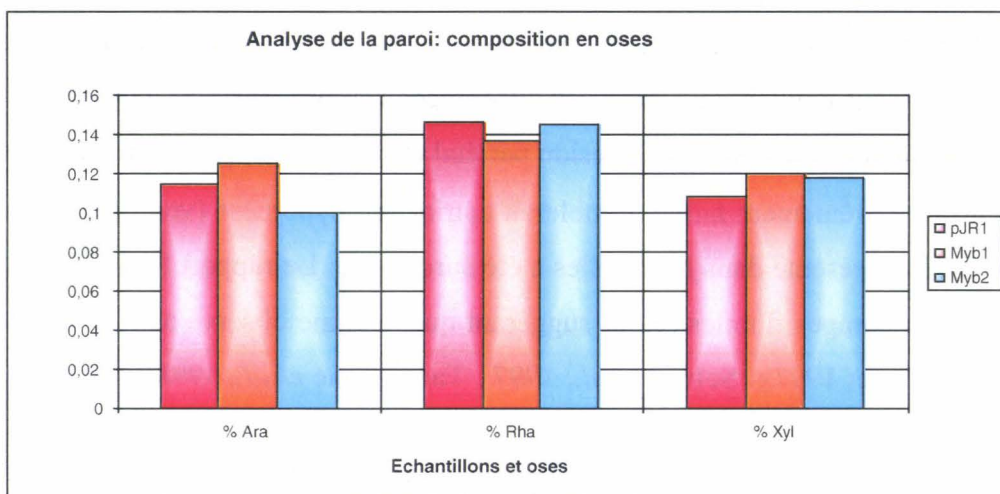


Figure 45: Analyse des monosaccharides pariétaux par chromatographie à phase gazeuse (CPG). Quatre lignées d'*EgMyb1*⁺ (A à D) et d'*EgMyb2*⁺ (E à H) et deux lignées témoins pJR1 sont analysées. La quantité des oses est en proportion (%). (Ara) arabinose; (Rha) rhamnose; (Fuc) fucose; (Xyl) xylose; (Gal UA) acide galacturonique; (Glc UA) acide glucuronique; (Man) mannose; (Gal) galactose; (Glc) glucose.

C.1 La sur-expression des gènes *EgMYB1*, *EgMyb2* induit des modifications phénotypiques importantes

Nos résultats ont démontré que la sur-expression des transgènes *EgMyb1* et *EgMyb2* est associée, dans les deux cas, par un phénotype marqué. En effet, les lignées analysées ont toutes montré un phénotype nain. Ce phénotype est caractérisé par une diminution de la hauteur de la hampe florale (qui se rattrape à deux mois) et de son diamètre (qui ne se rattrape pas). Cette diminution de taille est également associée à une réduction de taille des feuilles, des malformations des fleurs et une diminution de taille des siliques. Des modifications similaires ont été observées (Tamagnone *et al.*, 1998) chez les plantes de tabac sur-exprimant deux facteurs Myb (*AmMYB305*, *AmMYB330*) isolés d'*Antirrhinum majus*. Dans les deux cas, un nombre élevé (10/21 des transformants primaires pour *AmMYB330*) de plantes transformées montrait une diminution de hauteur associée à des feuilles (et fleurs) plus petites. De même, la sur-expression du gène *EgMyb2* chez le tabac (Goicoechea *et al.*, 2005) était également associée à une diminution en taille (9/18 plantes en serre). D'une façon intéressante, la sur-expression de ce gène chez le tabac était associée à une perte de dominance apicale – phénomène également observé pour les plantes *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺ d'*Arabidopsis* (nos résultats). Nos résultats sont, donc, en accord avec ceux chez le tabac suggérant ainsi que la sur-expression de facteurs Myb provoque des modifications majeures dans la croissance et le développement de la plante. Cependant, nous ne pouvons pas généraliser sur les effets de la sur-expression des facteurs Myb chez les plantes. Par exemple, la sur-expression, chez le tabac, d'un facteur Myb isolé du pin (*Pinus taeda*) n'a pas d'effet majeur sur la croissance des plantes (Patzlaff *et al.*, 2003a). De même, bien que l'activation d'un facteur Myb chez *Arabidopsis* stimule la biosynthèse des phénylpropanoïdes, il n'y a pas eu d'effet majeur sur la croissance de la plante (Borevitz *et al.*, 2000). Néanmoins, nos résultats montrent que la sur-expression des gènes *EgMyb1* et *EgMyb2* chez *Arabidopsis* est associée à des changements phénotypiques prononcés.

C.2 La sur-expression du gène *EgMyb1* est associée à l'absence de tissus vasculaires secondaires dans la hampe florale

Du fait de l'intérêt porté par notre laboratoire à la formation du xylème secondaire, nous avons procédé à des analyses histologiques détaillées des tissus internes de la hampe florale. Nos résultats ont montré que l'expression des deux transgènes était associée à une diminution similaire (pour les deux plantes Myb) du diamètre de la hampe florale. Cependant, les

modifications de l'organisation générale des tissus internes responsables de cette réduction de taille étaient différentes pour les plantes *EgMyb1*⁺ et pour les plantes *EgMyb2*⁺. En effet, chez les plantes *EgMyb1*⁺, la diminution de taille était associée à l'absence de tissus vasculaires (xylème et phloème) secondaires. Or, dans le cas des plantes *EgMyb2*⁺, ce sont plutôt les tissus parenchymateux (cortex et moëlle) qui sont touchés. Une autre modification histologique majeure associée aux plantes *EgMyb1*⁺ concerne l'absence de fibres interfasciculaires. D'une façon intéressante, ce phénotype est aussi caractéristique du mutant *ifl1/rev* d'*Arabidopsis*. Le gène REV code un facteur de transcription de type HD-ZIP III et des études ont montré que les facteurs HD-ZIP III, en interaction avec des gènes KANADI, sont impliqués dans le contrôle de la formation de tissus vasculaires secondaires via un mécanisme impliquant les microRNAs (Baima *et al.*, 2001 ; Eshed *et al.*, 2001 ; Emery *et al.*, 2003 ; McHale et Koning, 2004 ; Hawker et Bowman, 2004). Dans ce contexte, il est tentant d'imaginer que la sur-expression du gène *EgMyb1* exerce son effet via une action (inconnue) sur le système de contrôle impliquant les gènes HD-ZIP III. Cependant, des travaux (Nagata *et al.*, 2001 ; Ohashi-Ito *et al.*, 2002 ; Cano-Delgado *et al.*, 2004) montrant que l'expression de gènes HD-ZIP III peut être modifiée par les brassinostéroïdes indiquent que les mécanismes de contrôle régulant la formation de tissus vasculaires secondaires sont complexes.

Dans ce contexte, des travaux récents (Yang *et al.*, 2007) montrant que la protéine MYB26 régule l'épaississement de la paroi secondaire en contrôlant l'expression de gènes *NST* (*NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR*) est très intéressante. En effet, deux facteurs de transcription (NST1, NST3) sont impliqués dans la régulation de la formation des parois secondaires dans les tissus lignifiés (hampe florale et hypocotyle) d'*Arabidopsis* (Mitsuda *et al.* 2005 ; 2007 ; Zhong *et al.*, 2006). Les plantes « double mutant » de NST1 et NST3 montrent une perte significative d'épaississement et de lignification des parois secondaires dans les tissus de hampe florale et d'hypocotyle. En revanche, la sur-expression de gènes *NST1* et *NST3* induit l'épaississement ectopique des parois secondaires dans les fibres interfasciculaires et le xylème secondaire. Pris ensemble, ces résultats montrent que les facteurs de transcription NST jouent un rôle très important dans la formation des parois secondaires. Dans le contexte des résultats de Yang *et al.* (2007), il est possible que l'expression de gènes correspondants soit régulée par un(des) facteur(s) Myb(s).

Dans le contexte du phénotype des plantes *EgMyb1*⁺, l'identification, chez *Arabidopsis*, du mutant *apl* (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*) caractérisé par la présence de faisceaux conducteurs contenant très peu de cellules phloémiennes est intéressante (Bonke *et al.*, 2003). En effet, le gène *APL* code un facteur de transcription de type Myb suggérant ainsi que ces protéines régulatrices peuvent influencer le développement (ou non) de tissus vasculaires.

D'une façon intéressante, des analyses préliminaires montrant que les racines de plantes *EgMyb1*⁺ sont capables de former du xylème secondaire comparable à celui des plantes pJR1, est extrêmement intéressant. En effet, une telle observation pourrait suggérer que les mécanismes contrôlant la formation du xylème secondaire dans les racines d'*Arabidopsis* ne sont pas les mêmes que dans la hampe florale. Cependant, une telle hypothèse est à replacer dans le contexte de nos résultats (Baghdady *et al.*, 2006 ; Résultats Chapitre 1) montrant que les profils d'expression des promoteurs *EgCCR* et *EgCAD* sont très similaires dans les racines et les hampes florales. Il est clair que des analyses approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène.

Au niveau des feuilles, nos résultats ont montré une diminution de taille dans les plantes *EgMyb1*⁺. Des analyses histologiques détaillées indiquent que la « quantité » de tissus vasculaires (xylème et phloème) présents dans la nervure centrale est diminuée. Cette diminution semblerait due à une réduction du nombre de cellules, mais également à une réduction de la taille des cellules suggérant ainsi que l'activité mitotique et le processus d'expansion cellulaire soient affectés. Encore une fois, des analyses approfondies sont nécessaires.

En comparaison avec les plantes *EgMyb1*⁺, l'organisation des tissus internes dans les hampes florales des plantes *EgMyb2*⁺ était beaucoup moins bouleversée. En effet, et malgré une diminution similaire dans le diamètre de la hampe florale, les hampes florales des plantes *EgMyb2*⁺ contiennent des tissus vasculaires (primaires et secondaires) comparables à ceux observés chez les plantes pJR1. Dans ce cas, la diminution du diamètre de la hampe florale semblerait due à la réduction du nombre de couches cellulaires dans le cortex associée à un aplatissement de ces cellules ce qui forme un cortex plus mince que chez les plantes pJR1.

Les modifications (ou non) au niveau des feuilles et des racines des plantes *EgMyb2*⁺ sont comparables à celles observées pour les plantes *EgMyb1*⁺.

C.3 La sur-expression des gènes Myb est associée à la présence de cellules

xylémiennes collapsées (EgMyb1) et aux modifications de la teneur en lignine (EgMyb1 et EgMyb2).

Nos résultats ont montré que la sur-expression du gène *EgMyb1* était associée à des modifications phénotypiques importantes des cellules dans le xylème. En effet, les analyses histologiques ont révélé la présence de cellules « collapsées » au niveau du xylème primaire. Un tel phénotype indique une résistance mécanique réduite au niveau de la paroi avec pour résultat que la cellule s'implose en réaction à des pressions mécaniques grandissantes associées à la croissance de la hampe florale.

La présence de cellules de ce type a également été notée dans d'autres études. Par exemple, la sous-expression du gène CCR chez le tabac est associée à une diminution de la quantité de lignine et la présence de cellules collapsées (Piquemal *et al.*, 1998). De même, le mutant *irx4* d'*Arabidopsis* (Jones *et al.*, 2001), dont le gène CCR est muté, est également caractérisé par la présence de cellules collapsées. D'autres études concernant la sous-expression du gène CCoAOMT (Zhong *et al.*, 1998, 2000) ont également signalés la présence de cellules déformées. Dans ces travaux, la présence de cellules collapsées était associée à une diminution de la quantité de lignine. Nos analyses histochimiques (réactif de Weisner) des hampes florales de plantes *EgMyb1*⁺ suggéraient également une diminution de la quantité de tissus lignifiés (fibres interfasciculaires, xylème secondaire). Afin de vérifier ce point, nous avons procédé à des analyses chimiques des hampes florales et des feuilles des plantes *EgMyb1*⁺ et *EgMyb2*⁺.

Les résultats du dosage des lignines Klason (Dence, 1992) ont indiqué que les hampes florales des plantes *EgMyb1*⁺ âgées d'un et de deux mois contiennent environ 11-12 % de lignine en moins que les plantes pJR1. Cette observation est en accord avec les études (Tamagnone *et al.*, 1998) montrant que la sur-expression du gène *AmMyb308* chez le tabac était associée à une diminution de la quantité de lignine. Dans ce cas, la diminution était plus importante dans la partie basale de la tige (57 %) en comparaison avec la partie apicale (18 %). Cette observation suggère que la diminution est corrélée à la quantité de lignine (la partie basale de la tige étant plus lignifiée que la partie apicale) et, en conséquence avec le développement de la plante. En comparaison, la diminution (11-12 %) de la quantité de lignine observée dans nos échantillons reste inférieur. Ces résultats suggéraient que la sur-expression d'un facteur Myb devrait donner lieu à une diminution dans la quantité de lignine. Cependant, d'autres travaux indiquent que la situation est plus complexe. Par exemple, la sur-expression du gène *EgMyb2* chez le tabac (Goicoechea *et al.*, 2005) n'induit pas de

modification significative dans la quantité de lignine. De même, la sur-expression du gène *PtMyb4* chez le tabac (Patzlaff *et al.*, 2003) est associée à une lignification ectopique et une augmentation significative de la quantité de lignine totale. Ces observations soulignent le fait que les facteurs Myb peuvent agir en tant qu'activateur ou répresseur d'un gène en fonction de l'interaction protéine-promoteur et la partie C-terminale de la protéine.

Nos analyses par thioacidolyse (Lapierre *et al.*, 1983 et 1996) ont indiqué que la sur-expression du gène *EgMyb1* n'induit pas de modification dans la structure (condensation, rapport S/G) de la molécule de la lignine isolée des hampes florales de plantes âgées d'un mois. Dans les plantes âgées de deux mois, nos analyses ont suggéré des modifications légères (augmentation du niveau de condensation, augmentation quantité d'unités H) dans la structure de la lignine. Cependant, aucune modification majeure dans le rapport S/G n'a été constatée. Cette observation est opposée à la situation chez le tabac où la sur-expression du gène *AmMyb308* est associée à une augmentation du le rapport S/G (Tamagnone *et al.*, 1998). D'une façon intéressante, la sur-expression du gène *EgMyb2* chez le tabac (Goicoechea *et al.*, 2005), induit une augmentation du rapport S/G. Une telle observation souligne la complexité des interactions facteur Myb / gène cible / espèce.

Nos résultats ont indiqué qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la quantité de lignine ni dans sa structure pour les feuilles provenant de plantes *EgMyb1*⁺ en comparaison avec les plantes pJR1. De plus, il est très probable que les quantités déterminées par le dosage Klason représentent une surestimation. Dans ce cas, il serait préférable d'utiliser d'autres techniques de quantification, par exemple le dosage par bromure d'acétyle qui est plus approprié pour doser la lignine dans des tissus faiblement lignifiés (Johanson *et al.*, 1961).

Pour les hampes florales de plantes *EgMyb2*⁺ âgées d'un mois, nos résultats du dosage des lignines Klason n'ont pas permis de mettre en évidence une modification significative de la quantité de lignine en comparaison des plantes témoins . En revanche, le dosage de lignine avec des plantes âgées de deux mois a indiqué que les hampes florales de plantes *EgMyb2*⁺ contiennent environ 6,5% plus de lignine que les plantes sauvages/pJR1. Cette observation est en accord avec les études (Patzlaff *et al.*, 2003a) qui ont montré que la sur-expression de gène *PtMyb4* de pin chez le tabac provoquait une augmentation dans la quantité de lignine. Au contraire de nos résultats, Goicoechea *et al.*, (2005) ont observé que la sur-expression de gène *EgMyb2* ne provoque pas de modification dans la quantité de lignine chez le tabac. Encore une fois, une telle observation souligne la complexité des interactions facteur Myb / espèce.

Comme pour les plantes *EgMyb1*⁺, les analyses de la structure de la lignine par thioacidolyse dans les hampes florales des plantes *EgMyb2*⁺ n'ont pas indiqué des différences significatives en comparaison avec les plantes pJR1. Cette situation est le contraire de celle où le même gène a été sur-exprimé chez le tabac (Goicoechea *et al.*, 2005). Dans ce dernier cas, la sur-expression est associée à une augmentation du rapport S/G.

Nos analyses chimiques sur les lignines ont montré des modifications intéressantes au niveau de quantité de lignine dans la hampe florale des plantes transformées. Cependant, les analyses de polymères polysaccharidiques n'ont pas montré de différence significative entre les plantes transformées et les plantes sauvages/pJR1. Il est possible que ces analyses qui étaient réalisées sur des plantules ne montrent pas de différences importantes. Cependant, il serait nécessaire de faire ces analyses sur des plantes plus âgées comme lesquelles utilisés pour le dosage de lignine.

D. CONCLUSION

En conclusion, la sur-expression des gènes *EgMyb1* et *EgMyb2* chez *Arabidopsis* est associée à des modifications très importantes de la croissance et du développement des plantes. Ces modifications sont associées à des modifications majeures du développement des tissus vasculaires chez les plantes *EgMyb1*⁺. Chez ces plantes, les modifications sont associées à un phénotype de cellules collapsées et, probablement, des modifications du métabolisme pariétal. La sur-expression de gènes *EgMyb1* et *EgMyb2* provoque également une perturbation dans le processus de lignification. Afin d'approfondir nos connaissances sur les bases moléculaires de ces modifications phénotypiques importantes, nous avons décidé d'adopter une stratégie « microarrays » en utilisant les puces CATMA. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le troisième chapitre des résultats.

RESULTATS
CHAPITRE III

Recherche des gènes cibles des facteurs de transcription *EgMYB1* et *EgMYB2*

La xylogénèse permet, à partir de cellules méristématiques indifférenciées, la mise en place de tissus vasculaires complexes. Cette différenciation passe par l'intermédiaire de mécanismes cellulaires fondamentaux tels que la division et l'expansion cellulaires, la formation d'une paroi secondaire lignifiée et la mort cellulaire programmée (Fig. 1) (Chaffey *et al.*, 2002; Mellerowicz *et al.*, 2001; Plomion *et al.*, 2001). De récentes approches de génomique et l'analyse de mutants ont mis en évidence que ces processus nécessitent la mise en place de programmes génétiques spécifiques régulés notamment par l'intermédiaire de facteurs de transcription (Allona *et al.*, 1998; Bonke *et al.*, 2003; Demura and Fukuda, 2007; Hertzberg *et al.*, 2001; Ko and Han, 2004; Oh *et al.*, 2003a; Schrader *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Ces programmes font intervenir plusieurs centaines de gènes qui sont exprimés de manière préférentielle dans le xylème en formation. Cependant, des études plus poussées, au niveau cellulaire, montrent que ceux-ci peuvent être exprimés de façon séquentielle lors de la xylogénèse, du cambium en division jusqu'à la mort cellulaire des vaisseaux (Demura *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2005; Schrader *et al.*, 2004)

Les gènes *EgMYB1* et *EgMYB2* sont spécifiquement exprimés dans le xylème et les protéines correspondantes sont capables de fixer *in vitro* les séquences *cis* de type MYB présentes sur les promoteurs *CAD* et *CCR* mais aussi de réguler *in planta* l'expression des gènes de la lignification, l'une comme répresseur (*EgMYB1*) et l'autre comme activateur (*EgMYB2*) (Goicoechea *et al.*, 2005). La surexpression de *EgMYB2* dans le tabac ou le peuplier induit des modifications structurales du xylème avec une modification du nombre et de la taille des vaisseaux, des parois secondaires épaissies et une teneur différente en lignines (Sylvain Legay, communication personnelle ; (Goicoechea *et al.*, 2005). Les résultats décrits dans les chapitres précédents montrent que cette action des facteurs *EgMYBs* sur la xylogénèse s'exerce également chez *Arabidopsis*. Ces résultats suggèrent donc que *EgMYB1* et *EgMYB2* peuvent avoir un rôle dans la xylogénèse par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de gènes cibles, et que ces mécanismes pourraient être conservés chez les plantes.

Dans ce cadre, l'analyse fonctionnelle de ces deux facteurs de transcription dans la plante modèle *A. thaliana* a été orientée vers la recherche des gènes cibles potentiels de ces deux facteurs de transcription. En effet, les phénotypes observés chez des arabettes surexprimant ces deux gènes laissent penser que cette plante modèle, dont le génome entier a

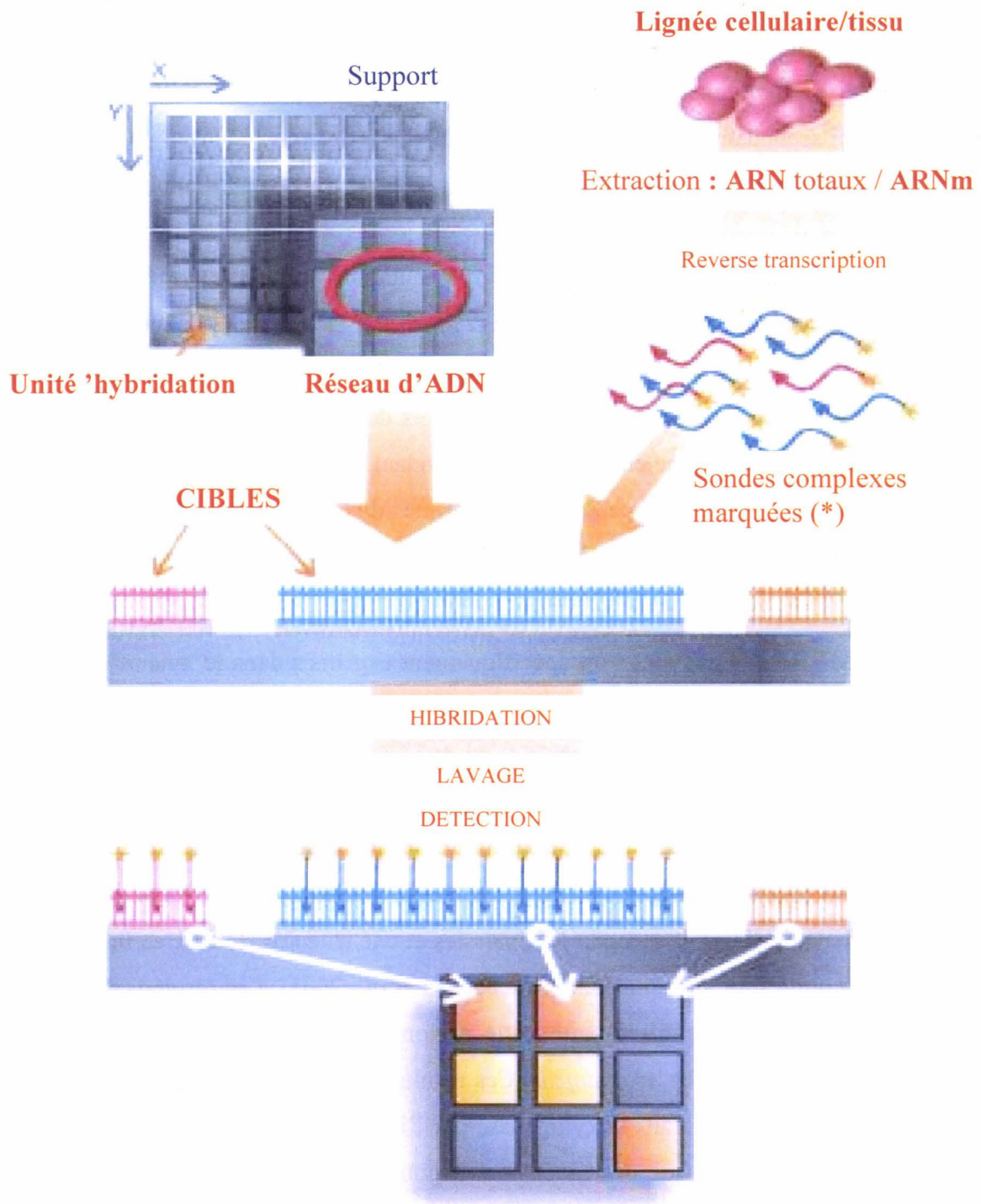


Figure 46 : **principe des puces à ADN**

Ici, pour chaque échantillon de cellules, on réalise cette expérience avec une puce à ADN permettant d'identifier 12650 ARNm – donc 12650 gènes – différents (avec 32 unités d'hybridation par ARNm). Les puces utilisées pour les différents échantillons sont identiques. Ainsi, pour chaque ARNm identifiable, on obtient un profil d'expression.

été séquencé, peut servir d'outil pour une approche de génomique à grande échelle afin de déterminer quels gènes ont leur expression affectée par la surexpression ectopique de *EgMYB1* ou *EgMYB2*. Ainsi, une analyse transcriptomique sur puces à ADN (microarray) contenant l'ensemble des gènes de l'arabette a été réalisée.

A. Génération des données de transcriptomique

Les expériences de puces à ADN permettent d'étudier l'expression de milliers de gènes, voire d'un génome complet, simultanément. De cette façon, il peut être possible d'identifier un ensemble de gènes dont l'expression répond à une condition particulière. D'autres applications concernent la cartographie de transcrits (Kim *et al.*, 2003), le géotypage (Borevitz *et al.*, 2003; West *et al.*, 2006), ou bien l'analyse structurale des promoteurs (Gao *et al.*, 2004). D'autre part, l'analyse comparée de l'ensemble des transcrits présents dans divers tissus, conditions physiologiques, ou chez des mutants, permet de regrouper les gènes ayant des profils d'expression apparentés en familles fonctionnelles (Rensink and Buell, 2005).

L'importance de plus en plus grande de ces approches, qui souligne leur utilité dans l'analyse fonctionnelle de gènes d'intérêt, est visualisable par une simple recherche sur PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>) avec les mots clefs « microarray » et « plant ». Celle-ci génère à ce jour une liste de 1086 références dont 364 pour les seules deux dernières années. Cependant, s'il est vrai que les puces à ADN sont maintenant relativement faciles d'accès et donc de plus en plus utilisées, les résultats qu'elles fournissent restent complexes du fait de la quantité d'information qu'elles génèrent.

A.1 Principe des puces à ADN

Le principe des puces à ADN est simple. Sur un support solide sont fixés des milliers de fragments d'ADN de façon géométrique à l'aide d'un robot (arrayer). Ainsi, chacun des fragments d'ADN est représenté par un spot sur le support (ou puce). Ils servent de cibles pour fixer de façon très spécifique les fragments de gènes complémentaires, présents dans les échantillons biologiques à tester grâce au phénomène d'hybridation, propre aux acides nucléiques. L'hybridation est détectée par diverses techniques, mais le plus couramment on associe la sonde à un marqueur fluorescent ou radioactif. Le marquage peut être double afin de faire une analyse comparative de deux pools d'ARN d'origines différentes (un pool marqué avec un fluorochrome rouge et un avec un fluorochrome vert par exemple) (Fig. 46).

échantillons biologiques à tester grâce au phénomène d'hybridation, propre aux acides nucléiques. L'hybridation est détectée par diverses techniques, mais le plus couramment on associe la sonde à un marqueur fluorescent ou radioactif. Le marquage peut être double afin de faire une analyse comparative de deux pools d'ARN d'origines différentes (un pool marqué avec un fluorochrome rouge et un avec un fluorochrome vert par exemple) (Fig. 46).

La quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont ensuite rendues possibles au moyen d'un système d'acquisition d'image puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques spécialement conçus à cet effet. Les résultats obtenus sont ensuite validés sur le plan statistique et interprétés dans un contexte biologique.

A.2 Le projet CATMA

Suite au séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana*, quelque 27 500 gènes ont été identifiés par analyse bioinformatique. À l'inverse des puces dites « thématiques », le programme CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray ; <http://www.catma.org>) a eu pour objectif de produire une puce à ADN couvrant le génome entier d'*Arabidopsis* et pouvant donc être utilisée pour toutes les expériences d'études du transcriptome. C'est ainsi qu'a été développée, grâce à l'association d'une dizaine d'organismes européens dont le CNRS, une puce contenant 24 576 gènes prédits à partir de la séquence du génome d'*Arabidopsis* à l'aide du logiciel EUGEN'HOM (<http://genopole.toulouse.inra.fr/bioinfo/eugene/EuGeneHom/cgi-bin/EuGeneHom.pl>) (Foissac *et al.*, 2003). Ces gènes sont représentés sous la forme d'amplicons PCR d'ADN double brin choisis pour être les plus spécifiques possible (GST) grâce au logiciel de prédiction SPADS (Specific Primers & Amplicons Design Software) (Thareau *et al.*, 2003). Leur taille varie de 150 à 600 nucléotides. L'ensemble des séquences est disponible dans la base de données FLAGdb++ (<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/index.shtml>) (Samson *et al.*, 2004). La puce CATMA contient également 9 contrôles correspondant à des gènes de sélection ou marqueurs couramment utilisés en génétique fonctionnelle chez *Arabidopsis*, et 12 GSTs issus de gènes humains sans homologues chez l'arabette. L'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, <http://www.evry.inra.fr/public/projects/transcriptome/transcriptome.html>) du Gépôle d'Evry-Val d'Essonne, est chargée de l'hybridation des puces et de l'analyse statistique des données brutes. En février 2007, plus d'une centaine de projets ont été menés à bien dont 47 ont leurs résultats disponibles sur CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb>).

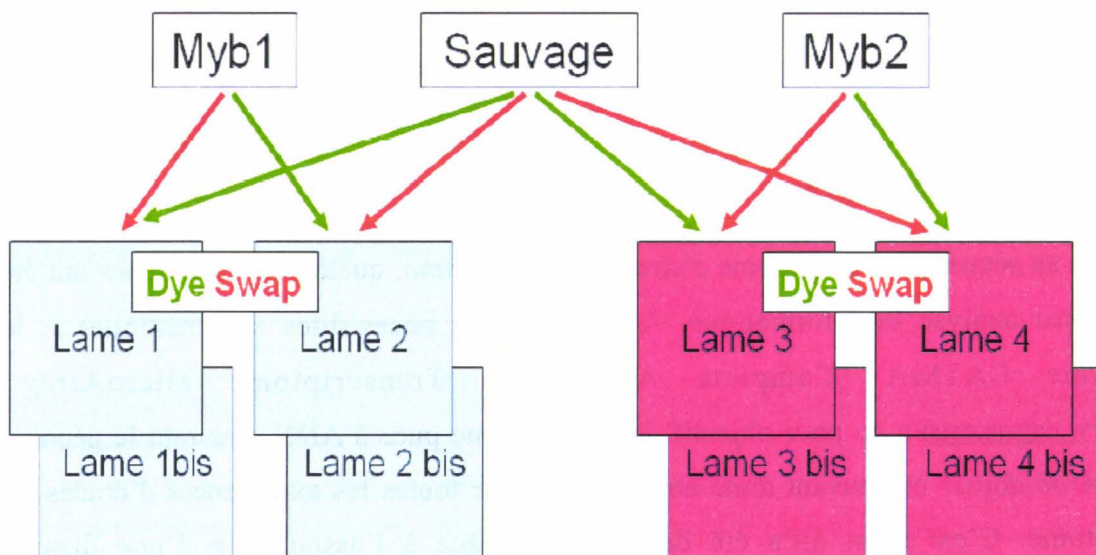


Figure 47 : schéma représentant le plan d'expérience suivi et le nombre de lames produites pour chaque tissu. Le dye-swap permet d'éviter les erreurs dues à des préférences de marquage par l'un ou l'autre des fluorochromes (on réalise 2 puces pour la même analyse en inter changeant le marqueur de l'ARN témoin avec le marqueur de l'ARN sujet). Chaque lame est doublée (lames bis) pour permettre l'analyse statistique. Ainsi, pour chaque tissu, 8 lames ont été réalisées.

A.3 Description du dispositif expérimental pour identifier les gènes cibles potentiels des facteurs *EgMYB* chez *Arabidopsis*

Le plan d'expérience a été construit pour tenir compte de 3 critères qui peuvent affecter la qualité des résultats et faciliter leur analyse (pour revue : (Yang and Speed, 2002) :

la variabilité biologique : un même transgène peut induire des variations dans les effets observés en fonction de la lignée transformée. D'autre part, l'arabette est très sensible aux variations des conditions de culture qui, mêmes minimales, peuvent induire des différences phénotypiques.

La variabilité technique : les techniques de fabrication des puces à ADN, la manipulation des acides nucléiques, le marquage des sondes, la détection des différents marqueurs, et l'identité même du manipulateur sont variables et peuvent donc influencer les résultats sans lien avec les conditions testées.

Obtenir un nombre suffisant de données à un coût minimum pour comparer 2 organes (feuilles et hampes) dans trois conditions (contrôle et plantes transgéniques *EgMYB1* et 2).

Afin de s'affranchir de la variabilité biologique tout en réduisant le nombre d'hybridations, les sondes ont été fabriquées avec des pools d'ARN préparés à partir de plusieurs lignées transgéniques, conformément aux recommandations de (Kendzioriski *et al.*, 2005). Ainsi, les ARNs ont été prélevés à partir de rosettes ou de hampes florales issues de 5 plantes pour quatre lignées par transgène (lignées *EgMYB1*+ N°5, N°9, N°11 et N°20 et *EgMYB2*+ N°4, N°12, N°14 et N°16), soit un total de 20 plantes par échantillon. Ces lignées ont été choisies suite à la caractérisation phénotypique décrite dans les chapitres précédents. Elles correspondent à des lignées exprimant les transgènes et montrant des phénotypes au niveau des feuilles ou des hampes florales. La préparation des ARNs des plantes contrôles pJR1 (lignées N°1, 2, 3 et 4) a été faite selon le même principe.

Le schéma des hybridations a été étudié pour répondre à une question prioritaire sur la différence entre une lignée transgénique et la plante contrôle, tout en permettant de répondre indirectement à une question secondaire, à savoir qu'elle est la différence entre les deux types de lignées transgéniques (Yang and Speed, 2002 ; Fig. 47). Ainsi, chaque type de plante transgénique sera comparé au contrôle, contrôle qui pourra faire le lien entre les deux types de plantes transgéniques. D'autre part, le nombre minimum d'hybridations a été répété une fois (2 dye-swaps) pour obtenir un total de 8 valeurs par gène, permettant une analyse statistique fiable.

Resultats_myb_puces.xls																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Q	R	S	V	W	X	Y	Z	AA	AB
1		7	10	13		0	###						validated						
2										5.E-02			miscellaneous						
3		-2,5	-2	-1	non diff	1	1,5					3	sent	10_2_510_2_510_2_5			10_2_510_2_510_2_5		
4													GonInfo						
5													release						
6		E	exon	G	good								Family						
7		I	intron	P	primer dimers								Project nb	rs4-3	rs4-3	rs4-3	rs4-3	rs4-3	
8		M	multiple	D	double band								Title	Myb	Myb	Myb	Myb	Myb	
9		V	virtual	B	blank								Sample type	leaf	leaf	leaf	inflo	inflo	
10				F	wrong size								R sample	Myb1	Myb1	Myb1	Myb1	Myb1	
11													G sample	Ws	Ws	Ws	Ws	Ws	
12	N*	ID	Sped	PCR	At1	At2	At3	f fonction	2101	f BioProcGO	2B1	2B1	f	Rat	Fval	f	Rat	Fval	
13	1126	CATMA1A	E1	G	AT1G11	-	-	transaldolase, putative	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	12,59	-0,85	4,14E-3	12,70	1,03	0,00E+0	
14	9990	CATMA2A	E3	G	AT2G44	-	-	transketolase, putative	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	9,24	-1,16	0,00E+0	10,16	0,88	3,54E-4	
15	20233	CATMA5A	E1	G	AT5G11	-	-	transaldolase, putative	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	10,90	-1,56	0,00E+0	10,59			
16	22347	CATMA5A	E1	G	AT5G44	-	-	ribose 5-phosphate isomerase-relate	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	9,53	1,27	0,00E+0	9,88			
17	10976	CATMA3A	E1	G	AT3G04	-	-	ribose 5-phosphate isomerase-relate	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	10,57	1,99	0,00E+0	8,79	-0,76	5,88E-3	
18	5191	CATMA1A	E3	G	AT1G71	-	-	ribose 5-phosphate isomerase-relate	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	11,89	1,08	0,00E+0	12,11	-1,67	0,00E+0	
19	6205	CATMA1B	E2	G	AT1G71	-	-	ribose 5-phosphate isomerase-relate	-	5-phosphoribose 1-d	-	-	11,77	0,91	1,19E-9	11,56	-1,87	0,00E+0	
20	743	CATMA1A	E1	G	AT1G00	-	-	pseudogene, YABBY2	-	abaxial cell fate speci	-	-	8,18	0,92	4,92E-10	8,07	-1,43	0,00E+0	
21	17116	CATMA4A	E1	G	AT4G19	-	-	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, pi	-	abscisic acid biosyntf	-	-	11,87	-1,34	0,00E+0	11,33	-0,62	5,31E-3	
22	13751	CATMA3A	E2	G	AT3G44	-	-	lipoygenase (LOX2)	-	abscisic acid biosyntf	-	-	11,81	1,54	0,00E+0	12,13	-2,90	0,00E+0	
23	5852	CATMA1A	E1	G	AT1G76	-	-	dehydration-responsive protein-relate	-	acetate biosynthesis	-	-	11,04	-1,38	0,00E+0	11,51			
24	14552	CATMA3A	E1	G	AT3G54	-	-	pKB-type carbohydrate kinase family p	-	acetate fermentation	-	-	9,56	1,18	0,00E+0	9,75			
25	22918	CATMA5A	E1	G	AT5G45	-	-	ATP-citrate synthase, putative / ATP-cit	-	acetyl-CoA biosynthes	-	-	10,02	-0,89	3,04E-9	10,57	1,12	0,00E+0	
26	965	CATMA1A	E1	G	AT1G10	-	-	expressed protein	-	acetyl-CoA biosynthes	-	-	11,96	-1,07	0,00E+0	11,75			
27	12175	CATMA3A	E1	G	AT3G19	-	-	dihydrolipoamide dehydrogenase 1, p	-	acetyl-CoA biosynthes	-	-	11,06	-1,46	0,00E+0	11,49	1,53	0,00E+0	
28	11266	CATMA3A	E1	G	AT3G07	-	-	formin homology 2 domain-containing	-	actin cytoskeleton reo	-	-	8,89	-0,68	3,14E-4	9,30	1,53	0,00E+0	
29	23435	CATMA5A	E1	G	AT5G56	-	-	actin-related protein, putative (ARP8)	-	actin filament-based i	-	-	10,51			10,77	-1,19	0,00E+0	
30	17403	CATMA4A	E1	G	AT4G22	-	-	adenine phosphoribosyltransferase, p	-	adenine salvage	-	-	11,42	-1,33	0,00E+0	11,49	1,11	0,00E+0	
31	20073	CATMA5A	E1	G	AT5G11	-	-	adenine phosphoribosyltransferase, p	-	adenine salvage	-	-	9,37	-2,32	0,00E+0	8,82			
32	6040	CATMA1A	I1	G	AT1G80	-	-	adenine phosphoribosyltransferase 2	-	adenine salvage path	-	-	10,61			10,49	1,36	0,00E+0	
33	1513	CATMA1A	E3	G	AT1G19	-	-	mercaptopyruvate sulfurtransferase (h	-	aging	-	-	10,98	-1,34	0,00E+0	11,00	1,69	0,00E+0	
34	18164	CATMA4A	M1	G	AT4G30	AT4		senescence-associated family protein	noc	aging	No		12,01	-2,37	0,00E+0	11,56	1,02	0,00E+0	
35	24376	CATMA5A	E1	G	AT5G86	-	-	senescence-associated family protein	-	aging	-	-	13,51	0,96	3,32E-11	13,34	1,00	0,00E+0	
36	11671	CATMA3A	E2	G	AT3G11	-	-	senescence-associated family protein	-	aging	-	-	9,33	-1,51	0,00E+0	10,10	0,99	0,00E+0	
37	18165	CATMA4A	E2	G	AT4G30	-	-	senescence-associated family protein	-	aging	-	-	10,36	-1,95	0,00E+0	9,88	0,91	6,72E-10	
38	18150	CATMA4A	E2	G	AT4G30	-	-	MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / er	-	aging	-	-	12,85	-1,04	0,00E+0	12,25			
39	18686	CATMA4A	E1	G	AT4G35	-	-	senescence-associated protein (SEN	-	aging	-	-	8,16	1,41	0,00E+0	8,11	-1,02	0,00E+0	
40	9432	CATMA2A	E1	G	AT2G35	-	-	ribonuclease 2 (RNS2)	-	aging	-	-	12,28	1,73	0,00E+0	12,31	-1,99	0,00E+0	
41	9063	CATMA2A	E1	G	AT2G35	-	-	harpin-induced family protein (YLS9) /	-	aging	-	-	11,33	1,92	0,00E+0	10,92	-2,22	0,00E+0	
42	15119	CATMA3A	E1	G	AT3G60	-	-	glycosyl hydrolase family 1 protein	-	aging	-	-	9,67	3,24	0,00E+0	9,81	-2,53	0,00E+0	
43	17934	CATMA4A	M1	G	AT4G28	AT4		senescence-associated protein, putat	noc	aging	No		10,08	3,04	0,00E+0	10,36	-3,77	0,00E+0	
44	3023	CATMA1A	E1	G	AT1G35	-	-	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase	-	alkaloid biosynthesis	-	-	11,11	-1,03	0,00E+0	11,08			

Figure 48 : Partie du fichier EXCEL envoyé par l'URGV contenant les données de l'expression des gènes d'*Arabidopsis* dans les inflorescences ou les feuilles de plantes surexprimant les facteurs de transcription EgMYB1 ou EgMYB2.

A.4 Analyses statistiques et tableaux de résultats

Les données brutes issues des hybridations ont été analysées statistiquement par la plate-forme de l'URGV à l'aide d'un logiciel spécifiquement développé pour le projet CATMA par M.L. Martin-Magniette en collaboration avec l'équipe « Statistique et Génome » du département OMIP de l'INA-PG (Lurin *et al.*, 2004).

Les données brutes pour un spot sont transformées en \log_2 de l'intensité médiane aux longueurs d'ondes 635 nm (rouge) et 532 nm (vert) pour stabiliser la variance et revenir à un modèle additif. Le bruit de fond n'est pas soustrait. Une normalisation par lame est réalisée pour retirer les biais systématiques. Dans un premier temps, les spots considérés comme mauvais par l'expérimentateur sont exclus de l'analyse. Puis une normalisation globale dépendant de l'intensité est réalisée par la procédure loess (Yang *et al.*, 2002) pour corriger les biais de fluorochromes. Enfin à chaque log-ratio d'un bloc (chaque puce est divisée en 3 metablocs, comprenant chacun 64 blocs de 144 spots) est soustraite la médiane des log-ratios de ce bloc afin de corriger un effet de zone. Pour déterminer quels sont les gènes différentiellement exprimés, un test de Student sur données appariées est réalisé sur les log-ratios. Le nombre d'observations par spots étant généralement faible, il est inadéquat de calculer une variance par gène. Pour cette raison, la variance du log-ratio est considérée comme étant égale pour tous les gènes et les spots montrant une variance extrême sont exclus. Les probabilités critiques brutes sont ajustées par la méthode de Bonferroni, qui contrôle le Family Wise Error Rate qui est la probabilité d'avoir au moins un faux positif.

Les résultats de l'analyse différentielle ainsi que des informations concernant chaque GST sont fournis dans un fichier EXCEL (Fig. 48). Ce fichier EXCEL de résultats comporte 2 feuilles, nommées MYB1 (hampe florale et feuille) et MYB2 (hampe florale et feuille) selon quel facteur MYB est sur-exprimé et selon l'organe testé. Une feuille comprend, pour chaque gène, le \log_2 des intensités moyennes, le \log_2 ratio moyen, la p-value indiquant la significativité de la différence observée entre les \log_2 des intensités dans chaque condition, ainsi que des informations sur l'identité et la qualité des GSTs. On retrouve ainsi l'annotation Gene Ontology (GO, <http://www.geneontology.org/>) donnant les processus biologiques, les compartiments cellulaires et les fonctions moléculaires probables du gène cible.

A.5 Pré-traitement informatique des résultats des hybridations sur puces CATMA

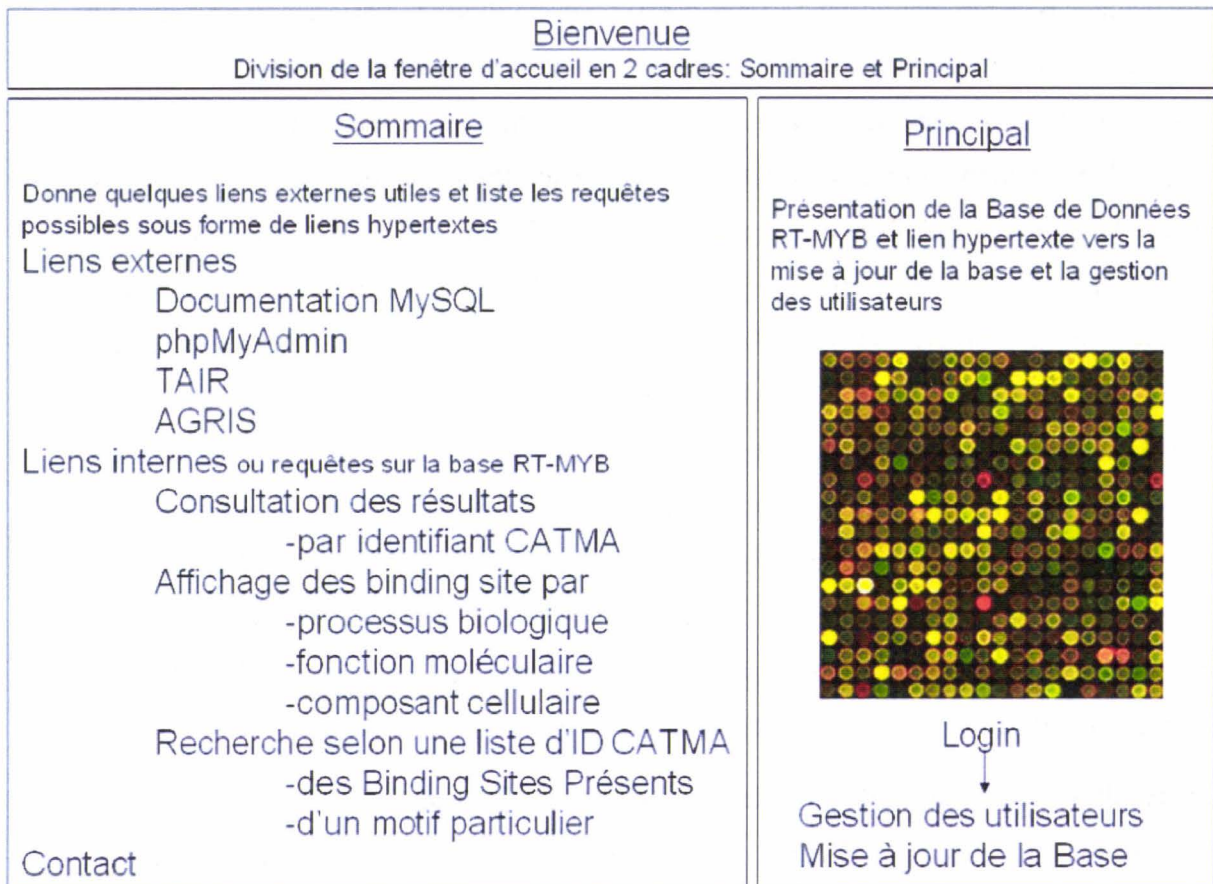


Figure 49 : Organisation de la page d'accueil. 'sommaire.php' propose une liste de liens hypertextes vers des sites Internet externes d'intérêt et des liens hypertextes vers d'autres programmes PHP permettant de réaliser des requêtes sur la base de données. 'sommaire.php' propose aussi un lien *Contact* pour envoyer un mail au développeur du site afin de pouvoir poser des questions ou faire des remarques. 'principal.php' présente la base de données RT-MYB et affiche un lien vers la gestion des utilisateurs et la mise à jour de la base.

donc été décidé de réaliser un travail préliminaire de tri et d'arrangement des données pour faciliter l'analyse. Ce travail a été accompli avec l'aide de Mlle Sophie Candel, étudiante du Master2 Professionnalisé « Bioinformatique » de l'Université Paul Sabatier Toulouse 3 (Candel, 2006).

Le cahier des charges qui a orienté ce travail de traitement informatique des données contenait plusieurs objectifs :

- Pouvoir stocker tous les résultats dans une page des données (Fig. 49) et leur ajouter, pour chaque GST présent sur la puce, la séquence du promoteur du gène correspondant. Les séquences des 25 000 gènes de l'arabette sont disponibles sur le site du TAIR (<http://www.arabidopsis.com>).
- Pouvoir retrouver facilement les résultats selon l'identifiant CATMA, ou *via* un processus biologique particulier.
- Retrouver la liste des 'binding site' présents dans les promoteurs d'une liste de gènes choisis par l'utilisateur ou ayant le même processus biologique, le même compartiment cellulaire ou encore la même fonction moléculaire et pouvoir classer ces gènes en fonction de leur profil de promoteur (présence ou absence de tel ou tel 'binding site').
- Pouvoir regrouper les gènes ayant le même profil de 'binding site'.
- Pouvoir retrouver une séquence particulière dans le promoteur d'un ou plusieurs gènes.
- Afficher les résultats de façon claire et pouvoir les enregistrer sur son propre ordinateur.
- Pouvoir mettre à jour la base de données.
- Pouvoir gérer les accès utilisateurs.

Tout cela devant se faire au travers d'une interface graphique conviviale permettant d'exécuter des requêtes SQL sur la base de données de façon automatique.

Les langages de développement utilisés ont été :

PERL (Practical Extraction and Report Language, <http://www.perl.com/download.csp>) qui est très utilisé dans le domaine de la bioinformatique et est certainement l'un des langages

Les langages de développement utilisés ont été :

PERL (Practical Extraction and Report Language, <http://www.perl.com/download.csp>) qui est très utilisé dans le domaine de la bioinformatique et est certainement l'un des langages de programmation les plus simples à utiliser. De plus, il est spécialement dédié au traitement des fichiers texte car il supporte les expressions régulières.

PHP (Hypertext Preprocessor, <http://www.php.net/downloads.php>) qui est un langage de programmation proche du PERL qui est interprété par le serveur et produit éventuellement un résultat HTML via la fonction 'echo'. Il permet de générer des pages HTML de façon dynamique, notamment grâce à la communication avec une base de données (utilisation la plus courante de PHP). D'ailleurs, il existe des fonctions spécialement élaborées dans ce but.

En ce qui concerne le système de gestion de la base de données, celui-ci a été réalisé avec **MySQL** (<http://dev.mysql.com/downloads/>) qui, outre sa gratuité, est utilisé dans de très nombreux cas car sa fiabilité est excellente et il permet de créer des tables contenant plusieurs milliards d'enregistrements (ce qui est largement suffisant pour la base de données que nous voulions développer). De plus, MySQL peut être utilisé au moyen de clients écrits en PERL. Les tables de la base de données et les quelques requêtes simples ont été créées à l'aide de **PhpMyAdmin** (http://www.phpmyadmin.net/home_page/downloads.php). C'est un outil écrit en PHP qui permet d'administrer les bases de données MySQL au travers d'une interface WEB (Fig. 49).

L'interface Homme/Machine de la base de données a été codée en PHP en raison des facilités qui existent entre ce langage et le Système de Gestion de Base de données Relationnel MySQL. Il existe en effet des fonctions spécifiques en PHP qui permettent de questionner les bases MySQL. Elle est accessible en interne sur le serveur de l'UMR5546 à l'adresse suivante : <http://194.199.55.219/~candel/bienvenue.php> (Fig. 49).

B. Analyse des résultats

B.1 Le tri des données

B.1.1 Les règles du tri

La lecture la plus simple des résultats consiste à regarder le ratio (\log_2) qui donne le rapport entre le niveau d'expression d'un gène dans la plante transgénique par rapport à ce qu'il est dans la plante contrôle, ainsi que la p-value qui valide la significativité statistique de la différence observée. Sachant que $\log_2 X = n$ si $2^n = X$, alors, si n vaut 1 cela veut dire que

Table 18 : Données statistiques sur les résultats des puces à ADN

	EgMYB1		EgMYB2	
	Feuille	Inflorescence	Feuille	Inflorescence
Nb de gènes différentiellement exprimés (p-val<0,05)	5058	3920	2905	3856
Nb de gènes avec Log2 ratio < -1	1245	766	871	682
Nb de gènes avec Log2 ratio < -1,5	554	367	399	292
Nb de gènes avec Log2 ratio < -2,5	131	91	94	68
Nb de gènes avec Log2 ratio > 1	1116	772	696	945
Nb de gènes avec Log2 ratio > 1,5	427	287	293	419
Nb de gènes avec Log2 ratio > 2,5	74	56	78	102
Nb de catégories « Probables »	79	51	61	55
Nb de catégories « Possibles »	259	220	216	221
Nb de catégories « Improbables »	163	151	158	108
Nb de gènes « Probables »	398	238	233	304



chance sur 100 que le résultat obtenu soit un artefact. En général, une p-value inférieure à 0,05 permet d'estimer qu'un résultat est significatif. Nous avons choisi une p-value maximale de 0,05 pour valider la significativité d'un résultat.

Une première analyse sommaire des résultats montre que la surexpression de *EgMYB1* entraîne une modification de l'expression de 5058 gènes dans les feuilles et de 3920 dans les tiges, dont 2094 gènes sont communs aux deux organes, par rapport au contrôle (p-val < 0,05) (Table 18). La surexpression de *EgMYB2* modifie l'expression de 2905 gènes dans les feuilles, de 3856 dans les tiges, dont 1687 gènes communs aux deux organes. D'autre part, si l'on regarde les 10 gènes dont l'expression est la plus fortement modulée par *EgMYB1* ou *EgMYB2*, en positif ou négatif, et quel que soit l'organe (Annexe 10), on trouve une diversité dans les fonctions moléculaires potentielles ou des processus biologiques concernés qui semble difficile à interpréter. Dans le même ordre d'idée, plus de 300 gènes montrent une très forte modification de leur expression ($|\log_2| > 2,5$) dans les plantes *EgMYB1* ou *EgMYB2* (Table 18). Non seulement ces nombres sont toujours élevés mais en plus rien ne permet de présupposer que les gènes cibles potentiels d'arabette des facteurs MYB d'*Eucalyptus* soient tous parmi les gènes les plus affectés.

Un autre résultat doit être pris en compte. Il s'agit du nombre de facteurs de transcription dont l'expression est modulée. Ainsi, 309 gènes de facteurs de transcription sont affectés dans les feuilles, et 272 dans les inflorescences, de plantes *EgMYB1+*. Parmi ceux-ci, 33 et 47, respectivement, sont des facteurs MYBs. Dans les plantes *MYB2+*, il y a 268 facteurs de transcription (31 MYBs) affectés dans les inflorescences, et 186 (27 MYBs) dans les feuilles. Sans savoir si cette modulation de leur expression est directement liée à la surexpression des facteurs *EgMYBs*, il est en par contre sur que ces gènes doivent affecter l'expression de leurs propres gènes cibles.

Dans l'objectif d'identifier les quelques gènes cibles potentiels des facteurs *EgMYBs*, ces résultats nous obligent à mettre en place une procédure de tri qui permette de réduire à seulement quelques dizaines ce très grand nombre de gènes initialement mis en avant tout en apportant une explication biologique à ce tri.

Ce tri doit d'autre part être strict afin d'assurer l'élimination de tous les gènes faux-positifs, au risque d'exclure également des gènes effectivement cibles. En effet, notre objectif est d'obtenir une liste de gènes vrais-positifs, même non exhaustive, mais sans faux positifs.

La règle fondatrice du tri que nous avons mis en place repose sur l'idée qu'un facteur de transcription affecte l'expression d'un groupe de gènes qui interviennent dans un processus cellulaire commun. Ainsi, la recherche des gènes cibles d'un facteur de transcription peut être abordée dans le cadre élargi d'un lien facteur de transcription-processus métabolique, plutôt que dans le cadre restreint d'un lien individualisé facteur de transcription-gène cible. Par exemple, un des gènes présent dans la liste des 10 plus fortement modulés (Annexe 10) peut faire partie d'un processus biologique pour lequel une grande partie des gènes ont aussi leur expression modulée, bien que moins fortement. Dans ce cas, ce gène est gardé car validé par deux lectures complémentaires des résultats. Au contraire, un gène avec une expression modulée mais dont les partenaires au sein d'une famille fonctionnelle ne sont pas affectés sera considéré comme faux-positif

B.1.2 Les résultats du tri en fonction de la classification GO et des rapports d'expression par rapport au contrôle

Pour chaque type de plante (surexprimeur MYB1⁺ ou MYB2⁺) et pour chaque organe (feuilles ; inflorescence ou hampe florale), les 25 000 gènes de la puce CATMA ont été rassemblés par catégories fonctionnelles GO en fonction du processus biologique (BioProc), afin de faire ressortir non plus un gène en particulier mais plutôt un ensemble de gènes impliqués dans un même processus. Ensuite, dans chaque catégorie, la proportion de gènes différenciellement exprimés en fonction de la valeur du ratio (\log_2) a été calculée. Enfin, les différentes classes BioProc ont été triées de façon décroissante en fonction de la proportion de gènes ayant une valeur absolue du \log_2 du ratio supérieure à 2 puis supérieure à 1 et enfin supérieure à 0.

Les processus biologiques ont pu ainsi être définis comme « probables » (au moins 5% des gènes du processus montrent un $\log_2 > 2$), « possibles » (au moins 5% des gènes du processus montrent un $\log_2 > 1$) et « improbables » (pas de gènes avec un $\log_2 > 1$) (Table 18).

Seules les catégories probables ont été considérées par la suite. Elles sont au nombre de 79 et 51 dans les feuilles des transformants *EgMYB1* et *EgMYB2*, respectivement, et de 61 et 55 dans les inflorescences des transformants *EgMYB1* et *EgMYB2*, respectivement (Annexes 11 et 12). Le nombre de gènes considérés comme « probables » qu'elles contiennent représentent moins de 10% des gènes initialement détectés (Table 18).

L'utilisation du promoteur CaMV 35S pour surexprimer les gènes *EgMYB* laisse supposer une présence des facteurs *EgMYB* dans les deux types d'organes. Même si des réponses différentes sont attendues entre les feuilles et les inflorescences, en particulier en relation avec les différents contextes cellulaires, il est possible d'imaginer qu'une partie des gènes cibles potentiels des facteurs *EgMYB* voient leur expression affectée dans les deux types d'organes. Les listes des processus biologiques probables des feuilles et inflorescences ont donc été comparées pour ne garder que ceux qui étaient communs (Annexe 13). Au total, 31 processus biologiques répondent à la surexpression de *EgMYB1* dans l'ensemble de la plante, impliquant 127 gènes différentiellement exprimés à la fois dans les feuilles et dans l'hampe florale. Il y a 32 processus biologiques qui répondent à la présence de *EgMYB2* impliquant 110 gènes différentiellement exprimés à la fois dans les feuilles et dans l'hampe florale. Il existe 20 processus biologiques probables communs aux plantes *EgMYB1* et *EgMYB2* qui sont communs aux deux facteurs de transcription (Annexe 14).

B.2 Les processus biologiques qui dépendent probablement des gènes *EgMYB1* et *EgMYB2*

B.2.1 Les processus probables communs aux deux organes des surexprimeurs *EgMYB1*⁺

Ceux-ci sont au nombre de 31 (Annexe 13). Ils peuvent être regroupés en plusieurs sous-groupes :

- la biogenèse cellulaire, qui comprend en grande partie la formation de la paroi cellulaire avec par exemple cell elongation, cell wall modification during cell expansion, cell wall catabolism, cellulose biosynthesis, lignin biosynthesis et S-adenosylmethionine biosynthesis ;
- les métabolismes secondaires avec en particulier les composés phénoliques avec des catégories telles que phenylpropanoid metabolism, flavonoid biosynthesis, pentacyclic triterpenoid biosynthesis, alkaloid biosynthesis et glucosinolate biosynthesis ;
- la signalisation hormonale avec auxin mediated signaling, response to abscisic acid stimulus, response to ethylene stimulus ;
- le transport avec boron transport, carbohydrate transport, nucleotide-sugar transport ;

- le métabolisme cellulaire, en particulier le métabolisme carboné, avec galactose metabolism, glycerol biosynthesis, lipid catabolism, one-carbon compound metabolism, nitrate assimilation ;
- la réponse aux stress avec response to cold, response to dessication, response to heat et response to pest/pathogen/parasite;
- l'expression génique avec negative regulation of transcription ;
- et le développement avec aging, flower development, lateral root morphogenesis et positive gravitropism.

Ce classement peut évidemment être nuancé dans le sens où certains des processus biologiques peuvent avoir plusieurs rôles. Par exemple la S-adenosylméthionine est un donneur de groupement méthyl en particulier lors de la synthèse des précurseurs de lignines, mais joue également le rôle de précurseur de la synthèse d'éthylène. Un autre exemple concerne la voie de signalisation de l'ABA qui pourrait être associée à la réponse aux stress hydriques. Enfin, un cas intéressant concerne le transport du bore qui est rangé dans les catégories transport ionique mais qui pourrait en fait être associé à la synthèse des lignines. En effet, il est admis que le bore régulerait les activités hydroxylase et oxydase des phénolases impliquées dans la synthèse des acides caféique et hydroxyferulique (Lewis, 1980).

Une distinction supplémentaire peut-être apportée entre ces processus, notamment, en termes de proportion de gènes impliqués. Si l'on trie ces catégories, par exemple en prenant les plus représentatives en terme de gènes impliqués en prenant en compte à la fois le nombre de gènes impliqués et la taille de la catégorie correspondante (on peut utiliser un facteur (nb de gènes impliqués) x (pourcentage de gènes impliqués)), les dix premières catégories sont *lignin biosynthesis*, *cellulose biosynthesis*, *phenylpropanoid metabolism*, *flavonoid biosynthesis*, *aging*, *response to heat*, *response to ethylene stimulus*, *response to dessication*, *one-carbon compound metabolism*, *S-adenosylmethionine biosynthesis*.

Il est intéressant de noter que la plupart de ces processus sont connus pour intervenir lors de la formation du xylème. D'autre part l'intervention de facteurs MYBs dans la régulation de la plupart de ces processus a déjà été démontrée (Abe *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 1997; Aharoni *et al.*, 2001; Celenza *et al.*, 2005; Cominelli *et al.*, 2005; Daniel *et al.*, 1999; Goicoechea *et al.*, 2005; Gomez-Maldonado *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2005; Nagaoka and Takano, 2003; Tamagnone *et al.*, 1998; Vailliau *et al.*, 2002), en particulier, celles de

EgMYB1 et *EgMYB2* dans la régulation de la synthèse des lignines (Legay, communication personnelle ; (Goicoechea *et al.*, 2005).

B.2.2 Les processus probables communs aux deux organes des surexprimeurs *EgMYB2*⁺

Dans le cas des plantes *EgMYB2*⁺, une grande partie des catégories fonctionnelles (20 en tout, Annexes 13 et 14) sont communes avec celles décrites pour *EgMYB1*. On retrouve ainsi tous les sous groupes tels que la biogenèse cellulaire et formation de la paroi cellulaire, les métabolismes secondaires, la signalisation hormonale, le transport, le métabolisme cellulaire, la réponse aux stress, l'expression génique, et le développement. Les catégories spécifiques de *EgMYB2* se répartissent dans ceux-ci.

L'ensemble amène les mêmes commentaires que pour *EgMYB1*.

B.3 Les gènes qui sont potentiellement cibles des facteurs *EgMYB1* et *EgMYB2*

Un total de 127 gènes pour *EgMYB1*, et de 110 gènes pour *EgMYB2*, ont été sélectionnés empiriquement comme probablement cibles de ces facteurs de transcription, respectivement (Annexes 19 et 20). Ils correspondent aux gènes dont l'expression est modulée à la fois dans les feuilles et les inflorescences de ces plantes (Annexes 15-18).

De façon assez surprenante, une très grande partie de ces gènes montrent des comportements inverses entre les feuilles et les hampes florales (81% pour *EgMYB1* ; 95% pour *EgMYB2*). Cette particularité a été observée sur l'ensemble des gènes présents sur la puce CATMA, indépendamment du tri décrit dans ce chapitre. Une telle proportion de gènes présentant ce phénomène n'a jamais été décrite dans les dizaines de projets réalisés par la plate-forme de l'URGV (Jean-Pierre Renou, communication personnelle). Afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'une erreur expérimentale, l'ensemble de l'expérience a été renouvelé et a permis d'obtenir exactement les mêmes résultats, renforçant du même coup la solidité statistique des données présentées dans ce mémoire. A ce jour, aucune explication solide ne peut être apportée à ce phénomène, hormis la possibilité que les facteurs *EgMYB* nécessiteraient l'aide d'autres partenaires protéiques pour exercer leur effet, partenaires dont la présence est variable entre les différents types d'organes. Ceci est à rapprocher des résultats décrits dans le chapitre II qui montrent que les racines de plantes *EgMYB1*⁺ sont capables de former du xylème secondaire comparable à celui des plantes témoins, alors qu'elles sont incapables d'en faire dans la hampe florale, suggérant que les mécanismes contrôlant la

formation du xylème secondaire dans les racines d'*Arabidopsis* ne sont pas les mêmes que dans la hampe florale. Toutefois, considérant que les facteurs *EgMYBs* sont préférentiellement exprimés dans le xylème secondaire, on pourrait supposer que les effets observés dans la hampe florale sont plus proches de la réalité. Cependant, ceci reste à être confirmé. En effet, parmi les 127 gènes probables affectés dans les plantes *EgMYB1+*, seuls 54 d'entre-eux sont réprimés (Annexe 19), une faible proportion si l'on considère les résultats qui montrent que *EgMYB1* serait un répresseur de la transcription.

Une grande partie de ces gènes appartiennent à des catégories fonctionnelles qui rendent leur présence plausible. Le groupe prédominant de ces gènes cibles potentiels de *EgMYB1* (40 gènes) et *EgMYB2* (20 gènes) code des protéines impliquées dans la biosynthèse des parois cellulaires, dont plus de 10 gènes sont impliqués dans la voie de biosynthèse des lignines (Annexes 19 et 20).

B.3.1 Gènes de paroi

B.3.1.1 Biosynthèse de la cellulose

Plusieurs catégories fonctionnelles regroupent des gènes impliqués dans la synthèse ou la modification des parois végétales (Annexes 15). En particulier, les plantes *EgMYB1+* mettent en avant 9 gènes intervenant dans la synthèse de la cellulose, avec 5 cellulose synthases, dont *IRX3* et *IRX5*. *Arabidopsis* contient 10 gènes de cellulose synthases (*AtCesA*) qui sont impliqués dans la synthèse de cellulose soit dans la paroi primaire ou dans la paroi secondaire. *AtCesA1*, *AtCesA3* et *AtCesA6*, qui correspondent aux mutants *rsw1* (Arioli *et al.*, 1998), *ixr1* (Scheible *et al.*, 2001) et *prc1* (Fagard *et al.*, 2000), respectivement, sont en grande partie responsables de la production de cellulose pendant la formation de paroi primaire de cellules dans la plupart des tissus. *IRX1* (*AtCesA8*, At4g18780) (Taylor *et al.* 2000), *IRX3* (*AtCesA7*, At5g17420) (Taylor *et al.* 1999) et *IRX5* (*AtCesA4*, At5g44030) (Taylor *et al.* 2000), ont été identifiés à partir de mutants présentant un xylème « irrégulier » (irregular xylem ou *irx*) (Taylor *et al.*, 2003 ; Taylor *et al.*, 2004) et sont exprimés dans des vaisseaux de xylème (Gardiner *et al.*, 2003). On retrouve également une modification de l'expression de *KORRIGAN*, une endo 1,4 beta glucanase qui joue un rôle dans la synthèse de cellulose lors de la formation de la paroi primaire (Nicol *et al.*, 1998) mais aussi secondaire (Szyjanowicz *et al.*, 2004).

D'autres gènes sont plutôt impliqués dans le catabolisme de la paroi avec 3 chitinases, et 2 glycoside hydrolases chez les plantes *EgMYB1+* (Annexe 19). La superfamille des

glycosyl hydrolases inclut les enzymes chitinase-like qui ont été initialement identifiées sur la base de leur capacité à dégrader la chitine dans les parois cellulaires des pathogènes fongiques. Les mutations dans des gènes endochitinase-like tels que *AtCTL1* causent un dépôt ectopique de lignine et la déformation de cellules de moelle due à une diminution en cellulose (Zhong *et al.*, 2002). La perte de fonction chez des allèles du gène *AtCTL1* conditionne le phénotype de la lignification ectopique de la moelle des mutant *elp1* et *pom1* (Zhong *et al.*, 2002 ; Rogers *et al.*, 2005). D'autres chitinases ont été également montrés pour être exprimés pendant la croissance secondaire (Aspeborg *et al.*, 2005).

De façon remarquable, aucun des gènes associés à la synthèse de cellulose ne semblent faire partie des gènes dont l'expression est affectée par la surexpression de *EgMYB2*.

B.3.1.2 Métabolisme de phénylpropanoïdes et biosynthèse des lignines

Le métabolisme des phénylpropanoïdes et la biosynthèse des lignines ont été intensément étudiés pendant des décennies dans de nombreuses espèces de plantes, pour identifier les enzymes participantes et les éléments de régulation (Ehrling *et al.*, 1999 ; Grima-Pettenati et Goffner 1999 ; Zhong *et al.*, 2000 ; Anterola et Lewis 2002). De façon remarquable, un certain nombre de gènes codant des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes et des lignines sont régulés par des facteurs de transcription de type MYB (Sablowski *et al.*, 1994 ; Borevitz *et al.*, 2000 ; Goicoechea *et al.*, 2005).

Dans cette étude, nous avons trouvé 17 gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et 46 gènes impliqués dans la biosynthèse des lignines (ou 63 gènes au total) chez les plantes *EgMYB1*⁺ et *EgMYB2*⁺ (Annexes 15-18). Parmi ces 63 gènes, 20 et 23 sont différentiellement exprimés uniquement dans les hampes florales (Annexes 15 et 16) et 30 et 19 sont différentiellement exprimés dans les feuilles chez *EgMYB1*⁺ et *EgMYB2*⁺ respectivement.

Les gènes de la voie des phénylpropanoïdes qui montrent une modification de leur expression dans les hampes florales *EgMYB2*⁺ sont deux gènes phenylalanine ammonia-lyase (PAL), deux cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), quatre 4-coumarate-CoA ligase (4CL) quatre S-adenosylmethionine synthase (SAMS), une caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT), deux cytochrome P450 98A3 (C3H), trois O-methyltransferase (OMT), deux ferulate-5-hydroxylase (FAH1), cinq cinnamoyl-CoA reductase (CCR), une cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) et trois laccases putatives (Lac) (Annexe 15). On a également trouvé dans les hampes florales des plantes *EgMYB1*⁺, quatre 4CL, deux NADPH-cytochrome p450

reductase, quatre SAMS, une CCoAOMT, deux CYP98A3 (C3H), trois OMT, une FAH (FAH1), deux CCR, une CAD et trois Lac (Annexe 15). Les gènes qui sont surexprimés dans les feuilles d'*EgMYB2*⁺ sont sept 4CL, une NADPH-cytochrome p450 reductase, cinq SAMS, une C3H, deux OMT, deux CCR, une CAD, et trois Lac (Annexe 16). Nous avons également trouvé dans les feuilles d'*EgMYB1*⁺, huit 4CL3, deux NADPH-cytochrome p450 reductase, une CCoAOMT, quatre SAMS, deux CYP98A3, quatre OMT, une FAH, cinq CCR, trois CAD et trois Lac (Annexe 16).

Les enzymes catalysant la voie des phénylpropanoïdes et la biosynthèse de différentes sous-unités de lignine (C3H, 4CL, SAM, FAH, CCoAOMT, OMT et Lac) sont sur-exprimées dans l'hampe florale des plantes *EgMYB1*⁺, excepté la CCR, la CAD et une OMT qui sont sous-exprimées (Annexe 15). On pourrait suggérer que la diminution des niveaux d'expression des gènes *CCR* et *CAD* serait en relation avec la baisse de quantité de lignine dans les hampes florales d'*EgMYB1*⁺. L'expression de l'ensemble des enzymes de ces voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des lignines (PAL, C3H, 4CL, SAM, FAH, CCoAOMT, OMT, CCR, CAD, Lac et NADPH) est sur-exprimé chez les plantes *EgMYB2*⁺ (Annexe 16). La quantité accrue de lignine dans les hampes florales des plantes *EgMYB2*⁺ pourrait être liée à l'augmentation de l'expression de ces gènes. Ceci est en accord avec les résultats de Goicoechea *et al.* (2005) chez le tabac qui montrent à la fois une augmentation de l'épaisseur de paroi secondaire, un changement en composition en lignine, et une augmentation de l'expression de tous les gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Si l'on regarde maintenant les gènes communs aux feuilles et hampes florales (Annexes 19 et 20), un grand nombre des gènes de la voie des phénylpropanoïdes et de la lignification sont retrouvés aussi bien chez les plantes *EgMYB1*⁺ que les plantes *EgMYB2*⁺. On retrouve en particulier plusieurs isoformes de la 4CL, de la CCR, plusieurs laccases, et une OMT ainsi que les deux gènes de l'arabette codant la S-adenosylmethionine synthetase. Les plantes *EgMYB1*⁺ sont également caractérisées par une CCoAOMT et une F5H.

Ce grand nombre de gènes de paroi est aussi à mettre en regard avec les autres phénotypes observés sur les plantes *EgMYB*⁺s et décrits dans le chapitre II. En particulier, la sur-expression des gènes *MYBs* est associée à la présence de cellules xylémiennes collapsées (*EgMYB1*) et aux modifications de la teneur en lignine (*EgMYB1* et *EgMYB2*). La présence de cellules collapsées indique une résistance mécanique réduite au niveau de la paroi. Ce phénotype a également été noté lors d'une sous-expression du gène *CCR* chez le tabac

(Piquemal *et al.*, 1998) ou chez *Arabidopsis* (Jones *et al.*, 2001). La sous-expression du gène *CCoAOMT* induit également la présence de cellules déformées associée à une diminution de la quantité de lignine (Zhong *et al.*, 1998, 2000).

La présence simultanée de nombreux gènes associés à la synthèse de cellulose ou de lignine chez les plantes *EgMYB1*⁺ est également très intéressante. Il est maintenant admis que la synthèse de ces deux polymères majeurs de la paroi secondaire doit se faire de façon concertée (Anterola et Lewis, 2002). Ainsi, une diminution du taux de lignines s'accompagne généralement d'une hausse de la quantité de cellulose, mécanisme qui permettrait à la plante de conserver une paroi rigide. A ce stade, il n'est cependant pas encore possible de dire si cette concomitance est le fruit de la fonction de *EgMYB1* qui jouerait alors un rôle de régulateur de la synthèse des composés pariétaux ou la mise en place d'une réponse cellulaire aux effets de *EgMYB1* sur la lignine ou la cellulose.

B.3.2 Expansion cellulaire

Après la division cellulaire, les cellules dans la zone cambiale augmentent de taille dans les directions axiales et radiales (Larson, 1994). Nous avons trouvé plusieurs gènes d'expansines potentielles dont la fonction probable est d'intervenir dans la modification de la paroi cellulaire pendant l'expansion cellulaire. Il s'agit de *AtEXP8*, *AtEXP9* et *AtEXP15* chez *EgMYB1*⁺, et de *AtEXP15* et *AtEXP16* chez *EgMYB2*⁺ respectivement (Annexes 19 et 20) (Darley *et al.*, 2001; Mellerowicz *et al.*, 2001). Les plantes *EgMYB1*⁺ sont également caractérisées par 3 gènes dont deux expansines (*AtEXP1*, *AtDWARF1*, *AtEXPB3*) impliqués dans l'élongation cellulaire.

Les plantes *EgMYB1*⁺ et *EgMYB2*⁺ présentent un nanisme avec une hampe florale et des cellules xylémiennes plus courtes que chez les témoins. Au niveau des feuilles, nos résultats ont montré une diminution de taille dans les plantes *EgMYB1*⁺. Des analyses histologiques détaillées indiquent que la « quantité » de tissus vasculaires (xylème et phloème) présent dans la nervure centrale est diminuée. Cette diminution semblerait due à une réduction du nombre de cellules, mais également à une réduction de la taille des cellules suggérant ainsi que l'activité mitotique et le processus d'expansion cellulaire sont affectés.

A ce stade, il ne servirait pas à grand-chose de commenter exhaustivement les deux centaines de gènes identifiés dans les plantes *EgMYB1*⁺ et *EgMYB2*⁺. En fait, pour chaque gène, il est possible de trouver des arguments en faveur de son intervention dans la formation du xylème, et donc en faveur de la possibilité qu'il soit une cible des facteurs *EgMYBs* qui

sont certainement impliqués dans ce processus. Par exemple, les gènes de sénescence pourraient intervenir dans la mort cellulaire programmée qui est l'étape ultime de la différenciation des vaisseaux. Les gènes impliqués dans la signalisation hormonale sont un autre exemple. En effet, il est maintenant bien établi qu'une hormone telle que l'auxine joue des rôles divers dans la régulation des processus de développement comme la division et l'expansion cellulaire, la différenciation, et la formation des tissus vasculaires secondaires (Reed, 2001 ; Sundberg *et al.*, 2000).

B.4 Analyse structurale des gènes cibles potentiels des facteurs *EgMYB*

Une recherche efficace des gènes cibles potentiels des facteurs *EgMYB* doit nécessairement passer par une analyse des séquences promotrices de ces gènes. En effet, l'action des facteurs de transcription passe par la fixation de séquences consensus présentes dans la région promotrice des gènes cibles. Cette fixation, associée ou non à une interaction avec un autre partenaire protéique, permet de recruter le complexe transcriptionnel qui permettra l'expression du gène. En clair, les gènes cibles des facteurs *EgMYB* doivent donc posséder dans leurs régions promotrices les séquences consensus de fixation des facteurs MYB.

Le site consensus de fixation des MYB a été identifié comme étant une séquence du type YAACNGHH (Y=C/T; H=A/C/T; N=A/C/T/G) (Ording *et al.*, 1996) ou C/TAACG/TG dans la majorité des organismes. Elles sont parfois assimilées à une famille plus large qui contient les éléments riches en AC (AC-rich). Cependant, tous les éléments AC-rich ne sont pas fixés par des facteurs MYBs (Kawaoka *et al.*, 2000 ; Sivadon et Grima-Pettenati, 2004).

Toutes les séquences des régions promotrices (500 pb) de tous les gènes de l'arabette ont été récupérées à partir de la base de données AGRIS (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>). Cette base de données donne également la structure des promoteurs en terme de présence de sites consensus de fixation de facteurs de transcription connus à ce jour.

La présence de sites de fixations des facteurs MYB, mais également d'autres facteurs de transcription, est donnée en annexes 19 et 20, qui reprend la liste des gènes cibles probables des facteurs *EgMYB1* et *EgMYB2*. On peut voir que plus de 90% des gènes cibles probables possèdent un site MYB ou MYB-related (AC-rich) chez les plantes *EgMYB*⁺. Cette proportion élevée montre que le tri a effectivement permis de sélectionner des gènes dont les promoteurs peuvent fixer un facteur MYB. Nous retrouvons en particulier les gènes de la

lignification, de la voie des phenylpropanoïdes, de la biosynthèse de cellulose, de modification de la paroi ou d'élongation cellulaire.

De façon intéressante, nous pouvons aussi noter la présence de sites pour d'autres facteurs de transcription pour une grande partie de ces gènes. Ce résultat est tout à fait en accord avec les mécanismes de la régulation transcriptionnelle qui font intervenir des complexes de transcription dynamiques dans lesquels plusieurs facteurs de transcription peuvent jouer de concert. Il est en particulier important de noter la présence de sites de fixation des protéines bHLH qui sont maintenant connues pour être des partenaires privilégiés des facteurs MYB dans la régulation de l'expression génique (Ramsay et Glover, 2005). Il reste néanmoins à déterminer quelle est la part de chacun de ces sites, y compris MYB, dans la modulation de l'expression des gènes.

C. Discussion

Dans l'objectif de caractériser fonctionnellement les gènes *EgMYB1* et *EgMYB2* exprimés dans le xylème d'eucalyptus, nous avons élaboré une stratégie de surexpression de ces gènes dans la plante modèle *A. thaliana*. En parallèle à des analyses phénotypiques qui ont permis de confirmer que ces deux facteurs pouvaient jouer dans la formation du xylème secondaire, il a été décidé d'entreprendre une analyse transcriptomique afin d'identifier les gènes cibles dont l'expression serait régulée par l'intermédiaire de ces facteurs de transcription. Cette stratégie semblait possible dans la mesure où les mécanismes de la régulation transcriptionnelle semblent conservés chez les angiospermes, notamment ceux impliquant les facteurs MYB. En effet, aussi bien les protéines MYB, que les domaines de liaison à l'ADN et les sites de fixation de ces facteurs dans les parties promotrices sont très similaires et semblent être fonctionnellement équivalents. Ainsi, la caractérisation de plusieurs facteurs MYB d'espèces très diverses ont pu être menées chez l'arabette ou le tabac (Aharoni *et al.*, 2001; Deluc *et al.*, 2006; Goicoechea *et al.*, 2005; Nieminen *et al.*, 2004; Tamagnone *et al.*, 1998).

La recherche de ces gènes cibles par la technologie des puces à ADN nous a permis de mettre en avant plusieurs milliers de gènes dont l'expression est modulée en réponse à la surexpression de *EgMYB1* ou *EgMYB2*. Ce très grand nombre de gènes nous a cependant obligé à élaborer une sélection grâce à un tri basé sur une idée simple qui suppose que l'intervention d'un facteur régulateur ne doit pas s'aborder au niveau de l'interaction entre deux gènes mais plutôt sur la régulation d'un processus dans son entier.

Ce tri a permis de ramener à une centaine le nombre de gènes potentiellement cibles des facteurs *EgMYB*. Il est évident qu'une partie d'entre-eux sont des faux-positifs et de vrais gènes cibles ont été perdus en route. Cependant, s'il est possible dans l'avenir proche de trouver un gène cible vrai, celui-ci représentera une nouvelle opportunité pour découvrir les autres.

Malgré tout, les gènes sélectionnés présentent des fonctions qui sont tout à fait en rapport avec la xylogénèse, notamment des gènes de paroi, de sénescence, d'expansion cellulaire, ou de réponses aux hormones. Les différents processus métaboliques qui sont mis en avant par cette étude font également le lien avec les phénotypes observés chez ces plantes *EgMYB*⁺. On confirme par exemple le lien qui semble exister entre les facteurs *EgMYB* et la lignification ou la formation des parois. La confirmation de ces liaisons fonctionnelles et génétiques permet d'imaginer que les autres gènes décrits, impliqués dans des processus dont la présence dans la xylogénèse est plus difficile à interpréter, sont néanmoins des gènes potentiellement cibles des facteurs *EgMYB*. Ils correspondraient alors à de nouvelles fonctions associées à la xylogénèse et non caractérisées à ce jour. Une analyse plus poussée des autres gènes permettra peut-être d'associer d'autres mécanismes métaboliques à la xylogénèse et de décrire les facteurs *EgMYB* comme des chefs d'orchestres coordonnant l'intervention de plusieurs processus cellulaires différents mais complémentaires dans la formation du xylème.

Cette approche de transcriptomique a été initiée tardivement durant cette thèse. Les résultats obtenus ne sont que préliminaires et il ne m'a pas été matériellement possible de faire des analyses complémentaires qui seront obligatoires pour comprendre les résultats et au final trouver les vrais gènes cibles des facteurs *EgMYB*.

Tout d'abord, il va être nécessaire de comparer les résultats obtenus avec ceux décrits dans la littérature au sujet des gènes impliqués dans la xylogénèse. Par exemple des méthodes globales d'analyse du transcriptome lors de la formation du xylème secondaire chez l'arabette ou dans d'autres espèces comme le peuplier ou le pin ont permis de mettre en avant certains gènes qu'il sera utile de confronter avec nos résultats (Oh *et al.*, 2003b; Schrader *et al.*, 2004; Whetten *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005). Il sera également important de suivre l'expression des gènes que nous avons mis en avant avec les données de transcriptomique en libre accès dans les bases de données. En effet, si l'on considère que certains de ces gènes répondent aux mêmes facteurs de transcription, il doit être possible de visualiser une corrélation dans leurs profils d'expression. Ce genre d'analyse est très souvent à même d'identifier des régulateurs ou

clusters de gènes impliqués dans un processus donnée et soumis aux même régulations (Brown *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002; Clarke and Zhu, 2006; Demura *et al.*, 2002).

La disponibilité des séquences et des structures des promoteurs des gènes est également à valoriser. En effet, bien que la présence d'un site de fixation des facteurs MYB soit obligatoire, il est possible que la présence d'autres sites soit également nécessaire. Lorsque les gènes cibles potentiels de *EgMYB1* ou *EgMYB2* seront connus, ou bien que des clusters de gènes co-régulés seront identifiés, il sera possible de comparer les parties promotrices afin de mettre en évidence des associations obligatoires entre certains sites de fixation et même d'identifier de nouveaux sites qui seront spécifiquement présents sur ces promoteurs mais qui ne sont pas connus aujourd'hui.

Enfin, lorsqu'un nombre réduit de gènes potentiels sera obtenu, la relation entre les facteurs *EgMYB*, leurs gènes cibles potentiels et les fonctions biologiques dans lesquelles ils sont impliqués devront être abordés par la vérification de l'interaction fonctionnelle entre les facteurs de transcription et les promoteurs des gènes cibles et par l'analyse de mutants.

**CONCLUSIONS GENERALES ET
PERSPECTIVES**

Conclusions générales

L'objectif principal de cette thèse était d'approfondir nos connaissances des rôles des facteurs de transcription MYB dans la régulation transcriptionnelle associée à la lignification et la formation de tissus vasculaires. La stratégie adoptée était de sur-exprimer, chez *Arabidopsis thaliana*, deux facteurs de transcription MYB, isolés d'*Eucalyptus gunnii*, et caractérisés précédemment dans l'UMR UPS-CNRS SCSV 5546. Après caractérisation phénotypique, des analyses transcriptomiques par micro-array (puces CATMA) ont été initiées pour identifier les gènes cibles de ces facteurs MYB et, éventuellement, établir un rapprochement avec le phénotype de plantes modifiées. Ces analyses devraient nous apporter des connaissances approfondies des rôles des facteurs MYB dans le contrôle de la lignification et de la xylogénèse.

L'intérêt principal de faire ces études chez *Arabidopsis* (au de-là de sa facilité de culture et de transformation génétique) dépend de la disponibilité des informations sur son génome (entièrement séquencé) et des outils moléculaires performants. D'autre part, plusieurs études ont démontré que le processus de la lignification chez *Arabidopsis* est très semblable à celui observé chez des espèces ligneuses, et que cette plante est même capable de former du xylème secondaire dans certaines conditions. Cependant, il est possible que, au niveau moléculaire, la régulation transcriptionnelle (interactions facteurs de transcription-promoteurs de « gènes lignine ») présente des différences. Vu que nous proposons de sur-exprimer des facteurs de transcription MYB hétérologues (*EgMYB1*, *EgMYB2*), il était important de vérifier si le processus de lignification (au niveau moléculaire) était similaire entre *Arabidopsis* et l'*Eucalyptus*. Dans le premier chapitre de résultats, nous avons suivi, d'une façon détaillée, les profils d'expression de deux promoteurs de gènes isolés d'*Eucalyptus gunnii* (*EgCCR* : *cinnamoyl CoenzymeA reductase* ; *EgCAD2* ; *cinnamyl alcohol dehydrogenase*). Ces deux gènes codent les deux enzymes spécifiques de la voie de biosynthèse des monolignols (unités monomériques de la lignine) et leurs profils d'expression permettent de voir où (dans quels tissus/cellules) et quand (stade de développement) les monolignols nécessaires à la lignification de la paroi sont produits.

Nos résultats ont permis de dégager 3 points principaux :

- i) Les profils d'expression de ces deux promoteurs chez *Arabidopsis* sont tout à fait comparables (mêmes tissus, mêmes stades de développement) avec les profils de ces mêmes promoteurs observés chez d'autres espèces (tabac, peuplier, vigne).

Cette observation suggère fortement que les régulations transcriptionnelles des gènes *CCR/CAD* sont conservées entre les espèces et que, en conséquence, la sur-expression de facteurs *EgMYB* (si impliqués dans ce processus) devrait avoir un effet sur l'expression de gènes d'*Arabidopsis* impliqués dans la lignification.

- ii) Les expressions de ces 2 gènes (*CCR/CAD*) sont coordonnées (mêmes tissus, mêmes stades de développement). Cette observation suppose une régulation transcriptionnelle (impliquant les facteurs MYB?) coordonnée.
- iii) La lignification des éléments des vaisseaux implique un processus de « co-opération cellulaire » avec la production (et transport) de monolignols de cellules parenchymateuses du xylème suite à l'autolyse cellulaire des vaisseaux. Ce mécanisme est probablement nécessaire du fait de la courte période de temps entre le début de la différenciation d'un élément de vaisseau et la mort cellulaire programmée de cette même cellule.

Ayant démontré que le système *Arabidopsis* convient pour une étude de la régulation transcriptionnelle de la lignification, nous avons procédé à la sur-expression des deux facteurs MYB (*EgMYB1*, *EgMYB2*) sous le contrôle d'un promoteur 35S. Ces résultats sont présentés dans le deuxième chapitre des résultats. Afin de vérifier que la transformation génétique n'induit pas de phénotype nous avons également procédé à des transformations avec le vecteur vide.

La caractérisation phénotypique des plantes transformées a mis en évidence des modifications prononcées induisant la génération des plantes « naines » et ceci pour les deux facteurs MYB. D'une façon globale, les deux types de plantes transformées sont caractérisées par une diminution de la hauteur et du diamètre de la hampe florale. D'autres modifications concernent la diminution de la taille des feuilles, la malformation des fleurs et une diminution dans la taille des siliques. Ces observations sont à mettre en rapport avec des travaux publiés dans la littérature où il a été reporté que la sur-expression de facteurs MYB est associée, ou non, avec un effet sur la taille de plantes. Ces observations soulignent la complexité des interactions facteur MYB/gènes/espèce.

L'objectif principal de notre étude était d'évaluer les rôles de facteurs MYB sur la lignification et la xylogénèse nous avons également entrepris des analyses détaillées des tissus internes et des cellules. Bien que la sur-expression des deux facteurs MYB était associée à une diminution du diamètre de la hampe florale, les origines de cette diminution n'étaient pas

les mêmes pour les deux facteurs. En effet, la sur-expression du facteur *EgMYB1* était associée à l'absence/diminution importante des tissus vasculaires, alors que la sur-expression du facteur *EgMYB2* était plutôt associée à une réduction de la quantité de tissus parenchymateux sans effet marqué sur la quantité de tissus vasculaires secondaires. Un autre effet remarquable concerne l'absence de fibres interfasciculaires chez les plantes *MYB1*. Ces observations sont également à mettre en rapport avec la littérature scientifique où plusieurs études ont démontré l'implication des facteurs MYB dans la formation et développement de tissus vasculaires. Cependant, il est intéressant de noter les effets différents des deux facteurs MYB, la sur-expression du facteur *EgMYB2* ne produisant pas d'effet marqué au niveau des tissus vasculaires secondaires. Des études supplémentaires seront nécessaires pour clarifier ce point.

Nous avons ensuite effectué des études au niveau cellulaire. Le résultat le plus remarquable concerne l'observation que la sur-expression du facteur *EgMYB1* est associée à la présence de cellules xylémiennes « collapsées » témoignant d'une plus faible résistance mécanique. Il est intéressant à constater que la sous-expression du gène *CCR* chez le tabac est également associée à un phénotype semblable. Nos analyses histochimiques (réactif de Weisner) ont suggéré une diminution dans la quantité de lignine associée aux parois cellulaires. Afin de confirmer ce point des analyses chimiques ont été faites sur des résidus pariétaux obtenus des hampes florales et des feuilles de plantes âgées d'un et de deux mois. Ces résultats ont indiqué que, dans les hampes florales, la sur-expression du facteur *EgMYB1* était associée à une diminution dans la quantité de lignine (plantes âgées d'un mois et de deux mois). En revanche, la structure de la lignine n'était pas changée dans les plantes âgées d'un mois, mais montrait des modifications légères (augmentation quantité unités H, augmentation condensation) dans les plantes âgées de deux mois. Pour les plantes *EgMYB2+*, la quantité ET la structure de la lignine n'étaient pas modifiées dans les plantes âgées d'un mois. En revanche, les hampes florales des plantes âgées de deux mois contiennent plus de lignine que les plantes témoins, la structure de la lignine n'étant pas modifiée. Des analyses comparables sur les feuilles étaient difficiles à interpréter. En effet, les résultats montraient des quantités de lignine élevées dans les deux types de plantes modifiées. Cependant, en règle générale, les feuilles sont des organes peu lignifiés et il est difficile à doser (par la technique Klason) avec précision des faibles quantités de lignine. Il serait intéressant à refaire ces analyses en utilisant des techniques plus appropriées.

Dans le troisième chapitre des résultats, nous avons utilisé des analyses transcriptomiques (puces CATMA) pour essayer d'identifier les gènes cibles des facteurs MYB sur-exprimés. Nos premiers résultats ont indiqué que la sur-expression des facteurs MYB modifie, d'une façon significative ($p\text{-val} < 0,05$), les expressions d'un nombre élevé de gènes (*EgMYB1*⁺ : 5 058 gènes feuilles, 3 920 gènes hampes florales, 2 094 gènes communs aux 2 organes ; *EgMYB2*⁺ : 2 905 gènes feuilles, 3 856 gènes hampes florales, 1 687 gènes communs aux 2 organes). Face à la difficulté de manipuler et d'interpréter des données si importantes il a été nécessaire de mettre en place un tri pour permettre i) la génération d'une collection de données utilisable et ii) l'élimination des « faux positifs ». Ceci a été effectué avec l'aide de Mlle Sophie Candel (étudiante du Master 2 Professionnalisé « Bioinformatique » de l'Université Paul Sabatier).

L'hypothèse sous-jacente de ce tri est qu'un facteur de transcription, dans une logique de coordination régulée, module un ensemble de gènes impliqués dans le contrôle d'un processus biologique donné plutôt que des gènes isolés. Ainsi, la première étape du tri a été de classer les 25 000 gènes d'*Arabidopsis* par catégories fonctionnelles (classification GO « processus biologiques »). Ensuite le calcul de la proportion des gènes différentiellement exprimés dans chaque catégorie fonctionnelle, suivie par un tri décroissant en fonction de cette proportion a permis de grouper les catégories fonctionnelles en 3 classes (probable, possible, improbable). Dans l'étape ultime du tri, nous n'avons gardé que les catégories fonctionnelles (classe probable) apparaissant dans les deux organes analysés (hampes florales et feuilles). Cette décision a été motivée par le fait que les deux transgènes étaient sous contrôle d'un promoteur constitutif. Finalement, cette approche a permis d'identifier 31 processus biologiques (127 gènes) pour les plantes sur-exprimant *EgMYB1*, et 32 processus biologiques (110 gènes) pour les plantes sur-exprimant *EgMYB2*. À noter que 20 processus biologiques sont communs aux plantes *EgMYB1*⁺/*EgMYB2*⁺. En conclusion, le tri a permis de réduire considérablement (à < 10 %) les données à analyser.

La première analyse « biologique » effectuée sur les données triées était de regrouper, par facteur MYB sur-exprimé, les centaines de processus biologiques. Cette approche, pour les plantes *EgMYB1*⁺, a permis d'assigner les 31 processus biologiques dans les sous-groupes suivants : Biogenèse cellulaire, Métabolisme secondaire, Signalisation hormonale, Transport, Métabolisme cellulaire, Réponses aux stress, Expression génique, et Développement. Le même exercice pour les plantes *EgMYB2*⁺ a également permis d'assigner les 32 processus biologiques dans les mêmes sous-groupes. Bien que difficile à généraliser, il est possible

d'établir un lien entre ces sous-groupes et la xylogénèse et la lignification. Par exemple, dans le sous-groupe « Biogénèse cellulaire » on peut trouver des gènes associés à l'élongation cellulaire, aux modifications de la paroi pendant l'expansion cellulaire, catabolisme pariétal, biosynthèse de la cellulose et de la lignine etc. De même, dans le sous-groupe « Signalisation hormonale » on peut trouver des gènes associés à la signalisation de l'auxine – hormone végétale connue pour son implication dans la formation des tissus vasculaires.

D'une façon très surprenante, nos résultats ont également indiqué qu'une proportion élevée de gènes triés (MYB1 : 81 % ; MYB2 : 95 %) montrait un comportement inverse entre les feuilles et les hampes florales. Autrement dit environ 8/10 gènes sur-exprimés dans les feuilles étaient sous-exprimés dans les hampes florales et vice-versa. La répétition des hybridations ont confirmé que ce résultat n'était pas généré par une erreur de manipulation et, bien que des études supplémentaires seront nécessaires, cette observation suggère que l'action du même facteur MYB pourrait varier en fonction de l'organe où il est exprimé.

La lignine est un polymère pariétal et, de ce fait, nous avons porté une attention particulière aux modifications d'expression impliquant des « gènes parois ». D'une façon intéressante, la sur-expression d'*EgMYB1* (mais pas *EgMYB2*) était associée à des modifications d'expression de gènes associés à la biosynthèse de cellulose (5 gènes de Cellulose Synthase : *CesA*, 1 gène *KORRIGAN*), mais également des gènes associés au catabolisme pariétal (3 gènes chitinase, 2 gènes glycosyl hydrolases). De même, la sur-expression des deux facteurs MYB était également associée à des modifications très importantes dans les expressions de gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (17 gènes) et lignine (46 gènes). Par exemple, la sur-expression d'*EgMYB1* induit la sur-expression de tous les gènes (montrant une modification d'expression) SAUF les gènes *OMT* (*O*-methyltransferase) et les gènes spécifiques à la biosynthèse des monolignols (*CCR*, *CAD*) qui sont, au contraire sous-exprimés. Cette régulation différentielle est très intéressante et il est tentant de faire le rapprochement avec le phénotype de vaisseaux « collapsés » caractéristique de plantes de tabac sous-exprimant le gène *CCR*. Par opposition, la sur-expression d'*EgMYB2* induit la sur-expression de tous les gènes lignines (montrant une modification d'expression) y compris les gènes *OMT*, *CCR* et *CAD*. Encore une fois il est tentant de faire le rapprochement avec les analyses chimiques montrant une augmentation de la quantité de lignine dans les hampes florales de plantes *EgMYB2*⁺. Cependant des analyses supplémentaires seront nécessaires.

Des analyses similaires ont également permis de mettre en évidence des modifications dans l'expression de gènes associés à l'expansion cellulaire via des actions sur la plasticité de la paroi. Par exemple, les expressions de 3 gènes (*AtEXP8*, *AtEXP9*, *AtEXP15*) codant des expansines ont été modifiées chez les plantes *EgMYB1*⁺, et les expressions de 2 gènes (*AtEXP15*, *AtEXP16*) codant des expansines ont été modifiées chez les plantes *EgMYB2*⁺. Cette observation est peut-être à mettre en rapport avec les effets de la sur-expression des facteurs MYB sur la taille de cellules (conditionné par l'expansion cellulaire).

Finalement, nous avons terminé ces études préliminaires par une analyse des régions promotrices (500 pb) des gènes (triés) dont l'expression a été modifiée par la sur-expression des facteurs MYB. Ces analyses ont montré qu'environ 90 % des promoteurs examinés contient un site MYB (ou site riche en éléments AC). Cette observation, très rassurante, semblerait confirmer que la stratégie de tri utilisée a été efficace en permettant de retenir un maximum de gènes « cibles probables » tout en éliminant des faux positives. Cependant, il sera nécessaire de démontrer, de façon expérimentale, que la régulation transcriptionnelle de ces gènes implique l'action de facteurs MYB.

Perspectives

D'un point de vu global, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis de démontrer, l'implication des facteurs *EgMYB1* et *EgMYB2* dans le contrôle de la lignification et la xylogénèse par analyse fonctionnelle chez *A. thaliana*. Plus important, les analyses transcriptomiques ont permis d'identifier un nombre élevé de gènes cibles potentiels pour ces facteurs MYB ouvrant ainsi de nombreuses pistes d'expérimentation pour confirmer (ou non) le rôle de ces gènes cibles dans les processus de la xylogénèse et de la lignification. D'un point de vu plus spécifique, on peut évoquer plusieurs pistes de recherche plus ciblées qui sont présentées ci-dessous.

Les résultats des analyses transcriptomiques (Résultats, Chapitre III) ont montré que les niveaux d'expression de plusieurs gènes lignine étaient modifiés par la sur-expression des facteurs MYB. Cependant, des analyses de ce type ne nous renseignent pas sur des modifications éventuelles de l'expression spatiale. Certains travaux scientifiques indiquent que la sur-expression de facteurs MYB est associée à une lignification ectopique et, dans ce cas, il serait intéressant de voir si l'expression de gènes lignine pourrait être corrélée à ce type de lignification. Le croisement de plantes (*Arabidopsis*) *EgCAD2/CCR-GUS* (Résultats, Chapitre I) avec les plantes *EgMYB1*⁺, *EgMYB2*⁺, suivi par des analyses histochimiques

permettrait d'approfondir ce point. Une telle étude serait également très intéressante dans le contexte de l'absence de fibres interfasciculaires (lignifiées) chez les plantes *EgMyb1⁺*. La technique du promoteur-gène rapporteur pourrait aussi être utilisée pour étudier l'expression spatiale d'autres « gènes cibles » identifiés.

Vue les modifications au niveau des parois des cellules xylémiennes (Résultats, Chapitre II), il serait également important de poursuivre des analyses plus approfondies par microscopie électronique. En effet, la sur-expression du facteur *EgMYB2* est associée à une modification de l'épaisseur des parois chez le tabac. De même, on pourrait aussi envisager des caractérisations « in situ » (microspectroscopie UV) de la composition de la lignine pariétale – est ce que les modifications sont limitées à la paroi secondaire, ou est ce que toute la paroi est impliquée ?

Concernant les analyses chimiques de la lignine (Résultats, Chapitre II) et les analyses transcriptomiques (Résultats, Chapitre III) montrant des modifications dans l'expression de gènes associés à la biosynthèse des phénylpropanoïdes, il serait important d'analyser la composition en composés phénoliques solubles. Une étude de ce type serait très intéressante dans le cas des plantes *EgMYB1⁺* où nous avons montré que les gènes *OMT*, *CCR* et *CAD* étaient sous-exprimés, mais également les autres gènes lignine/phénylpropanoïde étaient sur-exprimés. Dans ce cas, il est possible que le flux de carbone dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes soit augmenté avec une accumulation accrue de phénoliques solubles. Vue les modifications (plantes *EgMYB1⁺*) de l'expression des gènes associés à la biosynthèse de la cellulose et au catabolisme pariétal il serait intéressant de approfondir des analyses chimiques de la fraction polysaccharidique de la paroi à partir des échantillons plus âgés.

En ce qui concerne les analyses transcriptomiques (Résultats, Chapitre III), il sera nécessaire de confirmer ou d'invalider l'implication de gènes cibles dans les processus de xylogénèse/lignification par l'étude de mutants correspondants. Des preuves supplémentaires d'une interaction physique (facteur de transcription-promoteur) pourraient être apportées par des expériences de gel-retard (EMSA). Une autre piste très intéressante concerne l'étude des séquences régulatrices. En effet, notre étude a permis de démontrer qu'environ 90 % des promoteurs des gènes triés possèdent un site MYB. Des analyses détaillées de ces régions promotrices pourraient permettre l'identification d'autres sites régulateurs qui fixeraient d'autres facteurs de transcription pour une coopération avec les facteurs MYB afin d'agir sur la transcription des gènes cibles.

Finalement, il ne faut pas oublier que le xylème (= le bois) est une ressource végétale importante. Dans ce contexte, la production du bois (biomasse ligno-cellulosique) représente un enjeu majeur dans les industries de bois (bois d'œuvre), mais également pour les industries de pâte à papier. Il sera nécessaire, en conséquence, de valider les résultats obtenus dans cette étude sur les espèces ligneuses modèles comme le peuplier.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**(1): 63-78.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, **9**, 1859-1868.
- Adams MD, Kerlavage AR, Fleischmann RD, Fuldner RA, Bult CJ, Lee NH, Kirkness EF, Weinstock KG, Gocayne JD, White O & al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature*. **377**: 3-174.
- Aharoni A., Ric De Vos C. H., Wein M., Sun Z., Greco R., Kroon A., Mol J.N.M. and O'Connell A.P. (2001) The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J* **28**:3, 319-332
- Allina SM, Aviva P-H, Theilmann DA, Ellis BE, Douglas CJ (1998) 4-oumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. *Plant Physiol* **116**: 743-754
- Allona I., Quinn M., Shoop E., Swope K., Cyr S.S., Carlis J., Riedl J., Retzel E., Campbell M.M., Sederoff R. and Whetten R.W. (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:9693-9698.
- Aloni R. (1991). Wood formation in deciduous hardwood trees. In *Physiology of Trees*, ed. AS Raghavendra, pp. 175-97. New York: Wiley.
- Aloni R. (1987). Differentiation of vascular tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**:179-204
- Anterola AM and Lewis NG, (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochem*, **61**(3): 221-294.
- Anterola A.M, Jeon J.-H., Davin L.B. and Lewis N.G. (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **277**: 18272-18280.
- Anterola A.M, van Rensburg H., van Heerden P.S., Davin L.B. and Lewis N.G., (1999) Multi-site modulation of flux during monolignol formation in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**: 652-657.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Hofte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science* **279**: 717-720.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Fritig, B. and Legrand, M. (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J*, **8** (4): 465-477.
- Asamizu E, Nakamura Y, Sato S & Tabata S (2000) A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Res.* **7**: 175-180.

- Audic S & Claverie JM** (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7: 986-995.
- Baghdady A., Blervacq A.S., Jouanin L., Grima-Pettenati J., Sivadon P. and Hawkins S.** (2006) *Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 promoter activities are coordinated in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:674-683
- Baima S., Possenti M., Matteucci A., Wisman E., Altamura M.M., Ruberti I. & Morelli G.** (2001). The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol* 126: 643-655.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.-P., Grossniklaus, U. and Chua, N.-H.** (2001) LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev.* 15, 2613-2625.
- Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R. & Sederoff, R. R.** (1993). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260, 672-674.
- Baranowskij N, Froberg C, Prat S, Willmitzer L** (1994) A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO J* 13 : 5383-5392.
- Barnoud, F.** (1980). La cellulose. In: *Les polymères végétaux*, Monties B. (eds), Paris, pp: 66-86.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Jouanin, L. and Boerjan, W.** (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol*, 112: 1479-1490.
- Baucher, M., Monties, B., Vanmontagu, M. and Boerjan, W.** (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit Rev Plant Sci*, 17 (2): 125-197.
- Baucher, M., Bernard-Vailhe, M. A., Chabbert, B., Besle, J. M., Opsomer, C., Van Montagu, M. and Botterman, J.** (1999). Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol Biol*, 39 (3): 437-447.
- Baucher, M., Halpin, C., Petit-Conil, M. and Boerjan, W.** (2003). Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Molec Biol*, 38: 305-350.
- Becker-Andre' M, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K** (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative *cis*-acting elements of the two 4-coumarate:CoA ligase genes in potato. *J Biol Chem* 266: 8551-8559.
- Beheke H.D., Sjolund R.D.,** (1990). *Sieve Elements*. Berlin: Springer-Verlag. 305 pp.
- Bender J. and Fink GR** (1998) A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *PNAS USA* , 95:5655-5660.
- Bennett RN, Wallsgrove RM** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* 127: 617-633
- Bevan, M.W.,** (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucleic Acids Res.* 12 : 8711-8721.]
- Bidlack, J.E., and Buxton, D.R.,** (1992). Content and Deposition Rates of Cellulose, Hemicellulose and Lignin During Regrowth of Forages Grasses and Legumes. *Can. J.*

Plant Sci. In Press.

- Binns, A.N., Chen, R.H., Wood, H.N., and Lynn, D.G.** (1987) Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: Do cell wall components control cell division? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:980-984.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res*, **7**: 1513-1522
- Blee K., Choi J.W., O'Connell A.P., Jupe S.C., Schuch W., Lewis N.G. and Bolwell G.P.** (2001) Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochem*, **57**:1159–1166.
- Bligny R. & Douce R.** (1983) Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. *Biochem. J.* **209** : 489-496.
- Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M.** (2003) Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Bonke M., Thitamadee S., Mähönen A.P., Hauser M.T. and Helariutta Y.** (2003) APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis. *Nature* **426**: 181–186
- Borevitz, J.O., Liang, D., Plouffe, D., Chang, H.S., Zhu, T. and Weigel, D.** (2003) Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Res.*, **13**, 513-523.
- Borevitz, J.O., Xia, Y.J., Blount, J., Dixon, R.A. & Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12** : 2383-2393.
- Boudet AM, Lapierre C and Grima-Pettenati J.** (1995) Biochemistry and Molecular Biology of Lignification. *New Phytol* **129**: 203-236.
- Boudet, A.M., Lapierre, C. and Grima-pettenati, J.** (1995) Tansley review No. 80, Biochemistry and molecular biology of lignification. *New phytol.* **129**: 203-236.
- Boudet A.-M., Chabannes M., Goffner D., Lapierre C., Piquemal J., Petit-Conil M., Ralph J., Ranocha Ph., Ruel K., Grima-Pettenati J.** (1998). Controlled down-regulation of genes involved in the last steps of lignin synthesis may significantly change the lignin profiles of plants. In: *Proceedings of the Symposium Molecular Breeding of Woody Species*. Tokyo, Japan, pp. 1–21.
- Boudet AM.** (2000) Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 81–96.
- Boudet A. and Chabannes M.** (2001) Gains achieved by molecular approaches in the area of lignification. *Pure Appl. Chem.*, **73** (3): 561–566, 2001.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- Braun EL, Grotewold E** (1999) Newly discovered plant *c-myb*-like genes rewrite the evolution of the plant myb gene family. *Plant Physiol* **121**: 21-24.
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, et al.** (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol.* **18**: 630-634.

- Brett C., Waldron K.** (1996) *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Chapman & Hall, London.
- Brill E.M., Abrahams S., Hayes C.M., Jenkins C.L.D. and Watson J.M.** (1999). Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol* **41**: 279–291
- Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C** (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712.
- Brown, D.M., Zeef, L.A.H., Ellis, J., Goodacre, R. and Turner, S.R.** (2005). Identification of Novel Genes in Arabidopsis Involved in Secondary Cell Wall Formation Using Expression Profiling and Reverse Genetics. *Plant Cell*, **17**, 2281-2295.
- Bucciarelli B, Jung HG, Ostry ME, Anderson NA, Vance CP** (1998) Wound response characteristics as related to phenylpropanoid enzyme activity and lignin deposition in resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Can J Bot* **76**: 1282–1289
- Bugos, R. C., Chiang, V. L. and Campbell, W. H.** (1991). cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. *Plant Mol Biol*, **17** (6): 1203-1215.
- Burns CG, Ohi R, Krainer AR, Gould KL** (1999) Evidence that Myb-related CDC5 proteins are required for pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:13789-13794.
- Busam v, Junghanns K.T., Kneusel R.E., Kassemeyer H.-H. and Matern U.,** (1997) Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol* **115**: 1039–1048.
- Busse J.S. and Evert R.F.** (1999a). Pattern of differentiation of the first vascular elements in the embryo and seedling of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Plant Sci.* **160**:1–13.
- Byrne ME, Barley R, Curtis M, Arroyo JM, Dunham M, Hudson A, • Martienssen RA** (2000) *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, **408**:967-971.
- Cabané M., Pireaux J.C., Eric Léger E., Weber E., Dizengremel P., Pollet B. and Lapierre C.** (2004) Condensed Lignins Are Synthesized in Poplar Leaves Exposed to Ozone *Plant Physiol*, **134**: 586-594
- Campbell, M. M. and Sederoff, R. R.** (1996). Variation in lignin content and composition - Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol*, **110** (1): 3-13.
- Candel, S.** (2006). Surexpression des facteurs EgMYB chez *Arabidopsis thaliana* : analyse des résultats et création d'une base de données interfacée. **Rapport de stage.**
- Cano-Delgado A. Yin Y. Yu, C. Vafeados D. Mora-Garcia S. Cheng J.-C. Nam K. H. Li J. and Chory J.** (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*, **131**(21): 5341 - 5351.
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**: 1-30.

- Carpita, N.C.** (1996) Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Ann rev plant physiol & Plant Mol Biol*, **47**: 445-476.
- Carpita, N. C. and McCann, M. C.** (2002). The functions of cell wall polysaccharides in composition and architecture revealed through mutations. *Plant Soil*, **247** (1): 71-80.
- Carteaux F, Thibaud MC, Zimmerli L, Lessard P, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S & Nussaume L** (2003) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *Plant J*. 36: 177-188.
- Carty, S.M., and Greenleaf, A.L.** (2002). Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing. *Mol Cell Proteomics* **1**: 598-610.
- Cassab, G.I.** (1998). Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**: 281-309.
- Cassab G.I & Varner J.E.** (1988) Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **39** :321-353
- Carroll, S.B.** (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* **101**: 577-580.
- Celenza, J.L., Quiel, J.A., Smolen, G.A., Merrikh, H., Silvestro, A.R., Normanly, J. and Bender, J.** (2005); The *Arabidopsis* ATR1 Myb Transcription Factor Controls Indolic Glucosinolate Homeostasis. *Plant Physiol.*, **137**, 253-262.
- Chabannes M., Barakate A., Lapierre C., Marita J. M., Ralph J, Pean M, Danoun S, Halpin C, Grima-Pettenati J and Alain Michel Boudet A. M.** (2001a). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant journal* **28**(3), 257-270.
- Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J. P. and Boudet, A. M.** (2001b). *In situ* analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J*, **28**: 271-282.
- Chabbert, B., Monties, B., Liu, Y. T. & Lagrimini, M.** (1992). Lignin content and composition in transgenic toboggan plants with altered peroxidase activity. In *In proceedings 5th International conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, pp. 481-485. Edited by M. Kuwahara & e. u. P. C. M. Shimada, Tokyo).
- Chaffey, N.** (1999) Cambium: old challenges-new opportunities. *Trees Structure and Function* **13**: 138-151.
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S. and Sundberg, B.** (2002). Secondary xylem development in *Arabidopsis*: a model for wood formation. *Physiology Plantarum*, **114**, 594-600.
- Chapple C., Vogt T., Ellis B.E. and Somerville C.R.,** (1992) An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell* **4**: 1413-1424.
- Chapple C.,** (1998) Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450-independent monooxygenases. *Ann. Rev. plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**: 311-343.
- Chaubet, N., Pacquit, V., Sivadon, P. and Grima-Pettenati, J.** (2003) Control of genes involved the phenylpropanoid pathway with emphasis on lignin biosynthesis. *Cur topic in Plant Biol*, **4**: 117-128.

- Chen J, Varner JE** (1985) Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33-kDa protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4399-4403
- Chen, C. L.** (1991). Lignins: occurrence in woody tissues, isolation, reactions, and structure. In: Wood structure and composition, Lewin M. and Goldstein I. S. (eds), *New-York*, pp: 183 - 261.
- Chen F., Yasuda S. and Fukushima K.,** (1999) Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. *Planta* **207**: 597-603
- Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, Katagiri F, Chang HS, et al.** (2002a) Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*. 14: 559-574.
- Chen, T., Ueda, Y., Xie, S., and Li, E.** (2002b). A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* **277**: 38746-38754.
- Cherney J.H., Axtell J.D., Hassen M.M., Anliker K.S.** (1988) Forage quality characterization of chemically induced brown-midrib mutant in pearl millet, *Crop Sci.* **28**: 783-787.
- Du H, Clarke AE, Bacic A** (1996) Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends Cell Biol* **6**: 411-414.
- Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Van Montagu, M. and Boerjan, W.** (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol*, **118** (1): 125-135.
- Christensen, J. H., Overney, S., Rohde, A., Diaz, W. A., Bauw, G., Simon, P., VanMontagu, M. and Boerjan, W.** (2001). The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol*, **47** (5): 581-593.
- Clarke, J.D. and Zhu, T.** (2006). Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives. *The Plant Journal*, **45**, 630-650.
- Clifford, M. N.** (1974). Specificity of acidic phloroglucinol reagents. *J Chromatogr*, **94**: 321-324.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**(6): 735-743.
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L. and Tonelli, C.** (2005). A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. **15**, 1196-1200.
- Cooke R, Raynal M, Laudie M, Grellet F, Delseny M, Morris PC, Guerrier D, Giraudat J, & al.** (1996) Further progress towards a catalogue of all *Arabidopsis* genes: analysis of a set of 5000 non-redundant ESTs. *Plant J.* **9**: 101-124.
- Costa, M. A., Collins, R. E., Anterola, A. M., Cochrane, F. C., Davin, L. B. and Lewis, N. G.** (2003) An *in silico* assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochem* **64**: 1097-1112.

- Crowe ML, Serizet C, Thareau V, Aubourg B, Rouze P, Hilson P, Beynon J, Weisbeek P, van Hummelen P, Reymond P, Paz Ares J, Nietfeld W & Trick M (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res.* **31**: 156-158.
- Cukovic D, Ehrling J, VanZiffle JA, Douglas CJ (2001) Structure and evolution of 4-coumarate:coenzyme A ligase (*4CL*) gene families. *Biol Chem* **382**: 645–654.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.B. & Roby, D. (1999). A novel myb oncogene homologue in Arabidopsis thaliana related to hypersensitive cell death. *Plant J.* **20** : 57-66.
- Davin LB., Lewis NG and Umezawa T (1992) Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignins and neolignins, lignins and suberins. *Rec Adv phytochem*, **26**: 325-375.
- Davin L.B. and Lewis N.G. (1992). Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. *Rec. Adv. Phytochem.* **26**, 325–375.
- Day A., Ruel K., Neutelings G., Crônier D., David H., Hawkins S. and Chabbert B. (2005). Lignification in the flax stem: evidence for an unusual lignin in bast fibers. *Planta*, 234-245.
- De Los Reyes BG, Morsy M, Gibbons J, Varma TS, Antoine W, McGrath JM, Halgren R & Redus M (2003) A snapshot of the low temperature stress transcriptome of developing rice seedlings (*Oryza sativa* L.) via ESTs from subtracted cDNA library. *Theor Appl Genet.* 107: 1071-1082.
- Deluc, L., Barrieu, F., Marchive, C., Lauvergeat, V., Decendit, A., Richard, T., Carde, J.P., Mérillon, J.-M. and Hamdi, S. (2006). Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiol.*, **140**, 499-511.
- Dean, J. F. D. and Eriksson, K. E. L. (1994). Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, **48**: S21-33.
- Demura, T. and Fukuda, H. (2007) Transcriptional regulation in wood formation. **12**, 64-70.
- Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., Matsuoka, N., Minami, A., Nagata-Hiwatashi, M., Nakamura, K., Okamura, Y., Sassa, N., Suzuki, S., Yazaki, J., Kikuchi, S. and Fukuda, H. (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *PNAS*, **99**, 15794-15799.
- Dence, C. W. (1992). The determination of lignin. In: *Methods in lignin chemistry*, Lin S. Y. and Dence C. W. (eds), Berlin, Heidelberg, pp: 33-61.
- Denekamp, M. and Smeekens, S.C. (2003) Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiol.* **132**, 14151423.
- Dey, P.M. and Brinson, K. (1984) Plant cell walls. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* **42**: 265-382.
- Delmer, D. P. and Amor, Y. (1995). Cellulose biosynthesis. *Plant Cell*, **7** (7): 987-1000.
- Delmer D.P (1999) Cellulose biosynthesis exciting times for a difficult field of Study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**:245–76.

- Dey, P.M. and Brinson, K.** (1984) Plant cell walls. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. **42**: 265-382.
- Dharmawardhana D.P., Ellis B.E. and Carlson J.E.** (1992). Characterization of vascular lignification in *Arabidopsis thaliana*. *Can. J. Bot.* **70**:2238–2244.
- Dharmawardhana D.P., Ellis B.E. and Carlson J.E.** (1995). A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* **107**: 331–339
- Dhugga, K.S.** (2001) Building the wall: genes and enzymes complexes for polysaccharide synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 488-493.
- Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P.G.** (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**: 1079-1082.
- Diaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F** (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* **161**: 179–188
- Diaz, I., Vicente-Carbajosa, J., Abraham, Z., Martinez, M., Isabel-La Moneda, I. and Carbonero, P.** (2002) The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *Plant J.* **29**, 453-464.
- Diaz, A.P., Braun E.L., McMullen M.D. and Grotewold E.** (2003) Recently Duplicated Maize *R2R3 Myb* Genes Provide Evidence for Distinct Mechanisms of Evolutionary Divergence after Duplication. *Plant Physiol.* **1**; **131(2)**: 610–620.
- Dickison, W.C.** (2000) Integrative plant anatomy. Academic press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Toronto, Sydney Tokyo
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L.** (1995). Stress induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dixon RA and Harrison MJ.** (1990) Activation, Structure, and Organization of Genes involved in Microbial Defence in Plants. *Adv Genet.*, **28**: 166-217.
- Doblin, M.S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., and Delmer, D.P.** (2002). Cellulose biosynthesis in plants: From genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1407–1420.
- Donson J, Fang YW, Espiritu Santo G, Xing WM, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V & Volkmuth W** (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol.* **48**: 75-97.
- Douglas, C. J.** (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis:from weeds to trees. *Trends Plant Sci*, **1**: 171-178.
- Doyle JJ & Doyle JL** (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- Driouich, A., Laine, A. C., Vian, B. and Faye, L.** (1992). Characterization and localization of laccase forms in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J*, **2**: 13-24.
- Dumville, J.C., and Fry, S.C.** (2000) Uronic acid-containing oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 125-140.

- Edwards, R. and Dixon, R. A.** (1991). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase from suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch Biochem Biophys*, **287** (2): 372-379.
- Edashige Y., Ishii, T.,** (1996) Structures of cell wall polysaccharides from suspension-cultured cells of *Cryptomeria Japonica*. *Mokuzai Gakkaiski*. **42**: 895-900.
- Ehlting J, Bu^{ttner} D, Wang Q, Douglas CJ, Somssich IE, Kombrink E** (1999) Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J* **19**:9–20.
- Elkin Y Edwards R Mavandad M Hedrick SA Ribak O Dixon RA and Lamb CJ** (1990) Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Nat. Acad Sci USA.*, **87**: 9057-9061.
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Domenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V. and Quesada, M. A.** (1999). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol Plant*, **106**: 355-362.
- Emery J.F., Floyd S.K., Alvarez J., Eshed Y., Hawker N.P., Izhaki A., Baum S.F., Bowman J.L.** (2003). Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol*, **13**: 1768–1774.
- Erickson M, Larsson S, and Miksche GE** (1973) Gas-chromatographic analysis of lignin oxidation products. *Act. Chem. Scand.* **27**: 903-914.
- Esau, K.,** Cell Wall. (1977) In *Plant Anatomy*, John Wiley & Sons, New York, pp. 43-60.
- Eshed Y., Baum S.F., Perea J.V. and Bowman J.L.** (2001). Establishment of polarity in lateral organs of *Arabidopsis*. *Curr Biol* **11**: 1251–1260.
- Eudes A., Pollet B., Sibout R., Do C-T., Séguin A., Lapierre C., Jouanin L.** (2006) Evidence for a role of AtCAD1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225**, 23-39.
- Ewing B & Green P** (2000) Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet.* **25**: 232-234.
- Fengel D. and Wegener G.** (1984) *Wood : Chemistry, Ultrastructure, Reaction*. Berlin, New York, Walter de Gruyter. **613** pages.
- Fisher RF, Egelhoff TT, Mulligan JT and Long SR** (1988) Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes & Development*, **2**: 282-293.
- Foissac, S., Bardou, P., Moisan, A., Cros, M.-J. and Schiex, T.** (2003). EUGENE'HOM: a generic similarity-based gene finder using multiple homologous sequences. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 3742-3745.
- Foucart C., Paux E., Ladouce N., San-Clemente H., Grima-Pettenati J. and Sivadon P.** (2006) Transcript profiling of a xylem versus phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in *Eucalyptus*. *New Phytol.*, **170**:739-752.
- Frampton J, Leutz A, Gibson T, Graf T.** (1989). DNA-binding domain ancestry [letter]. *Nature* **342**, 134.

- Freudenberg, K., Harkin, J. M., Rechert, M. and Fukuzumi, T.** (1958). Die an der verholzung beteiligten enzyme. Die dehydrierung des subaoinalkohols. *Chem Ber*, **91**: 581-590.
- Freudenberg, K. and Harkin, J. M.** (1963). The glucosides of cambial sap of spruce. *Phytochem*, **2**: 189-193.
- Freudenberg K, Neish AC** (1968) Constitution and biosynthesis of lignin. In A Kleinzeller, GF Springer, HG Wittman, eds, Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Vol 2. Springer-Verlag, New York, pp 1-129
- Fry, S.C.** (1987a) The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. Longman, UK, pp 1- 15.
- Fry S.C** (1987b) Intracellular ferulation of pectic polysaccharides. *Planta*, **171**: 205-211.
- Fry, S.C.** (1988) The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical.
- Fry, S.** (1995). Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Rev Plant Physiol*, **46**: 497 - 520.
- Fry, S.C.** (2000) The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis. The Blackburn Press, Caldwell, NJ.
- Fukuda H.** (1992). Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **136**:289–332
- Fukuda, H.** (1997) Tracheary element differentiation. *Plant Cell*, **9**: 1147-1156.
- Fukuda H. and Komamine A.** (1985). *Cytodifferentiation*. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, ed. IK Vasil, **2**:149–212. New York: Academic.
- Fukushima, K. and Terashima, N.** (1990) Heterogeneity in formation of lignin. XIII. Formation of phydroxyphenyl lignin in various hardwoods visualized by microautoradiography. *J. Wood Chem. Technol.* **10**: 413–433.
- Fukushima, K., Matsui, N., Taguchi, S., Yasuda, S.,** (1997). On the roles of monolignol glucosides and monolignol pathway (coniferyl alcohol 5-hydroxyconiferyl alcohol-sinapyl alcohol) in lignin biosynthesis of *Magnolia kobus*. In: 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, 9–12 June 1997, Montreal, Quebec, Canada 28-(21–24).
- Galliano H., Heller W. and Sandermann H.J.** (1993), Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochemistry* **32**: 557–563.
- Galsser WG., and Glasser HR.** (1981) Pap. Puu **63**: 71-83.
- Gao, Y., Li, J., Strickland, E., Hua, S., Zhao, H., Chen, Z., Qu, L. and Deng, X.W.** (2004) An Arabidopsis Promoter Microarray and its Initial Usage in the Identification of HY5 Binding Targets in Vitro. **54**, 683-699.
- Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB and Bacic A** (2004) Characterization of the Arabidopsis Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein *AtAGP17* Mutant (*rat1*) That Results in a Decreased Efficiency of Agrobacterium Transformation. *Plant Physiol.*, **135**: 2162-2171
- Gavnholt, B. and Larsen, K.** (2002). Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plant*, **116** (3): 273-280.

- Gibbs RD**, (1958) The määle reaction, lignins and the relation between woody plants. In: *Thimann KV* (Ed). The physiology of forest trees. Roland Press Com. New York. pp: 269-312.
- Glover, B.J., Perez-Rodriguez, M. and Martin, C.** (1998) Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor. *Development*, **125**, 34973508.
- Goff SA, Cone KC, Chandler VL** (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B*-gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev*, **6**:864-875.
- Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M. E., Schuch, W. and Boudet, A. M.** (1992). Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. *Planta*, **188**: 48-53.
- Goffner, D., Campbell, M. M., Campargue, C., Clastre, M., Borderies, G., Boudet, A. and Boudet, A. M.** (1994). Purification and characterization of cinnamoyl-coenzyme A:NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiol*, **106**: 625-632
- Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. and Boudet, A. M.** (1998). A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol Biol*, **36 (5)**: 755-765.
- Goicoechea M, Lacombe E, Legay S, Mihaljevic S, Rech P, Jauneau A, Lapierre C, Pollet B, Verhaegen D, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J.** (2005) EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* ;**43**:553–567.
- Gomez-Maldonado, J., Avila, C., Torre, F., Canas, R., Canovas, F.M. and Campbell, M.M.** (2004). Functional interactions between a glutamine synthetase promoter and MYB proteins. *The Plant Journal*, **39**, 513-526.
- Gomord, V., Kiefer-Meyer, M.C., O'Connell, A. and Faye, L.** (1996) Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco, *Gene*. **178(1-2)** : 205-507.
- Goodwin, T.W., and Mercer, E.I.**, (1983) The Plant Cell Wall. In *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press, New York, NY, pp. 55-91.
- Goodwin, T. W. and Mercer, E. I.** (1990). The plant cell wall. In: Introduction to plant biochemistry, Press P. (eds), *Oxford, New York*, pp: 55 - 91.
- Goujon T., Ferret V., Mila I., Pollet B., Ruel B., Burlat V., Joseleau J.P., Barrière Y., Lapierre Y. and Jouanin L.** (2003) Down-regulation of the AtCCR1 gene in *Arabidopsis thaliana*: effects on phenotype, lignins and cell wall degradability. *Planta* **217 (2)**: 218 – 228.
- Grand C.**, (1984) Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **169**: 7–11.
- Grima-Pettenati, J., Feuillet, C., Goffner, D., Borderies, G. and Boudet, A. M.** (1993). Molecular cloning and expressin of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol Biol*, **21**: 1085-1095.
- Grima-Pettenati, J., Campargue, C., Boudet, A., and Boudet, A.M.** (1994). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from *Phaseolus*

vulgaris. *Phytochem.*, **37**:, 941–947

- Grima-Pettenati J. and Goffner D.** (1999) Lignin genetic engineering revisited. *Plant Science*, **145**:51-65.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J.K., Jacobsen, J.V.** (1995) Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl - amylase gene promoter. *Plant Cell*, **7**, 1879–1891.
- Gubler, F., Raventos, D., Keys, M., Watts, R., Mundy, J. and Jacobsen, J.V.** (1999) Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *Plant J.* **17**, 19.
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W. and Dixon R.A.,** (2001) Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *The Plant Cell* **13**: 73–88.
- Ha, M.A., Apperley, D.C., Evans, B.W., Huxham, M., Jardine, W.G., Vietor, R.J., Reis, D., Vian, B., and Jarvis, M.C.** (1998). Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *Plant J.* **16**, 183–190.
- Hahlbrock K, Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347–369
- Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Tollier, M. T. and Schuch, W.** (1994). Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant J.*, **6** (3): 339-350.
- Halpin C., Holt K., Chojecki J., Oliver D., Chabbert B., Monties B., Edwards K., Barakate A. and Foxon G.A.** (1998), *Brown-midrib* maize (*bm1*)—a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J*, **14**: 545–553.
- Halpin C, Grima-Pettenati J and Alain Michel Boudet A. M.** (2001). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant journal* **28**(3), 257-270.
- Hanahan D.** (1983) studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol.*, **166** : 557-580.
- Harborne, J. B.** (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *In: Methods in plant biochemistry*, Harborne J. B. (eds), *San Diego*, pp: 1-28.
- Harding SA, Leshkevich J, Chiang VL, Tsai C-J** (2002) Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme A ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiol* **128**: 428–438.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA.** (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**: 2110–2113.
- Hatfield R. and Vermerris W.** (2001) Lignin Formation in Plants. The Dilemma of Linkage Specificity *Plant Physiology*, **126**: 1351–1357
- Hawker N.P. and Bowman, J.L.** (2004). Roles for Class III HD-Zip and KANADI genes in Arabidopsis root development. *Plant Physiol.* **135**:2261–2270.

- Hawkins, S. and Boudet, A. M.** (1994). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* hook. *Plant Physiol*, **104**: 75-84.
- Hawkins, S., et Boudet, A.** (1996) Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook.) histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma*, **191**: 96-104.
- Hemerly, A.S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D.** (1993) *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell*, **5**: 1711-1723.
- Herrmann KM** (1999) The Shikimate pathway *Ann Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol* **50**: 473-503
- Hermann, A., Schmitt, S., and Jeltsch, A.** (2003). The human Dnmt2 has residual DNA- (cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* **278**, 31717-31721.
- Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J., Andersson, A., Erlandsson, R., Blomqvist, K., Bhalerao, R., Uhlen, M., Teeri, T.T., Lundberg, J., Sundberg, B., Nilsson, P. and Sandberg, G.** (2001). A transcriptional roadmap to wood formation. **98**, 14732-14737.
- Hibino T., Takabe K., Kawazu T., Shibata D. and Higuchi T.** (1995), Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Bioscience, Biotechnol, and Biochem* **59**: 929-931.
- Higginson T., Li S.F. and Parish R.W.** (2003) AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **35**:2, 177-192
- Higuchi T.** (1985). Biosynthesis of lignin. In: Higuchi T, ed. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Orlando: Academic Press, 141-160.
- Higuchi T.** (1990). Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.*, **24**, 23-63.
- Higuchi, T., Ito, T., Umezawa, T. and Shibata, D.** (1994). Red-brown color of lignified tissues of transgenic plants with antisens CAD gene: wine-red lignin from coniferyl aldehyde. *J Biotechnol*, **37**: 151-158.
- Higuchi T.** (1997) *Biochemistry and Molecular Biology of Wood*. Springer-Verlag, New York, pp 20-22, 144-181.
- Hilson, P., Allemeersch, J., Altmann, T., Aubourg, S., Avon, A., Beynon, J., Bhalerao, R. P., Bitton, F., Caboche, M., Cannoot, B., et al.** (2004). Versatile Gene-Specific Sequence Tags for *Arabidopsis* Functional Genomics: Transcript Profiling and Reverse Genetics Applications. *Genome Res* **14**: 2176-2189.
- Hirayama T. and Shinozaki K** (1996) A *cdc5+* homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:13371-13376.
- Hoeren FU, Dolferus R, Wu Y, Peacock WJ and Dennies ES** (1998) Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene (*ADHI*) by low oxygen. *Genetics*, **149**:479-490.
- Hosokawa, M., Suzuki, S., Umezawa, T. and Sato, Y.** (2001) Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol*. **42**: 959-968.

- Howe KM, and Watson RJ.** (1991) Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res* **19(14)**:3913–3919
- Hu, H., Brown, P.H. and Labavitch J.M.** (1996) Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. *J. Exp. Bot.*, **47** : 227-232
- Hu W-J, Kawaoka A, Tsai C-J, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang VL** (1998) Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5407–5412.
- Hu, W. J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D. D., Tsai, C. J. and Chiang, V. L.** (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat Biotechnol*, **17 (8)**: 808-812.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A., and Voragen, AG.J.** (2000) Glucuronarabinoxylan from maize kernel cell walls are more complex than those from Sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate Polymers* **43**: 269-279
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H. & Watanabe, A.** (2001) G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13(8)**:1891-905.
- Jefferson, RA., Kavanagh, TA. and Bevan, MW.** (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO J* **6**:3901-3907.
- Jiang C., Gu X., and Peterson T.** (2004) Identification des structures et des carboxy-terminale motifs conservés de gène de la famille Myb de l'espèce d'*Arabidopsis* et d'*Oryza sativa* L. indica *Genome Biol.* **5 (7)** : R46
- Jin, H. & Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant *MYB-gene* family. *Plant Mol. Biol.* **41** : 577-585.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrrens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. and Martin C.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **19** : 6150-6161.
- Joachim H., G. Jung and Weiting Ni** (1998) Lignification of plant cell walls: Impact of genetic manipulation *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12742–12743
- Jones L., Ennos A.R. and Turner S.R.** (2001). Cloning and characterization of *irregular xylem4 (irx4)*: a severely lignin-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**: 205–216.
- Johnson, D. B., Moore, W. E. and Zank, L. C.** (1961). The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi J.*, **44(11)**: 793-798.
- Jouanin, L., Goujon, T., deNadai, V., Martin, M. T., Mila, I., Vallet, C., Pollet, B., Yoshinaga, A., Chabbert, B., PetitConil, M. and Lapierre, C.** (2000). Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid *O*-methyltransferase activity. *Plant Physiol*, **123 (4)**: 1363-1373.
- Jung, H-J. and Fahey, G.C.Jr.** (1983) Interactions among Phenolic monomers and *in-vitro* fermentation. *J. of Dairy Sci.* **66**: 1255.
- Jung S.H., Lee JY & Lee D.H.** (2003) Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol.* **52**: 553-567.

- Kajita, S., Katayama, Y. and Omori, S.** (1996). Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiol*, **37** (7): 957-965.
- Kajita S, Hishiyama S, Tomimura Y, Katayama Y, Omor S** (1997) Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol* **114**: 871-879
- Kaku T., Tabuchi A., Wakabayashi K., Kamisaka S. and Hoson T.** (2002) Action of xyloglucan hydrolase with the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epidermal cells. *Plant cell physiol.* **43**(1) : 21-26.
- Kärkönen, A., Koutaniemi, S., Mustonen, M., Syrjänen, K., Brunow, G., Kilpeläinen, I., Teeri, T.H. and Simola, L.K.** (2002) Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol. Plant.* **114**: 343-353.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. and Ebinuma, H.** (2000). Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *The Plant Journal*, **22**, 289-301.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., and MacPherson, J.** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**:1299-1302
- Kendzioriski, C., Irizarry, R.A., Chen, K.-S., Haag, J.D. and Gould, M.N.** (2005). On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *PNAS*, **102**, 4252-4257.
- Kieliszewski M.J. & Lamport D.T.A.** (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, posttranslational codes and phylogeny. *Plant J.*, **5**: 157-172.
- Kim, M. K., Jeon, J. H., Fujita, M., Davin, L. B. and Lewis, N. G.** (2002). The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8 'DIRIGENT' family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. *Plant Mol Biol*, **49** (2): 199-214.
- Kim, H., Ralph, J., Lu, F. C., Ralph, S. A., Boudet, A. M., MacKay, J. J., Sederoff, R. R., Ito, T., Kawai, S., Ohashi, H. and Higuchi, T.** (2003). NMR analysis of lignins in CAD-deficient plants. Part 1. Incorporation of hydroxycinnamaldehydes and hydroxybenzaldehydes into lignins. *Org Biomol Chem*, **1** (2): 268-281.
- Kim, H., Snesrud, E.C., Haas, B., Cheung, F., Town, C.D. and Quackenbush, J.** (2003). Gene Expression Analyses of Arabidopsis Chromosome 2 Using a Genomic DNA Amplicon Microarray. *Genome Res.*, **13**, 327-340.
- Kim, S.-J., Kim, M.-R., Bedgar, D.L., Moinuddin, S.G.A., Cardenas, C.L., Davin, L.B., Kang, C., and Lewis, N.G.** (2004). Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1455-1460.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hulskamp, M. and Baumlein, H.** (2001) Ectopic expression of the *Arabidopsis* AtMYB23 gene induces differentiation of trichome cells. *Dev. Biol.* **235**, 366377.
- Klempnauer KH, Gonda TJ, Bishop JM.** (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31** : 453-463
- Klempnauer, K.H. & Sippel, A.E.** (1987). The highly conserved aminoterminal region of the protein encoded by the v-myb oncogene functions as a DNA-binding domain. *EMBO J.* **6** : 2719-2725.

- Knight, M.E., Halpin, C., and Schuch, W.** (1992). Identification and characterization of cDNA clones encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **19**, 793–801.
- Knox JP** (1995) The extracellular matrix in higher plants: developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB J* **9**: 1004–1012.
- Knox JP** (1996) Arabinogalactan-proteins: developmentally regulated proteoglycans of the plant cell surface. In M Smallwood, JP Knox, DJ Bowles, eds, *Membranes, Specialized Function in Plants*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 93–102.
- Knobloch K-H, Hahlbrock K** (1975) Isoenzymes of *p*-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max* (soybeans). *Eur J Biochem* **52**: 311–320
- Knight, M.E., Halpin, C., and Schuch, W.** (1992). Identification and characterization of cDNA clones encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **19**, 793–801.
- Ko, J.-h. and Han, K.-h.** (2004). Arabidopsis whole-transcriptome profiling defines the features of coordinated regulations that occur during secondary growth. **55**, 433-453.
- Ko J.H, Han K.H, Park S. and Yang J.** (2004) Plant Body Weight-Induced Secondary Growth in Arabidopsis and Its Transcription Phenotype Revealed by Whole-Transcriptome Profiling. *Plant Physiol*, **135**:. 1069–1083
- Koncz, C. and Scell, J.,** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Arobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204** : 383-396.
- Kranz HD, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner RC, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M and Martin C** (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **16**:263-276.
- Kranz H, Scholz K, Weisshaar B** (2000) c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *Plant J* **21**:231-235.
- Kumar, A. and Ellis, B. E.** (2001). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol*, **127** (1): 230-239.
- Kutscha, N. P. and Gray, J. R.** (1972). The suitability of certain stains for studying lignification in balsam fir, *Abies balsamea* (L) Mill. *Life Sci Agric Expt Station, Technical bulletin*, **53**: 5-50.
- Lacombe, E., Hawkins, S., Doorselaere, J.V., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., and Boudet, A.M.** (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: Cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11** : 429–441.
- Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M. and Rothstein, S.** (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissues-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 7542-7546.
- Lagrimini L.M., Gingas V., Finger F., Rothstein S. and Liu T.T.Y.** (1997) Characterization of Antisense Transformed Plants Deficient in the Tobacco Anionic Peroxidase. *Plant Physiol* **114**(4): 1187-1196.

- Laigeng L., Yihua Z., Xiaofei C., Jiayan S., Jane M. M., John R., and Vincent L. C.**, (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100 (8) : 4939-4944.
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann H Jr.** (1995) Elicitor-Induced Spruce Stress Lignin (Structural Similarity to Early Developmental Lignins). *Plant Physiol* 108: 1277-1287.
- Lapasin R, Pricl S.** (1995). *The Rheology of Industrial Polysaccharides. Theory and Applications*. London: Blackie. 620 pp.
- Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, R.** (1986). Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung*, 40: 113-119.
- Lapierre, C., Tollier, M. T. and Monties, B.** (1988). Mise en évidence d'un nouveau type d'unité constitutive dans les lignines d'un mutant de maïs bm3. *C R Acad Sci Paris*, 307: 723-728.
- Lapierre, C., Jung H. G., Buxton D. R., Hatfield R. D. and Ralph J.** (eds), (1993). Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: *Forage cell wall structure and digestibility, Madison*, pp: 133-166.
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Leple JC, Boerjan W, Ferret V, De Nadai V, Jouanin L** (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*. 119: 153-164.
- Larkin, J.C., Oppenheimer, D.G., Pollock, S., Marks, M.D.** (1993) Arabidopsis *GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell*, 5, 1739-1748.
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO & Davis RW** (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 13057-13062.
- Latchman, D.S.** (1998). Eukaryotic transcription factors. 3rd edn. (San Diego: Academic Press).
- Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. and Grima-Pettenati, J.** (2001) Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochem*. 57, 1187-1195.
- Lauvergeat V., Rech P., Jauneau A., Guez C., Coutos-Thevenot P. and Grima-Pettenati J.** (2002) The vascular expression pattern directed by the Eucalyptus gunnii Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species, *Plant Mol. Biol*. 50 : 497-509.
- Lechelt-Kunze C, Meissner RC, Drewes M & Tietjen K** (2003) Flufenacet herbicide treatment phenocopies the fiddlehead mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Pest Manag Sci*. 59: 847-856.
- Lee D, Meyer K, Chapple C, Douglas CJ** (1997) Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell* 9: 1985-1998.
- Lee, M.M. & Schiefelbein, J.** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*,

- is a position dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99** : 473-483.
- Lee MM, and Schiefelbein J.** (2001) Developmentally distinct *MYB* genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* , **128**:1539-1546.
- Lee, M.W., Qi, M. & Yang, Y.** (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice *myb* gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14** : 527-535.
- Lee JY & Lee DH** (2003) Use of serial analysis of gene expression technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress. *Plant Physiol.* **132**
- Lei XH, Shen X, Xu XQ, Bernstein HS** (2000) Human Cdc5, a regulator of mitotic entry, can act as a site-specific DNA binding protein. *J Cell Sci* 2000, **113** : 4523-4531.
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C. and Rothan C.** (2005). Changes in Transcriptional Profiles Are Associated with Early Fruit Tissue Specialization in Tomato *Plant Physiol.* **139(2)**: 750 - 769.
- Lewis, D.H.** (1980). Boron, lignification and the origin of vascular plants- a unified hypothesis. *New Phytologist*, **84**, 209-229.
- Lewis NG, Davin LB** (1999) Lignans: biosynthesis and function. In DHR Barton, K Nakanishi, O Meth-Cohn, eds, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol 1. Elsevier, London, pp 639-712
- Lewis NG, Yamamoto E.** (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 455-96.
- Lewis, N. G., Davin, L. B., Sarkanen, S.,** (1999). The nature and function of lignins. In: Barton, D. H. R., Sir, Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., (Eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, London, Vol. **3**, pp. 617-745.
- Li, L, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL** (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**: 1567-1586.
- Li, L, Cheng XF, Leshkevich J, Umezawa T, Harding SA, Chiang VL** (2001) The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**: 1567-1586.
- Lindermayr, C., Mollers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H. and Ebel, J.** (2002). Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate : coenzyme A ligase gene family - Primary structures, catalytic properties, and differential expression. *Eur J Biochem*, **269 (4)**: 1304-1315.
- Lipsick, J.S.** (1996). One billion years of Myb. *Oncogene*. **13** : 223-235.
- Iiyama, K. & Pant, R.** (1988) The mechanism of the Maüle Colour reaction. Introduction of methylated syringyl nuclei into softwood lignin. *Wood Sci. Technol.*, **22**: 167 175.
- Lorenz WW & Dean JF** (2002) SAGE profiling and demonstration of differential gene expression along the axial developmental gradient of lignifying xylem in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree Physiol.* **22**: 301-310.

- Lüderitz, T. and Grisebach, H.** (1981). Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Biochem*, **123**: 583-586.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lechary, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Tacconnat, L. and Small, I.** (2004). Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis. *Plant Cell*, **16**, 2089-2103.
- Lüscher B, Eisenman RN.** (1990). New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev.*, **4**(12B):2235–2241.
- Mahonen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N. and Helariutta Y.** (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes Dev.* **14**:2938–2943.
- Majello, B., L. C. Kenyon, and R. Dalla-Favera.** (1986). Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** :9636-9640
- Majewski-Sawka A, Nothnagel EA** (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* **122**: 3–9.
- Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D., Guo, D. J., Chen, F. and Dixon, R. A.** (2003). Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochem*, **62** (1): 53-65.
- Martin C, Paz-Ares J:** (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends Genet*, **13** :67-73.
- Martz F., Maury S., Pinçon G. and Legrand M.,** (1998) cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol Biol* **36**: 427–437.
- Matsui N., Chen F., Yasuda S. and Fukushima K.,** (2000) Conversion of guaiacyl to syringyl moieties on the cinnamyl alcohol pathway during the biosynthesis of lignin in angiosperms. *Planta* **210**: 831–835.
- Matsui, K., Hiratsu, K., Koyama, T., Tanaka, H. and Ohme-Takagi, M.** (2005). A Chimeric AtMYB23 Repressor Induces Hairy Roots, Elongation of Leaves and Stems, and Inhibition of the Deposition of Mucilage on Seed Coats in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 147-155.
- Mäule, C.** (1901). Das verhalten verholzter membranen gegen kalium permanganat, ein holzreaktionen neuer art. *Beitr Wiss Botanik*, **4**: 166-185
- Mauseth, J.D.** (1988). The Cell: In Plant Anatomy. Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, CA, pp: 13-40.
- McCann M.C.** (1997) Tracheary element formation: building up to a dead end. *Trends Plant Sci.*, **2**:333-338.
- McCann M.C. and Roberts K.** (1994) Changes in cell wall architecture during cell elongation. *J.Exp. Bot.*, **45**: 1683- 1691.

- McHale, N.A., and Koning, R.E.** (2004). MicroRNA-directed cleavage of *Nicotiana sylvestris* PHAVOLUTA mRNA regulates the vascular cambium and structure of apical meristems. *Plant Cell* **16**:, 1730–1740
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P.** (1984). Structure and function of the primary cell wall of plants. *Annual review of biochemistry*, **53**: 635-663.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M** (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 1998, **282** : 662-682.
- Meissner RC, Jin H, Cominelli E, Denekamp M, Fuertes A, Greco R, Kranz HD, Penfield S, Petroni K, Urzainqui A** (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell*, **11**:1827-1840.
- Mellerowicz, E.J., Baucher, M., Sundberg, B. and Boerjan, W.** (2001). Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **47**, 239-274.
- Meng, H. and Campbell, W. H.** (1998). Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid *O*-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. *Plant Mol Biol*, **38** (4): 513-520.
- Meshitsuka, G. and Nakano, J.** (1978). Studies on the mechanism of lignin color reaction (XII): Maüle color reaction (8). *Mokuzai Gakkaishi*, **24**: 563-568.
- Meshitsuka, G. and Nakano, J.** (1979). Studies on the mechanism of lignin color reaction (XIII): Maüle color reaction (9). *Mokuzai Gakkaishi*, **25** (9): 588-594.
- Meyer K., Shirley A.M., Cusumano J.C., Bell-Lelong D.A. and Chapple C.,** (1998) Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Aca Sci USA* **95**: 6619–6623.
- Meyermans H., Morreel K., Lapierre C., Pollet B., Bruyn A. De, Busson R., Herdewijn P., Devreese B., Van Beeumen J., Marita J.M., Ralph J., Chen C., Burggraeve B., Van Montagu M., Messens E. and Boerjan W.,** (2000) Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *The J Biol Chem* **275**: 36899–36909.
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M.** (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell*, **17**: 2993–3006.
- Mitsuda, N. Iwase, A. Yamamoto, H. Yoshida, M. Seki, M. Shinozaki, K. and Ohme-Takagi M.** (2007). NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**(1): 270 - 280.
- Monties B.** (1991). Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Animal Feed Science and Technology* **32**: 159-175.
- Moreau, C., Aksenov, N., Lorenzo, M., Segerman, B., Funk, C., Nilsson, P., Jansson, S. and Tuominen, H.** (2005). A genomic approach to investigate developmental cell death in woody tissues of *Populus* trees. *Genome Biology*, **6**, R34.
- Morrison, I. M.** (1976). New laboratory methods for predicting the nutritive value of forage crops. *World Review of Animal Production*, **XII** (3): 75-82.
- Muller C, Yang R, Idos G, Tidow N, Diederichs S, Koch OM, Verbeek W, Bender TP,**

- Koeffler HP** (1999) c-myb transactivates the human cyclin A1 promoter and induces cyclin A1 gene expression. *Blood* **94** : 4255-4262.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol*, **15**: 473-497
- Murray, F., Kalla, R., Jacobsen, J. and Gubler, F.** (2003) A role for HvGAMYB in anther development. *Plant J.* **33**, 481491.
- Nagaoka, S. and Takano, T.** (2003). Salt tolerance-related protein STO binds to a Myb transcription factor homologue and confers salt tolerance in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, **54**, 2231-2237.
- Nagata, N., Asami, T. and Yoshida, S.** (2001). Brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis, inhibits development of secondary xylem in cress plants. *Plant Cell Physiol.* **42**:1006– 1011.
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L** (2001) The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**: 2099–2114
- Newman L.J., Perazza D.E., Juda L. and Campbell M.M.** (2004) Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant J* **37**:2, 239-250
- Nieminen K.M., Kauppinen L. and Helariutta Y.** (2004) A Weed for Wood? *Arabidopsis* as a Genetic Model for Xylem Development. *Plant Physiol* **135**:653-659
- Northcote D.H.** (1995). Aspects of vascular tissue differentiation in plants: parameters that may be used to monitor the process. *Int. J. Plant Sci.* **156**:145–56.
- Nose, M., Bernards, M.A., Furlan, M., Zajicek, J., Eberhardt, T.L. and Lewis, N.G.** (1995) Toward the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. *Phytochemistry* **39**: 71–79.
- Novikova LN, Medvedeva SA, Volchatova IV and Bogatyreva SA** (2002) Change in macromolecular characteristics biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting. *Appl. Biochem. Microbiol.* **38**: 181-185.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y.** (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79** : 639-648
- Ogino T, Garner C, Markley JL, and Herrmann KM** (1982) Biosynthesis of aromatic compounds: ¹³C NMR spectroscopy of whole *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **79**(19): 5828–5832.
- Oh, S., Park, S. and Han, K.H.** (2003a). Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. **54**, 2709-2722.
- Oh, S., Park, S. and K.H., H.** (2003b). Transcriptional regulation of secondary growth in *Arabidopsis thaliana*. **54**, 2709-2722.
- Ohashi H., Yamamoto E., Lewis N.G. and Towers G.H.,** (1987) 5-Hydroxyferulic acid in *Zea mays* and *Hordeum vulgare* cell walls. *Phytochemistry* **26**: 1915–1916.
- Ohashi-Ito K., Demura, T. and Fukuda, H.** (2002). Promotion of transcript accumulation of novel *Zinnia* immature xylem-specific HD-Zip III homeobox genes by brassinosteroids. *Plant Cell Physiol.* **43**:1146–1153.

- Okano, M., Xie, S., and Li, E.** (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 2536-2540.
- Olson, P.D. & Varner, J.E.** (1993). Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* **4**, 887-892.
- O'Malley D., Porter S. and Sederoff R.** (1992), Purification, characterization, and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol* **98**: 1364–1371.
- O'Neill, M. A., Albersheim, P. and Darvill, A.** (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Methods in plant biochemistry, Dey P. M. (eds), London, pp: 415-441.
- Oppenheimer, D. G., Herman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J. & Marks, M. D.** (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell*, **67** : 483-493.
- Ording E., Bergholtz S., Brendeford E.M., Jamin N. and Gabrielsen O.S.** (1996) Flexibility in the second half-site sequence recognised by the c-Myb R2 domain--in vitro and in vivo analysis. *Oncogene*. **13(5)**:1043-51.
- Ornston, L.N., Balows, A. and Baumann, P.** (1987) Annual review of microbiology. *Annual review of microbiology*. **41**: 465-505.
- Overvoordea P.J., Okushimaa Y., Alonsob J.M., Chana A., Changa C., Eckerb J.R., Beth Hughesa, Liua A., Onoderaa C., Quacha H., Smitha A., Yua G. and Theologisa A.** (2005) Functional Genomic Analysis of the *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* Gene Family Members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**:3282-3300
- Pakusch, A.E., Kneusel, R.E., and Matern, U.** (1989). S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 488–494.
- Pakusch, A. and Matern, U.** (1991). Kinetic characterization of caffeoyl-coenzyme A-specific-3-O-methyltransferase from elicited parsley cell suspensions. *Plant Physiol*, **96**: 327-330.
- Pakusch, A., Matern, U. and Schiltz, E.** (1991). Elicitor-inducible caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from *Petroselinum crispum* cell suspensions. *Plant Physiol*, **95**: 137-143.
- Pandey, D.,** (1997) Hardwood plantations in the tropics and subtropics: tropical forest plantation areas 1995, Report to the FAO Project GCP/INT/628/UK, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, Surman C, Newman LJ, Smith C, Bevan MW, Mansfield S, Whetten RW, Sederoff RR, Campbell MM.** (2003a). Characterisation of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J* **36**: 743–754.
- Patzlaff A, Newman LJ, Dubos C, Whetten RW, Smith C, McInnis S, Bevan MW, Sederoff RR, Campbell MM.** (2003b). Characterisation of PtMYB1, an R2R3-MYB from pine xylem. *Plant Mol Biol* **53**: 597–608.
- Paz-Ares J, Wienand U, Peterson PA, Saedler H** (1986) Molecular cloning of the c1 locus of *Zea mays*: a locus regulating the anthocyanin pathway. *EMBO J*, **5**:829-834.
- Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B and Legrand M.** (1994) Phenylalanine Ammonia-lyase in Tobacco. Molecular Cloning and Gene Expression during the hypersensitive Reaction to Tobacco Mosaic Virus and the Response to a Fungal Elicitor. *Plant Physiol*

106: 877-886.

- Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C. and Bevan, M.W.** (2001) MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell*, **13**, 2777-2791.
- Pesquet E., Jauneau A., Digonnet C., Boudet A.-M., Pichon M. and Goffner D.** (2003) *Zinnia elegans*: the missing link from in vitro tracheary elements to xylem. *Physiol. Plant.* (2003) **119**, 463-468.
- Petersen M. and Alfermann A.W.** (2001): The Production of Cytotoxic Lignans by Plant Cell Cultures. *App Microbiol and Biotech* **55**: 135-142
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A. M. and Grima-Pettenati, J.** (1998). Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant Mol Biol*, **38** (4): 671-676.
- Pinçon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J. P., Boudet, A. M. and Legrand, M.** (2001). Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyltransferase I and cinnamoyl-coenzyme a reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiol*, **126** (1): 145-155.
- Piquemal J., Lapierre C., Myton K., O'Connell A., Schuch W., Grima-Pettenati J. and Boudet, A.M.**, 1998. Down-regulation of cinnamoylcoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J.* **13**: 71-83.
- Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C. E. and O'Malley, D.** (1995). Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity*, **74**: 661-668.
- Plomion, C., Leprovost, G. and Stokes, A.** (2001) Wood Formation in Trees. *Plant Physiol.*, **127**, 1513-1523.
- Poke F., Vaillancourt R.V., Elliott R.C, and Reid J.B.** (2003) Sequence variation in two lignin biosynthesis genes, cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD2). *Molecular Breeding* **12**: 107-118, 2003.
- Pufky J, Qiu Y, Rao MV, Hurban P & Jones AM** (2003) The auxin-induced transcriptome for etiolated *Arabidopsis* seedlings using a structure/function approach. *Funct Integr Genomics*. 3: 135-143. Epub 2003 Nov 2026.
- Puthoff DP, Nettleton D, Rodermeil SR & Baum TJ** (2003) *Arabidopsis* gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J.* **33**: 911-921.
- Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Soer E, de Vetten N, Mol J and Koes R** (1999) Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell*, **11**:1433-1444.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., de Forchetti, S.M., Tigier, H. & Valpuesta, V.** (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* **122**, 1119-27.
- Rabinowicz P, Braun E, Wolfe A, Bowen B, Grotewold E** (1999) Maize R2R3 Myb genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* **153**:427-444.
- Raes J., Rohde A., Christensen J. H., Van de Peer Y., and Boerjan W.** (2003) Genome-

- Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **133**: 1051–1071.
- Ralph, J., MacKay, J. J., Hatfield, R. D., O'Malley, D. M., Whetten, R. W. and Sederoff, R. R. (1997). Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. *Science*, **277** (5323): 235-239.
- Ralph, J., Hatfield, R. D., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C., & Boudet, A. M. (1998). NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamylalcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12803-12808
- Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J. M., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R. D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M. R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R. R., O'Malley, D. M., Scott, J. T., MacKay, J. J., Yahiaoui, N., Boudet, A., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L. and Boerjan, W. (2001). Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochem*, **57** (6): 993-1003.
- Ramsay, N.A. and Glover, B.J. (2005). MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. **10**, 63-70.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M. and Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *Eur J Biochem*, **259** (1-2): 485-495.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M. and Goffner, D. (2001). Laccase down-regulation causes alterations in phénolique métabolisme and cell wall structure in poplar. *Soumis*.
- Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M. and Goffner, D. (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol*, **129** (1): 145-155.
- Reed, J.W. (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. **6**, 420-425.
- Reinhammar B. & Malström B.G. (1981). "Blue" copper-containing oxidases. In : *Copper Proteins Metal Ions in Biology* (ed T.G. Spiro), pp. 109-149, New-York.
- Rensink, W.A. and Buell, C.R. (2005). Microarray expression profiling resources for plant genomics. **10**, 603-609.
- Richardson, A., Duncan, J. & McDougall, G. J. (2000). Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. *Tree Physiol* **20**, 1039-47.
- Riechman, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. & Yu, C.L. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290** : 2105-2110.
- Ringli C., Keller B. and Ryser U. (2001) Glycine-rich proteins as structural components of plant cell wall. *Cell Mol Life Sci*. **58(10)** : 1430-1441.
- Ro DK, Mah N, Ellis BE, and Douglas CJ, (2001) Functiona characterization and subcellular localization of poplar (populus trichcarpax populus deltoides) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant physiol.*, **126**: 317-329.

- Roberts L.W., Gahan P.B. and Aloni R.** (1988). *Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators*. Berlin: Springer-Verlag. 154 pp.
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., and Wolffe, A.P.** (2000). DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338-342.
- Rogers L. and Campbell M.** (2004) The genetic control of lignin deposition during plant growth and development *New Phytologist*. **164**: 17–30
- Roland, J. C.** (1980). Ultrastructure et texture des polysaccharides dans la paroi des cellules végétales. In: Les Polymères Végétaux, Monties B. (eds), Paris, pp: 46-65.
- Romero I, Fuertes A, Benito MJ, Malpical JM, Leyva A, Paz-Ares J** (1998) More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14** : 273-284. 454.
- Rosinski JA, and Atchley WR** (1998) Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J Mol Evol* **46**:74-83.
- Ruan Y, Gilmore J & Conner T** (1998) Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J*. **15**: 821-833.
- Runge, F. E.** (1834). Über einige produkte der steinkohlendestillation. *J Prakt Chem*, **1**: 24-32.
- Ruelland, E., Campalans, A., Selmán-Housein, G., Puigdomenech, P. and Rigau, J.** (2003). Cellular and subcellular localization of the lignin biosynthetic enzymes caffeic acid-*O*-methyltransferase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-coenzyme A reductase in two monocots, sugarcane and maize. *Physiol Plant*, **117** (1): 93-99.
- Rushton, J.J. & Ness, S.A.** (2001). The conserved DNA binding domain mediates similar regulatory interactions for A-Myb, B-Myb, and c-Myb transcription factors. *Blood Cells, Molec. and Diseases* **27** : 459-463.
- Ryser G., Schorderet M., Zhao G.F., Studer D., Ruel K., Hauf G. and Keller B.** (1997) Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J.*, **12**: 97-111.
- Sablowski RW, Moyano E, Culianez-Macia FA, Schuch W, Martin C, Bevan M.** (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J* **13**: 128–137.
- Salisbury, F.B., and Ross, C.W.,** (1992) *Plant Physiology and Plant Cells*. In *Plant Physiology*, Wadsworth, Inc., Belmont, CA, pp. 3-26.
- Saka, S. and Goring, D.A.I.** (1983). The distribution of organic constituents in black spruce wood as determined by TEM-EDXA. *Mokuza Gakkaishi*, **29**(10): 648-656.
- Sakurai N.** (1998) Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *J. plant Res.*, **111** :133-148.
- Samson, F., Brunaud, V., Duchene, S., De Oliveira, Y., Caboche, M., Lecharny, A. and Aubourg, S.** (2004). FLAGdb++: a database for the functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Nucl. Acids Res.*, **32**, D347-350.
- Samuels, A.L., Rensing, K.H., Douglas, C.J., Mansfield, S.D., Dharmawardhana, D.P. and Ellis, B.E.** (2002) Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* **216**: 72–82.

- Sarkanen K.V. and Ludwic C.H.** (1971) Lignin: Occurrences, Formation, Structure and Reactions New York, Wiley Interscience, 916.
- Sarni, F., Grand, C. and Boudet, A. M.** (1984). Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). *Eur J Biochem*, **139**: 259-265.
- Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R. & Whetten, R.** (2001b) Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant res.* **114**, 147-155.
- Sawbridge T, Ong E-K, Binnion C, Emmerling M, Meath K, Nunan K, O'Neill M, O'Toole F, Simmonds J & Wearne K** (2003) Generation and analysis of expressed sequence tags in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science*. 165: 1077-1087.
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G** (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**:1219-1229.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. & Wisman, E.** (2001). Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13** : 113-123.
- Schmitt D., Pakusch A.-E. and Matern U.,** (1991) Molecular cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *The J Biol Chem* **266**, 17416–17423.
- Schrader, J., Nilsson, J., Mellerowicz, E., Berglund, A., Nilsson, P., Hertzberg, M. and Sandberg, G.** (2004). A High-Resolution Transcript Profile across the Wood-Forming Meristem of Poplar Identifies Potential Regulators of Cambial Stem Cell Identity. *Plant Cell*, **16**, 2278-2292.
- Schultz CJ, Gilson P, Oxley D, Youl JJ, Bacic A** (1998) GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci* **3**: 426–431.
- Schultz CJ, Rumsewicz MP, Johnson KL, Jones BJ, Gaspar YM, Bacic A** (2002) Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan-protein gene family as a test case. *Plant Physiol* **129**: 1448–1463.
- Schwartz, P.B.; Youngs, V.L. and Shelton, D.R.** (1989) Isolation and characterisation of lignin from hard red spring wheat bran. *Cereal Chemistry*. **66** (4): 289-295.
- Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y & al.** (2002a) Functional annotation of a full-length *Arabidopsis* cDNA collection. *Science*. 296: 141-145.
- Seki M, Satou M, Sakurai T & Shinozaki K** (2002b) RIKEN *Arabidopsis* full-length cDNA database. *Trends Plant Sci*. 7: 562-563.
- Seo, H.S., Yang, J.-Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. and Chua, N.-H.** (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, **423**, 995999.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. J. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. and Dixon, R. A.** (1997). Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol*, **115**: 41-50.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Koizumi M** (1992). Nucleotide sequence of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a myb homologue. *Plant Mol Biol* **19**:493-499.

- Showalter, A. M.** (1993). Structure and function of plant cell wall protein. *Plant Cell*, **5**: 5-23.
- Showalter, A. M.** (2001). Introduction: plant cell wall proteins. *Cell Mol Life Sci*, **587**: 1361-1362.
- Sibout R., Eudes A., Pollet B., Goujon T., Mila I., Granier F., Séguin A., Lapierre C. and Jouanin L.**, (2003) Expression Pattern of Two Paralogs Encoding Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases in Arabidopsis. Isolation and Characterization of the Corresponding Mutants. *Plant Physiol.*, **132**: 848-860
- Simola, L.K., Lemmetyinen, J. and Santanen, A.** (1992) Lignin release and photomicrographie in suspension cultures of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* **84**: 874-379.
- Sivadon, P. and Grima-Pettenati, J.** (2004) Transcription control of genes involved in lignin biosynthesis. *plantation Forest Biotechnology*, pp 203-218.
- Smith, C.J.S., Watson, C.F., Ray, J., Bird, C.R., Morris, P.C., Schuch, W. and Grierson, D.** (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*. **334** : 724-726.
- Solano, R., Nieto, C., Paz-Ares, J.** (1995) MYB.Ph3 transcription factor from *Petunia hybrida* induces similar DNA-bending/distortions on its two types of binding site. *Plant J.*, **8**, 673-682.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M., and Koes, R.** (2000). anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-1631.
- Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, George R, Guarin H, Kronmiller B, Pacleb J, Park S, Wan K, Rubin GM & Celniker SE** (2002a) A *Drosophila* full-length cDNA resource. *Genome Biol.* **3**: research0080.0081-0080.0088.
- Stapleton M, Liao G, Brokstein P, Hong L, Carninci P, Shiraki T, Hayashizaki Y, Champe M, Pacleb J, Wan K, Yu C, Carlson J, George R, Celniker S & Rubin GM** (2002b) The *Drosophila* gene collection: identification of putative full-length cDNAs for 70% of *D. melanogaster* genes. *Genome Res.* **12**: 1294-1300.
- Steeves, V., Forster, H., Pommer, U. and Savidge, R.** (2001) Coniferyl alcohol metabolism in conifers—I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. *Phytochemistry* **57**: 1085-1093.
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K. and Saedler, H.** (2003) Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J.* **34**, 519528.
- Sterjiades, R., Dean, J. F. D., gamble, G., Himmelsbach, D. S. & Eriksson, K. E. L.** (1993) Extracellular laccases and peroxidases from sycamore map (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. Reactions with monolignols and lignin compounds. *Planta* **201**, 75-87.
- Sterky F., Regan S., Karlsson J., Hertzberg M., Rohde A., Holmberg A., Amini B., Bhalerao R., Larsson M., Villaroel R. et al.** (1998) : Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:13330-13335.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**: 447-456.

- Sugimoto, K., Takeda, S. & Hirochika, H.** (2000). MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell* **12** : 2511-2527.
- Szyjanowicz, P.M.J., McKinnon, I., Taylor, N.G., Gardiner, J., Jarvis, M.C. and Turner, S.R.** (2004). The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrgan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **37**, 730-740.
- Tabuchi A., Mori H., Kamisaka S. and Hoson T.** (2001) A new type of endo-xyloglucan transferase devoted to xyloglucan hydrolysis in the cell wall of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol.* **42(2)** : 154-161.
- Tamagnone L., Merida A., Parr A., Mackay S., Cullianez-Macia F.A., Roberts K., and Martin C.** (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco. *Plant Cell*, **10**:135-154.
- Tan, S., Hunziker, Y., Sargent, D. F., and Richmond, T. J.** (1996). Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Natur* **381**: 127-51.
- Tang, L.Y., Reddy, M.N., Rasheva, V., Lee, T.L., Lin, M.J., Hung, M.S., and Shen, C.K.** (2003). The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. *J Biol Chem* **278**: 33613-33616.
- Taylor, N.G., Howells, R.M., Huttly, A.K., Vickers, K., and Turner, S.R.** (2003). Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 1450–1455.
- Taylor, N.G., Laurie, S., and Turner, S.R.** (2000). Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2529–2539.
- Taylor NG, Scheible WR, Cutler S, Somerville CR, Turner SR** (1999) The *irregular xylem 3* locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase gene required for secondary cell wall synthesis. *Plant Cell* **11**: 769–780.
- Tepfer M & Taylor IEP** (1981) The permeability of plant cell walls as measured by gel filtration chromatography. *Science* **213**: 761-763 34
- Terashima, N., Fukushima, K., Tsuchiya, S. and Takabe, K.** (1986) Heterogeneity in formation of lignin. VI. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *J. Wood Chem. Technol.* **6**: 495–504.
- Teutonico, R.A., Dudley, M.W., Orr, J.D., Lynn, D.G., and Binns, A.N.** (1991) Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **97**:288-297.
- Thareau, V., Dehais, P., Serizet, C., Hilson, P., Rouze, P. and Aubourg, S.** (2003). Automatic design of gene-specific sequence tags for genome-wide functional studies. *Bioinformatics*, **19**, 2191-2198.
- Theander, O., and Aman, P.,** (1984) Anatomical and Chemical Characteristics. In *Straw and Other Fibrous By-Products as Feed* (Sundstol, F., and Owen, E., Eds.), Elsevier, Amsterdam, Holland, pp. 45-78.
- Thilmony R., William Underwood W., and Yang He S.Y.** (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* **46** : 34

- Tierney ML, Wiechert J, Pluymers D** (1988) Analysis of the expression of extensin and p33-related cell wall proteins in carrot and soybean. *Mol Gen Genet* **211**: 393-399
- Tiimonen H., Aronen T., Laakso T., Saranpää P., Chiang V., Ylioja T., Roininen H. and Häggman H.** (2005). Does lignin modification affect feeding preference or growth performance of insect herbivores in transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth)? *Planta*, **222** (4): 699-708.
- Timell, T.E.** (1964) wood hemicellulose: Part one. advanced in carbohydrate chemistry and biochemistry. **19**: 247-302.
- Timmermans MCP, Hudson A, Becraft PW, Nelson T** (1999) Rough sheath2: a Myb protein that represses knox homeobox genes in maize lateral organ primordia. *Science*, **284**:151-153.
- Tiré C., De Rycke R., De Loose M., Inzé D., Van Montagu M. and Engler G.** (1994) Extension gene expression is induced by mechanical stimuli leading to local cell wall strengthening in *Nicotiana plumbaginacée*. *Planta* **195** : 175-181.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H. and Simon, P.** (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **288** (1-2): 129-138.
- Tokunaga, N. Sakakibara, N. Umezawa, T. Ito, Y. Fukuda, H. and Sato Y.** (2005) Involvement of Extracellular Dilignols in Lignification During Tracheary Element Differentiation of Isolated Zinnia Mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol.* **46**(1): 224–232
- Tsiantis M, Schneeberger R, Golz JF, Freeling M, Langdale JA** (1999) The Maize *rough sheath2* gene and leaf development programs in monocot and dicot plants. *Science*, **284**:154-156.
- Turner S.R. and Hall M.** (2000). The gapped xylem mutant identifies a common regulatory step in secondary cell wall deposition. *Plant J.* **24**:477–488.
- Uhlmann A, Ebel J** (1993) Molecular cloning and expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack. *Plant Physiol* **102**: 1147–1156.
- Ulm R, Baumann A, Oravec A, Mate Z, Adam E, Oakeley EJ, Schafer E & Nagy F** (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 1397-1402.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.-L., Triantaphylides, C. and Roby, D.** (2002) A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1017910184.
- Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M. T., Petitconil, M., Leple, J. C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Vanmontagu, M., Inze, D., Boerjan, W. and Jouanin, L.** (1995). A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J*, **8** (6): 855-864.
- Varner J.L and Lin, L.S.** (1989) Plant cell wall architecture. *Cell*, **56**: 231-239.
- Velculescu VE, Vogelstein B & Kinzler KW** (2000) Analysing uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet.* **16**: 423-425.

- Vignols, F., Rigau, J., Torres, M. A., Capellades, M. and Puigdomènech, P.** (1995). The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid *O*-methyltransferase. *Plant Cell*, **7**: 407-416.
- Vignols, F., Jse-Estanyol M., Caparros-Ruiz D., Rigau J. and Puigdomenech P.,** (1999) Involvement of a maize prolin-rich protéine in secondary cell wall formation as deduced from its spécifique mRNA localization. *Plant Mol. Biol.*, **39(5)** : 945-952.
- Vogt T & Jones P.** (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* **5(9)**:380-6.
- Voo KS, Whetton RW, O'Malley DM, Sederoff RR** (1995) 4-Coumarate:coenzyme A ligase from loblolly pine xylem. *Plant Physiol* **108**: 85-97
- Waites R, Selvadurai HRN, Oliver IR and Hudson A** (1998) The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell*, **93**:779-789.
- Walter, M.H.** (1992) Regulation of lignification in defence. In. Boller, T.A.M.,F. (ed.), *Plant Gene Research. Gene Involved in Plant Defence*. Springer, Vienna, 327-352.
- Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS, Tobin EM** (1997) A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis Lhcb* gene. *Plant Cell* **9**:491-507.
- Wang SM & Rowley JD** (1998) A strategy for genome-wide gene analysis: integrated procedure for gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 11909-11914.
- Wang Z, Taramino G, Yang D, Liu G, Tingey SV, Miao GH & Wang GL** (2001) Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Mol Genet Genomics.* **265**: 302-310.
- Weisner, J.** (1878). Das verhalten des phloroglucins und einiger verwandter körper zur verholzten zellmembran. *Sitzber Akad Wiss Wien Abt I*, **77**: 60-66.
- Wengenmayer, H., Ebel, J. and Grisebach, H.** (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors: purification and properties of cinnamoyl-CoA : NADPH reductase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *Eur J Biochem*, **65**: 529-536.
- West, M.A.L., van Leeuwen, H., Kozik, A., Kliebenstein, D.J., Doerge, R.W., St. Clair, D.A. and Michelmore, R.W.** (2006). High-density haplotyping with microarray-based expression and single feature polymorphism markers in *Arabidopsis*. *Genome Res.*, **16**, 787-795.
- Weston, K.** (1998). Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:76-81
- Whetten, R. and Sederoff, R.** (1995). Lignin biosynthesis. *Plant Cell*, **7 (7)**: 1001-1013.
- Whetten R, MacKay JJ, Sederoff RR** (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 585-609
- Whetten, R., Sun, Y.H., Zhang, Y. and Sederoff, R.** (2001). Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. **47**, 275-291.
- Whitham SA, Quan S, Chang HS, Cooper B, Estes B, Zhu T, Wang X & Hou YM** (2003) Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* **33**: 271-283.

- Williams C.E. and Grotewold E.** (1997) Differences between Plant and Animal Myb Domains Are Fundamental for DNA Binding Activity, and Chimeric Myb Domains Have Novel DNA Binding Specificities. *J Biol Chem* **272(1)(3)**: 563–571
- Wu J, Maehara T, Shimokawa T, Yamamoto S, Harada C, Takazaki Y, Ono N, Mukai Y, Koike K, Yazaki J, Fujii F, Shomura A, Ando T, Kono I, Waki K, Yamamoto K, Yano M, Matsumoto T & Sasaki T** (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. *Plant Cell*. **14**: 525- 535.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J. and Speed, T.P.** (2002) .Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucl. Acids Res.*, **30**, e15-.
- Yang, C. Xu, Z. Song, J. Conner, K. Vizcay Barrena, G. and Wilson Z. A.** (2007). Arabidopsis MYB26/MALE STERILE35 Regulates Secondary Thickening in the Endothecium and Is Essential for Anther Dehiscence. *Plant Cell*, **19(2)**: 534 - 548.
- Yang, Y.H. and Speed, T.** (2002). DESIGN ISSUES FOR CDNA MICROARRAY EXPERIMENTS. **3**, 579-588.
- Yahiaoui, N., Marque, C., Myton, K. E., Negrel, J. and Boudet, A. M.** (1998). Impact of different levels of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. *Planta*, **204**: 8-15.
- Ye, Z. H.** (1997). Association of caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiol*, **115 (4)**: 1341-1350.
- Ye Z-H, Freshour G, Hahn MG, Burk DH, Zhong R** (2002) Vascular development in *Arabidopsis*. *Int Rev Cytol* **220**:225–256.
- Ye, Z.H., Kneusel, R.E., Matern, U., and Varner, J.E.** (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* **6**, 1427–1439.
- Zablackis E., York W.S., Pauly M., Hantus S., Reiter WD., Cappelle C.C.S., Albersheim P. & Darvill A.** (1996). Substitution of *L*-fucose by *L*-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. *Science* **272**:1804–1810
- Zhong R., Morrison W.H., Negrel J. and Ye Z.-H.,** (1998) Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **10**, 2033–2045.
- Zhong R., Morrison, W.H. Himmelsbach, D.S., Poole F.L., and Ye Z.-H.,** (2000) Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol* **124**: 563–577.
- Zimmermann, M.H. and Brown C.L.** (1971) Trees: structure and function. Springer-Verlag. New York, pp 169-220.
- Zobel B.J. and Van Buijtenen J.P.** (1989) Wood Variation. Its Causes and Control. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Zhang X-H. and Chiang V.L.** (1997) Molecular cloning of 4-coumarate: coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol* **113**: 65–74.
- Zhao, C., Craig, J.C., Petzold, H.E., Dickerman, A.W. and Beers, E.P.** (2005). The Xylem and Phloem Transcriptomes from Secondary Tissues of the Arabidopsis Root-Hypocotyl. *Plant Physiol.*, **138**, 803-818.

- Zhong, R. Demura, T. and Ye Z.-H.** (2006). SND1, a NAC Domain Transcription Factor, Is a Key Regulator of Secondary Wall Synthesis in Fibers of Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(11): 3158 - 3170.
- Zhu T, Budworth P, Han B, Brown D, Chang HS, Zou GZ & Wang X** (2001) Toward elucidating the global gene expression patterns of developing *Arabidopsis*: Parallel analysis of 8 300 genes by a high-density oligonucleotide probe array. *Plant Physiol Biochem.* 39: 221-242.
- Zou J. and Taylor D.C.** , (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA homologous to parsley (*Petroselinum crispum*) S-adenosyl--methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *Plant Physiol Biochem* 32: 423–427.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des tampons

TAE1X	Tris base	48.4g/l
	EDTA 0.5M pH 8	20ml/l
	Acide acétique	11.42ml/l
TBE1X	Tris base	10.8g/l
	EDTA 0.5M pH 8	4ml/l
	Acide borique	5.5g/l
SSC20X	NaCl	3M
	Citrate de sodium	0.3M
SSPE10X	NaCl	3M
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.2M
	EDTA PH 7.4	20mM

Annexe 2 : Composition du gel d'électrophorèse

TAE	x 1
Agarose	X % (m/v)
BET	150 µg/µl

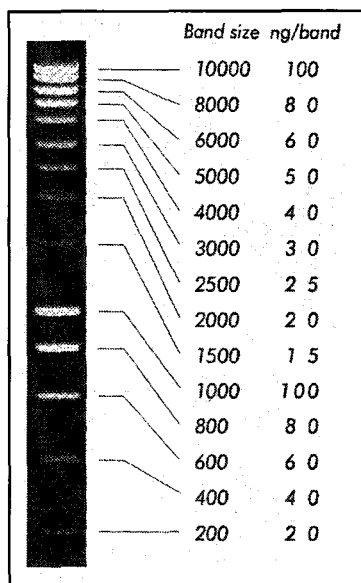
Annexe 3 : Composition du tampon TAE (x1)

Tris-acétate	40 mM
EDTA	1 mM
pH=7,8	

Annexe 4 : Composition du tampon de charge ADN

Bleu de bromophénol	0,25 %
Xylène cyanol	0,25 %
Glycérol	30 %

Annexe 5 : Marqueur de taille (Eurogentec, Smart Ladder 200 à 10000 pb)



Annexe 6 : Tampon MOPS 5x

MOPS	20 mM
Acétate de sodium	5 mM
EDTA	1 mM
Formaldéhyde 37%	3% (v/v)

Annexe 7 : Composition du tampon de charge ARN

Glycérol	50%
EDTA	1 mM
Bleu de bromophénol	0,4%

Annexe 8 : Tampon de fixation phosphate de sodium

Na ₂ HPO ₄	100 mM
NaHPO ₄	100 mM
pH=7,2	

Annexe 9 : Tampon d'incubation

Tampon phosphate de sodium	1M
EDTA	0.5M pH 8
Ferricyanure (K ₃ Fe (CN) ₆)	0.5 mM
Ferrocyanure (K ₄ Fe (CN) ₆)	0.5 mM
Triton X100	2%
X-GlucA (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)	1 mM, 50mg/ml DMF

Annexe 10 : Liste des 10 gènes dont l'expression est la plus fortement induite ou réprimée par *EgMYB1* ou *EgMYB2* dans les feuilles et les inflorescences des plantes transgéniques.

CATMA ID	Molecular fonction	Biological Process (GO)	Ratio (log ₂)
MYB1 Feuilles			
CATMA2A43580	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	5,08
CATMA1A61835	germin-like protein (GER1)	biological_process unknown	4,66
CATMA2A42670	expressed protein	biological_process unknown	4,42
CATMA2B42670	expressed protein	biological_process unknown	4,25
CATMA1A13910	expressed protein	biological_process unknown	4,19
CATMA3A44603	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	lipid transport	4,16
CATMA1A62540	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	No classification	4,10
CATMA2B42220	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	metabolism	4,02
CATMA1A28750	FAD-binding domain-containing protein	electron transport	3,92
CATMA2A03450	expressed protein	No classification	3,84
CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	lignin biosynthesis	-3,80
C160	ribosomal protein S11	No classification	-3,90
C161	ribosomal protein L36	No classification	-3,93
CATMA2A45620	ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)	N-terminal protein myristoylation	-3,96
CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	lignin biosynthesis	-3,96
CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	cell wall catabolism	-4,03
CATMA3A15760	ABC transporter family protein	amino acid transport	-4,06
CATMA4A35905	polyadenylate-binding protein 2 (PABP2)	translational initiation	-4,06
CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	-4,24
C162	ribosomal protein L36	No classification	-4,41
MYB1 Inflorescence			
CATMA3A38190	expressed protein	No classification	4,87
CATMA1A11930	high-affinity nitrate transporter, putative	inorganic anion transport	4,12
CATMA3A50260	beta-1,3-glucanase (BG3)	carbohydrate metabolism	4,11
CATMA1A40440	BURP domain-containing protein	No classification	4,11
CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	lignin biosynthesis	4,09
CATMA2A42030	glycoside hydrolase family 19 protein	cell wall catabolism	3,97
CATMA1A18560	expressed protein	N-terminal protein myristoylation	3,93
CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	3,76
CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	stem cell maintenance	3,75
CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	cell wall catabolism	3,64
CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	response to heat	-3,80
CATMA2A37175	phosphate transporter (PT2)	carbohydrate transport	-3,83
CATMA3A10458	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein	No classification	-3,86
CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	alkaloid biosynthesis	-3,93
CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	flavonoid biosynthesis	-3,99
CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	response to heat	-4,09
CATMA1A55360	thionin, putative	defense response	-4,15
CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	response to heat	-4,18
CATMA2A24530	heat shock transcription factor family protein	regulation of transcription, DNA-dependent	-4,19
CATMA2A44640	IQ domain-containing protein / BAG domain-containing protein	apoptosis	-4,70
MYB2 Feuilles			
CATMA1A62540	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	No classification	4,57
CATMA4A15020	germin-like protein (GLP9)	biological_process unknown	4,47
CATMA1A13910	expressed protein	biological_process unknown	4,45
CATMA2B42670	expressed protein	biological_process unknown	4,35
CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	aging	4,17

CATMA2B42220	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	metabolism	4,11
CATMA2A43580	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	4,01
CATMA2A42670	expressed protein	biological_process unknown	4,00
CATMA1A22190	Bet v I allergen family protein	No classification	3,96
CATMA3A01030	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	glycerol metabolism	3,93
CATMA3A38990	expansin family protein (EXPL3)	cell wall organization and biogenesis	-3,74
CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	lignin biosynthesis	-3,86
CATMA3A38190	expressed protein	No classification	-3,89
C162	ribosomal protein L36	No classification	-3,94
CATMA3A15760	ABC transporter family protein	amino acid transport	-3,97
C136	ribosomal protein S18	No classification	-3,99
CATMA3A43260	expressed protein	biological_process unknown	-4,00
CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	stem cell maintenance	-4,17
C232	-	No classification	-4,30
CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	-5,15
MYB2 Inflorescence			
CATMA2A23830	F-box family protein (FBL6)	ubiquitin-dependent protein catabolism	5,00
CATMA1A40440	BURP domain-containing protein	No classification	4,94
CATMA3A38190	expressed protein	No classification	4,65
C136	ribosomal protein S18	No classification	4,63
CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	4,60
C153	cytochrome b6	No classification	4,48
C052	photosystem II protein M	No classification	4,47
C126	cytochrome b559 alpha chain	No classification	4,45
CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	cell wall catabolism	4,32
C245	NADH dehydrogenase subunit 1	No classification	4,30
CATMA2A43970	cytochrome P450 76C2, putative (CYP76C2) (YLS6)	electron transport	-3,67
CATMA2B42220	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	metabolism	-3,88
CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	flavonoid biosynthesis	-3,93
CATMA3A02980	glycosyl hydrolase family 17 protein	No classification	-4,00
CATMA2A41920	trypsin inhibitor, putative	defense response	-4,01
CATMA1A55360	thionin, putative	defense response	-4,34
CATMA4A15020	germin-like protein (GLP9)	biological_process unknown	-4,40
CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	alkaloid biosynthesis	-4,43
CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	response to best/pathogen/parasite	-4,62
CATMA1A62540	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	No classification	-4,81

Annexe 11 : Liste des processus contenant les gènes cibles « probables » du facteur *EgMYB1* dans les feuilles ou les hampes florales.

	Pourcentage (%)						Pourcentage (%)					
	Nb total gènes	Nb gènes impliqués	Log2 > 0	Log2 > 1	Log2 > 2		Nb total gènes	Nb gènes impliqués	Log2 > 0	Log2 > 1	Log2 > 2	
BioProc probable						BioProc probable						
MYB1 Inflorescences						MYB1 Feuilles						
1 abscisic acid biosynthesis	13	5	38	8	8							
						adenine salvage	1	2	2	100	100	50
2 aging	38	17	45	24	8	aging	2	38	13	34	26	8
3 alkaloid biosynthesis	12	6	50	33	17	alkaloid biosynthesis	3	12	5	42	33	17
						anaerobic respiration	4	9	4	44	11	11
4 anthocyanin biosynthesis	9	3	33	11	11							
						aromatic amino acid family biosynthesis, shikimate pathway	5	13	5	38	15	8
						ATP biosynthesis	6	15	5	33	13	7
						autophagy	7	16	7	44	31	6
5 auxin mediated signaling	8	2	25	25	13	auxin mediated signaling	8	8	3	38	25	13
6 boron transport	2	2	100	100	50	boron transport	9	2	2	100	50	0
						carbon utilization	10	4	2	50	25	25
7 carbohydrate transport	67	22	33	19	9	carbohydrate transport	11	67	22	33	15	1
8 cell elongation	20	4	20	10	10	cell elongation	12	20	6	30	30	10
9 cell wall catabolism	23	10	43	22	13	cell wall catabolism	13	23	8	35	26	9
10 cell wall modification during cell expansion	19	5	26	16	5	cell wall modification during cell expansion	14	19	7	37	21	5
						cell wall organization and biogenesis	15	3	3	100	100	33
11 cellulose biosynthesis	18	10	56	33	11	cellulose biosynthesis	16	18	11	61	28	11
12 chemotaxis	5	2	40	20	20							
						chloride transport	17	8	4	50	25	13
						chlorophyll biosynthesis	18	17	6	35	12	6
13 ciliary/flagellar motility	33	6	18	6	6							
14 de novo pyrimidine base biosynthesis	6	2	33	17	17							
						dTDP-rhamnose biosynthesis	19	4	2	50	25	25
						ethylene biosynthesis	20	17	2	12	12	6
						fatty acid beta-oxidation	21	9	4	44	33	22
15 flavonoid biosynthesis	31	12	39	29	16	flavonoid biosynthesis	22	31	12	39	23	6
16 flower development	15	7	47	13	7	flower development	23	15	4	27	13	13
						folic acid and derivative	24	7	1	14	14	14

						biosynthesis	25						
17	galactose metabolism	17	4	24	18	6	galactose metabolism	26	17	4	24	18	12
18	gibberellic acid catabolism	6	1	17	17	17							
19	gluconeogenesis	3	2	67	67	33							
20	glucosinolate biosynthesis	14	4	29	29	7	glucosinolate biosynthesis	27	14	4	29	29	14
21	glycerol biosynthesis	8	1	13	13	13	glycerol biosynthesis	28	8	2	25	13	13
22	glycerol metabolism	18	5	28	17	6							
							glycoprotein catabolism	29	4	1	25	25	25
23	inorganic anion transport	17	6	35	18	6							
24	iron ion homeostasis	11	3	27	27	9							
							jasmonic acid biosynthesis	30	8	5	63	25	13
							jasmonic acid mediated signaling pathway	31	1	1	100	100	100
25	lateral root morphogenesis	7	3	43	43	29	lateral root morphogenesis	32	7	2	29	29	29
26	lignin biosynthesis	46	14	30	15	9	lignin biosynthesis	33	46	20	43	26	15
27	lipid catabolism	8	1	13	13	13	lipid catabolism	34	8	2	25	25	13
							lipid storage	35	9	4	44	33	22
							lipid transport	36	72	18	25	17	8
							L-phenylalanine biosynthesis	37	6	2	33	33	17
							L-ser biosynthesis	38	10	2	20	20	10
							L-ser metabolism	39	5	2	40	20	20
							mercury ion transport	40	2	1	50	50	50
							methionine biosynthesis	41	4	2	50	50	25
							methionine metabolism	42	2	2	100	100	50
28	mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	5	2	40	20	20							
							mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	43	17	5	29	12	6
29	multidrug transport	29	8	28	17	7							
							N-acetylglucosamine metabolism	44	1	1	100	100	100
30	negative regulation of transcription	6	2	33	17	17	negative regulation of transcription	45	6	3	50	33	17
							neutral amino acid transport	46	2	2	100	50	50
31	nitrate assimilation	5	2	40	20	20	nitrate assimilation	47	5	2	40	20	20
							nucleotide-sugar metabolism	48	15	3	20	7	7
32	nucleotide-sugar transport	8	1	13	13	13	nucleotide-sugar transport	49	8	2	25	13	13
	nutrient uptake	1	1	100	100	100							
33	one-carbon compound metabolism	8	2	25	13	13	one-carbon compound metabolism	50	8	5	63	50	13
34	pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	18	18	18	pentacyclic triterpenoid biosynthesis	51	11	2	18	18	9
							peroxisome division	52	6	3	50	33	17

						phenylpropanoid biosynthesis 52	8	4	50	50	25
phenylpropanoid metabolism	17	6	35	12	6	phenylpropanoid metabolism 53	17	10	59	41	6
						phloem loading 54	1	1	100	100	100
						photosynthesis 55	21	11	52	33	10
physiological process	5	4	80	60	40						
polyamine biosynthesis	6	4	67	50	17						
positive gravitropism	3	2	67	67	67	positive gravitropism 56	3	3	100	67	67
						positive regulation of circadian rhythm 57	1	1	100	100	100
						primary cell wall biosynthesis 58	3	2	67	67	33
						proline catabolism 59	2	1	50	50	50
						regulation of translation 60	12	6	50	50	8
response to abscisic acid stimulus	17	7	41	29	12	response to abscisic acid stimulus 61	17	7	41	35	29
						response to auxin stimulus 62	75	19	25	16	8
response to cold	11	5	45	36	27	response to cold 63	11	2	18	18	9
response to dessication	5	2	40	40	20	response to dessication 64	5	4	80	40	20
response to ethylene stimulus	10	4	40	40	10	response to ethylene stimulus 65	10	6	60	30	20
						response to gibberellic acid stimulus 66	11	6	55	27	18
response to heat	28	11	39	36	32	response to heat 67	28	11	39	29	21
response to nitrate	6	3	50	17	17						
response to pest/pathogen/parasite	7	2	29	14	14	response to pest/pathogen/parasite 68	7	4	57	43	14
						response to stress 69	32	9	28	16	6
						response to water 70	7	3	43	43	14
						response to water deprivation 71	12	9	75	17	8
						response to wounding 72	15	8	53	33	13
S-adenosylmeth. biosynthesis	3	2	67	67	0	S-adenosylmeth. biosynthesis 73	3	3	100	100	100
						salinity response 74	11	3	27	18	9
						sodium ion transport 75	23	8	35	26	9
specification of carpel identity	1	1	100	100	100						
starch catabolism	3	2	67	33	33						
stem cell maintenance	2	1	50	50	50	stem cell maintenance 76	2	1	50	50	50
						sulfate reduction, APS pathway 77	1	1	100	100	100
						sulfate transport 78	11	3	27	9	9
sulfolipid biosynth	2	2	100	100	100						
						sulfur metabolism 79	9	1	11	11	11
						systemic acquired resistance 80	6	3	50	50	17
vitamin E metabolism	1	1	100	100	100						
						ubiquitin cycle 81	35	6	17	6	6
Total gènes	238					Total gènes	398				

Annexe 12 : Liste des processus contenant les gènes cibles « probables » du facteur *EgMYB2* dans les feuilles ou les hampes florales.

BioProc probable	Nb total gènes	Nb gènes impliqués	Pourcentage (%)			BioProc probable	Nb total gènes	Nb gènes impliqués	Pourcentage (%)		
			Log2 > 0	Log2 > 1	Log2 > 2				Log2 > 0	Log2 > 1	Log2 > 2
Myb 2 Inflorescences						Myb 2 Feuilles					
abscisic acid biosynthesis	13	4	31	15	8						
						acetyl-CoA biosynthesis from pyruvate	6	1	17	17	17
						adenine salvage	2	2	100	100	50
aging	38	17	45	21	8	aging	38	10	26	18	16
alkaloid biosynthesis	12	4	33	25	17	alkaloid biosynthesis	12	4	33	33	17
amino acid metabolism	44	8	18	9	5						
						aminobutyrate metabolism	5	3	60	20	20
anthocyanin biosynthesis	9	1	11	11	11	anthocyanin biosynthesis	9	3	33	33	11
						arginine catabolism to glutamate	1	1	100	100	100
						aromatic amino acid family metabolism	26	11	42	35	8
auxin mediated signaling	8	3	38	25	25	auxin mediated signaling	8	3	38	25	25
boron transport	2	2	100	100	100	boron transport	2	2	100	100	50
calcium ion transport	28	8	29	21	7						
cell elongation	20	8	40	20	5						
cell wall catabolism	23	9	39	22	9						
cell wall modification during cell expansion	19	3	16	16	5	cell wall modification during cell expansion	19	3	16	16	11
cell wall organization and biogenesis	3	2	67	67	33	cell wall organization and biogenesis	3	3	100	67	33
cellulose biosynthesis	18	13	72	44	17						
						chalcone biosynthesis	2	1	50	50	50
circadian rhythm	14	6	43	43	7						
cysteine biosynthesis	7	2	29	29	14						
development	11 6	26	22	14	5						
fatty acid elongation	7	2	29	29	14						
flavonoid biosynthesis	31	8	26	19	10	flavonoid biosynthesis	31	9	29	19	10
flower development	15	4	27	20	7	flower development	15	2	13	13	13
folic acid and derivative biosynthesis	7	1	14	14	14						
galactose metabolism	17	5	29	12	12	galactose metabolism	17	4	24	18	6

glucosinolate biosynthesis	14	3	21	21	7						
glycerol biosynthesis	8	2	25	13	13						
						glycerol metabolism	18	4	22	11	6
						glycine catabolism	4	1	25	25	25
						glycoprotein catabolism	4	1	25	25	25
growth	6	1	17	17	17						
hyperosmotic salinity response	15	7	47	27	13	hyperosmotic salinity response	15	8	53	20	7
						inorganic anion transport	17	3	18	18	6
ion transport	22	8	36	9	5	ion transport	22	3	14	5	5
iron ion homeostasis	11	3	27	27	9						
lateral root morphogenesis	7	3	43	43	14	lateral root morphogenesis	7	3	43	43	29
lignin biosynthesis	46	18	39	26	13	lignin biosynthesis	46	11	24	17	7
lipid catabolism	8	2	25	13	13						
						lipid metabolism	62	14	23	13	5
lipid storage	9	2	22	22	11						
lipid transport	72	15	21	17	8	lipid transport	72	16	22	18	10
						L-serine metabolism	5	2	40	40	20
methionine metabolism	2	2	100	100	50	methionine metabolism	2	2	100	100	50
microsporogenesis	11	2	18	9	9	microsporogenesis	11	2	18	9	9
						N-acetylglucosamine metabolism	1	1	100	100	100
						negative regulation of flower development	14	2	14	14	7
negative regulation of transcription	6	4	67	33	17						
nitrate assimilation	5	3	60	60	40	nitrate assimilation	5	3	60	40	20
nonselective vesicle docking	21	5	24	14	10						
nucleotide-sugar transport	8	1	13	13	13	nucleotide-sugar transport	8	1	13	13	13
nutrient uptake	1	1	100	100	100	nutrient uptake	1	1	100	100	100
oligopeptide transport	61	18	30	15	5	oligopeptide transport	61	16	26	20	10
						one-carbon compound metabolism	8	4	50	50	13
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	18	18	9	pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	18	18	9
phenylpropanoid biosynthesis	8	4	50	38	13						
phenylpropanoid metabolism	17	5	29	24	6	phenylpropanoid metabolism	17	8	47	35	6
phosphorylation	6	1	17	17	17						
polyamine biosynthesis	6	3	50	50	17						
positive gravitropism	3	1	33	33	33	positive gravitropism	3	2	67	67	67
positive regulation of circadian rhythm	1	1	100	100	100						
						positive regulation of transcription	9	3	33	22	11
primary cell wall biosynthesis	3	2	67	33	33						
						proline catabolism	2	1	50	50	50

regulation of translation	12	5	42	42	8						
response to abscisic acid stimulus	17	5	29	29	12	response to abscisic acid stimulus	17	4	24	18	6
						response to auxin stimulus	75	16	21	13	5
response to cold	11	6	55	45	27	response to cold	11	5	45	36	18
						response to dessication	5	2	40	40	20
response to ethylene stimulus	10	3	30	30	20						
response to gibberellic acid stimulus	11	3	27	18	9						
response to heat	28	9	32	18	7	response to heat	28	10	36	18	7
response to pest/pathogen/parasite	7	2	29	14	14	response to pest/pathogen/parasite	7	1	14	14	14
response to wounding	15	7	47	40	7	response to wounding	15	7	47	33	7
S-adenosylmeth. biosynthesis	3	3	100	100	67	S-adenosylmeth. biosynthesis	3	3	100	100	67
salicylic acid biosynthesis	5	2	40	40	20						
stem cell maintenance	2	1	50	50	50	stem cell maintenance	2	1	50	50	50
sulfate transport	11	2	18	9	9						
						sulfolipid biosynthesis	2	2	100	100	50
sulfur metabolism	9	1	11	11	11	sulfur metabolism	9	2	22	11	11
						type II protein secretion system	2	1	50	50	50
						vitamin B2 biosynthesis	10	2	20	20	10
						vitamin E metabolism	1	1	100	100	100
total		304				Total		233			

Annexe 13 : Liste des processus contenant les gènes cibles « probables » communs aux feuilles et aux inflorescences des plantes *EgMYB1* ou *EgMYB2*.

MYB1 BioProc probable	Nb total gènes	Nb gènes impliqués	
		Inflorescence	Feuilles
aging	38	17	13
alkaloid biosynthesis	12	6	5
Auxin mediated signaling	8	2	3
Boron transport	2	2	2
carbohydrate transport	67	22	22
cell elongation	20	4	6
cell wall catabolism	23	10	8
cell wall modification during cell expansion	19	5	7
cellulose biosynthesis	18	10	11
flavonoid biosynthesis	31	12	12
flower development	15	7	4
galactose metabolism	17	4	4
glucosinolate biosynthesis	14	4	4
glycerol biosynthesis	8	1	2
lateral root morphogenesis	7	3	2
lignin biosynthesis	46	14	20
Lipid catabolism	8	1	2
negative regulation of transcription	6	2	3
nitrate assimilation	5	2	2
nucleotide-sugar transport	8	1	2
One-carbon compound metabolism	8	2	5
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	2
phenylpropanoid metabolism	17	6	10
positive gravitropism	3	2	3
response to abscisic acid stimulus	17	7	7
response to cold	11	5	2
response to dessication	5	2	4
response to ethylene stimulus	10	4	6
response to heat	28	11	11
response to pest/pathogen/parasite	7	2	4
S-adenosylmeth. biosynthesis	3	2	3

MYB2 BioProc probable	Nb total gènes	Nb gènes impliqués	
		Inflorescence	Feuilles
aging	38	17	10
alkaloid biosynthesis	12	4	4
anthocyanin biosynthesis	9	1	3
auxin mediated signaling	8	3	3
boron transport	2	2	2
cell wall modification during cell expansion	19	3	3
cell wall organization and biogenesis	3	2	3
flavonoid biosynthesis	31	8	9
flower development	15	4	2
galactose metabolism	17	5	4
hyperosmotic salinity response	15	7	8
ion transport	22	8	3
lateral root morphogenesis	7	3	3
lignin biosynthesis	46	18	11
lipid transport	72	15	16
methionine metabolism	2	2	2
microsporogenesis	11	2	2
nitrate assimilation	5	3	3
nucleotide-sugar transport	8	1	1
nutrient uptake	1	1	1
oligopeptide transport	61	18	16
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	2
phenylpropanoid metabolism	17	5	8
positive gravitropism	3	1	2
response to abscisic acid stimulus	17	5	4
response to cold	11	6	5
response to heat	28	9	10
response to pest/pathogen/parasite	7	2	1
response to wounding	15	7	7
S-adenosylmeth. biosynthesis	3	3	3
stem cell maintenance	2	1	1
sulfur metabolism	9	1	2

Annexe 14 : Liste des processus contenant les gènes cibles « probables » communs aux plantes *EgMYB1* et *EgMYB2*

Processus biologique	Nb total de gènes	Nb de gènes impliqués			
		MYB1		MYB2	
		Hampe florale	Feuille	Hampe florale	Feuille
aging	38	17	13	17	10
alkaloid biosynthesis	12	6	5	4	4
auxin mediated signalling	8	2	3	3	3
cell wall modification during cell expansion	19	5	7	3	3
flavonoid biosynthesis	31	12	12	8	9
flower development	15	7	4	4	2
galactose metabolism	17	4	4	5	4
lateral root morphogenesis	7	3	2	3	3
lignin biosynthesis	46	14	20	18	11
nitrate assimilation	5	2	2	3	3
nucleotide-sugar transport	8	1	2	1	1
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	11	2	2	2	2
phenylpropanoid metabolism	17	6	10	5	8
positive gravitropism	3	2	3	1	2
response to abscisic acid stimulus	17	7	7	5	4
response to cold	11	5	2	6	5
response to heat	28	11	11	9	10
response to pest/pathogen/parasite	7	2	4	2	1
S-adenosylmethionine biosynthesis	3	2	3	3	3
stem cell maintenance	2	1	1	1	1

Annexe 15 : Comparaison des listes des gènes des catégories « Probables » dont l'expression est affectée dans les feuilles et les hampes des plantes *EgMYBI*

Processus biologiques	Type		+/-	Type		+/-	
	M1HF	Nom de gène		M1F	Nom de gène		
aging	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	+	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	-	
	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)	+	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein	+	
	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	+	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)	+	
	CATMA1CTRL17	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	+	CATMA3A11020	senescence-associated family protein	-	
	CATMA2A27750	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative	-	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein	+	
	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein	+	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	+	
	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)	+	CATMA4A31885	MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / endo-xyloglucan transferase / xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (SEN4)	-	
	CATMA3A11020	senescence-associated family protein	+	CATMA4A32030	senescence-associated family protein	-	
	CATMA3A38620	senescence-associated family protein	+	CATMA4A32040	senescence-associated family protein	+	
	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein	-	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)	+	
	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	-	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	-	
	CATMA4A29700	senescence-associated protein, putative	+	CATMA5A30906	glutamine synthetase (GS2)	-	
	CATMA4A32030	senescence-associated family protein	+	CATMA5A61415	senescence-associated family protein	+	
	CATMA4A32040	senescence-associated family protein	+				
	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)	-				
	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	-				
	CATMA5A61415	senescence-associated family protein	+				
	alkaloid biosynthesis	CATMA1A07440	strictosidine synthase family protein	+	CATMA1A33330	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-
		CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	-	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	+
		CATMA1A63370	strictosidine synthase family protein	-	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein	+
CATMA1B63370		strictosidine synthase family protein	-	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein	+	
CATMA3A50010		strictosidine synthase family protein	-	CATMA3A50020	strictosidine synthase family protein	-	
CATMA3A50020		strictosidine synthase family protein	+				
auxin mediated signaling	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	-	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	+	
	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	+	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)	+	
cell wall modification during cell expansion (sensu Magnoliophyta)	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)	+	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	-	
	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)	-	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)	-	
	CATMA2B27340	expansin, putative (EXP6)	+	CATMA2A27340	expansin, putative (EXP6)	+	
	CATMA4A39720	expansin, putative (EXP20)	+	CATMA2A35920	expansin, putative (EXP3)	+	
	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)	+	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)	+	
				CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)	+	
				CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)	-	
			CATMA5A04475	expansin, putative (EXP2)	+		
flavonoid biosynthesis	CATMA1A16025	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	
	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA3A18660	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	
	CATMA2A43780	dihydroflavonol 4-reductase family / dihydrokaempferol 4-reductase	+	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)	+	

		family					
	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)	-	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	-	+
	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	-	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	-
	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA4A17120	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	+
	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein	-	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein	-	+
	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	-
	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	-	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	-	+
	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	-	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	-	+
	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	+
	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	+	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	-	-
flower development	CATMA1A56570	pseudogene, putative cycloidea cyc4 protein	+	CATMA1A43122	myrosinase-binding protein, putative (F-ATMBP)	-	-
	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	-	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	-	+
	CATMA3A01295	developmental protein SEPALLATA2 / floral homeotic protein (AGL4) (SEP2)	-	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	-	-
	CATMA3A35245	alcohol dehydrogenase (ATA1)	-	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEP1)	-	+
	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	+				
	CATMA4A38500	basic helix-loop-helix (bHLH) protein SPATULA (SPT)	+				
	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEP1)	-				
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	+	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	-	-
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	+	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	-	-
	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	+	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	-	-
	CATMA3A17420	aldose 1-epimerase family protein	+	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	-	+
lateral root morphogenesis	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	-	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	-	-
	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	+	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	-	-
	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	+				
lignin biosynthesis	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	CATMA1A14998	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	-
	CATMA2A01315	cinnamoyl-CoA reductase family	+	CATMA1A61900	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	-	+
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	-
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-	-
	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-	-
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	+	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	+
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	-
	CATMA3A16820	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-	-
	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	+	CATMA3A19045	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	-	-
	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	-	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	-	-
	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	-	-
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+	CATMA4A32080	cinnamoyl-CoA reductase-related	-	-
	CATMA5A50076	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	-	+
	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	-	-
				CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	-	-

				CATMA5A17870	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative (CAD)	-
				CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-
				CATMA5A50076	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-
				CATMA5A54250	cinnamoyl-CoA reductase family	+
				CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	-
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	-	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	+
nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	transporter-related	+	CATMA2A26710	transporter-related	-
				CATMA4A33230	UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter-related	
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	+	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	-
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	+	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	-
phenylpropanoid metabolism	CATMA1A19470	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	+	CATMA1A19470	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	-	CATMA1A19480	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA1A54346	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	-	CATMA1A19510	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	+	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA4A26250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	+	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	+
				CATMA3A21070	4-coumarate--CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative (4CL)	-
				CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	-
				CATMA4A26250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-
				CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-
positive gravitropism	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+	CATMA1A57755	gravity-responsive protein / altered response to gravity protein (ARG1)	-
	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
				CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	+	CATMA1A19450	dehydrin (COR47)	-
	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	+	CATMA1A47375	protease inhibitor, putative (DR4)	-
	CATMA2A04295	glycine-rich protein (GRP)	+	CATMA1A62630	glycine-rich protein (GRP)	-
	CATMA3A52270	pirin, putative	-	CATMA2A04295	kip-related protein 1 (KRP1) / cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (ICK1)	+
	CATMA4A16726	drought-responsive protein / drought-induced protein (Di21)	+	CATMA2A21885	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	+
	CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	+	CATMA3A55026	drought-responsive family protein	-
	CATMA5A41820	CBL-interacting protein kinase 20 (CIPK20)	+	CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	-

response to cold	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	-
	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	-
	CATMA4A02680	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein	-			
	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	+			
	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	+			
response to heat	CATMA1A05490	31.2 kDa small heat shock family protein / hsp20 family protein	+	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-
	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-	CATMA1A45150	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	-
	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-
	CATMA1A63710	heat shock protein 101 (HSP101)	-	CATMA1A63715	heat shock protein 101 (HSP101)	-
	CATMA2A27880	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	-	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	-
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-
	CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	-	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	-
	CATMA5A13710	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative	-	CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	-
	CATMA5A33010	15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI)	-	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	-
	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-
	CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-	CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-
	response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	-	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)
CATMA3A44640		macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	-	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+
				CATMA5A00695	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+
				CATMA5A52910	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+
S-adenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	+	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	-
	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
				CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	-
stem cell maintenance cell elongation	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	+	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	-
	CATMA1A58850	expansin, putative (EXP1)	+	CATMA1A58850	expansin, putative (EXP1)	+
	CATMA3A19415	cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)	+	CATMA2A05540	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (EXT) (EXGT-A1)	+
	CATMA4A29890	beta-expansin, putative (EXPB3)	+	CATMA3A19415	cell elongation protein / DWARF1 / DIMINUTO (DIM)	-
	CATMA5A17970	spermine/spermidine synthase family protein	+	CATMA3B01545	delta 7-sterol-C5-desaturase (STE1)	+
				CATMA4A29890	beta-expansin, putative (EXPB3)	-
				CATMA5A43320	homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2) / HD-ZIP protein 2	-
cell wall catabolism	CATMA1A01350	chitinase, putative	-	CATMA1A01350	chitinase, putative	+
	CATMA1A04870	chitinase-like protein 1 (CTL1)	+	CATMA1A04870	chitinase-like protein 1 (CTL1)	-
	CATMA1A46050	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	+	CATMA2A31750	protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	-
	CATMA2A42030	glycoside hydrolase family 19 protein	+	CATMA2A41990	chitinase, putative	+
	CATMA2A42040	chitinase, putative	+	CATMA2A42030	glycoside hydrolase family 19 protein	+
	CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	+	CATMA2A42040	chitinase, putative	+
	CATMA3A40540	chitinase, putative	-	CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	-
	CATMA3B40540	chitinase, putative	-	CATMA5A07470	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	-

	CATMA4A01885	chitinase, putative	-			
	CATMA5A07470	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	+			
cellulose biosynthesis	CATMA2A23880	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	+	CATMA2A23880	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	-
	CATMA2A44280	glycosyl hydrolase family 14 protein	-	CATMA2A44280	glycosyl hydrolase family 14 protein	+
	CATMA3A23850	beta-amylase, putative / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	-	CATMA3A23850	beta-amylase, putative / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	-
	CATMA4A19880	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX1)	+	CATMA4A34150	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	-
	CATMA4A34150	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	+	CATMA5A15220	cellulose synthase family protein	-
	CATMA5A15220	cellulose synthase family protein	-	CATMA5A15680	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX3)	-
	CATMA5A15680	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX3)	+	CATMA5A17020	beta-amylase, putative (BMY3) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	-
	CATMA5A39800	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX5)	+	CATMA5A39800	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX5)	-
	CATMA5A45658	endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR) / cellulase (OR16pep)	+	CATMA5A45657	endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR) / cellulase (OR16pep)	-
	CATMA5A59360	alpha-glucosidase, putative	+	CATMA5A45658	endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR) / cellulase (OR16pep)	-
				CATMA5A59360	alpha-glucosidase, putative	-
glucosinolate biosyntheses	CATMA4A03370	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP3)	+	CATMA1A15390	cytochrome P450 family protein	-
	CATMA4A03380	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP2)	+	CATMA4A03370	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP3)	-
	CATMA4A13955	cytochrome P450 family protein	+	CATMA4A13955	cytochrome P450 family protein	-
	CATMA5A20495	2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	+	CATMA5A20495	2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	-
glycerol biosynthesis	CATMA5A12400	lipase family protein	-	CATMA1A17490	lipase family protein	-
				CATMA5A12400	lipase family protein	+
lipid catabolism	CATMA4A31410	expressed protein	+	CATMA2A05700	phospholipase A2 family protein	+
				CATMA4A31410	expressed protein	-
mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c	CATMA4A34210	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative	-	CATMA2A01110	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit, putative	+
	CATMA5A23200	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative	-	CATMA2A37780	nodulin MtN21 family protein	-
				CATMA3A05390	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit (NDUFA8) family protein	+
				CATMA5A07860	NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit, mitochondrial, putative	-
				CATMA5A17170	NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit (NDUFA8) family protein	+
negative regulation of transcription	CATMA5A16500	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein	+	CATMA4A40092	myb family transcription factor (MYB4)	-
	CATMA5A20125	expressed protein	+	CATMA5A16500	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein	-
				CATMA5A20125	expressed protein	-
one-carbon compound métabolisme	CATMA3A23770	adenosylhomocysteinase, putative / S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, putative / AdoHcyase, putative	+	CATMA3A23770	adenosylhomocysteinase, putative / S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, putative / AdoHcyase, putative	-
	CATMA3A45650	carbonic anhydrase family protein	+	CATMA3A45650	carbonic anhydrase family protein	+
				CATMA3A48610	dihydrofolate synthetase/folylpolyglutamate synthetase (DHFS/FPGS4)	+
				CATMA4A14135	adenosylhomocysteinase / S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase / AdoHcyase (SAHH)	-
response to dessication	CATMA2A31540	calcium-binding RD20 protein (RD20)	-	CATMA1A39210	peroxiredoxin (PER1) / rehydrin, putative	+
	CATMA2A35456	plasma membrane intrinsic protein 2C (PIP2C) / aquaporin PIP2.3	-	CATMA2A20280	universal stress protein (USP) family protein / responsive to dessication	-

		(PIP2.3) / water-stress induced tonoplast intrinsic protein (RD28)			protein (RD2)	
				CATMA2A35456	plasma membrane intrinsic protein 2C (PIP2C) / aquaporin PIP2.3 (PIP2.3) / water-stress induced tonoplast intrinsic protein (RD28)	-
				CATMA5A48205	low-temperature-responsive protein 78 (LTI78) / desiccation-responsive protein 29A (RD29A)	
response to ethylene stimulus	CATMA2A25415	ethylene-insensitive3-like1 (EIL1)	+	CATMA1A04710	ethylene-responsive protein, putative	-
	CATMA3A03743	hevein-like protein (HEL)	-	CATMA2A25415	ethylene-insensitive3-like1 (EIL1)	-
	CATMA3A16175	AP2 domain-containing protein RAP2.3 (RAP2.3)	+	CATMA2A36520	ethylene-responsive protein, putative	+
	CATMA3A24390	ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative	-	CATMA3A03743	hevein-like protein (HEL)	+
				CATMA3A16175	AP2 domain-containing protein RAP2.3 (RAP2.3)	-

Annexe 16 : Comparaison des listes des gènes des catégories « Probables » dont l'expression est affectée dans les feuilles et les hampes des plantes *EgMYB2*

Processus biologiques	Type			+/-	Type			+/-	
	M2HF	Nom de gène			M2F	Nom de gène			
aging	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)		-	
	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)		+	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		-	
	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein		+	
	CATMA2A18120	senescence-associated protein-related		+	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)		+	
	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein		-	CATMA3A11020	senescence-associated family protein		-	
	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)		-	CATMA3A40350	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)		+	
	CATMA3A11020	senescence-associated family protein		+	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein		+	
	CATMA3A38620	senescence-associated family protein		+	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative		+	
	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein		-	CATMA4A32030	senescence-associated family protein		-	
	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative		-	CATMA4A32040	senescence-associated family protein		-	
	CATMA4A31885	MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / endo-xyloglucan transferase / xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (SEN4)		+					
	CATMA4A32030	senescence-associated family protein		+					
	CATMA4A32040	senescence-associated family protein		+					
	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)		-					
	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)		-					
	CATMA5A30906	glutamine synthetase (GS2)		+					
	CATMA5A61415	senescence-associated family protein		+					
	alkaloid biosynthesis	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein		-	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein		+
		CATMA1A63370	strictosidine synthase family protein		-	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein		+
CATMA1B63370		strictosidine synthase family protein		-	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein		+	
CATMA3A50010		strictosidine synthase family protein		-	CATMA3A50020	strictosidine synthase family protein		-	
auxin mediated signaling	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)		-	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)		+	
	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)		-	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)		+	
	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)		+	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)		-	
cell wall modification during cell expansion (sensu Magnoliophyta)	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)		+	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)		-	
	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)		-	CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)		+	
	CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)		-	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)		-	
flavonoid biosynthesis	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	CATMA3A41970	AMP-dependent synthetase and ligase family protein		-	
	CATMA3A18660	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		+	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)		+	
	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)		-	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)		+	
	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	
	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	CATMA4A17120	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		+	
	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)		-	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein		+	
	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)		+	

	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	+	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	+
				CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	-
flower development	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	-	CATMA1A43122	myrosinase-binding protein, putative (F-ATMBP)	-
	CATMA3A01295	developmental protein SEPALLATA2 / floral homeotic protein (AGL4) (SEP2)	-	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	+
	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	+			
	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEP1)	-			
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	+	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	-
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	+	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	-
	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	+	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	-
	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	-	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	+
	CATMA4A25550	aldose 1-epimerase family protein	+			
lateral root morphogenesis	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	-	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	+
	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	+	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	-
	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	+	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	-
lignin biosynthesis	CATMA1A14998	cinnamoyl-CoA reductase, putative	+	CATMA1A61900	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	+
	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	+	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-
	CATMA2A01315	cinnamoyl-CoA reductase family	+	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-
	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	+	CATMA3A16820	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	-
	CATMA3A19045	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	+	CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	-
	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	+	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-
	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	+	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA4A32080	cinnamoyl-CoA reductase-related	+			
	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	-			
	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+			
	CATMA4A37876	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+			
	CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	+			
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+			
	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+			
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	-	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	+
	CATMA5A49360	glutamate synthase (NADH), chloroplast, putative	+	CATMA5A49360	glutamate synthase (NADH), chloroplast, putative	-
nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	transporter-related	+	CATMA2A26710	transporter-related	-
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	+	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	-
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	+	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	-
phenylpropanoid metabolism	CATMA2A28743	trans-cinnamate 4-monooxygenase / cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) (CA4H) / cytochrome P450 73 (CYP73) (CYP73A5)	-	CATMA1A19480	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-

	CATMA2A28746	trans-cinnamate 4-monoxygenase / cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) (CA4H) / cytochrome P450 73 (CYP73) (CYP73A5)	-	CATMA1A19510	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA2A35330	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)	-	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA3A09340	phenylalanine ammonia-lyase, putative	-	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	+	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	-
	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	+	CATMA3A21070	4-coumarate--CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative (4CL)	+
	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL2)	+	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	-
	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL3)	-	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-
positive gravitropism	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
				CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	+	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	-
	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	+	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	-
	CATMA3A52270	pirin, putative	-	CATMA2A04295	glycine-rich protein (GRP)	-
	CATMA3A55026	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	+	CATMA3A55026	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	-
	CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	+			
response to cold	CATMA2A38040	expressed protein	+	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	+
	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	+
	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-	CATMA4A40685	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	+
	CATMA4A40685	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	-	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	-
	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	+	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	-
	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	+			
response to heat	CATMA1A05490	31.2 kDa small heat shock family protein / hsp20 family protein	+	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-
	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	+	CATMA1A45150	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	-
	CATMA1A43590	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)	+	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-
	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	+	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	-
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	+	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-
	CATMA4A10295	22.0 kDa ER small heat shock protein (HSP22.0-ER)	+	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	-
	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	+	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	-
	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	+	CATMA5A19520	heat shock family protein	-
	CATMA5A13710	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative	+	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-
				CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-
response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	-	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+
	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	-			
S-adenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	+	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	-
	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	+	CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	-
stem cell maintenance	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	+	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	-
anthocyanin biosynthesis	CATMA2A01885	ribonuclease 1 (RNS1)	+	CATMA2A01885	ribonuclease 1 (RNS1)	-
				CATMA4A24645	leucoanthocyanidin dioxygenase, putative / anthocyanidin synthase, putative	+
				CATMA5A38610	dihydroflavonol 4-reductase (dihydrokaempferol 4-reductase) (DFR)	-
boron transport	CATMA2A45610	anion exchange family protein	+	CATMA2A45610	anion exchange family protein	-

	CATMA2B45610	anion exchange family protein	+	CATMA2B45610	anion exchange family protein	-
cell wall organization and biogenesis (sensu Magnoliophyta)	CATMA2A19790	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	+	CATMA2A19790	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	+
	CATMA3A38990	expansin family protein (EXPL3)	+	CATMA3A38990	expansin family protein (EXPL3)	-
			-	CATMA4A39920	expansin family protein (EXPL2)	-
hyperosmotic salinity response	CATMA2A22390	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	+	CATMA1A05430	shaggy-related protein kinase iota / ASK-iota (ASK9) (GSK1)	-
	CATMA3A04913	hydrophobic protein (RCI2A) / low temperature and salt responsive protein (LTI6A)	-	CATMA2A22390	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	+
	CATMA4A25450	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase	-	CATMA3A04913	hydrophobic protein (RCI2A) / low temperature and salt responsive protein (LTI6A)	+
	CATMA4A26645	ABA-responsive protein (HVA22d)	-	CATMA3A19200	zinc finger (C2H2 type) protein 2 (AZF2)	-
	CATMA4A32260	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	-	CATMA4A25450	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase	+
	CATMA4A32270	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	-	CATMA4A26645	ABA-responsive protein (HVA22d)	-
	CATMA5A62900	zinc finger (C2H2 type) protein 1 (AZF1)	-	CATMA4A32260	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	+
				CATMA4A32270	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	+
ion transport	CATMA1A00320	cyclic nucleotide-regulated ion channel (CNGC10) (ACBK1)	-	CATMA3A17140	cyclic nucleotide-binding transporter 2 / CNBT2 (CNGC19)	-
	CATMA2A22320	cyclic nucleotide-regulated ion channel / cyclic nucleotide-gated channel (CNGC6)	+	CATMA5A11380	nodulin MtN3 family protein	+
	CATMA2A44785	cyclic nucleotide-regulated ion channel / cyclic nucleotide-gated channel (CNGC3)	+	CATMA5A48410	expressed protein	-
	CATMA2A44800	cyclic nucleotide-regulated ion channel, putative (CNGC12)	+			
	CATMA5A11380	nodulin MtN3 family protein	-			
	CATMA5A49035	cyclic nucleotide-regulated ion channel / cyclic nucleotide-gated channel (CNGC1)	+			
	CATMA5A51375	outward rectifying potassium channel (KCO1)	+			
	CATMA5A53695	cyclic nucleotide-regulated ion channel / cyclic nucleotide-gated channel (CNGC5)	+			
lipid transport	CATMA1A26130	lipid transfer protein-related	-	CATMA1A26130	lipid transfer protein-related	+
	CATMA1A46320	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-	CATMA1A46320	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+
	CATMA2A13890	lipid transfer protein, putative	+	CATMA1A51920	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
	CATMA2A36170	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+	CATMA2A13890	lipid transfer protein, putative	-
	CATMA2A36820	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)	-	CATMA2A36820	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)	+
	CATMA3A07570	lipid transfer protein 6 (LTP6)	-	CATMA2A43580	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+
	CATMA3A17820	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+	CATMA3A07570	lipid transfer protein 6 (LTP6)	+
	CATMA3A44603	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	-	CATMA3A17820	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
	CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+	CATMA3A22590	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+

	CATMA3A51550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfe	+	CATMA3A44603	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	+
	CATMA4A00190	r protein (LTP) family protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-	CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
	CATMA4A24190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-	CATMA3A51550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
	CATMA4A32530	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-	CATMA4A00190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+
	CATMA4A35280	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+	CATMA4A24190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+
	CATMA5A05150	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	+	CATMA4A24340	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
				CATMA5A05150	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-
methionine metabolism	CATMA2A42575	methylenetetrahydrofolate reductase 2 (MTHFR2)	+	CATMA2A42575	methylenetetrahydrofolate reductase 2 (MTHFR2)	-
	CATMA3A52975	methylenetetrahydrofolate reductase 1 (MTHFR1)	+	CATMA3A52975	methylenetetrahydrofolate reductase 1 (MTHFR1)	-
microsporogenesis	CATMA3A49670	male sterility protein, putative	+	CATMA3A49670	male sterility protein, putative	-
	CATMA5A06490	leucine-rich repeat protein kinase, putative / extra sporogenous cells (ESP)	-	CATMA5A19965	acyl CoA reductase, putative / male-sterility protein, putative	-
nutrient uptake	CATMA4A31820	ATPase 2, plasma membrane-type, putative / proton pump 2, putative / proton-exporting ATPase, putative	-	CATMA4A31820	ATPase 2, plasma membrane-type, putative / proton pump 2, putative / proton-exporting ATPase, putative	+
oligopeptide transport	CATMA1A21680	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-	CATMA1A21680	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+
	CATMA1A31710	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+	CATMA1A30850	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+
	CATMA1A59165	nitrate transporter (NTP1)	+	CATMA1A43260	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+
	CATMA1A61330	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-	CATMA1A48780	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA1B39460	oligopeptide transporter OPT family protein	-	CATMA1A57940	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+
	CATMA2A36200	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+	CATMA1B39460	oligopeptide transporter OPT family protein	+
	CATMA2A38770	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-	CATMA2A25005	nitrate transporter (NTP2)	+
	CATMA3A21540	nitrate transporter (NTP3)	+	CATMA2A36200	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA3A26790	oligopeptide transporter OPT family protein	-	CATMA2A38770	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+
	CATMA3A46920	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+	CATMA3A15600	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA4A17180	oligopeptide transporter OPT family protein	+	CATMA3A21540	nitrate transporter (NTP3)	-
	CATMA4A25840	transporter, putative	-	CATMA3A26790	oligopeptide transporter OPT family protein	+
	CATMA4A28160	oligopeptide transporter OPT family protein	-	CATMA3A40980	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA4A29370	oligopeptide transporter OPT family protein	-	CATMA3A46920	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA5A11590	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-	CATMA5A49410	oligopeptide transporter OPT family protein	+
	CATMA5A11600	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-	CATMA5A58270	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	-
	CATMA5A49410	oligopeptide transporter OPT family protein	-	CATMA1A42490	photosystem II 5 kD protein	+
	CATMA5A58270	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	+	CATMA1A60890	choline kinase, putative	-
response to wounding	CATMA1A18690	wound-responsive family protein	+	CATMA2A37130	protease inhibitor, putative	+
	CATMA2A37130	protease inhibitor, putative	-	CATMA2A37140	serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	+
	CATMA2A37140	serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	-	CATMA3A25075	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506-binding protein (ROF1)	-
	CATMA3A25075	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506-binding protein (ROF1)	+	CATMA5A13000	formate dehydrogenase (FDH)	+
	CATMA3B25075	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506-binding protein (ROF1)	+	CATMA5A39400	protease inhibitor, putative	+
	CATMA5A13000	formate dehydrogenase (FDH)	+			

	CATMA5A39400	protease inhibitor, putative	-		
sulfur metabolism	CATMA5A59495	3prim(2prim),5prim-bisphosphate nucleotidase, putative / inositol polyphosphate 1-phosphatase, putative	-	CATMA3A00905	sulfite oxidase, putative +
				CATMA5A59495	3prim(2prim),5prim-bisphosphate nucleotidase, putative / inositol polyphosphate 1-phosphatase, putative +

Annexe 17 : Comparaison des listes des gènes des catégories « Probables » dont l'expression est affectée dans les feuilles des plantes *EgMYB1* et *EgMYB2*

Processus biologiques	Type	Nom de gène	+/-	Type	Nom de gène	+/-	
	M1F			M2F			
aging	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	-	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)	-	
	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein	+	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	-	
	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)	+	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein	+	
	CATMA3A11020	senescence-associated family protein	-	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)	+	
	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein	+	CATMA3A11020	senescence-associated family protein	-	
	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	+	CATMA3A40350	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)	+	
	CATMA4A31885	MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / endo-xyloglucan transférse / xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (SEN4)	-	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein	+	
	CATMA4A32030	senescence-associated family protein	-	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	+	
	CATMA4A32040	senescence-associated family protein	+	CATMA4A32030	senescence-associated family protein	-	
	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)	+	CATMA4A32040	senescence-associated family protein	-	
	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	-				
	CATMA5A30906	glutamine synthetase (GS2)	-				
	CATMA5A61415	senescence-associated family protein	+				
	alkaloid biosynthesis	CATMA1A33330	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	+
		CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	+	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein	+
CATMA1B63370		strictosidine synthase family protein	+	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein	+	
CATMA3A50010		strictosidine synthase family protein	+	CATMA3A50020	strictosidine synthase family protein	-	
CATMA3A50020		strictosidine synthase family protein	-				
auxin mediated signaling	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	+	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	+	
	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)	+	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)	+	
	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	-	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	-	
cell wall modification during cell expansion (sensu Magnoliophyta)	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)	-	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)	-	
	CATMA2A27340	expansin, putative (EXP6)	+	CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)	+	
	CATMA2A35920	expansin, putative (EXP3)	+	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)	-	
	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)	+				
	CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)	+				
	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)	-				
	CATMA5A04475	expansin, putative (EXP2)	+				
flavonoid biosynthesis	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA3A41970	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	-	
	CATMA3A18660	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)	+	
	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)	+	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	+	
	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	+	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	+	
	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA4A17120	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	
	CATMA4A17120	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	+	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein	+	

	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein	+	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	+
	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	+
	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	+	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	-
	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	+			
	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	+			
	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	-			
flower development	CATMA1A43122	myrosinase-binding protein, putative (F-ATMBP)	-	CATMA1A43122	myrosinase-binding protein, putative (F-ATMBP)	-
	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	+	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	+
	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	-			
	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEP1)	+			
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoreosin-lariciresinol reductase, putative	-	CATMA1A30440	pinoreosin-lariciresinol reductase, putative	-
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	-	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	-
	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	-	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	-
	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	+	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	+
lateral root morphogenesis	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	-	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	+
	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	-	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	-
				CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	-
lignin biosynthesis	CATMA1A14998	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	CATMA1A61900	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	+
	CATMA1A61900	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	+	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-
	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-
	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	+	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	CATMA3A16820	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	-
	CATMA3A19045	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	-	CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	-
	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	-	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+
	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	-	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-
	CATMA4A32080	cinnamoyl-CoA reductase-related	-			
	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	+			
	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	-			
	CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	-			
	CATMA5A17870	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative (CAD)	-			
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-			
	CATMA5A50076	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	-			
	CATMA5A54250	cinnamoyl-CoA reductase family	+			
	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	-			
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	-	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	+	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	+
				CATMA5A49360	glutamate synthase (NADH), chloroplast, putative	-



nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	transporter-related	-	CATMA2A26710	transporter-related	-
	CATMA4A33230	UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter-related				
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	-	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	-
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	-	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	-
phenylpropanoid metabolism	CATMA1A19470	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-	CATMA1A19480	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA1A19480	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-	CATMA1A19510	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-
	CATMA1A19510	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	-	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-
	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	-	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	-
	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	+	CATMA3A21070	4-coumarate--CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative (4CL)	+
	CATMA3A21070	4-coumarate--CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative (4CL)	-	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	-
	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	-	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-
	CATMA4A26250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-			
	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-			
positive gravitropism	CATMA1A57755	gravity-responsive protein / altered response to gravity protein (ARG1)	-	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-
	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	-			
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A19450	dehydrin (COR47)	-	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	-
	CATMA1A47375	protease inhibitor, putative (DR4)	-	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	-
	CATMA1A62630	glycine-rich protein (GRP)	-	CATMA2A04295	glycine-rich protein (GRP)	-
	CATMA2A04295	kip-related protein 1 (KRP1) / cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (ICK1)	+	CATMA3A55026	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	-
	CATMA2A21885	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	+			
	CATMA3A55026	drought-responsive family protein	-			
	CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	-			
response to cold	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	-	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	+
	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	-	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	+
				CATMA4A40685	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	+
				CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	-
				CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	-
response to heat	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-
	CATMA1A45150	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	-	CATMA1A45150	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	-
	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-
	CATMA1A63715	heat shock protein 101 (HSP101)	-	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	-
	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	-	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	-
	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	-	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	-

	CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	-	CATMA5A19520	heat shock family protein	-
	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	-	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-
	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-	CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-
	CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-			
response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	+	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+
	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+			
	CATMA5A00695	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+			
	CATMA5A52910	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	+			
S-adenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	-	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	-
	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	-
	CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	-	CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	-
stem cell maintenance	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	-	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	-

Annexe 18 : Comparaison des listes des gènes des catégories « Probables » dont l'expression est affectée dans les hampes florales des plantes *EgMYB1* et *EgMYB2*.

Processus biologiques	Type			+/-	Type			+/-
	M1HF	Nom de gène			M2HF	Nom de gène		
aging	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+
	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)		+	CATMA1A25040	ribonuclease 3 (RNS3)		+
	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+	CATMA1B15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+
	CATMA1CTRL17	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)		+	CATMA2A18120	senescence-associated protein-related		+
	CATMA2A27750	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative		-	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein		-
	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein		+	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)		-
	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)		+	CATMA3A11020	senescence-associated family protein		+
	CATMA3A11020	senescence-associated family protein		+	CATMA3A38620	senescence-associated family protein		+
	CATMA3A38620	senescence-associated family protein		-	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein		-
	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein		-	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative		-
	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative		-	CATMA4A31885	MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / endo-xyloglucan transferase / xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase (SEN4)		+
	CATMA4A29700	senescence-associated protein, putative		+	CATMA4A32030	senescence-associated family protein		+
	CATMA4A32030	senescence-associated family protein		+	CATMA4A32040	senescence-associated family protein		+
	CATMA4A32040	senescence-associated family protein		+	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)		-
	CATMA4A37425	senescence-associated protein (SEN1)		-	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)		-
	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)		-	CATMA5A30906	glutamine synthetase (GS2)		+
CATMA5A61415	senescence-associated family protein		+	CATMA5A61415	senescence-associated family protein		+	
alkaloid biosynthesis	CATMA1A07440	strictosidine synthase family protein		+	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein		-
	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein		-	CATMA1A63370	strictosidine synthase family protein		-
	CATMA1A63370	strictosidine synthase family protein		-	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein		-
	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein		-	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein		-
	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein		-	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein		-
	CATMA3A50020	strictosidine synthase family protein		+				
auxin mediated signaling	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)		-	CATMA1A03107	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)		-
	CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)		+	CATMA1A47078	transcription activator NAC1 (NAC1)		-
					CATMA5A61005	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)		+
cell wall modification during cell expansion (sensu Magnoliophyta)	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)		+	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)		+
	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)		-	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)		-
	CATMA2B27340	expansin, putative (EXP6)		+	CATMA3A48450	expansin, putative (EXP16)		-
	CATMA4A39720	expansin, putative (EXP20)		+				
	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)		+				
flavonoid biosynthesis	CATMA1A16025	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-
	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		+	CATMA3A18660	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		+
	CATMA2A43780	dihydroflavonol 4-reductase family / dihydrokaempferol 4-reductase family		+	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)		-
	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)		-	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein		-

	CATMA3A48130	chalcone-flavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	-	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-
	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	-
	CATMA5A04460	chalcone-flavanone isomerase family protein	-	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-
	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	+
	CATMA5A07240	flavonoid 3prim-monoxygenase / flavonoid 3prim-hydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	-			
	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	-			
	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-			
	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	+			
flower development	CATMA1A56570	pseudogene, putative cycloidea cyc4 protein	+	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	-
	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	-	CATMA3A01295	developmental protein SEPALLATA2 / floral homeotic protein (AGL4) (SEP2)	-
	CATMA3A01295	developmental protein SEPALLATA2 / floral homeotic protein (AGL4) (SEP2)	-	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	-
	CATMA3A35245	alcohol dehydrogenase (ATA1)	-			
	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	+			
	CATMA4A38500	basic helix-loop-helix (bHLH) protein SPATULA (SPT)	+			
	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEP1)	-			
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	+	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	+
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	+	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	+
	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	+	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	+
	CATMA3A17420	aldose 1-epimerase family protein	+	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	-
				CATMA4A25550	aldose 1-epimerase family protein	+
lateral root morphogenesis	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	-	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	-
	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	+	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	+
	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	+	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	+
lignin biosynthesis	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	-	CATMA1A14998	cinnamoyl-CoA reductase, putative	+
	CATMA2A01315	cinnamoyl-CoA reductase family	+	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	+
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA2A01315	cinnamoyl-CoA reductase family	+
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+
	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	+	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	-
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	+
	CATMA3A16820	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+
	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	+	CATMA3A19045	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	+
	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	-	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	+
	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+	CATMA4A27740	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	+
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+	CATMA4A32080	cinnamoyl-CoA reductase-related	+
	CATMA5A50076	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	+	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	-
	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+
	CATMA1A61900	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative	-	CATMA4A37876	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	+
				CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	+
				CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 /	+

					caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)		
					CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	+
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+		CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	+
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	-		CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	-
					CATMA5A49360	glutamate synthase (NADH), chloroplast, putative	+
nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	transporter-related	+		CATMA2A26710	transporter-related	+
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	+		CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	+
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	+		CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	+
phenylpropanoid metabolism	CATMA1A19470	4-coumarate--CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	+		CATMA2A28743	trans-cinnamate 4-monoxygenase / cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) (CA4H) / cytochrome P450 73 (CYP73) (CYP73A5)	-
	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	-		CATMA2A28746	trans-cinnamate 4-monoxygenase / cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) (CA4H) / cytochrome P450 73 (CYP73) (CYP73A5)	-
	CATMA1A54346	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)			CATMA2A35330	phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1)	-
	CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	+		CATMA3A09340	phenylalanine ammonia-lyase, putative	-
	CATMA4A26250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	+		CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	+
	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	-		CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	+
					CATMA3A21086	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL2)	+
				CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL3)	-	
positive gravitropism	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+		CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+
	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	+				
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	+		CATMA1A47375	drought-responsive family protein	+
	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	+		CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	+
	CATMA2A04295	glycine-rich protein (GRP)	+		CATMA3A52270	pirin, putative	-
	CATMA3A52270	pirin, putative	-		CATMA3A55026	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	+
	CATMA4A16726	drought-responsive protein / drought-induced protein (Di21)	+		CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	+
	CATMA5A23380	dehydration-responsive protein (RD22)	+				
	CATMA5A41820	CBL-interacting protein kinase 20 (CIPK20)	+				
response to cold	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-		CATMA2A38040	expressed protein	+
	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-		CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-
	CATMA4A02680	late embryogenesis abundant 3 family protein / LEA3 family protein	-		CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	-
	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	+		CATMA4A40685	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	-
	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	+		CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	+
				CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	+	
response to heat	CATMA1A05490	31.2 kDa small heat shock family protein / hsp20 family protein	-		CATMA1A05490	31.2 kDa small heat shock family protein / hsp20 family protein	-
	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	-		CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	+
	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6A-CI)	-		CATMA1A43590	26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)	+
	CATMA1A63710	heat shock protein 101 (HSP101)	-		CATMA1A69105	heat shock protein, putative	+
	CATMA2A27880	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	-		CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	+
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	-		CATMA4A10295	22.0 kDa ER small heat shock protein (HSP22.0-ER)	+
	CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6-M)	-		CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	+
	CATMA5A13710	heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock	-		CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4	+

	CATMA5A33010	protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative 15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI)	-	CATMA5A13710	(HSTF4) heat shock protein 100, putative / HSP100, putative / heat shock protein clpB, putative / HSP100/ClpB, putative	+
	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5-M)	-			
	CATMA5A48515	heat shock protein 81-1 (HSP81-1) / heat shock protein 83 (HSP83)	-			
	CATMA1A45150	17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)	+			
response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	+	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	-
	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	-	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	-
S-adenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	+	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	+
	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	+
				CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	+
stem cell maintenance	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	+	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	+

+ : sur-expression
- : sous-expression

Annexe 19 : Liste des gènes des Processus Biologiques probables cibles du facteur *EgMYB1* et des sites consensus de fixation des facteurs de transcription dans leurs parties promotrices.

Processus Biologique	Id CATMA	Fonction Génique	Expr.		Sites de fixation consensus de facteurs de transcription							
			Feuilles	Hauts florale	MYB	MYB-related	bZIP	LFY	WRKY	Homeobox	BHLH	ARF
aging	CATMA1A15443	mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST2) (RDH2)	↘	↗	+							
	CATMA2A34180	harpin-induced family protein (YLS9) / HIN1 family protein / harpin-responsive family protein	↗	↘			+	+	+	+		
	CATMA2A38006	ribonuclease 2 (RNS2)	↗	↘				+				
	CATMA3A11020	senescence-associated family protein	↘	↗	+	+						+
	CATMA3A53150	glycosyl hydrolase family 1 protein	↗	↘	+	+	+		+	+	+	
	CATMA4A29690	senescence-associated protein, putative	↗	↘			+					+
	CATMA4A32030	senescence-associated family protein	↘	↗	+		+	+	+		+	+
	CATMA4A32040	Senescence-associated family protein	↘	↗	+		+	+	+		+	+
	CATMA4A37425	Senescence-associated protein (SEN1)	↗	↘				+				
	CATMA5A18690	raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	↗	↘	+		+	+	+	+		
CATMA5A61415	Senescence-associated family protein	↗	↗	+		+	+	+	+	+	+	
alkaloid biosynthesis	CATMA1A63360	strictosidine synthase family protein	↗	↘	+		+	+	+	+		
	CATMA1B63370	strictosidine synthase family protein	↗	↘	+		+	+	+		+	+
	CATMA3A50010	strictosidine synthase family protein	↗	↘	+		+	+	+	+	+	+
	CATMA3A50020	strictosidine synthase family protein	↘	↗	+		+	+	+	+		+
auxin mediated signaling	CATMA1A03107	Auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 17 (IAA17)	↗	↘	+		+	+	+		+	
	CATMA5A61005	Auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 9 (IAA9)	↘	↗	+	+	+	+	+			+
boron transport	CATMA2A45610	anion exchange family protein	↘	↗	+		+	+	+	+	+	+
	CATMA2B45610	anion exchange family protein	↘	↗	+		+	+	+	+	+	+
carbohydrate transport	CATMA1A15360	Transporter-related	↘	↘								
	CATMA1A18460	integral membrane protein, putative / sugar transporter family protein	↘	↘		+	+		+	+		
	CATMA1A19913	Transporter-related	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA1A64560	integral membrane protein, putative	↘	↘	+			+	+	+		+

	CATMA1A65660	phosphate transporter family protein	↗	↘		+						+
	CATMA1A68510	Transporter-related	↘	↗	+			+	+	+		+
	CATMA2A19340	mannitol transporter, putative	↘	↗		+		+	+	+		+
	CATMA2A31034	inorganic phosphate transporter (PHT5)	↗	↘	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA2A37175	phosphate transporter (PT2)	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA3A20140	sugar transporter, putative	↗	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA4A37030	Transporter-related	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA4A38220	mannitol transporter, putative	↘	↘	+	+		+	+	+		+
	CATMA5A24040	hexose transporter, putative	↗	↘	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA5A57125	hexose transporter, putative	↗	↘	+			+	+	+	+	+
cell elongation	CATMA1A58850	expansin, putative (EXP1)	↗	↗	+	+		+	+	+		+
	CATMA3A19415	cell elongation protein / DW+1 / DIMINUTO (DIM)	↘	↗	+	+		+	+		+	+
	CATMA4A29890	betaexpansin, putative (EXPB3)	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
cell wall catabolism	CATMA1A01350	chitinase, putative	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA1A04870	Chitinase-like protein 1 (CTL1)	↘	↗	+			+	+			+
	CATMA2A42030	glycoside hydrolase family 19 protein	↗	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA2A42040	chitinase, putative	↗	↗	+	+			+	+		
	CATMA3A16320	glycoside hydrolase family 19 protein	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA5A07470	Peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	↘	↗	+			+		+	+	
cell wall modification during cell expansion	CATMA2A02000	expansin, putative (EXP15)	↘	↗	+				+	+	+	+
	CATMA2A38930	expansin, putative (EXP8)	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA5A01340	expansin, putative (EXP9)	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
cellulose biosynthesis	CATMA2A23880	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA2A44280	glycosyl hydrolase family 14 protein	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA3A23850	Beta-amylase, putative / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	↘	↘	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA4A34150	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	↘	↗	+			+				
	CATMA5A15220	cellulose synthase family protein	↘	↘	+			+		+	+	+
	CATMA5A15680	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX3)	↘	↗	+			+	+	+	+	+
	CATMA5A39800	cellulose synthase, catalytic subunit (IRX5)	↘	↗	+	+		+	+	+		+
	CATMA5A45658	Endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN (KOR) / cellulase (OR16pep)	↘	↗	+			+	+	+	+	+
	CATMA5A59360	alpha-glucosidase, putative	↘	↗								
flavonoid biosynthesis	CATMA2A36550	oxidoreductase, 2OGFe(II) oxygenase family protein	↘	↘	+	+		+		+	+	+
	CATMA3A44230	naringenin 3-dioxygenase / flavanone 3-hydroxylase (F3H)	↗	↘	+	+		+		+	+	+
	CATMA3A48130	chalconeflavanone isomerase / chalcone isomerase (CHI)	↗	↘	+	+		+	+	+	+	+

	CATMA3A48940	oxidoreductase, 2OGFe(II) oxygenase family protein	↘	↘	+	+		+	+	+	+	+	+
	CATMA5A04460	chalconeflavanone isomerase family protein	↗	↘	+		+		+				+
	CATMA5A04790	oxidoreductase, 2OGFe(II) oxygenase family protein	↘	↘	+		+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A07240	flavonoid 3-primmonooxygenase / flavonoid 3-primhydroxylase (F3primH) / cytochrome P450 75B1 (CYP75B1) / transparent testa 7 protein (TT7)	↗	↘	+	+	+				+	+	+
	CATMA5A07985	flavonol synthase 1 (FLS1)	↗	↘	+	+	+	+	+			+	+
	CATMA5A22130	oxidoreductase, 2OGFe(II) oxygenase family protein	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	↘	↗	+		+						+
flower development	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA4A30680	abnormal inflorescence meristem 1 / fatty acid multifunctional protein (AIM1)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A14070	developmental protein SEPALLATA1 / floral homeotic protein (AGL2) (SEPL)	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoresinollariciresinol reductase, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+			+
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	↘	↗	+	+	+		+				+
	CATMA3A00250	aldose 1epimerase family protein	↘	↗	+			+	+				
glucosinolate biosynthesis	CATMA4A03370	2-oxoglutaratedependent dioxygenase, putative (AOP3)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+		
	CATMA4A13955	cytochrome P450 family protein	↘	↗	+		+	+	+				
	CATMA5A20495	2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	↘	↗	+	+	+	+			+	+	
glycerol biosynthesis	CATMA5A12400	lipase family protein	↗	↘	+		+	+	+	+	+		+
lateral root morphogenesis	CATMA2A32790	leucinerich repeat family protein	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+		+
	CATMA5A23553	Auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	↘	↗	+	+	+		+	+	+	+	+
lignin biosynthesis	CATMA1A70050	Cinnamoyl-CoA reductase, putative	↘	↘	+	+	+	+				+	+
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+		+
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA2A39210	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	↗	↘	+		+	+	+	+	+		
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	↘	↗	+		+	+	+	+	+		
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	↘	↗			+	+	+				+
	CATMA4A27740	Caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	↘	↗	+		+	+	+	+	+	+	+
	CATMA4A36890	O-methyltransferase family 2 protein	↗	↘	+	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA4A37873	cytochrome P450 84A1 (CYP84A1) / ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A50076	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+	+	+

	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
lipid catabolism	CATMA4A31410	expressed protein	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
negative regulation of transcription	CATMA5A16500	transcription regulator NOT2/NOT3/NOT5 family protein	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A20125	expressed protein	↘	↗			+				
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	↘	↗	+	+	+	+	+		+
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	↗	↘	+		+	+	+		+
Nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	Transporter-related	↘	↗	+	+	+	+	+		+
onecarbon compound metabolism	CATMA3A23770	Adenosyl-homocysteinase, putative / S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, putative / AdoHcyase, putative	↘	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A45650	carbonic anhydrase family protein	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3oxido-squalene-triterpenoid cyclase	↘	↗	+		+	+	+		+
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxy-squalene-cycloartenol cyclase, putative / (S)2,3-epoxy-squalene mutase, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
phenylpropanoid metabolism	CATMA1A19470	4-coumarate-CoA ligase family protein / 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	↘	↗			+				
	CATMA1A54343	4-coumarate-CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	↗	↘	+		+	+			+
	CATMA3A21086	4-coumarate-CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	↘	↗	+		+	+	+		+
	CATMA4A26250	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	↘	↗			+		+		
	CATMA4A31835	NADPH-cytochrome p450 reductase, putative / NADPH-ferrihemoprotein reductase, putative	↘	↘	+	+	+	+	+	+	+
positive gravitropism	CATMA2A36420	amino acid permease, putative (AUX1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A47375	Drought-responsive family protein	↘	↗	+		+	+			+
	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA2A04295	Glycine-rich protein (GRP)	↗	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA5A23380	Dehydration-responsive protein (RD22)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
response to cold	CATMA5A11030	tubulin beta6 chain (TUB6)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A21330	tubulin beta8 chain (TUB8) (TUBB8)	↘	↗	+		+	+	+		+
response to dessication	CATMA2A35456	plasma membrane intrinsic protein 2C (PIP2C) / aquaporin PIP2.3 (PIP2.3) / water-stress induced tonoplast intrinsic protein (RD28)	↘	↘	+	+	+	+	+	+	+
response to ethylene stimulus	CATMA2A25415	Ethylene-insensitive-3-like-1 (EIL1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A03743	Hevein-like protein (HEL)	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA3A16175	AP2 domain-containing protein RAP2.3 (RAP2.3)	↘	↗			+			+	
	CATMA3A24390	Ethylene-responsive transcriptional coactivator, putative	↘	↘	+		+	+	+		

response to heat	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8CI)	↘	↘												+									
	CATMA1A48920	17.6 kDa class I heat shock protein (HSP17.6ACI)	↘	↘	+				+														+	+	
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4CI)	↘	↘					+																
	CATMA4A26885	23.6 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.6M)	↘	↘	+				+				+	+											+
	CATMA5A47350	23.5 kDa mitochondrial small heat shock protein (HSP23.5M)	↘	↘	+				+				+	+											+
	CATMA5A48515	heat shock protein 811 (HSP811) / heat shock protein 83 (HSP83)	↘	↘													+								
response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A43540	hypersensitive response protein 3 (HR3)	↗	↘												+				+	+				
	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	↗	↘	+				+				+	+							+	+		+	+
Sadenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	Sadenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	↘	↗	+				+											+			+	+	
	CATMA2A35150	Sadenosylmethionine synthetase, putative	↘	↗	+				+												+			+	+
stem cell maintenance	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	↘	↗	+				+				+	+						+	+		+	+	+

	CATMA5A59110	flavonol synthase, putative	↘ ↗	+		+				+
flower development	CATMA1A58800	no apical meristem (NAM) family protein	↗ ↘	+	+	+	+	+	+	+
galactose metabolism	CATMA1A30440	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA1A64615	isoflavone reductase, putative	↘ ↗	+	+	+		+		+
	CATMA3A00250	aldose 1-epimerase family protein	↘ ↗	+			+	+		
	CATMA3A56330	mRNA-binding protein, putative	↗ ↘	+	+	+	+	+	+	+
hyperosmotic salinity response	CATMA2A22390	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	↗ ↘	+						
	CATMA3A04913	hydrophobic protein (RCI2A) / low temperature and salt responsive protein (LTI6A)	↗ ↘	+		+	+	+		+
	CATMA4A25450	coronatine-responsive tyrosine aminotransferase / tyrosine transaminase	↗ ↘	+		+	+	+	+	+
	CATMA4A26645	ABA-responsive protein (HVA22d)	↘ ↘	+		+	+		+	
	CATMA4A32260	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	↗ ↘	+		+		+		
	CATMA4A32270	hydrophobic protein, putative / low temperature and salt responsive protein, putative	↗ ↘			+	+	+		+
ion transport	CATMA5A11380	nodulin MtN3 family protein	↗ ↘	+		+	+	+	+	+
lateral root morphogenesis	CATMA2A03130	subtilisin-like protease (AIR3)	↗ ↘	+		+	+	+	+	+
	CATMA2A32790	leucine-rich repeat family protein	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A23553	auxin-responsive protein / indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)	↘ ↗	+	+	+		+	+	+
lignin biosynthesis	CATMA1A70050	cinnamoyl-CoA reductase, putative	↘ ↗	+	+	+	+			+
	CATMA2A27560	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA2A36370	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA2A39220	cytochrome P450 98A3, putative (CYP98A3)	↘ ↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A16810	S-adenosylmethionine synthetase, putative	↘ ↗			+	+	+		+
	CATMA3A55120	O-methyltransferase family 3 protein	↘ ↗			+				
	CATMA5A12910	cinnamoyl-CoA reductase-related	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A50073	quercetin 3-O-methyltransferase 1 / flavonol 3-O-methyltransferase 1 / caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase (OMT1)	↘ ↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA5A55770	laccase, putative / diphenol oxidase, putative	↘ ↗	+		+		+	+	+
lipid transport	CATMA1A26130	lipid transfer protein-related	↗ ↘	+		+		+	+	+
	CATMA1A46320	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↗ ↘	+		+	+	+		+
	CATMA2A13890	lipid transfer protein, putative	↘ ↗	+	+	+	+	+	+	
	CATMA2A36820	nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)	↗ ↘	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A07570	lipid transfer protein 6 (LTP6)	↗ ↘	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A17820	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↘ ↗	+	+	+	+	+		+

	CATMA3A44603	nonspecific lipid transfer protein 5 (LTP5)	↗	↘	+	+				+		
	CATMA3A46940	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↘	↗	+			+	+	+	+	+
	CATMA3A51550	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↘	↗				+	+			
	CATMA4A00190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↗	↘	+	+		+	+	+		
	CATMA4A24190	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA5A05150	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	↘	↗	+	+		+	+	+		+
methionine metabolism	CATMA2A42575	methylenetetrahydrofolate reductase 2 (MTHFR2)	↘	↗	+	+		+	+	+		+
	CATMA3A52975	methylenetetrahydrofolate reductase 1 (MTHFR1)	↘	↗	+	+		+	+			+
microsporogenesis	CATMA3A49670	male sterility protein, putative	↘	↗	+	+		+	+	+		+
nitrate assimilation	CATMA1A35155	nitrate reductase 2 (NR2)	↗	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA1A66910	nitrate reductase 1 (NR1)	↗	↘	+			+	+	+		+
	CATMA5A49360	glutamate synthase (NADH), chloroplast, putative	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
nucleotide-sugar transport	CATMA2A26710	transporter-related	↘	↗	+	+		+	+	+		+
nutrient uptake	CATMA4A31820	ATPase 2, plasma membrane-type, putative / proton pump 2, putative / proton-exporting ATPase, putative	↗	↘	+			+	+	+	+	+
oligopeptide transport	CATMA1A21680	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	↗	↘	+	+		+		+	+	+
	CATMA1B39460	oligopeptide transporter OPT family protein	↗	↘	+			+	+	+		+
	CATMA2A36200	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	↘	↗	+	+		+	+	+		+
	CATMA2A38770	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	↗	↘	+	+		+	+	+		+
	CATMA3A21540	nitrate transporter (NTP3)	↗	↗	+	+		+	+	+		+
	CATMA3A26790	oligopeptide transporter OPT family protein	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA3A46920	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA5A49410	oligopeptide transporter OPT family protein	↗	↘	+			+	+	+	+	+
	CATMA5A58270	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	↘	↗	+			+		+	+	+
pentacyclic triterpenoid biosynthesis	CATMA1A68085	lupeol synthase (LUP1) / 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclase	↘	↗	+			+	+	+		+
	CATMA3A38160	cycloartenol synthase, putative / 2,3-epoxysqualene--cycloartenol cyclase, putative / (S)-2,3-epoxysqualene mutase, putative	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
phenylpropanoid metabolism	CATMA1A42782	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA1A42785	4-coumarate--CoA ligase 1 / 4-coumaroyl-CoA synthase 1 (4CL1)	↘	↗	+	+		+	+	+	+	+
	CATMA1A54343	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3	↗	↘	+			+	+			+

	CATMA3A21086	(4CL3) 4-coumarate--CoA ligase 2 / 4-coumaroyl-CoA synthase 2 (4CL2)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
positive gravitropism	CATMA2B36420	amino acid permease, putative (AUX1)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
response to abscisic acid stimulus	CATMA1A47375	drought-responsive family protein	↘	↗	+		+	+		+	+
	CATMA1A62630	protease inhibitor, putative (DR4)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
	CATMA3A55026	homeobox-leucine zipper protein 12 (HB-12) / HD-ZIP transcription factor 12	↘	↗			+	+	+	+	+
response to cold	CATMA2A40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	↗	↘	+	+	+	+		+	+
	CATMA2B40960	cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15b)	↗	↘	+	+	+	+		+	+
	CATMA4A40685	glycine-rich RNA-binding protein 8 (GRP8) (CCR1)	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A11030	tubulin beta-6 chain (TUB6)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A21330	tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	↘	↗	+		+	+	+		+
response to heat	CATMA1A06470	17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)	↘	↗				+			
	CATMA1A69105	heat shock protein, putative	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA3A39230	17.4 kDa class I heat shock protein (HSP17.4-CI)	↘	↗		+					
	CATMA4A23540	26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P)	↘	↘			+			+	+
	CATMA4A38575	heat shock factor protein 4 (HSF4) / heat shock transcription factor 4 (HSTF4)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
response to pest/pathogen/parasite	CATMA3A44640	macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein	↗	↘	+		+	+	+	+	+
response to wounding	CATMA2A37130	protease inhibitor, putative	↗	↘	+		+	+	+	+	
	CATMA2A37140	serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	↗	↘	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA3A25075	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / FK506-binding protein (ROF1)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	+
	CATMA5A13000	formate dehydrogenase (FDH)	↗	↗	+	+	+	+		+	
	CATMA5A39400	protease inhibitor, putative	↗	↘		+	+	+	+		+
S-adenosylmethionine biosynthesis	CATMA1A01480	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1)	↘	↗	+		+		+	+	+
	CATMA2A35150	S-adenosylmethionine synthetase, putative	↘	↗	+	+	+			+	+
	CATMA4A02070	S-adenosylmethionine synthetase 2 (SAM2)	↘	↗	+		+	+	+	+	+
stem cell maintenance	CATMA1A51510	homeobox protein SHOOT MERISTEMLESS (STM)	↘	↗	+	+	+	+	+	+	
sulfur metabolism	CATMA5A59495	3prim(2prim),5prim-bisphosphate nucleotidase, putative / inositol polyphosphate 1-phosphatase, putative	↗	↘	+	+	+	+	+	+	

