



HAL
open science

Aptitude du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'embryogenèse somatique : approches de physiologie cellulaire et moléculaire via l'analyse du protéome et du transcriptome

Florian Gautier

► **To cite this version:**

Florian Gautier. Aptitude du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'embryogenèse somatique : approches de physiologie cellulaire et moléculaire via l'analyse du protéome et du transcriptome. Ecologie, Environnement. Université de Limoges, 2017. Français. NNT : 2017LIMO0101 . tel-01973792

HAL Id: tel-01973792

<https://theses.hal.science/tel-01973792>

Submitted on 8 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et INRA Val de Loire

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Spécialité : Biosciences de l'environnement et de la santé

Présentée et soutenue par

Florian GAUTIER

Le 20 décembre 2017

**Aptitude du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'embryogenèse
somatique : approches de physiologie cellulaire et moléculaire *via*
l'analyse du protéome et du transcriptome**

Thèse dirigée par Dr. Marie-Anne Lelu-Walter et Dr. Guy Costa

JURY :

Président du jury

M. Vincent Gloaguen, Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Françoise Corbineau, Professeur, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6

M. Hervé Etienne, Chercheur (HDR), CIRAD Montpellier

Examineurs

Mme. Caroline Teyssier, Chargée de Recherches, INRA Orléans

M. Jean-François Trontin, Ingénieur de Recherche - Cadre E3, FCBA Bordeaux

M. Philippe Label, Directeur de Recherches, INRA Clermont-Ferrand

Mme. Marie-Anne Lelu-Walter, Directrice de Recherches, INRA Orléans

M. Guy Costa, Maître de Conférences-HDR, Université de Limoges



*“Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes,
mais celles qui s’adaptent le mieux aux changements.”*

Charles Darwin





Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la chaire d'excellence Ressources Forestières et Usages du Bois, qui est financée par la Fondation Partenariale de l'Université de Limoges, la région Limousin puis Nouvelle-Aquitaine et la Commission européenne.

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury. Dans un premier temps Françoise Corbineau et Hervé Etienne qui ont accepté le dur travail de rapporteur. Et dans un second temps, les examinateurs Caroline Teyssier, Jean-François Trontin et Philippe Label.

J'adresse mes plus grands remerciements à mes deux directeurs de thèse. Dans un premier temps ils iront à Marie-Anne Lelu-Walter pour ses connaissances et sa passion de l'embryogenèse somatique qu'elle a su me transmettre. Ainsi que les possibilités de collaboration avec d'autres chercheurs/laboratoires qui m'a notamment permis d'aller en République Tchèque et en Argentine. Ces remerciements sont adressés dans un second temps à Guy Costa, responsable de la chaire SylvaLIM, qui a permis la mise en place de cette thèse, pour son soutien et la rigueur de travail qu'il a pu me transmettre durant la rédaction du manuscrit. Cela m'a permis d'avoir un œil plus critique sur mon travail mais aussi sur la littérature.

Un grand merci à Caroline Teyssier pour avoir suivi mes travaux de près, partagé son bureau avec moi, pour ses commentaires et critiques constructifs, mais aussi sa bonne humeur. Elle a su au long de ces 3 ans supporter mon caractère ainsi que mes fautes de grammaire, me partager sa passion pour la nature (et particulièrement les Orchidées), et me soutenir dans les moments difficiles. Je te lègue mon coin à trompettes de la mort !

J'exprime toute ma gratitude à Philippe Label pour son implication, ses conseils, son soutien, la rigueur dont il a fait preuve afin de m'aider dans mes analyses de bio-informatiques, mais aussi dans le positionnement des résultats de ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Kateřina Eliášová pour m'avoir accueilli et encadré durant mon séjour en République Tchèque, pour m'avoir transmis son savoir en microscopie, d'avoir supporté à ce moment mon anglais très pauvre, mais surtout pour sa gentillesse et l'attention dont elle a fait preuve (encore merci pour les Trdelnik !).

Merci à Gilles Pilate de m'avoir accueilli au sein de l'AGPF, mais aussi à Vincent Sol au sein du LCSN, ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler et discuter au sein de ces deux laboratoires. Je m'arrêterais principalement sur les personnes qui m'ont aidé pour la réalisation des différentes expériences : Nathalie Boizot, Marie-Claude Lesage-Descauses, Véronique Laine-Prade, Camille Grand-Perret (acide/base hein :D), Françoise Laurans, Odile Rogier, et Jean-Charles Leplé. Mais aussi Jean-Charles Bastien, pour son soutien et sa passion pour le Douglas.

Je remercie aussi toutes les personnes extérieures avec qui j'ai pu travailler durant cette thèse : Particulièrement Jean-François Trontin du FCBA de Bordeaux, pour sa participation à mes comités de thèse, les réunions de travail, son aide et ses critiques sur mon travail, mais aussi la motivation qu'il a pu me transmettre sur mon travail.



Martin Vágner de l'Institut expérimental de botanique à Prague pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, ainsi que Bedřich Pešekc, Jiří Malbeck, Zuzana Vondráková et Jaroslava Špačková pour leur apprentissage et leur bonne humeur.

Stéphane Claverol de l'équipe Protéome au CGFB de Bordeaux pour les analyses de spectrométrie de masse.

Je n'oublierais pas le fond de dotation « Plantons pour l'avenir » qui m'a permis de présenter mon travail de thèse devant des professionnels, et pour le prix qui m'a été décerné lors du salon « ForestInnov » par Lionel Say du CFBL.

Je remercie particulièrement les personnes avec qui j'ai pu et profiter de la vie en dehors du Laboratoire, par nos passions et goûts musicaux : Marie et Camille. Mais aussi à toutes les autres personnes de l'AGPF encore là ou non (Thibo, Petite Salade, Baptiste, Alexandre, Yves, Céline, Vincent, Thomas, Ben, Vincent...), mais aussi du LCSN (Idelette, Zineb, Amaury, Soukaina, Florent, Guillaume, Tom, Dorothée, Christelle, Salim...)

Je remercie aussi mes amis hors laboratoire pour leur soutien : Yoann, Margo, Gougou (aussi pour ses conseils scientifiques), Aurélien, Jérôme, Rickou, Braves (oui j'avais envie), Rémi, Julie, Nico, Ben, David, Morgui, Raph...

J'aurais une pensée toute particulière pour ma famille et mes proches, et principalement Gwendoline qui partage ma vie, qui a dû subir mon départ et qui m'aura soutenu et donné la force de finir ce travail.

Et pour finir, vu que ce sont mes remerciements, je me permets de remercier ma passion pour la bière, qui aura su me motiver et orienter mes projets futurs. Mais aussi le HellFest, qui chaque année m'a fait oublier ma thèse pendant 3 jours. Pour finir merci aux musiques « Jaina theme » et « Invincible » qui auront motivé ma rédaction.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





Sommaire

Remerciements	3
Droits d’auteurs	5
Sommaire	7
Abréviations	13
Introduction Générale	15
Chapitre I. Etat de l’art	19
I.1. Le sapin de Douglas	19
I.1.1. Généralités	19
I.1.2. La place du Douglas en France	19
I.1.3. Caractéristiques botaniques du Douglas	22
I.1.4. Ecologie du Douglas	23
I.1.5. Différentes pathologies du Douglas	23
I.1.6. La reproduction sexuée du Douglas	23
I.1.6.1. La pro-embryogenèse	25
I.1.6.2. L’embryogenèse précoce	26
I.1.6.3. L’embryogenèse tardive	26
I.1.6.4. La maturation	27
I.1.7. L’amélioration du Douglas en France	28
I.2. Les techniques de multiplication végétative chez le Douglas	31
I.2.1. Le bouturage horticole	31
I.2.2. Le greffage horticole	32
I.2.3. L’embryogenèse somatique.....	32
I.2.4. L’embryogenèse somatique du Douglas.....	33
I.2.4.1. Initiation/induction de masses embryogènes (ME).....	35
I.2.4.2. Multiplication des ME.....	36
I.2.4.3. Cryoconservation	36
I.2.4.4. Maturation des embryons somatiques.....	37
I.2.4.5. Germination – Plantes - Acclimatation.....	38
I.2.4.6. L’embryogenèse somatique secondaire	38
I.2.4.7. Avantages et limites de l’embryogenèse somatique	39
I.3. Caractéristiques des cultures embryogènes de conifères (ME).....	40
I.3.1. Les glucides	40
I.3.2. Les régulateurs de croissance	42
I.3.2.1. L’acide indole-3-acétique (AIA)	42
I.3.2.2. L’acide abscissique (ABA).....	42
I.3.2.3. Les cytokinines (CKs)	43
I.3.2.4. Autres régulateurs : éthylène, gibbérelline (GA) et acide jasmonique (JA)	46
I.4. Caractéristiques moléculaires des cultures embryogènes	46
I.4.1. Régulation biologique de l’information génétique	50
I.4.1.1. Facteurs de transcription et gènes homéotiques	50
I.4.1.1.1. Gènes Leafy Cotylédon (LEC)	50
I.4.1.1.1.1. LEC1	51
I.4.1.1.1.2. LEC2	51

I.4.1.1.2. Agamous-like (AGL).....	51
I.4.1.1.3. WUSHEL (WUS) et WUSCHEL-related homeobox (WOX)	52
I.4.1.1.4. AP2/ERF (Apetala 2/Ethylene Response factor)	52
I.4.1.1.4.1. SERF1	52
I.4.1.1.4.2. ERF022.....	53
I.4.1.1.5. MYB.....	53
I.4.1.1.6. Les protéines d'abondance tardive (LEA)	53
I.4.1.2. Processus de l'information génétique	53
I.4.1.2.1. Les micro ARN (miRNA)	54
I.4.1.2.2. 60s et 40s ribosomal protein.....	54
I.4.1.2.3. Histones désacétylases (HDAC)	54
I.4.1.2.4. Protéines chaperonnes	54
I.4.1.2.4.1. Elongation factor	55
I.4.1.2.4.2. Heat shock proteins (HSP).....	55
I.4.2. Réponse au stress	55
I.4.2.1. Glutathione S-transferase (GST)	55
I.4.2.2. Cytochrome P450 (CYP P450).....	56
I.4.2.3. Ascorbate peroxidase (APX)	56
I.4.3. Processus du métabolisme.....	56
I.4.3.1. Adénylate kinase	57
I.4.3.2. Triosephosphate isomérase.....	57
I.4.4. Processus cellulaires.....	57
I.4.4.1. Tubuline et actine	57
I.4.4.2. SEPR	58
I.4.4.3. ADP-ribosylation/GTPase-activating proteins (ARF-GAP)	58
I.4.4.4. Metacaspase (MC).....	58
I.4.4.5. Germines-like proteins (GLP)	58
I.4.5. Transport et stockage	59
I.4.5.1. Nodulin-like intrinsic protein (NIP)	59
I.4.5.2. Lipid-transfer proteins (LTP)	59
I.4.5.3. Vicilin.....	59
I.5. Méthodes d'étude de la physiologie moléculaire.....	60
I.5.1. Analyses de Protéomique	61
I.5.1.1. Etape d'ionisation.....	61
I.5.1.2. Etape d'analyse de la masse	62
I.5.1.3. La détection et la détermination des peptides	64
I.5.2. Analyses de Transcriptomique	65
I.5.2.1. Préparation	65
I.5.2.2. Séquençage.....	65
I.6. L'embryogenèse somatique du Douglas aujourd'hui : problématiques et objectifs.....	67
Chapitre II. Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique.....	71
II.1. Présentation de la problématique	71
II.2. Extended Abstract : Gautier <i>et al.</i> (2017): What is the best way to maintain embryogenic capacity of embryogenic lines initiated from Douglas-fir immature embryos ?	74
II.3. Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique : analyses cytologiques, biologiques, biochimiques et moléculaires	79
II.4. Matériels et méthodes de la thèse.....	79

II.4.1. Matériel Végétal	79
II.4.2. Multiplication	80
II.4.3. Maturation	80
II.4.4. Mesure de la teneur en eau.....	80
II.4.5. Préparations histologiques et observations microscopiques (réalisées au laboratoire de Botanique Expérimentale de Prague)	82
II.4.5.1. Préparation de blocs de paraffine	82
II.4.5.2. Coloration des coupes	82
II.4.6. Dosage des sucres solubles et de l'amidon.....	83
II.4.7. Dosage des régulateurs de croissance (réalisé au laboratoire de Botanique Expérimentale de Prague)	84
II.4.7.1. Extraction.....	84
II.4.7.2. Purification des extraits hormonaux	84
II.4.7.3. Détermination de l'ABA par GC-MS.....	85
II.4.7.4. Détermination des autres hormones par LC-MS	85
II.4.8. Protéomique.....	85
II.4.8.1. Extraction des protéines solubles	85
II.4.8.2. Séparation et purification des protéines (Etape réalisée par la plateforme de protéomique de Bordeaux)	86
II.4.8.3. Analyse en spectrométrie de masse du protéome (Etape réalisée par la plateforme de protéomique de Bordeaux)	86
II.4.9. Transcriptomique	87
II.4.9.1. Extraction des ARN totaux	87
II.4.9.2. Quantification et qualification des ARN totaux	87
II.4.9.3. Séquençage	87
II.4.9.4. Nettoyage des données	87
II.4.10. Annotations et analyses fonctionnelles par Gene Ontology (termes GO).....	88
II.4.11. Analyses statistiques	88
II.5. Résultats	90
II.5.1. Comparaisons biologiques des ME et NE.....	90
II.5.2. Comparaisons morphologiques, et histologiques des ME et NE de Douglas	92
II.5.3. Comparaisons biochimiques des ME et NE de Douglas	94
II.5.3.1. Teneur en eau	94
II.5.3.2. Teneur en sucres solubles, amidon, et protéines totales	95
II.5.3.2.1. Sucres solubles.....	95
II.5.3.2.2. Amidon	95
II.5.3.2.3. Protéines totales	96
II.5.3.3. Régulateurs de croissance	97
II.5.3.3.1. Auxines et acide abscissique	97
II.5.3.3.2. Cytokinines	97
II.5.4. Comparaisons moléculaires des ME et NE de Douglas	100
II.5.4.1. Analyse des résultats de protéomique	100
II.5.4.1.1. Analyse fonctionnelle.....	100
II.5.4.1.2. Surreprésentation des termes GO	105
II.5.4.2. Analyse des résultats de transcriptomique.....	106
II.5.4.2.1. Analyse fonctionnelle.....	106
II.5.4.2.2. Surreprésentation des termes GO	109
II.5.4.2.3. Découverte de certains transcrits	110



II.5.4.3. Analyse des accessions conjuguées des données de protéomique et de transcriptomique.....	112
II.5.4.3.1. Analyse fonctionnelle.....	112
II.5.4.3.2. Surreprésentation des termes GO.....	112
II.6. Discussion.....	115
II.6.1. Quels sont les caractéristiques biologiques liées à l'aptitude à l'embryogenèse ?.....	115
II.6.2. Relation entre marqueurs biochimiques et aptitude à l'embryogenèse.....	117
II.6.2.1. Sucres solubles, amidon et protéines totales.....	117
II.6.2.1.1. Teneur en sucres solubles.....	117
II.6.2.1.2. Teneur en amidon.....	117
II.6.2.1.3. Marqueurs moléculaires.....	118
II.6.3. Existe-t-il des régulateurs de croissance caractéristiques de l'aptitude à l'embryogenèse ?.....	118
II.6.3.1. Auxines.....	118
II.6.3.2. Cytokinines.....	119
II.6.3.3. Acide abscissique.....	120
II.6.4. Quels sont les marqueurs moléculaires caractéristiques de l'aptitude à l'embryogenèse ?.....	121
II.6.4.1. Rapprochement du protéome et du transcriptome.....	123
II.6.4.1.1. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des ME de Douglas.....	123
II.6.4.1.1.1. Régulation de l'information génétique.....	123
II.6.4.1.1.2. Processus cellulaires.....	124
II.6.4.1.2. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des NE de Douglas.....	125
II.6.4.1.2.1. Réponse aux stimuli.....	125
II.6.4.1.2.2. Processus cellulaires.....	127
II.6.4.1.2.3. Processus métaboliques.....	128
II.6.4.2. Marqueurs présents dans le transcriptome, et régulant l'acquisition de la capacité embryogénèse.....	129
II.6.4.3. Marqueurs présents dans le transcriptome, caractérisant l'état non-embryogène.....	133
II.7. Bilan.....	134

Chapitre III. Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in propagated embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]..... 139

III.1. Présentation de la problématique.....	139
III.2. Lelu-Walter <i>et al.</i> (in press): High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in <i>Pseudotsuga menziesii</i> [Mirb.].....	142
III.3. Gautier <i>et al.</i> (to be Submitted) : Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in propagated embryogenic lines of <i>Pseudotsuga menziesii</i> [Mirb.].....	162
III.4. Résultats complémentaires : évolution du transcriptome entre lignées I et II.....	215
III.4.1. Analyse fonctionnelle.....	215
III.4.2. Surreprésentation des termes GO.....	218
III.5. Discussion autour de l'évolution du transcriptome des lignées II de Douglas.....	221
III.5.1. Comparaison lignées II versus lignées I des identifiants communs entre le protéome et le transcriptome.....	221
III.5.1.1. Processus métaboliques.....	221
III.5.1.2. Régulation de l'information génétique et métabolisme des protéines.....	221
III.5.1.3. Transport.....	222

III.5.2. Marqueurs présents dans le transcriptome, et régulant le potentiel embryogène	223
III.5.2.1. Régulation de l'information génétique.....	223
III.5.2.1.1. Régulation de la transcription et de la traduction	223
III.5.2.1.2. Expression des gènes	224
III.5.2.2. Processus cellulaires	225
III.5.2.3. Processus métaboliques	226
III.6. Bilan.....	227
Chapitre IV. Discussion générale.....	231
IV.1. La caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse du Douglas.....	231
IV.1.1. Les processus cellulaires, marqueurs de l'état embryogène des ME	233
IV.1.1.1. La division.....	233
IV.1.1.2. Réorganisation cellulaire et expansion	234
IV.1.1.3. La différenciation cellulaire.....	234
IV.1.2. Le stockage d'amidon et la réponse aux stimuli : un marqueur de l'état non-embryogène des NE.....	235
IV.2. La caractérisation des modifications cellulaires et protéiques induites lors de la répétition d'un cycle d'embryogenèse somatique chez le Douglas.....	236
IV.2.1. Les variations structurelles des embryons somatiques, marqueurs de l'augmentation du potentiel embryogène	237
IV.2.2. Les processus cellulaires, marqueurs de l'augmentation du potentiel embryogène	237
Chapitre V. Conclusions et perspectives.....	241
V.1. Conclusions	241
V.2. Perspectives	243
Références bibliographiques.....	247
Annexes	281
Table des illustrations	323
Table des tableaux.....	328



Abréviations

I : Lignée primaire

II : Lignée secondaire

III : Lignée tertiaire

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophenoxyacétique

ABA : Acide abscissique

ABA-GE : ABA glucose ester

ACN : Acétonitrile

ACP : Analyse en composantes principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AIB : Acide indole butyrique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BA : Benzyladénine

CKs : Cytokinines

ES : Embryon somatique

EZ : Embryon zygotique

FCBA : l'Institut Technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement

Fru : Fructose

GA : Gibbérelline

Gal : Galactose

GC/MS-MS : Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Glc : Glucose

GO : Gene Ontology

IAA : Acide indole 3-acétique

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

iP : Isopentenyladenine

IPA : Isopentenyladenosine



IRSTEA : Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

IUFRO : International Union of Forest Research Organizations

JA : Acide jasmonique

LC-MS/MS : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

MAAPRAT : Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire

ME : Masse embryogène

MF : Masse fraîche

MIT : Mitose

MS : Masse sèche

NE : Cal non-embryogène

ONF : Office National des Forêts

PCD : Mort cellulaire programmée (Programmed cell death)

PH : Composés phénoliques

PSME : *Pseudotsuga menziesii*

RFO : Raffinose Family Olygosaccharides

ROS : Reactive oxygen species

S: Suspenseur

SDS : Dodécylsulfate de sodium

TCA : Tricarboxylic acid / cycle de Krebs

TCR : Taillis à courte rotation

TM : Tête méristématique

Z : Zéatine



Introduction Générale

L'augmentation de la population mondiale entraîne une hausse de la demande actuelle en bois. Les besoins futurs de cette ressource vont nécessiter une adaptation de la production forestière, avec l'utilisation de variétés génétiquement améliorées afin de maximiser la productivité des forêts, mais aussi la résistance au changement climatique qui est actuellement un enjeu majeur. Trouver de meilleures méthodes de propagation va devenir primordial, notamment car la multiplication classique en masse est très lente, du fait d'un cycle biologique rallongé chez les arbres, mais aussi puisque le potentiel génétique du futur arbre est inconnu quand la propagation se fait par graine (brassage génétique par fécondation sexuée). L'utilisation d'une multiplication végétative puissante pourrait permettre à terme d'accélérer les schémas de sélections, mais aussi de diffuser de nouvelles variétés répondant aux besoins industriels et écologiques. Les résineux sont actuellement très utilisés pour la foresterie mondiale (pin maritime, pin taeda, épicéa, Douglas...), et l'essor du Douglas en France au vu des multiples avantages de son bois, en font une essence d'intérêt.

En 100 ans, le Douglas est devenu la seconde essence utilisée après le pin maritime pour le reboisement des forêts françaises. Même si le pays est en autosuffisance en termes de quantité de graines produites, les problèmes majeurs impactant les récoltes sont le faible taux de germination de l'espèce, mais également l'ancienneté des vergers français (1989 pour les plus récents). Le Douglas est actuellement multiplié par voie végétative *via* le greffage ou le bouturage horticole. Ces méthodes limitent l'obtention de plants (vieillesse des pieds mères, faible nombre de copies par individu et taux d'enracinement (de la Goublaye et Franclet 1978, Bastien *et al.*, 2013), mais limitent aussi la possibilité de l'utilisation de tests clonaux qui permettent d'étudier la valeur génétique d'un individu. La mise au point d'une méthode de multiplication végétative performante répondant à ces limites est crucial dans l'avenir de la foresterie française. L'embryogenèse somatique est connue pour être la méthode de culture *in vitro* la plus performante pour la propagation clonale des arbres forestiers (Lelu-Walter *et al.*, 2013). Elle s'affranchit également de toutes les limitations des autres techniques précédemment détaillées. Chez les conifères, cette méthode puissante de multiplication végétative n'est cependant à ce jour obtenue qu'à partir d'un matériel très juvénile (graine, Trontin *et al.*, 2016a). L'obtention de l'embryogenèse somatique à partir de matériel âgé, et donc aux caractéristiques connues (croissance, qualité du bois, tolérance au stress hydrique), est un besoin urgent car les arbres sélectionnés sont la cible des améliorateurs forestiers. Pour cela nous souhaitons trouver des marqueurs/indicateurs de l'embryogenèse.

L'objectif de ce travail de thèse est de caractériser l'aptitude à l'embryogenèse somatique du Douglas à travers deux questions :

1- Quels sont les mécanismes cellulaires, biochimiques et moléculaires liés à l'aptitude à l'embryogène du Douglas ? Certaines lignées embryogènes de Douglas, produisent spontanément du cal non-embryogène (**NE**, Gautier *et al.*, 2017), qui est un fait propre à cette espèce (Lelu-Walter communication personnelle). La présence simultanée de masses embryogènes (**ME**) et de **NE** est un matériel de choix pour la caractérisation de l'état embryogène, les **NE** constituant le contrôle « négatif ». Cependant la capacité des **ME** en multiplication à donner du **NE** (d'origine inconnue), peu traduire une certaine hétérogénéité des

lignées. C'est pourquoi, nous avons décidé de réinitier l'embryogenèse somatique à partir d'embryons somatiques (ES) cotylédonaire. Des ES cotylédonaire matures ont été placés sur milieu d'induction. Certains ES ont développé à la fois des **ME** et des cals **NE**. Isolées et mises en multiplication, ces lignées prolifèrent. Nous disposons donc de lignées secondaires isogéniques (**ME** vs **NE**) stables, en multiplication. La prolifération des cals **NE** consiste en une croissance *sensu stricto* alors que celle des **ME** consiste en une division d'ES immatures (par clivage, polyembryogenèse). Nous avons étudié trois lignées embryogènes et leurs cals **NE** suivant différentes approches : morphologiques et cytologiques (macroscopie et microscopie), cellulaires (potentiel embryogène et teneur en eau), biochimiques (teneur en glucides, protéines totales et régulateurs de croissance) et moléculaires (protéomique et transcriptomique).

2- Les lignées sont caractérisées par leur potentiel embryogène, c'est à dire par leur capacité à régénérer des ES cotylédonaire. Ce potentiel embryogène (= nombre ES g⁻¹ MF) est variable entre les lignées comme démontré chez le mélèze hybride (Lelu-Walter et Pâques, 2009). Chez le Douglas cette variabilité d'ordre génétique existe avec des lignées très embryogènes (2000-3000 ES g⁻¹ MF) à des lignées peu embryogènes (30 ES g⁻¹ MF, Lelu-Walter *et al.*, in press). Un des moyens d'améliorer le potentiel embryogène, est d'initier l'embryogenèse somatique secondaire. Les lignées secondaires ont un potentiel embryogène équivalent voire très nettement supérieur à celui des lignées primaires (d'origine) comme précédemment rapporté pour le mélèze hybride (Lelu *et al.*, 1994) et le pin maritime (Klimaszewska *et al.*, 2009). Récemment observé chez le Douglas (Lelu-Walter *et al.*, in press), cette propriété n'a jamais été étudié. C'est pourquoi nous nous proposons d'étudier, à travers la cytologie/histologie, la biologie cellulaire, la biochimie et la biologie moléculaire, les mécanismes impliqués dans l'augmentation du potentiel embryogène, lors de la répétition de l'embryogenèse somatique, à partir de lignées peu ou moyennement embryogènes.

Ces deux approches intégratives à travers ces questions sont originales et innovantes par les analyses proposées et par les techniques très performantes mises en œuvre. Une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires liés à l'aptitude à l'embryogenèse somatique nous aidera pour progresser vers l'initiation d'embryons somatiques à partir de tissus d'arbres âgés qui sont la véritable cible de l'améliorateur. En effet, cela permettra la multiplication d'arbres aux performances attestées et mesurées (croissance, qualité du bois, tolérance au stress hydrique).



Chapitre I – Etat de l’art





Chapitre I. Etat de l'art

I.1. Le sapin de Douglas

I.1.1. Généralités

Découvert par A. Menzies en 1792, le Douglas *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco est un conifère appartenant à la division des gymnospermes et à la famille des *Pinaceae*. Originaire d'Amérique du Nord (de la côte de l'océan Pacifique, depuis la Californie jusqu'à la Colombie-Britannique, au Canada, **Figure I.1**), c'est l'une des espèces cultivées les plus importantes dans le Pacifique Nord-Ouest, où il représente environ 12,8 % du volume total de bois sur pieds aux États-Unis (<http://www.fia.fs.fed.us>). Le bois du Douglas est recherché en raison de sa forte résistance mécanique, pour sa durabilité et son imputrescibilité naturelle. En termes de volume par hectare, les Douglas sont considérés comme les conifères les plus productifs aux États-Unis, avec environ 34,6 millions d'hectare d'arbres de Douglas gérés principalement dans les peuplements naturels aux États-Unis et au Canada (<http://www2.wvpa.org/WESTERNSPECIES/DouglasFir/tabid/405/default.aspx>). Le Douglas est composé de deux sous-espèces : le Douglas vert (*Pseudotsuga menziesii* ssp. *menziesii*) et le Douglas bleu (*Pseudotsuga menziesii* ssp. *glauca*), qui sont toutes les deux physiologiquement, morphologiquement, et chimiquement différentes (Hermann et Lavender, 1999). La variété *glauca* occupe des sites essentiellement secs et froids. Les peuplements de cette variété de Douglas s'étendent jusqu'au Mexique (**Figure I.1**). Il est suggéré, sur la base d'une étude de phylogénie moléculaire à partir de microsatellites, que les Douglas présents au sud des USA résulteraient d'une migration de population du nord vers le Mexique au Pléistocène (Gugger *et al.*, 2011).

Le Douglas a été introduit en Europe en 1827 par Sir D. Douglas, botaniste écossais. Les premiers Douglas ont été plantés en France comme arbre d'ornement dans des parcs et jardins. Grâce à sa remarquable capacité d'adaptation aux stations de moyenne altitude du centre de la France, cette espèce devient forestière à la fin du 19^{ème} siècle. Aujourd'hui, le Douglas est l'une des principales essences résineuses de reboisement des forêts françaises et ceci s'est amplifié depuis les dernières tempêtes (exemple de 1999). Cette espèce est facile à planter, a une croissance rapide, et résiste à la plupart des insectes et des maladies, ce qui en fait une culture forestière idéale (Howe *et al.*, 2006).

I.1.2. La place du Douglas en France

Les peuplements de Douglas en France s'étendent sur 420 000 hectares, principalement dans le Massif Central, en Normandie, en Alsace-Lorraine et en Champagne-Ardenne (**Figure I.2**). A la fin des années 1990, la douglaseraie française représentait moins de 5 % de la production nationale. En 2012, c'est environ 98 millions de m³ de Douglas sur pied qui ont été produits, pour un accroissement biologique annuel supérieur à 5 millions de m³. Durant l'année 2015-2016, le Douglas a été la seconde essence la plus vendue après le pin maritime (**Tableau I.1**). Son bois est principalement utilisé pour des usages tels que la charpente, mais aussi pour le bois

collé, en bardage ou en terrasse. C'est un matériau de construction par excellence, dû à ses très bonnes propriétés mécaniques et sa durabilité naturelle élevée, celles-ci augmentant avec l'âge des arbres. En le comparant aux autres conifères utilisés en France, il a été montré que quel que soit la largeur des cernes de Douglas, cette essence avait un module d'élasticité (résistance à la déformation) nettement supérieur aux autres espèces de conifères, comme le pin maritime, le pin sylvestre et l'épicéa (**Figure I.3**).

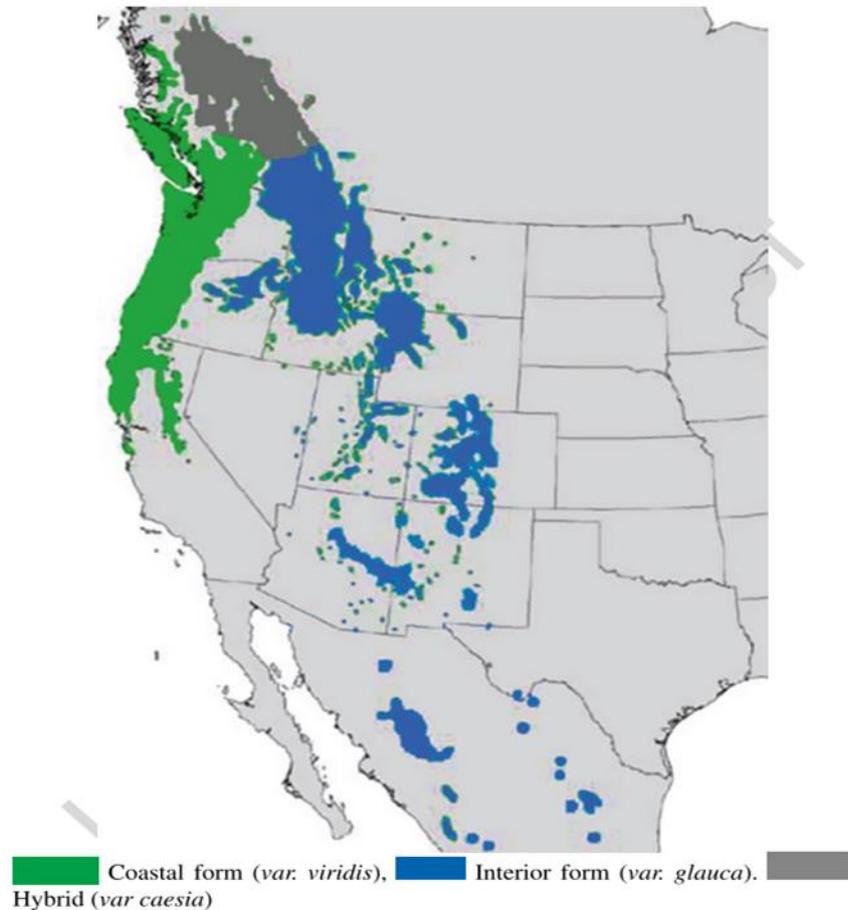


Figure I.1 Aire de répartition naturelle du Douglas vert (vert), du Douglas bleu (bleu) et de l'hybride (gris foncé) sur la côte ouest des Etats Unis. Source Bastien *et al.*, (2013).

Tableau I.1 Classement des 10 espèces forestières les plus vendues en nombre de plants. Extrait des résultats de l'enquête statistique annuelle MAAPRAT/IRSTEA sur les ventes de plants forestiers pour la campagne de plantation 2015-2016. *TCR = taillis à courte rotation.*

Rang 2014-2015	Espèces les plus vendues* (hors matériels destinés aux TCR)	Ventes en France 2015-2016	Rappel Ventes en France 2014-2015	Variation France	Export 2015-2016	Rappel Export 2014-2015	Variation Export	TOTAL ventes (France+Export) 2015-2016	TOTAL ventes (France+Export) 2014-2015	Variation France+Export
1	<i>Pinus pinaster</i>	41 141 731	44 233 019	-7%	1 500	250	+500%	41 143 231	44 233 269	-7%
2	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	10 215 538	8 168 408	+25%	555 200	1 140 250	-51%	10 770 738	9 308 658	+16%
3	<i>Quercus petraea</i>	3 679 354	3 229 136	+14%	10 550	72 350	-85%	3 689 904	3 301 486	+12%
4	<i>Picea abies</i>	2 621 812	2 588 362	+1%	77 375	200 000	-61%	2 699 187	2 788 362	-3%
5	<i>Pinus taeda</i>	2 511 735	1 618 474	+56%	6 000	0		2 517 735	1 618 474	+56%
6	<i>Abies nordmanniana</i>	1 545 012	1 427 769	+8%	174 100	75 700	+130%	1 719 112	1 503 469	+14%
7	<i>Pinus sylvestris</i>	1 081 808	938 126	+15%	8 150	17 000	-52%	1 089 958	955 126	+14%
8	<i>Picea sitchensis</i>	993 321	1 025 165	-3%	5 000	170 400	-97%	998 321	1 195 565	-16%
9	<i>Larix decidua</i>	984 124	995 267	-1%	0	28 830	-100%	984 124	1 024 097	-4%
10	<i>Pinus nigra var. corsicana</i>	910 453	917 063	-1%	43 400	11 725	+270%	953 853	928 788	+3%



Figure I.2 Aire de répartition du Douglas en France d'après « Le Douglas, un choix pour la construction » (France Douglas, 2012).

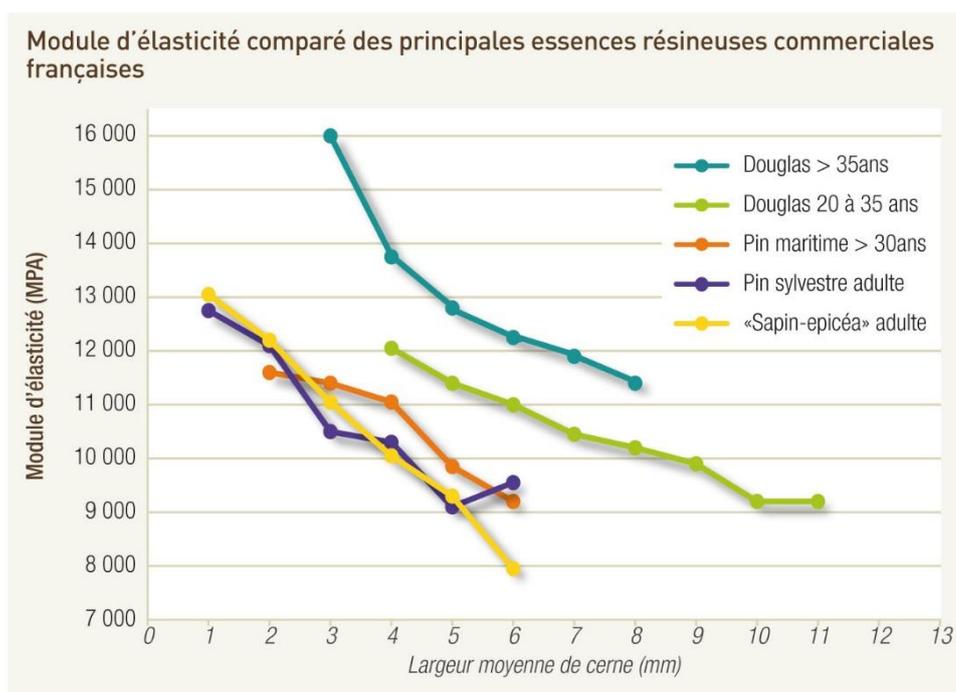


Figure I.3 Comparaison du module d'élasticité des principales essences résineuses commerciales françaises (pin maritime, Douglas, pin sylvestre et épicéa).

I.1.3. Caractéristiques botaniques du Douglas

Espèce sempervirente (à feuillage persistant), le Douglas possède une grande longévité (400 à 500 ans), et une croissance très rapide. Pouvant mesurer entre 40 et 50 m en Europe, il atteint jusqu'à 120 mètres pour 1400 ans dans les meilleures stations forestières de son aire d'origine (Hermann et Lavender, 1999). C'est un arbre avec une cime pointue (**Figure I.4 A**), ne s'aplatissant que tardivement. Ses branches longues et tombantes sont disposées en verticilles. Il est pourvu de petites aiguilles fines, aplaties, vertes pâles avec deux bandes blanches sur la face inférieure et vertes brillantes sur la face supérieure. Les aiguilles (**Figure I.4 B**), sont douces au toucher, et très odorantes. Les bourgeons sont nombreux, longs, brun-rouges et luisants (**Figure I.4 C**). Les cônes pendants, de 5 à 12 cm de long sont pourvus de bractées trifides (caractéristique de l'espèce) dépassant des écailles (**Figure I.4 D**). L'écorce varie avec l'âge de l'arbre, elle est mince et lisse, grise-brune avec la présence de poches de résines pour un jeune arbre, et épaisse, liégeuse, brune-rougeâtre et écailleuse pour un arbre plus âgé (**Figure I.4 E**). Le bois de Douglas possède un duramen caractéristique rose-saumon à brun-rougeâtre (**Figure I.4 F**), et un aubier plus pâle bien différencié.

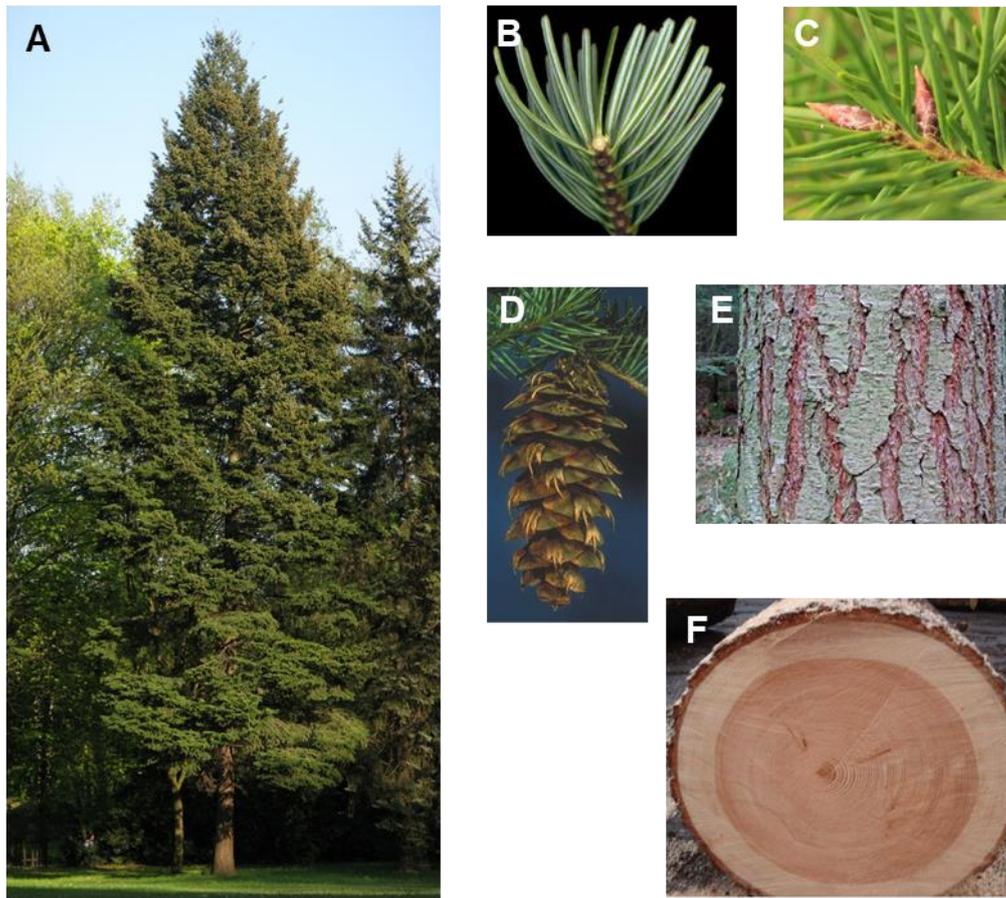


Figure I.4 Caractéristiques botaniques du Douglas. A : arbre entier ; B : aiguilles ; C : bourgeons végétatifs ; D : cône femelle ; E : écorce ; F : couleur du bois.

I.1.4. Ecologie du Douglas

C'est une espèce acceptant les terrains humides et aérés. Elle croît très bien sur sols caillouteux, même superficiels, où l'enracinement est profond (grâce à ses racines pivotantes). Le Douglas est une essence très plastique, qui va donc facilement s'adapter à différents terrains. Il a besoin d'au moins 700 mm d'eau par an, mais supporte les sécheresses estivales grâce à son système racinaire profond, bien développé, ainsi qu'au maintien des fonctions physiologiques jusqu'à un potentiel hydrique très bas. C'est aussi une essence très sensible à la concurrence, ce qui requiert des éclaircies régulières au sein des peuplements.

I.1.5. Différentes pathologies du Douglas

Malgré sa forte résistance aux pathogènes, le Douglas est tout de même sujet à différentes pathologies. La plus répandue, qui cause le plus de dommages est induite par un champignon pathogène, le tramète du pin (*Phellinus pini*). Outre ce champignon, le Douglas peut être parasité par un hémiparasite végétal, le gui nain (*Arceuthobium Douglasii*), capable à la fois de synchroniser sa croissance sur celle du Douglas tout en envahissant le bourgeon apical. Il existe aussi plusieurs espèces d'insectes pathogènes des cônes de Douglas, mais seuls certains entraînent des dégâts importants pour la récolte. Il y a en premier lieu le *Megastigmus spermotrophus* (Chalcide), introduit avec le Douglas en Europe, dont la larve se développe à l'intérieur de la graine, sans aucun signe extérieur de sa présence. Mais également les vers (*Dioryctria abietivorella*) et les mites (*Barbara colfaxiana*) des cônes de Douglas, les moucheron (*Contariana oregonensis*), qui vont détruire la graine et empêchent l'ouverture normale du cône rendant la récolte par l'homme impossible. Et pour finir, le coléoptère *Dendroctonus pseudotsugae* qui est un insecte destructeur des vieux peuplements de Douglas dans son aire d'origine.

I.1.6. La reproduction sexuée du Douglas

Le Douglas est une espèce monoïque (organes reproducteurs mâles et femelles portés par le même individu) qui commence à produire des graines entre 7 et 10 ans d'âge et dont la production, initialement très irrégulière, se stabilise au-delà de 20 ans (Stein et Owston, 2002). Une des conséquences de cette variabilité de production, est la faible productivité des vergers à graines français, où seulement 25 % des arbres produisent suffisamment de graines. Les fleurs, ou strobiles mâle et femelle, se forment l'année précédente de mars à avril (**Figure I.5**). La fécondation se fait au mois de juin, donnant par la suite un cône immature au cours du mois de juillet. Les cônes deviennent matures de mi-août à mi-septembre, les bractées virent alors au brun. La tombée des graines survient peu après l'effet des chaleurs d'été, qui entraînent la déhiscence des écailles et la libération des graines ailées. L'aptitude à germer des graines va varier en fonction de la période de leur dissémination. Elle sera à son maximum en automne puis déclinera rapidement durant l'hiver et le printemps. La vente de graine de Douglas nécessite de ce fait la collecte des cônes 2 mois avant la dissémination des graines. La libération des graines nécessite alors le ressuyage des cônes afin de réduire au maximum l'humidité interne avant leur passage dans des sècheries (exemple : sécherie de la Joux, Jura).

Chez les gymnospermes, la formation de l'embryon et de la graine se fait en différentes étapes. Le développement embryonnaire est lui-même divisé en quatre phases (Singh 1978) (**Figure I.6**) :

1-pro-embryogenèse : depuis la fécondation jusqu'à avant l'allongement du suspenseur.

2-embryogenèse précoce : depuis l'allongement du suspenseur et avant la mise en place l'établissement du méristème racinaire.

3-embryogenèse tardive : mise en place des méristèmes racinaire et caulinaire, ainsi que le développement de l'embryon au stade cotylédonaire.

4-maturation : englobant l'accumulation des réserves, la réduction du métabolisme interne pour aboutir à la déshydratation.

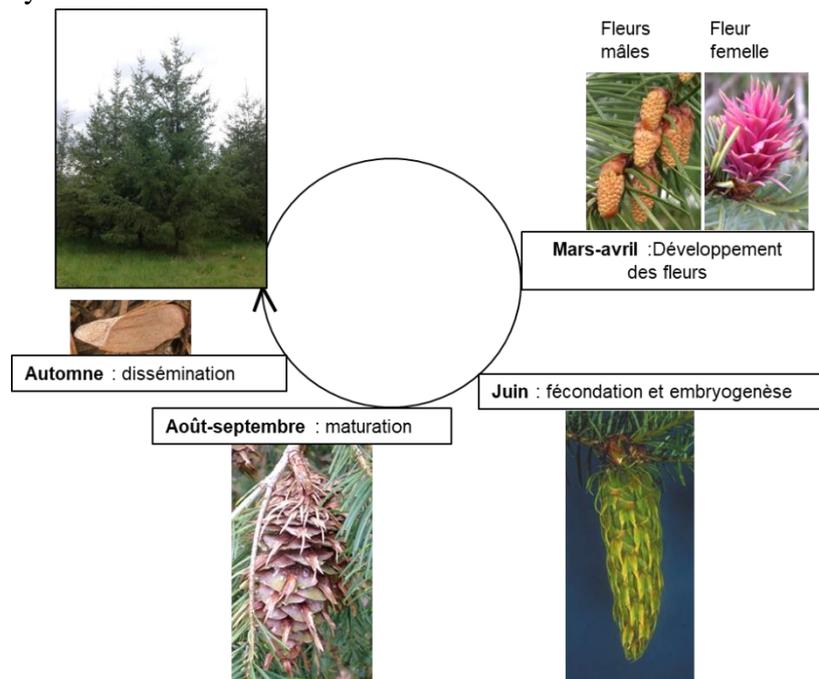


Figure I.5 Cycle de reproduction du Douglas. Mars-avril mise à fleur, pollinisation, pour finir en automne avec la dissémination des graines matures. Photos : Florian Gautier.

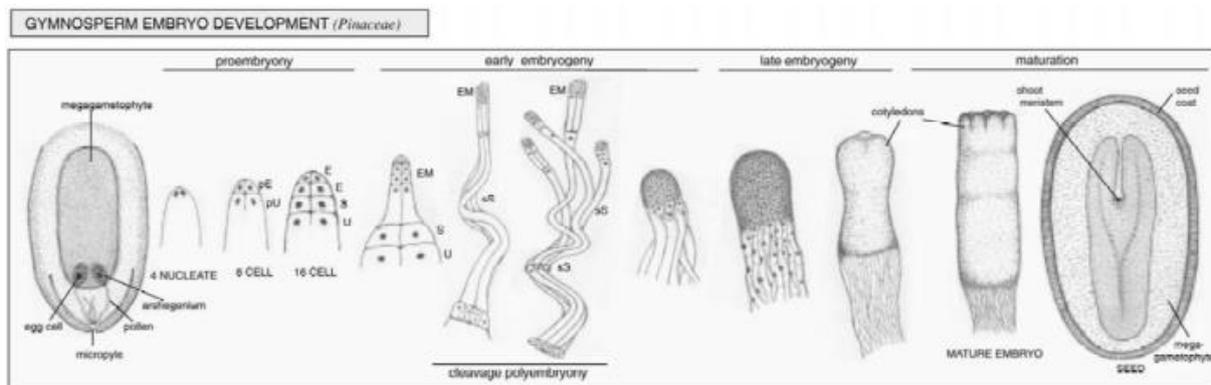


Figure I.6 Représentation schématique du développement de l'embryon zygote (EZ) chez la famille des *Pinaceae* : 4 stades : pro embryogenèse, l'embryogenèse précoce, l'embryogenèse tardive et la maturation. *pU* : partie supérieure primaire, *pE* : partie embryonnaire primaire, *E* : partie embryonnaire, *S* : suspenseur, *U* : partie supérieure, *EM* : tête embryonnaire, *sS* : suspenseur secondaire (von Arnold *et al.*, 2002).

I.1.6.1. La pro-embryogenèse

Chaque strobile femelle est fait de quelques dizaines d'écaillés ovulifères portant chacune à sa face supérieure deux ovules basaux. L'ovule est constitué du nucelle central entouré d'un tégument percé en un point, le micropyle, dont toutes les structures sont diploïdes. Au sein du nucelle apparaît par méiose une cellule plus grande que les autres : la mégaspore. Par division, cette mégaspore haploïde produit une masse ovoïde correspondant à un gamétophyte femelle. Par conséquent chez les gymnospermes, le tissu nutritif de l'embryon (endosperme ou mégagamétophyte) est haploïde (Dogra 1978). Les mégagamétophytes sont constitués d'un à quatre archégonies possédants chacun une oosphère, ou gamète femelle. La fécondation pouvant se produire dans chacun des archégonies, le mégagamétophyte peut donc initialement renfermer plusieurs zygotes (**Figure I.7**). Ce phénomène est appelé polyembryogenèse simple (Dogra 1978). Chaque zygote nouvellement formé subit une première division mitotique (**Figure I.8, 4**), puis une seconde, conduisant à la formation d'une cellule coenocytique à 4 noyaux (**Figure I.8, 5**). Les noyaux vont migrer vers la base du pro-embryon (**Figure I.8, 6**), où une phase de cytotdiérèse permettra de former deux couches de cellules (**Figure I.8, 7-8**), qui vont par la suite, constituer le pro-embryon primaire (**Figure I.8, 9**). Les divisions internes qui suivront, formeront quatre couches cellulaires. Le premier niveau (pE) se divisera pour former l'embryon (E), et le second (pU) formera le suspenseur primaire (S) (**Figure I.8, 10-11**) (Dogra 1967; Singh 1978), ce qui donnera comme structure finale le pro-embryon secondaire.

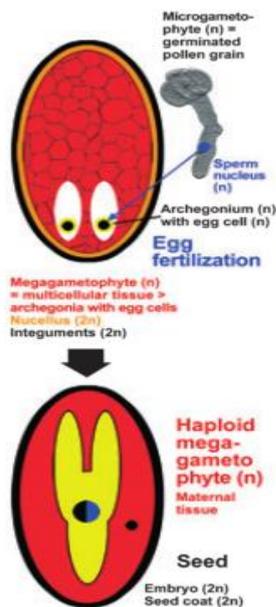


Figure I.7 Structure des graines de gymnospermes : (A) multiples fécondations, (B) megagamétophyte tissu haploïde, nutritif de l'embryon zygote (Linkies *et al.*, 2010).

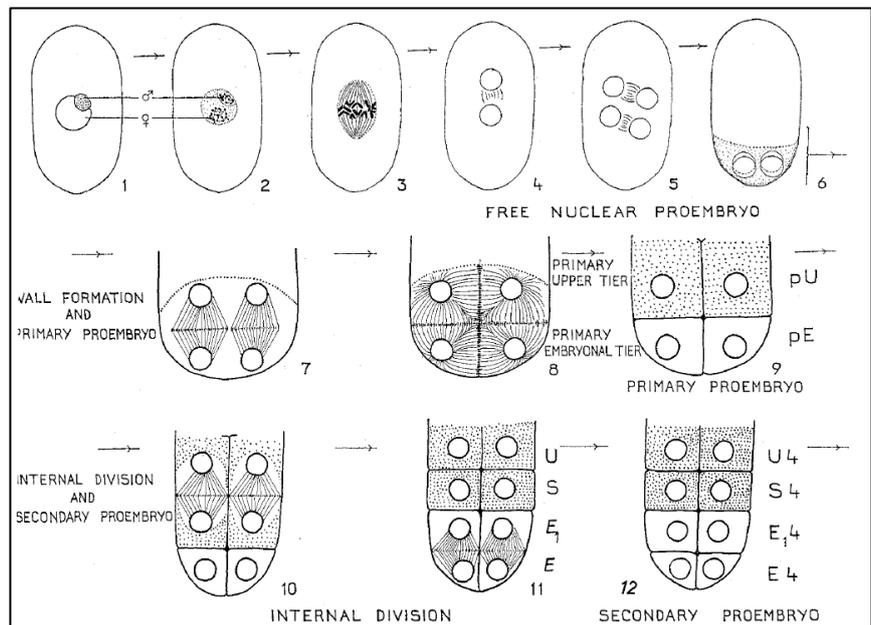


Figure I.8 Schéma explicatif de la proembryogenèse des conifères, depuis la fécondation à la formation du proembryon secondaire. *pU* : partie supérieure primaire, *pE* : partie embryonnaire primaire, *U* : partie supérieure secondaire, *S* : suspenseur, *E₁* : segment embryonnaire, *E* : cellules embryonnaires (Dogra 1967).

I.1.6.2. L'embryogenèse précoce

C'est au cours de cette phase, que le suspenseur va s'allonger (**Figure I.9**). Celui-ci est composé de plusieurs files de cellules ne se divisant pas. Plus le suspenseur s'allonge, plus il pousse l'embryon vers la partie centrale de l'archégone (nommée cavité corrosive). Le suspenseur joue différents rôles : soutien et positionnement de l'embryon dans la graine, la synthèse de régulateurs de croissance, et la conduction des nutriments vers l'embryon. Chez le genre *Pinus* les 4 cellules initiales vont former quatre embryons secondaires, dont un deviendra dominant, entraînant l'avortement des trois autres (**Figure I.9**, 15-19). Ce phénomène est appelé polyembryogenèse de clivage. Chez le Douglas, appartenant au genre *Picea*, l'embryogenèse zygotique n'est jamais associée à la formation de structures embryonnaires multiples (Allen et Owens, 1972). Il y a, par ailleurs, une absence de polyembryogenèse de clivage (Gupta et Durzan, 1986) (**Figure I.9**, 20-23).

Proembryogenèse Embryogenèse précoce Embryogenèse tardive

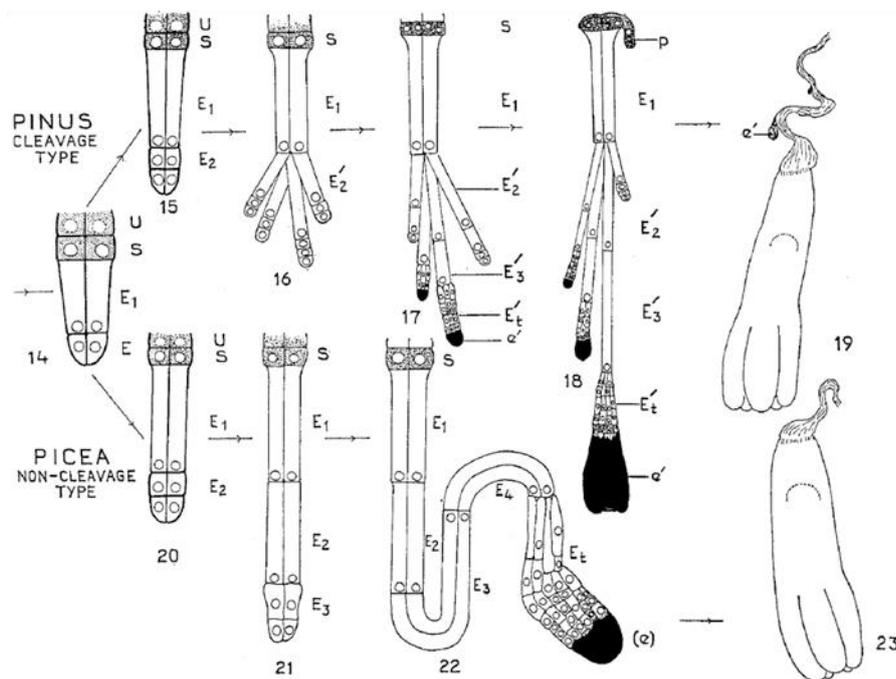


Figure I.9 Schéma explicatif de l'embryogenèse précoce à l'embryogenèse tardive, montrant une polyembryogenèse de clivage (*Pinus*, 15-19), ou non (*Picea*, 20-23). U : partie supérieure secondaire, S : suspenseur, E : segments embryonnaires, e : tête embryonnaire (Dogra 1967).

I.1.6.3. L'embryogenèse tardive

L'embryogenèse tardive est la phase marquée par les phénomènes d'histogenèse et d'organogenèse le long de l'axe de l'embryon (von Arnold *et al.*, 2002). La partie embryonnaire se divise en 2 régions : une région proximale au suspenseur, dans laquelle les cellules se divisent de manière transversale, et une région distale par rapport au suspenseur, où les cellules se divisent dans tous les plans. La partie proximale va être le lieu de différenciation du méristème racinaire, tandis que la partie distale sera le lieu de formation du méristème caulinaire apical

qui sera entouré de 1 à 7 cotylédons. Les futurs tissus vasculaires et corticaux sont alors différenciés (Vestman *et al.*, 2011).

I.1.6.4. La maturation

Une fois entièrement formé, l'embryon cotylédonaire entre dans une phase de maturation, qui a pour effet d'arrêter les divisions cellulaires et le début de l'expansion cellulaire (**Figure I.10**). Le processus d'accumulation des réserves (sucres, lipides et protéines) débute alors, afin de préparer la graine à la déshydratation, à la dormance, mais aussi de lui assurer son autonomie lors des premières phases de germination. La maturation dite physiologique, est considérée comme terminée lorsque la graine a atteint son poids sec maximum (accumulation optimale pour permettre la germination). En termes qualitatif et quantitatif, les réserves accumulées vont impacter le succès de la germination de la graine et la croissance ultérieure du semis. De plus, une augmentation de la teneur en acide abscissique (ABA) endogène au début de la maturation va s'effectuer progressivement, puis se réduire lors de la déshydratation (diminution de la teneur en eau) de cette graine. La viabilité des graines déshydratées peut être maintenue à long terme à température basse (Engelmann 1991). La phase de déshydratation de l'embryon est cruciale pour permettre la transition entre la phase de maturation et la phase de germination (Kermode 1990). Cette phase est marquée par un arrêt total des processus cellulaires (division et élongation), par une diminution de la quantité d'ABA, et par un changement des sucres solubles accumulés (raffinose et stachyose principalement).

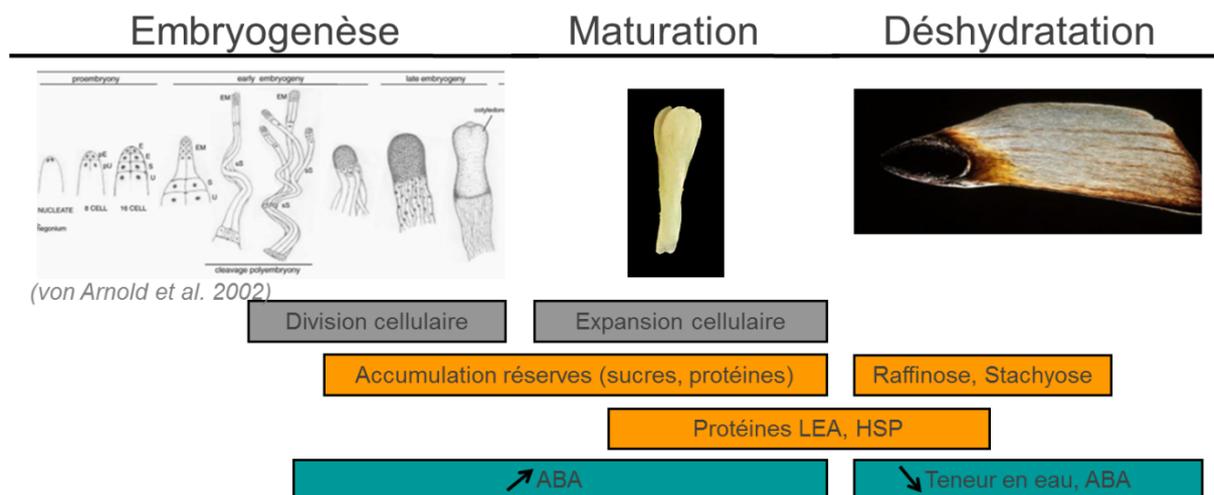


Figure I.10 Principales caractéristiques physiologiques des différentes étapes de l'embryogenèse et de la déshydratation. *LEA* : Protéines abondantes lors de l'embryogenèse tardive ; *HSP* : protéines de réponse au choc thermique ; *ABA* : Acide abscissique (von Arnold *et al.*, 2002 ; Bewley *et al.*, 2013).

I.1.7. L'amélioration du Douglas en France

En France, le programme d'amélioration du Douglas a débuté dans les années 1950, afin de subvenir aux besoins français en produisant ses propres graines, tout en améliorant la qualité et la stabilité (résistance) de ce matériel végétal. En parallèle en 1965, l'IUFRO (International Union of Forest Research Organization) a décidé de mettre en place le premier programme d'amélioration du Douglas dans le monde, en commençant une collection de graines de Douglas avec un contrôle de l'origine, afin d'identifier et de préserver les meilleures ressources génétiques (Bastien *et al.*, 2013). Les objectifs du programme d'amélioration français, sont tout d'abord d'adapter la ressource aux changements climatiques (températures plus élevées, et plus sèches (exemple de la canicule de 2003), mais aussi de réduire la ramification, tout en maintenant un bon taux de croissance et une bonne densité de bois. Le programme a débuté classiquement par des tests de provenances (lien géographique, en évaluant la croissance, la forme et le débourrement), et de descendances (lien de parenté) d'arbres sélectionnés en France. Au total plus de 500 populations ont été évaluées dans 62 essais, ne couvrant pas moins de 133 hectares. Par la suite, des tests de descendances ont été réalisés sur 500 arbres français et américains (Washington). Une région de provenance unique (divisée en deux régions de provenances) a alors été délimitée pour le Douglas Français (PME901 (basse altitude) et PME902 (>800m), **Figure I.11**). Au total, 1500 populations ont été sélectionnées, et différents vergers à graines ont été plantés. Trois vergers avec des provenances de Washington et de l'Oregon, un avec des provenances de Californie, et trois avec des provenances françaises. Ces vergers couvrent une surface de 93 hectares et sont dans une phase de production de semences (**Tableau I.2**) (Bastien *et al.*, 2013). Actuellement, le programme d'amélioration du Douglas en France est conduit par l'INRA, le FCBA et l'Irstea (depuis 1993) afin de produire des variétés améliorées, destinées au reboisement des forêts françaises (**Figure I.12**).

Les 8 vergers à graines répartis sur l'ensemble du territoire français permettent au pays d'être autosuffisant quant à la production des semences. Cependant, l'âge des arbres constituant ces vergers (de 27 à 38 ans, **Tableau I.2**), va se traduire par une baisse progressive de la production de semences dans les années à venir. En effet, il a été démontré qu'après 40 ans, la production de semences chez le Douglas commence à décliner. Le besoin de mettre en place des vergers plus petits et renouvelés plus souvent commence à se faire sentir.

Le programme Douglas-Avenir s'est construit dans ce contexte afin de répondre à deux enjeux :

- Quantitatif, en stabilisant durablement le niveau de ressource au-delà des années 2030/2040.
- Qualitatif, afin de permettre à la filière de poursuivre le déploiement sur le territoire d'une essence à fort potentiel économique.

Même si des avancées significatives ont été faites sur l'amélioration du Douglas, la multiplication végétative de cette espèce n'a jamais été développée sur une grande échelle à cause de facteurs limitants : pourcentage d'enracinement faible, un nombre limité de boutures par arbre et un vieillissement très rapide des pieds mères. Il faut donc pour cela utiliser une méthode de multiplication végétative puissante permettant d'accélérer les schémas de sélection,

mais permettant aussi de diffuser de nouvelles variétés améliorées répondant aux besoins économiques et écologiques.

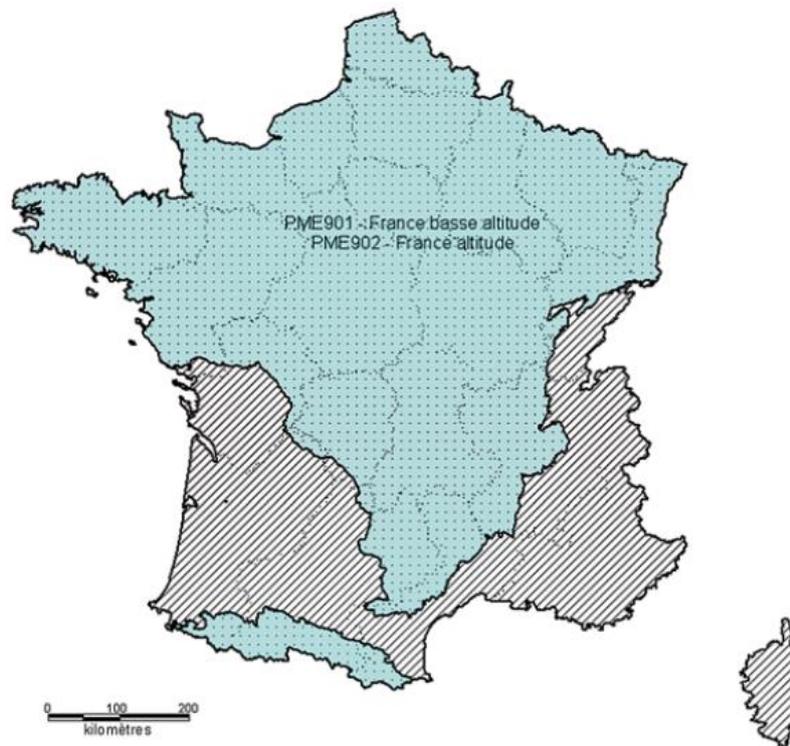


Figure I.11 Deux régions de provenances (PME901 : basse altitude ; et PME902 : >800m) délimitées du Douglas en France, représentant les résultats des tests de descendance sur 500 arbres de provenance de Washington (Bastien *et al.*, 2013). La partie grise correspond aux régions ne faisant pas partie des régions de provenances.

Tableau I.2 Caractéristiques des différents vergers à graines français testés (supériorité de certains caractères testés) ou qualifiés (sélection phénotypique individuelle) pour la production de plants (Source : France-Douglas, <http://www.france-Douglas.com>).

Code et nom du verger	Année de plantation	Début de production	Origine du matériel	Critère de choix du matériel d'origine	Nombre de clones	Nombre de clones efficaces	Catégorie
PME-VG-001 Darrington-VG	1978	1988	USA Washington	Forme, croissance modérée débournement tardif, et bois dense	70	64	Testée
PME-VG-002 La Luzette-VG	1980-81	2003	USA Washington et Est France	Vigueur juvénile et débournement tardif	343 (226 après éclaircie)	214 (136 après éclaircie)	Testée
PME-VG-003 Washington-VG	1984-87	2005	USA Washington	Vigueur juvénile et débournement tardif	289	252	Qualifiée
PME-VG-004 France1-VG	1989-90	2006	Peuplements français de l'est du Massif Central	Croissance, débournement tardif et angle d'insertion des branches	110	57	Qualifiée
PME-VG-005 Washington2-VG	1983-84	2007	USA Washington	Vergers le plus tardif, croissance, densité du bois, et forme	135	66	Qualifiée
PME-VG-006 Californie-VG	1985-86	2008	USA Californie	Débournement précoce, vigueur et forme (adapté à la sécheresse)	116	86	Qualifiée
PME-VG-007 France2-VG	1989-90	2007	Peuplements français de l'est du Massif Central	Croissance, débournement et forme (angle d'insertion des branches)	138	53	Qualifiée
PME-VG-008 France3-VG	1989-90	2010	Peuplements français de l'est du Massif Central	Croissance, débournement et forme (angle d'insertion des branches)	151	59	Qualifiée

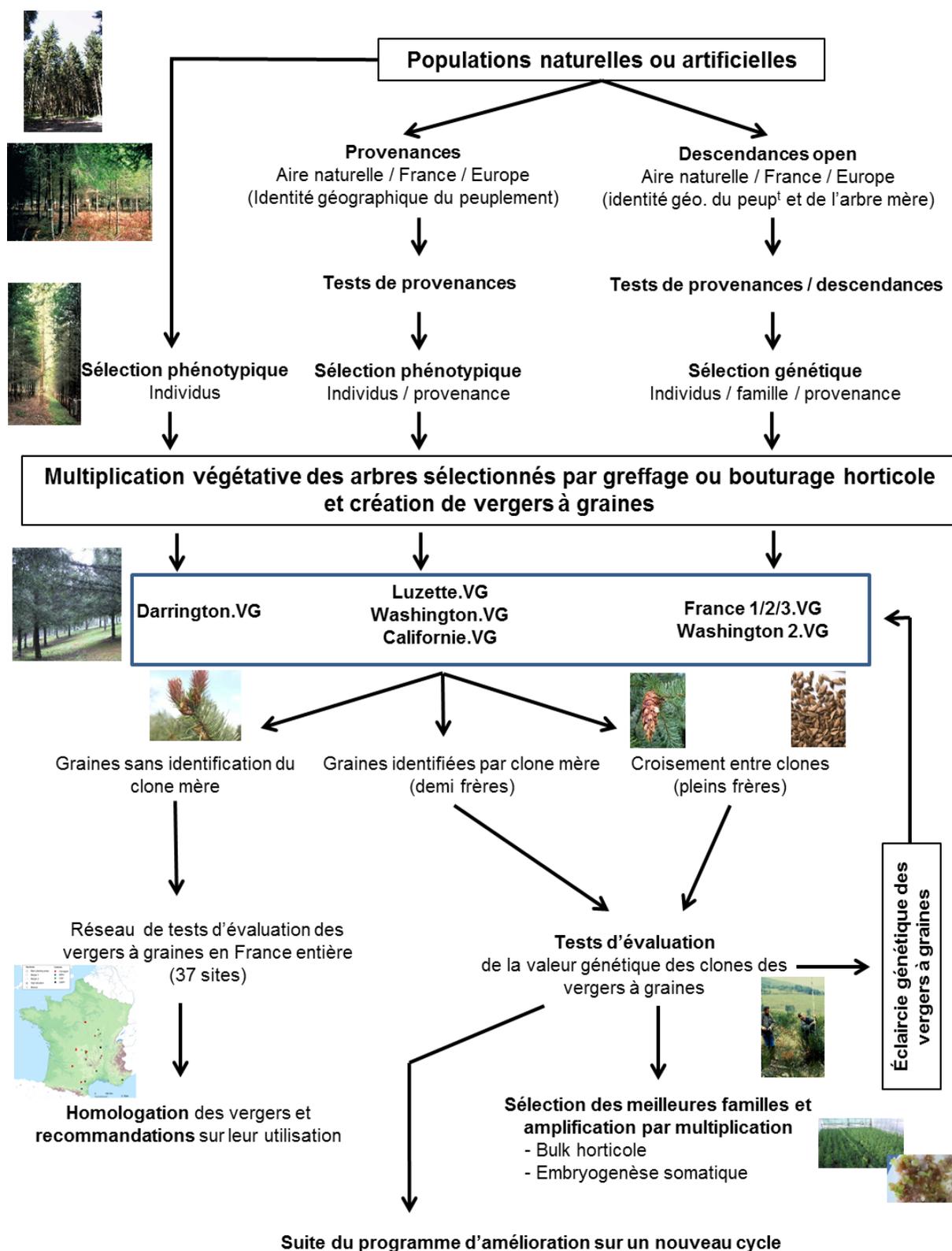


Figure I.12 Schéma du programme d'amélioration du Douglas en France. Différents tests (descendance et provenance) ont permis de former les différents vergers à graines français ; sélection et multiplication des individus intéressants après identification et évaluation. JC Bastien (communication personnelle).

I.2. Les techniques de multiplication végétative chez le Douglas

Chez les conifères, la multiplication végétative en condition naturelle est rare et limitée à des individus placés dans des conditions environnementales extrêmes. Ces conditions peuvent conduire à un isolement spatial important des populations considérées. La capacité des cellules végétales à utiliser la totipotence cellulaire (dédiﬀérenciation des cellules) permet de dupliquer de façon conforme des individus par des processus comme le bouturage horticole, ou le marcottage. Ce processus, aussi appelé « multiplication végétative », produit des clones génétiquement identiques à leur donneur. De ce fait si on souhaite améliorer une espèce végétale, l'utilisation de la multiplication conforme permet alors de produire rapidement une grande quantité d'individus sélectionnés. La multiplication végétative est de ce fait bien adaptée dans un programme d'amélioration pour :

- stabiliser le matériel amélioré.
- identifier des marqueurs moléculaires de sélection permettant de réduire le temps entre les cycles de sélection.
- permettre l'utilisation des tests clonaux, plutôt que des tests de descendance moins efficace, pour l'évaluation génétique des individus.
- faciliter l'évaluation des génotypes, de leur plasticité phénotypique et de leur adaptabilité environnementale.

Différentes techniques de multiplication végétative permettent de multiplier indifféremment le Douglas : le bouturage horticole, le greffage et la propagation *in vitro* (embryogenèse somatique).

I.2.1. Le bouturage horticole

Cette technique de multiplication végétative se réalise soit sur des rameaux d'arbres, soit sur des pousses qui ont été taillées. Ces tailles permettent à la base d'éliminer les pousses âgées de 2 à 3 ans, afin de favoriser le développement des brachyblastes (section portant les aiguilles). La rhizogenèse est initiée en plongeant la base des boutures dans de l'acide indole butyrique (AIB). Les racines apparaissent après 40 jours. La réussite de cette technique va dépendre de nombreux facteurs : la qualité et l'origine génétique du matériel, le contrôle de l'ambiance du bouturage etc... Le bouturage horticole du Douglas est assez facile à réaliser tant que le matériel biologique est juvénile (< 6 ans). Cependant, la technique du bouturage présente 2 limites importantes chez cette espèce : le taux de multiplication faible, l'aptitude famille dépendante de la multiplication et le faible nombre de copies par individu (maximum 65) (Bastien *et al.*, 2013). De plus, l'enracinement des boutures et la qualité du système racinaire dépendent tout à la fois du clone et de l'année de prélèvement des boutures (ou micro-bouture) (de la Goublaye et Franlet, 1978). Ce phénomène récurrent chez les conifères est en lien avec le vieillissement ontogénétique (passage juvénile à adulte) qui entraîne une perte des capacités organogénétiques. Le bouturage ne semble donc pas être la méthode de choix pour la multiplication de cette essence.



I.2.2. Le greffage horticole

Cette technique est habituellement utilisée pour la création de vergers à graines, ou le transfert et la sauvegarde d'un matériel sélectionné. Le principe de cette technique est de récolter un greffon et de l'apposer sur un porte greffe constitué par un jeune plant de deux ans. Le greffon commence à se développer après 1 mois, et le taux de reprise est généralement très élevé. Cette opération minutieuse, longue et coûteuse (deux ans en pépinière avant d'être installés dans les vergers), n'est utilisée que pour la création de banques de clones ou des vergers à graines.

I.2.3. L'embryogenèse somatique

Cette technique permet de produire *in fine* des embryons somatiques (ES), à partir de cellules du soma et non à partir de cellules germinales, suivant un processus ressemblant à l'embryogenèse zygotique (Zimmerman 1993). Les premiers ES de plante ont été obtenus chez la carotte, *Daucus carota* (Steward *et al.*, 1958). Depuis ces travaux, les techniques liées à l'embryogenèse somatique chez les angiospermes n'ont fait que progresser (Yang et Zhang, 2010 ; Helal 2011; Rai *et al.*, 2011). Chez les gymnospermes, l'embryogenèse somatique a été initiée en premier lieu chez l'épicéa commun *Picea abies* (Chalupa 1985; Hakman et von Arnold, 1985) et chez *Pseudotsuga menziesii* (Durzan et Gupta, 1987) à partir d'un embryon zygotique (EZ) immature. Depuis, les études sur le développement des ES des conifères ont permis l'optimisation de cette technique (Cairney et Pullman, 2007 ; Klimaszewska *et al.*, 2007 ; Klimaszewska *et al.*, 2016 ; Lelu-Walter *et al.*, 2016 ; Reeves *et al.*, in press, Lelu-Walter *et al.*, in press). Il est important de noter que le processus de l'embryogenèse somatique n'est pas le même que celui de l'embryogenèse zygotique (pas de pro embryogenèse), les premières étapes de l'initiation n'ayant jamais été observées, même si on obtient au final des structures très similaires (von Aderkas *et al.*, 1991; Nagmani *et al.*, 1995) (**Figure I.13**).

Si le bouturage ou le greffage ne semblent pas être les méthodes de choix, l'embryogenèse somatique semble plus adaptée pour multiplier le Douglas. Il faut noter que cette technique est utilisée à l'étranger par des compagnies privées pour multiplier différentes espèces de conifères comme le sapin (*Picea abies*) au Danemark, ou encore le pin taeda et le Douglas par les compagnies Arbogen, Westvaco et Weyerhaeuser. L'embryogenèse somatique trouve sa place dans un programme d'amélioration, grâce au maintien de la juvénilité du tissu, et à un taux de multiplication élevé. Dans un premier temps, l'embryogenèse somatique pourrait fournir suffisamment de copies afin d'estimer avec précision les valeurs génotypiques de chaque arbre sélectionné. Dans un second temps, elle pourrait fournir du matériel pour le déploiement de variétés polyclonales (croisement de clones avec des caractéristiques choisies), soit par la production directe en acclimatant les plants obtenus par embryogenèse somatique, soit en passant par la production de plants (production de stock mère) qui sera suivie par une seconde étape de multiplication végétative par bouturage (Bastien *et al.*, 2013).



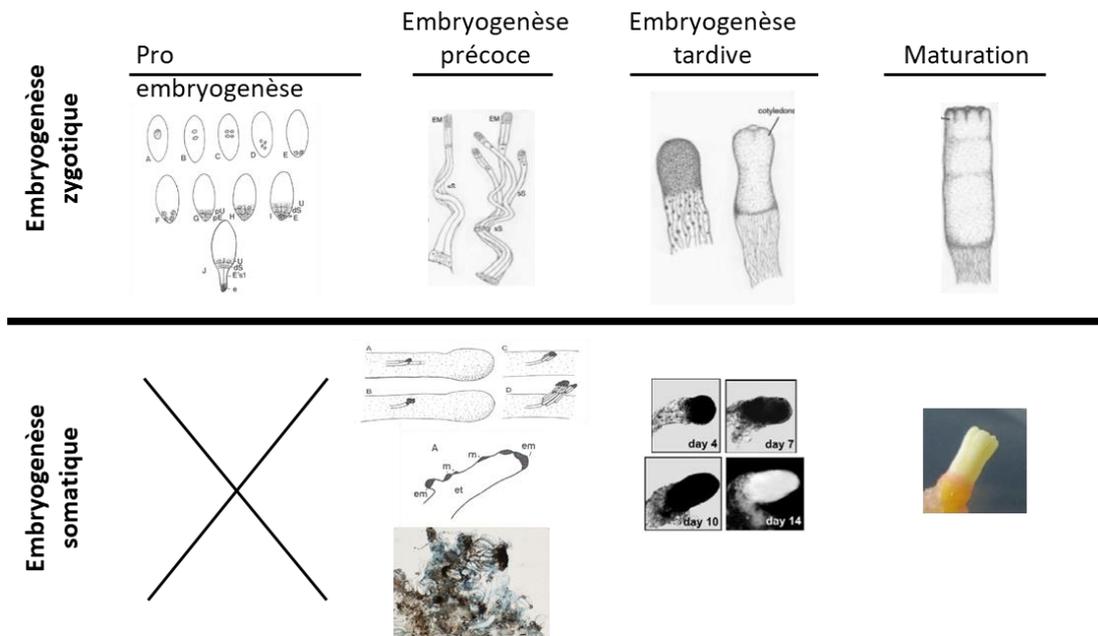


Figure I.13 : Comparaison des différents stades de l’embryogenèse zygotique avec ceux de l’embryogenèse somatique chez les conifères (von Aderkas *et al.*, 1991 ; von Arnold *et al.*, 2002).

I.2.4. L’embryogenèse somatique du Douglas

Les premiers ES de Douglas ont été obtenus en 1987 suite aux travaux de Durzan et Gupta. Le matériel végétal utilisé actuellement pour l’initiation de cultures embryogènes du Douglas, comme pour les autres conifères, est un EZ immature au stade pré-cotylédonnaire (Klimaszewska *et al.*, 2016 ; Reeves *et al.*, in press). L’embryogenèse somatique du Douglas n’a été que très peu publiée, dont la plupart sous forme de brevet (Tableau I.3) (Durzan et Gupta, 1987 ; Gupta et Pullman, 1991 ; Nagmani *et al.*, 1991 ; Gupta *et al.*, 1994 ; Gupta *et al.*, 1995 ; Gupta et Pullman, 1995 ; Gupta et Pullman, 1996 ; Taber *et al.*, 1998 ; Benowicz *et al.*, 2002 ; Pullman *et al.*, 2003 ; Gupta *et al.*, 2004 ; Pullman *et al.*, 2005a ; Dean 2008 ; Pullman *et al.*, 2009 ; Kong et von Aderkas, 2011 ; Reeves *et al.*, in press ; Lelu-Walter *et al.*, in press). A l’instar de ce qui est décrit pour les autres conifères, l’embryogenèse somatique se déroule en plusieurs étapes : initiation des ME, multiplication des ME, puis maturation pour obtenir des ES cotylédonnaires. Mis dans des conditions favorables, ces ES cotylédonnaires germent, se développent en plantules qui sont acclimatées et transférées sur le terrain.



Tableau I.3 Historique des travaux réalisés en embryogenèse somatique du Douglas : étude des différentes étapes (initiation, multiplication, cryoconservation, maturation, essais en champs). Les références en bleues correspondent à des brevets.

Auteurs	Initiation	Multiplication	Cryoconservation	Maturation	Essais en champs
Durzan et Gupta, (1987)					
Gupta <i>et al.</i> (1991)					
Nagmani <i>et al.</i> (1991)					
Gupta <i>et al.</i> (1994)					
Gupta et Pullman, (1995)					
Gupta <i>et al.</i> (1995)					
Gupta et Pullman, (1996)					
Taber <i>et al.</i> (1998)					
Benowicz <i>et al.</i> (2002)					
Pullman <i>et al.</i> (2003)					
Gupta <i>et al.</i> (2004)					
Pullman <i>et al.</i> (2005a)					
Dean (2008)					
Pullman <i>et al.</i> (2009)					
Kong et von Aderkas, (2011)					
Reeves <i>et al.</i> (in press)					
Lelu-Walter <i>et al.</i> (in press)					

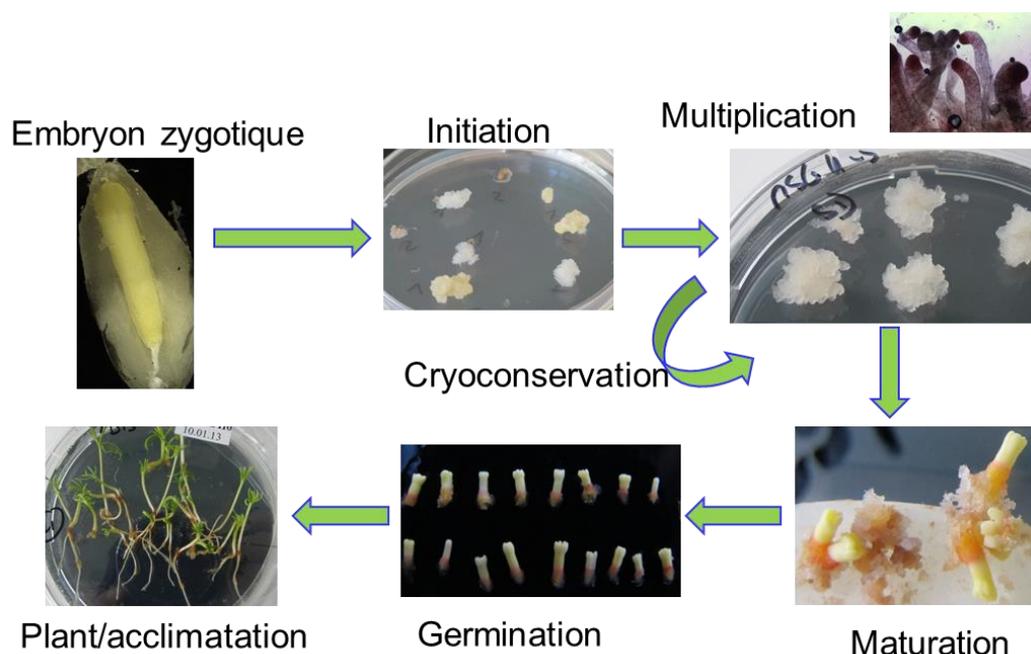


Figure I.14 Différentes étapes de l'embryogenèse somatique du Douglas : initiation, multiplication des masses embryogènes (cryoconservation possible), maturation des embryons somatiques (ES). Les ES cotylédonaires mis en germination, se développent en plantes qui sont ensuite acclimatées (Photos : Marie-Anne Lelu-Walter ; Florian Gautier).

I.2.4.1. Initiation/induction de masses embryogènes (ME)

Après 4 à 5 semaines suivant la fécondation, des EZ immatures sont prélevés dans les cônes et placés sur milieu d'induction (Gupta et Pullman, 1995 ; Reeves *et al.*, in press). Chez le Douglas, il faut attendre 5 à 8 semaines avant d'obtenir des cultures embryogènes (Pullman *et al.*, 2009). Ces cultures embryogènes, comme pour tous les conifères, sont des amas cellulaires de couleur blanche plus ou moins filamenteux (**Figure I.15**, b), d'aspect mucilagineux, composés de nombreuses têtes blanches correspondant à des ES, observables sous la loupe binoculaire. Au microscope optique, les ES révèlent des structures à un stade précoce de l'embryogenèse (**Figure I.15**, d) (Von Aderkas *et al.*, 1991), ainsi que la présence d'une polyembryogenèse de clivage (non présente lors de l'embryogenèse zygotique du Douglas, **Chapitre 1 § I.1.6.2 L'embryogenèse précoce**). Les ES immatures sont composés d'une masse de cellules méristématiques appelée tête embryonnaire (rouge foncé), et d'un suspenseur multicellulaire avec de longues cellules vacuolisées, ce qui en fait une structure bipolaire. Le centre de ces masses se multiplie très lentement et se nécrose, tandis que les extrémités ont un taux de multiplication plus élevés et produisent plus d'ES immatures (*Picea*, Petrek *et al.*, 2015). Chez les conifères ces cultures sont nommées masses embryogènes (**ME**). Le taux d'initiation de **ME** chez le Douglas n'a fait que s'améliorer avec l'optimisation des milieux de culture, de 25 % lors des premiers travaux, à 79,6 % pour le milieu d'initiation Glitz (Reeves *et al.*, in press). Pour initier l'embryogenèse somatique, les EZ sont placés sur un milieu modifié de Litvay (Litvay *et al.*, 1985) dit milieu d'initiation Glitz (ou d'induction), initialement optimisé pour *Pinus taeda* (Hargreaves *et al.*, 2009), contenant 4,5 μM de 2,4-D, 2,2 μM BAP, 4 g.l⁻¹ de phytigel et 30 g.l⁻¹ de saccharose (Reeves et al 2017). Les EZ sont ensuite incubés à l'obscurité et à 23°C pendant 6 semaines. Gupta *et al.* (1994) ont testé d'autres sources de carbone comme le glucose et le maltose, et suggèrent que ce dernier représente, chez le Douglas, la meilleure formulation pour l'initiation des ES (brevet : US 2004/0237130 A1). Les **ME** issues de différents EZ vont former des lignées différentes avec un génotype différent.

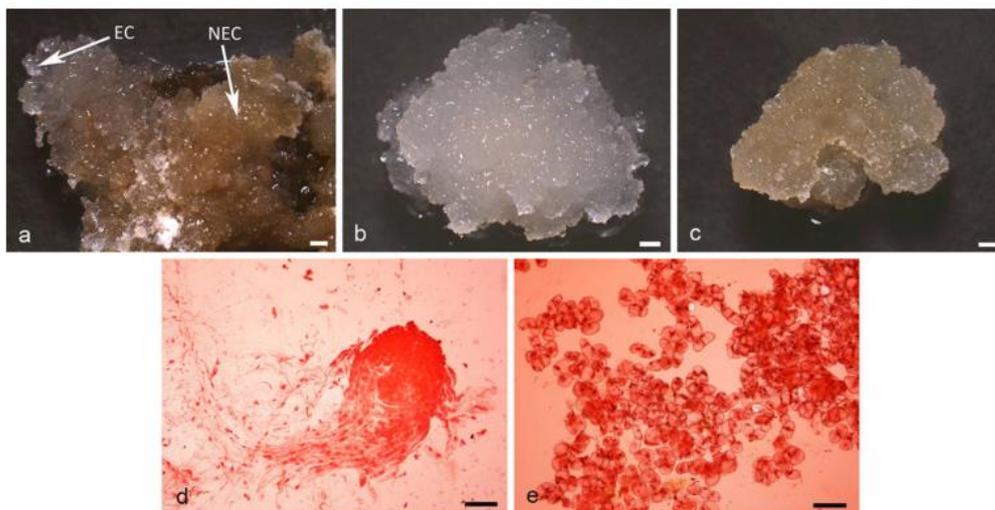


Figure I.15 Aspect macromorphologique sous loupe des masses embryogènes (**ME**, a, b) et des cals non-embryogènes (ne formant pas d'embryon, a, c) de *Larix principis-rupprechtii* provenant du même **embryon zygotique** (a) (échelle de 1 mm). Cytologie sous microscope optique avec une coloration à l'acétocarmin de **ME** (d) et de cal (e) (échelle de 100 μm). D'après Zhao *et al.* (2015a).

I.2.4.2. Multiplication des ME

Les **ME** formées sont ensuite transférées sur un milieu de multiplication pour favoriser leur prolifération. Pour le Douglas ce milieu contient auxine et cytokinine (1 g.l⁻¹ de 2,4-D ; 0,5 g.l⁻¹ de BAP, Reeves *et al.*, in press). Les **ME** placées en chambre de culture à 23°C et à l'obscurité, sont repiquées sur le même milieu tous les 15 jours. Le taux de croissance peut être très conséquent, pouvant aller jusqu'à un facteur 12 comme vu chez le Douglas (données non montrées). Pour des lignées embryogènes de *Pinus pinaster*, l'accroissement relatif en matière fraîche peut être supérieur à 1000 % en seulement deux semaines (Trontin *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été montré que le saccharose du milieu est rapidement hydrolysé en hexoses (glucose et fructose), réduisant, de façon transitoire, l'osmolarité des milieux. Ces modifications d'osmolarité dans le milieu semblent améliorer la qualité et la taille des ES produits (Gupta et Pullman, 1996). Chez le Douglas, la multiplication des **ME** a été récemment optimisée d'une part par un étalement des **ME** sur filtre papier, lui-même placé sur le milieu de multiplication (Gautier *et al.*, 2017), d'autre part par l'utilisation du maltose à la place du saccharose, améliorant la structuration des embryons somatiques (Reeves *et al.*, in press).

I.2.4.3. Cryoconservation

Cette technique, permet de conserver facilement et pour de longues périodes des **ME** via une congélation dans de l'azote liquide à -196°C (Lelu-Walter *et al.*, 2006). La préparation du matériel nécessite un pré-traitement des **ME** dans une solution plasmolysante (saccharose ou sorbitol, 0,4-0,6 M), suivi d'un traitement avec un cryoprotectant comme le diméthylsulfoxyde (DMSO). Pour le Douglas et l'épicéa, le DMSO peut être remplacé, par une phase d'acclimatation des **ME** avec ajout de 50 µM d'ABA dans le milieu de multiplication, puis d'un prétraitement au froid à 5°C pendant 4 semaines (Kong et von Aderkas, 2011). La très bonne réactivation des embryons cryoconservés (100 % de reprise de croissance) permet d'envisager la création de cryobanques (Reeves *et al.*, in press) (**Figure I.16**). Dans le cas du Douglas, des **ME** issues de 500 génotypes différents sont actuellement cryoconservés aux Etats-Unis (Gupta *et al.*, 1994). Les intérêts de la cryoconservation des **ME** sont :

- une sauvegarde du matériel végétal dans un état sanitaire optimal et sécurisé (pas de perte de matériel, de contamination).
- sauvegarde des **ME**, et donc conservation du matériel à un stade très juvénile.
- une conservation sur le très long terme.
- une réduction des coûts de conservation des génotypes.

Par conséquent cette technique permet la conservation des ressources génétiques.



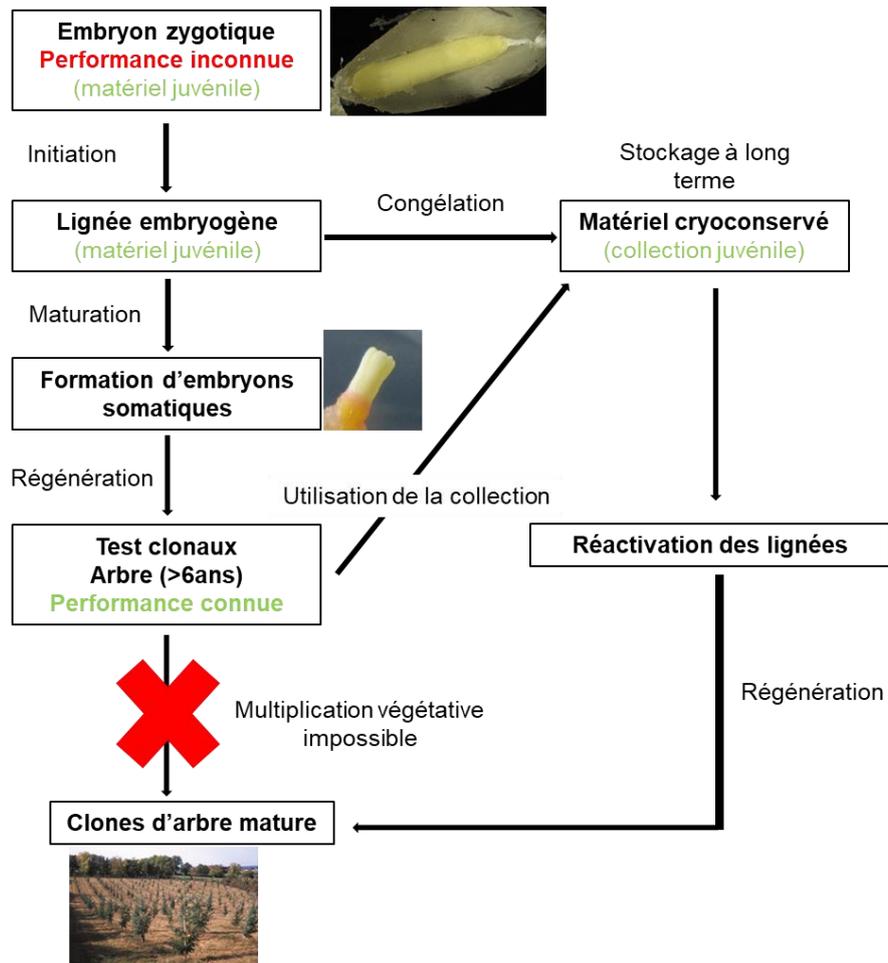


Figure I.16 Schéma explicatif de l'intérêt de la cryoconservation afin de créer une banque de matériel végétal juvénile. Photos : Marie-Anne Lelu-Walter et Florian Gautier.

I.2.4.4. Maturation des embryons somatiques

A cette étape, les ES se différencient en embryons pré-cotylédonaires, puis cotylédonaires de couleur blanc/jaune avec 4 à 7 petits cotylédons (Zhang *et al.*, 1999). Chez le Douglas, la maturation se fait sur 8 semaines à l'obscurité sur un milieu modifié de Litvay, dit « de maturation » Glitz, additionné de 60 μM d'ABA, de 0,2 M de saccharose et de 10 g.l^{-1} de phytigel (Lelu-Walter *et al.*, in press). A l'instar de ce qui est décrit chez le pin maritime, les concentrations élevées en saccharose et en phytigel par rapport au milieu de multiplication se traduisent par une baisse du potentiel hydrique du milieu, qui est favorable au développement des embryons (Morel *et al.*, 2014a). Cependant la maturation des ES cotylédonaires est, chez le Douglas, asynchrone. Les lignées **ME** sont caractérisées par leur potentiel embryogène qui est défini par le nombre d'embryons somatiques cotylédonaires obtenu ($\text{Nbre ES g}^{-1} \text{MF}$). Chez le Douglas, les **ME** présentent un potentiel embryogène stable au cours du temps (Lelu-Walter *et al.*, in press), à la différence de ce qui est observé chez les pins. Chez le pin maritime, après 6 mois de culture, le potentiel embryogène des **ME** diminue drastiquement. Les **ME** sont alors incapables de régénérer des ES cotylédonaires (Klimaszewska *et al.*, 2009). Le potentiel embryogène peut être variable d'une lignée à l'autre (génotype différent) chez les conifères (Lelu-Walter *et al.*, 2006). Chez le Douglas le nombre d'ES cotylédonaires peut varier de 30 à plus de 2000 $\text{ES g}^{-1} \text{MF}$ (Lelu-Walter *et al.*, in press).

I.2.4.5. Germination – Plantes - Acclimatation

Les ES, isolés sous la loupe, sont transférés sur un milieu de germination sans régulateurs de croissance (saccharose 30 g l⁻¹). Ils sont ensuite placés à 24°C à l'obscurité pendant 5-7 jours, avant d'être transférés à la lumière sous une photopériode de 16 h (Lelu-Walter *et al.*, in press). Après 1-2 semaines, les ES ont germé (développement de la racine) ; et après 7-8 semaines les ES ont développés une plantule (ES présentant une racine, ainsi qu'une partie aérienne). Chez le Douglas, le pourcentage de germination peut dépendre des lignées (Gupta *et al.*, 1995). Les plants germés seront ensuite acclimatés puis mis en champs. Benowicz *et al.* (2002) ont démontré que sur une courte période (2 ans), les plants de Douglas produits par embryogenèse somatique ou zygotique étaient semblables à la fois en termes de vitesse de débourrement des bourgeons formés, et sur différents critères adaptatifs comme la résistance au stress hydrique et au froid comme l'a montré Dean en 2008.

I.2.4.6. L'embryogenèse somatique secondaire

L'embryogenèse somatique peut être obtenue à partir d'ES cotylédonaire issus de **ME** primaires. Les ES déposés sur milieu d'induction forment des **ME** secondaires puisqu'elles sont issues d'un second cycle d'initiation. Ceci a notamment été démontré chez *Picea glauca x engelmannii* (Eastman *et al.*, 1991), chez le mélèze hybride, *Larix x eurolepis* (Lelu *et al.*, 1994), ou encore chez *Pinus pinaster* (Klimaszewska *et al.*, 2009) (**Figure I.17**). En comparaison avec les **ME** primaires, les **ME** secondaires peuvent avoir un potentiel embryogène équivalent aux lignées primaires (Eastman *et al.*, 1991), voir même supérieur (Lelu *et al.*, 1994). Dans le cas du Douglas, la réitération d'un second cycle d'embryogenèse somatique permet d'augmenter significativement le potentiel embryogène, et cela seulement si les lignées embryogènes primaires ont un faible potentiel embryogène (Lelu-Walter *et al.*, in press). Ainsi, le potentiel embryogène de la lignée secondaire SD4-4 est trois fois supérieur à celui de la lignée primaire SD4 (1646 et 478 ES g⁻¹ MF respectivement) ; pour TD17-3, son potentiel est multiplié par 5 par rapport à celui de la lignée primaire TD17 (148 et 30 ES g⁻¹ MF respectivement). L'embryogenèse somatique secondaire peut donc être considérée comme une méthode de rejuvenilisation pour des espèces dont le potentiel embryogène des **ME** primaires est faible ou diminue avec le temps.



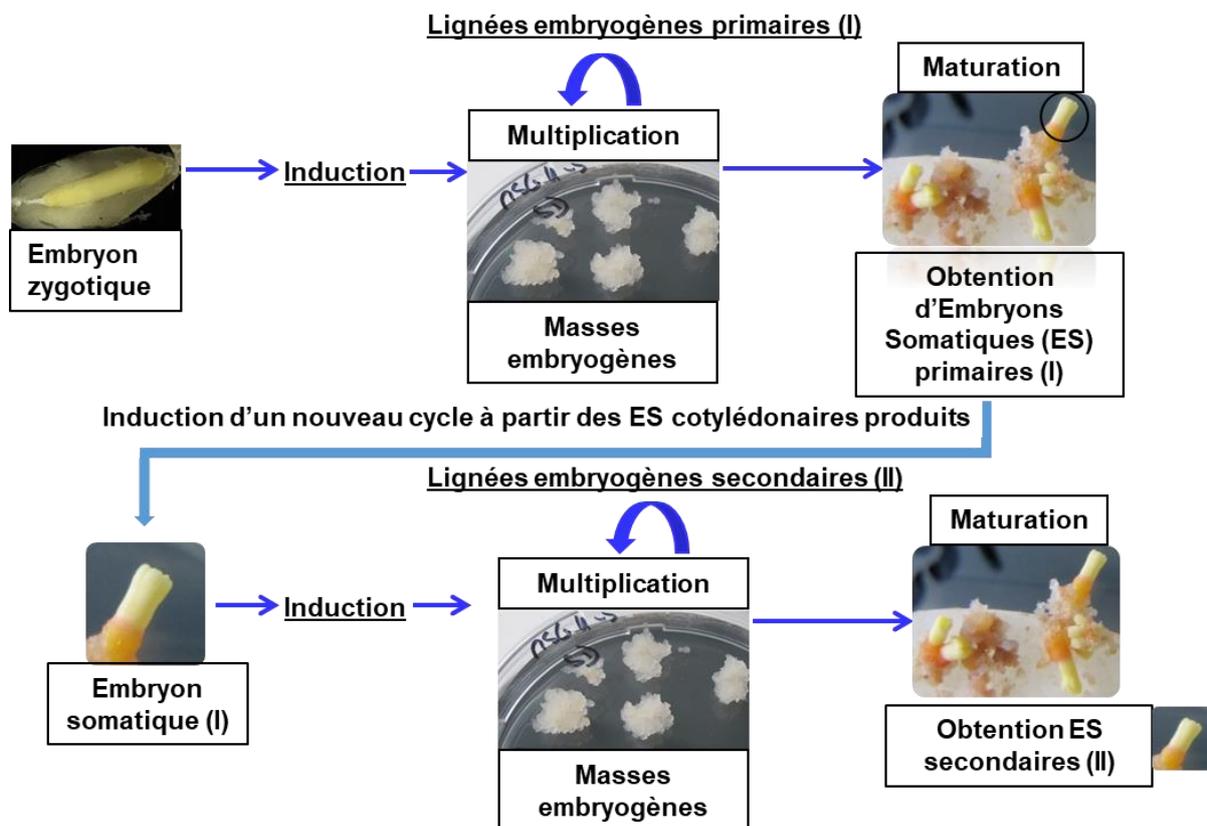


Figure I.17 Schéma explicatif de l'embryogenèse somatique primaire et secondaire du Douglas. Obtention des lignées embryogènes primaires à partir d'un embryon zygotique ; obtention de lignées embryogènes secondaires à partir d'un embryon somatique (ES) issu d'une lignée embryogène primaire de Douglas.

I.2.4.7. Avantages et limites de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique possède différents avantages dans l'amélioration du Douglas. Tout d'abord elle s'affranchit des nombreux problèmes des autres techniques de multiplication végétative comme le bouturage ou le greffage horticole. Ensuite, son plus grand intérêt est la production en théorie illimitée des embryons. Enfin, la possibilité de la cryoconservation est un avantage non négligeable, qui permet de stocker les ME à un état juvénile, et d'y revenir ultérieurement sur des lignées d'intérêts.

Malgré les intérêts qu'apportent cette technique, l'embryogenèse somatique présente certaines limites chez les plantes, et principalement chez les conifères. Le tissu/organe de départ, le génotype, et pour finir l'état de juvénilité du matériel biologique sont les principaux freins à l'utilisation de cette méthode de propagation.

Chez les conifères, comme énoncé précédemment, l'initiation de l'embryogenèse somatique n'est possible qu'à partir d'un tissu jeune comme les EZ immatures. Le taux d'initiation des ME de conifères diminue avec la maturité des EZ, allant de plus de 60 % pour un embryon immature, à 10 % pour un embryon mature (Durzan et Gupta, 1987 ; Klimaszewska *et al.*, 2001 ; Park 2002 ; Kong et von Aderkas, 2011). Par ailleurs, l'initiation de l'embryogenèse somatique

est d'autant plus facile si elle est réalisée à partir d'ES plutôt qu'avec des EZ (*Picea abies* ; Harvengt *et al.*, 2001).

La fréquence d'initiation peut être faible en fonction du génotype et entraîner une limite. Pour le Douglas, il a été observé des différences de pourcentage d'initiation à partir du zygote, qui vont de 57 % d'initiation (Durzan et Gupta, 1987; Pullman *et al.*, 2003; Pullman *et al.*, 2005a; Pullman *et al.*, 2009), à 79,6 % au maximum (Reeves *et al.*, in press). Ces maximums ont été obtenus avec l'optimisation des conditions de culture et un meilleur contrôle de cette espèce. Chez les conifères, l'aptitude à l'embryogenèse a été montrée génotype-dépendante (Becwar *et al.*, 1990; Lelu-Walter *et al.*, 2006; Klimaszewska *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017). La sélection fine du parent femelle, ou mâle dans certains cas, le plus favorable à cette initiation lors du croisement, permettrait une large amélioration de l'initiation de l'embryogenèse somatique (MacKay *et al.*, 2006).

Chez les conifères, si l'EZ est un matériel de choix pour initier des embryons somatiques, aucune information des qualités sylvicoles du futur arbre n'est disponible. Des tests clonaux doivent être mis en place avec les plantes obtenues afin d'évaluer leurs performances au champ. De ce fait, la compréhension des phénomènes liés à l'initiation de l'embryogenèse somatique permettrait de s'affranchir de l'utilisation des EZ et donc de pouvoir initier des ES à partir de matériel mature dont on connaît les capacités sylvicoles permettant alors un gain de temps considérable. Les travaux de De Diego *et al.* (2008) ont montré, que chez *Pinus pinaster*, la régénération d'ES à partir de bourgeons dormants d'arbres âgés de plus de 20 ans était possible. Des travaux similaires, mais à partir d'aiguilles prélevées sur des arbres de 10 ans issus de l'embryogenèse somatique, ont été réalisés chez *Picea glauca* (Klimaszewska *et al.*, 2011). Les analyses moléculaires plus récentes sur ce matériel, ont montrés que la surexpression de gènes à domaine MADS pourrait être des marqueurs clefs de cette initiation (Rutledge *et al.*, 2017). Ces résultats présentent une avancée importante pour l'obtention de l'embryogenèse somatique à partir de matériel âgé. Pour cela, il est d'abord indispensable de comprendre l'aptitude à l'embryogenèse, c'est-à-dire l'obtention de l'aptitude à former des ES.

I.3. Caractéristiques des cultures embryogènes de conifères (ME)

Afin de comprendre l'aptitude à l'embryogenèse, il est primordial de caractériser le matériel embryogène. Les profils biologiques, biochimiques ou encore moléculaires caractérisent les **ME**, et vont permettre la production ou non d'embryons. Les paragraphes suivants vont se décomposer pour d'abord d'écrire l'EZ afin de comprendre ce qui se passe *in vivo*, ainsi que dans l'ES, puis au stade précis de la multiplication des cultures embryogènes.

I.3.1. Les glucides

Les glucides jouent de nombreux rôles lors du développement de l'EZ, comme source d'énergie et de squelettes carbonés, mais également comme agent osmotique. Certains d'entre eux, comme le stachyose, un triholoside constitué de $[\alpha(1,6)\text{-D-Gal}]_2\text{-}\alpha(1,6)\text{-D-Glc-}\beta(1,2)\text{-D-Fru}$ et le raffinose un triholoside $\alpha(1,6)\text{-D-Galactosylsaccharose}$, sont connus pour être fortement présents en fin de maturation afin de protéger l'embryon contre les dommages liés à la déshydratation (Blackig *et al.*, 1996). Outre les 2 oligosaccharides sus mentionnés, le

développement de l'embryon voit également varier les teneurs en saccharose (α -D-Glc- β (1,2)-D-Fru), en β -D-Fru et en α -D-Glc. Enfin, l'amidon (enchainement de α (1 \rightarrow 4)-D-glucopyranoside ramifié α (1 \rightarrow 6)-D-glucopyranoside), qui est une des principales molécules de réserve des plantes s'accumule majoritairement durant la maturation de l'EZ et l'ES (Jordy et Favre, 2003). La teneur en ces sucres, ainsi que l'activité enzymatique des invertases acides et alcalines et de la saccharose synthase peuvent être utilisées comme des marqueurs de la qualité des ES cotylédonaires (Klimaszewska *et al.*, 2007).

Lipavská et Konrádová, (2004) (**Figure I.18**, prolifération) expliquent que les profils glucidiques des ME en multiplication de *Picea abies* sont caractérisés par une teneur importante en Glc et Fru, et une faible teneur en saccharose, à l'instar de ce qui a été montré chez le Douglas (Taber *et al.*, 1998) et plus récemment chez *Araucaria angustifolia* (Navarro *et al.*, 2017). Chez *Picea mariana* et *Picea glauca*, la teneur en saccharose stagne ($\sim 15 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$), alors que celles en Glc et Fru varient pour atteindre, après 10 jours de multiplication, une valeur maximale d'environ $60 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MS}$. Comme les produits d'hydrolyse du saccharose, l'activité enzymatique des invertases (invertase acide et alcaline) suit le même profil (Iraqi et Tremblay, 2001). Pendant cette phase, le Glc produit et la conversion du Fru, sert à stimuler la production d'énergie au travers de l'activité mitochondriale. Le Douglas peut métaboliser le Glc et le Fru en même temps, mais avec une préférence pour le Fru (Taber *et al.*, 1998). Ce choix osidique est espèce dépendante (Tremblay et Tremblay, 1991). Chez le pin maritime, Breton *et al.* (2005) montrent que de l'amidon, glucide servant de forme de stockage des plantes, est visible dans les ES, et se trouve à l'interface entre la tête embryonnaire et le suspenseur en fin de phase de multiplication.

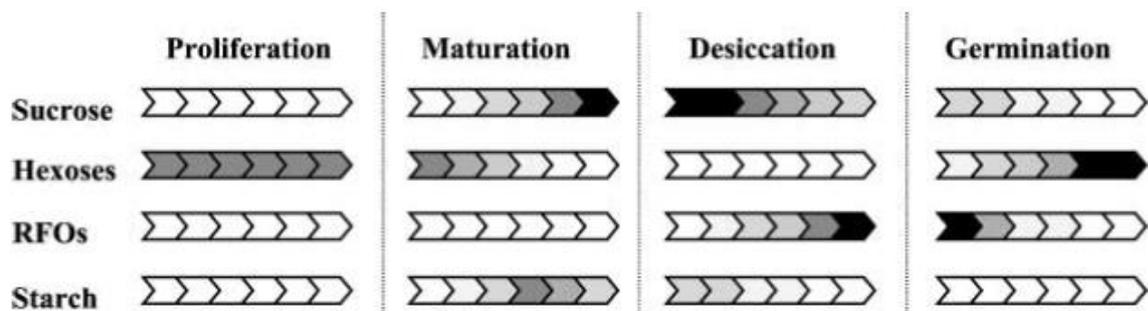


Figure I.18 Schéma des teneurs en oses présents au cours des différentes étapes de l'embryogenèse somatique de *Picea abies*. La couleur blanche représente des niveaux très faibles, le gris représente des valeurs plus hautes, et le noir des valeurs élevées. RFO = Raffinose Family Oligosaccharides, Sucrose = Saccharose, Starch = Amidon. (Lipavská et Konrádová, 2004).

I.3.2. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance vont jouer un rôle très important durant l'embryogenèse zygotique ou somatique (Jiménez 2005), que ce soit dans la signalisation ou dans la formation de l'embryon. Leur teneur varie en fonction du stade de développement de l'embryon. Depuis 1957 (Skoog et Miller, 1957), nous savons que les teneurs de deux hormones végétales (auxine et cytokinine) ajoutées au milieu de culture, permettent une dédifférenciation des cellules formant alors un cal sur l'explant. Les régulateurs de croissance endogènes étudiés lors de l'embryogenèse somatique sont l'auxine, les cytokinines, l'acide abscissique, l'éthylène, les gibbérellines et l'acide jasmonique.

I.3.2.1. L'acide indole-3-acétique (AIA)

C'est le régulateur principal de l'organogenèse chez les plantes. Le transport polaire de l'auxine contrôle la croissance, l'embryogenèse, la formation des racines, et la différenciation (Friml et Palme, 2002). Durant l'embryogenèse, ce régulateur est important pour une division correcte des cellules, ainsi que pour la formation du suspenseur. Plus tard, l'auxine aura un rôle dans le maintien de la symétrie bilatérale de l'embryon cotylédonaire. En effet, chez *Brassica juncea* le blocage du transport polaire de l'auxine (mutant *pin1*) entraîne une malformation de l'embryon (Liu *et al.*, 1993). Son rôle durant l'embryogenèse somatique a largement été étudié particulièrement lors de l'induction et de la multiplication des tissus embryogènes des conifères (Tautorius *et al.*, 1991). Au cours de l'embryogenèse somatique précoce, l'auxine favorise la différenciation en cellules embryogènes. Ce régulateur de croissance est impliqué, avec différents facteurs de transcription, comme LEC2 (*Arabidopsis thaliana*, (Ledwoń et Gaj, 2009)) et la famille *WUSCHEL-related homeobox* (*WOX* (**Chapitre 1 § I.4.1.1.3**)), pour sa propre régulation, et celle de l'embryogenèse somatique (*Picea abies*, Palovaara *et al.*, 2010). Chez la carotte la teneur en auxine est importante au cours de la phase d'initiation de l'embryogenèse zygotique ou somatique, pour diminuer progressivement au cours de la phase de maturation (Michalczyk *et al.*, 1992). Durant la phase de multiplication, la teneur en AIA des **ME** est relativement faible chez les conifères, comme il a été montré chez *Picea abies* (300 ng.g⁻¹MS) par rapport aux autres étapes comme la maturation (~3000 ng.g⁻¹MS) (Vagner *et al.*, 1999). Le pic d'AIA au moment de la maturation est corrélé avec la polarisation de l'embryon. Etienne *et al.*, (1993) ont montré qu'il y avait des différences de teneur entre des cals non-embryogènes (360 pmol.g⁻¹ MS) et des cals embryogènes (100 pmol.g⁻¹ MS) d'*Hevea brasiliensis*. Lors d'une comparaison similaire chez le mélèze hybride, Jourdain *et al.*, (1997) n'ont pas observé de différences tout au long de la phase de multiplication pour cette espèce (~100 pmol.g⁻¹ MS). Klimaszewska *et al.* (2009) ont, quant à eux, comparé la teneur en AIA dans des **ME** jeunes (215 pmol.g⁻¹ MF) et des **ME** âgées ne donnant plus d'embryons (123 pmol.g⁻¹ MF).

I.3.2.2. L'acide abscissique (ABA)

Ce régulateur de croissance est principalement connu à l'étape de maturation de l'embryon (Dodeman *et al.*, 1997; von Arnold *et al.*, 2002), car il favorise son développement, tout en empêchant la germination précoce de l'embryon (Kermode 1990). Pendant l'embryogenèse

somatique des conifères, l'arrêt de la division et de l'apport en auxine et cytokinines, remplacées par de l'ABA, est mimé durant la maturation avec l'ajout de ce régulateur dans le milieu de culture (**Chapitre 1 § I.2.4.4 Maturation des embryons somatiques**) permettant un pic d'ABA endogène. Il permet d'améliorer la qualité des embryons en augmentant la tolérance à la dessiccation (Rai *et al.*, 2011). Généralement, ce régulateur est retrouvé comme étant un inhibiteur de l'embryogenèse somatique, mais il est utilisé chez certains conifères afin d'augmenter le taux d'initiation (Pullman *et al.*, 2003). Cependant, ce régulateur est le plus important des régulateurs étudiés dans les ME de *Pinus pinaster* par Klimaszewska *et al.*, (2009).

Lors d'une accumulation trop importante d'ABA, un mécanisme d'inactivation de l'ABA est possible afin de le stocker, sous forme d'ester, en le conjuguant avec un résidu Glc (ABAGE) à l'aide de l'acide abscissique glycosyltransférase (UTG75 B2) (Arc *et al.*, 2013). L'hydrolyse à l'aide de la 1-3-β-glucosidase-1, libère le Glc de l'ABA qui passe alors d'une forme inactive à une forme active en réponse à un stress osmotique (*Arabidopsis thaliana*, Xu *et al.*, 2012).

I.3.2.3. Les cytokinines (CKs)

C'est une famille de régulateurs de croissance composée d'une multitude de petites molécules contrôlant les processus de développement des plantes (Vondráková *et al.*, 2016). Ces molécules identifiées du fait qu'elles aient la même activité biologique que la zéatine (Z, première cytokinine découverte), sont toutes composées d'une base adénine substituée (dérivé N⁶). Actuellement près de 200 CKs ou régulateurs avec une activité cytokinine, naturelles ou synthétiques, ont été identifiées (Spíchal 2012). La quasi-totalité de toutes les CKs naturelles est présente dans toutes les plantes. Leur rôle *in planta* s'étend de la croissance du bourgeon à l'influence des mécanismes de transport, aux réponses à différents facteurs biotiques et abiotiques (Vondráková *et al.*, 2016). Le rôle *in vitro* de ces régulateurs a été défini comme favorisant la croissance de cellules végétales (Skoog et Miller, 1957), car ils sont nécessaires à la division cellulaire, ainsi qu'à l'organogenèse. Il existe deux groupes de CKs, les isoprénoïdes et les aromatiques.

Les CKs aromatiques connues sont souvent des formes de synthèse comme la kinétine et la benzyl adénine (BAP). Si certaines formes de CKs aromatiques ont été identifiées comme des composés naturels, leur voie de biosynthèse est actuellement inconnue (Spíchal 2012).

La voie de biosynthèse des CKs isoprénoïdes a cependant été largement étudiée, et ces CKs possèdent différentes isoformes. Les précurseurs sont formés par la diméthylallylpyrophosphate (DMAPP), et la 4-hydroxy-3-méthyl-2-(E)-butenyl diphosphate (HMBPP) couplés avec une adénine, et seront triphosphates, puis monophosphates (PH). Une phosphatase permet d'obtenir les formes actives, ribosides, puis les « free base » sont produites à l'aide d'une phosphohydrolase (5'-ribonucleotidophosphohydrolase). Certaines formes de CKs sont inactives, les CKs glycosylées. Cela se fait pour la Z à l'aide d'une zéatine-O-glucosyltransférase, permettant une liaison réversible d'un Glc sur l'aglycone, donnant une forme de stockage nommée O-glucosides (OG), O-glucosides-xyloside (OX), ou riboside-O-glucosides (ROG). Outre cette O-glucosylation, les CKs peuvent être N-glucosylées par une N-glucosyltransférase, formant des isoformes irréversiblement inactives (7G ou 9G), qui seront

par la suite dégradées en dérivés d'adénine par la cytokinine déshydrogénase (Spíchal 2012). Les voies de biosynthèse et de dégradation des cytokinines sont expliquées par la **Figure I.19**. Durant l'embryogenèse somatique, les CKs sont nécessaires pour l'induction des **ME** et leur multiplication. Les CKs les plus étudiées lors de la l'embryogenèse somatique sont les CKs isoprénoides libres (« free base ») et conjuguées (riboside), qui sont la Z, l'isopentenyladénosine (iPA ou iPR), l'isopentenyladénine (iP), et la zéatine riboside (ZR). La teneur endogène en CKs chez les conifères, varie au cours des stades de l'embryogenèse, avec des teneurs fortes durant l'initiation des **ME** et leur multiplication, et une diminution à partir du début de la maturation et l'arrêt de la division cellulaire (iP : $\sim 230 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$ à $\sim 50 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$, iPA : $\sim 37 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$ à $\sim 12 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$, Z : $\sim 22 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$ à $\sim 7 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$, ZR : $\sim 17 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$ à $\sim 13 \text{ ng.g}^{-1} \text{ MF}$, (*Picea abies* (Vágner *et al.*, 1998)). Chez le mélèze, von Aderkas *et al.* (2001) ont montré que la teneur en iP augmentait durant la maturation, alors que les teneur en iPA, Z, et ZR diminuaient. Il existe des variations de teneurs différentes en fonction des CKs, et des stades de l'embryogenèse somatique, mais il n'y a rien de précis sur leur rôle (Z et ZR possèdent des teneurs faibles par rapport aux autres CKs).



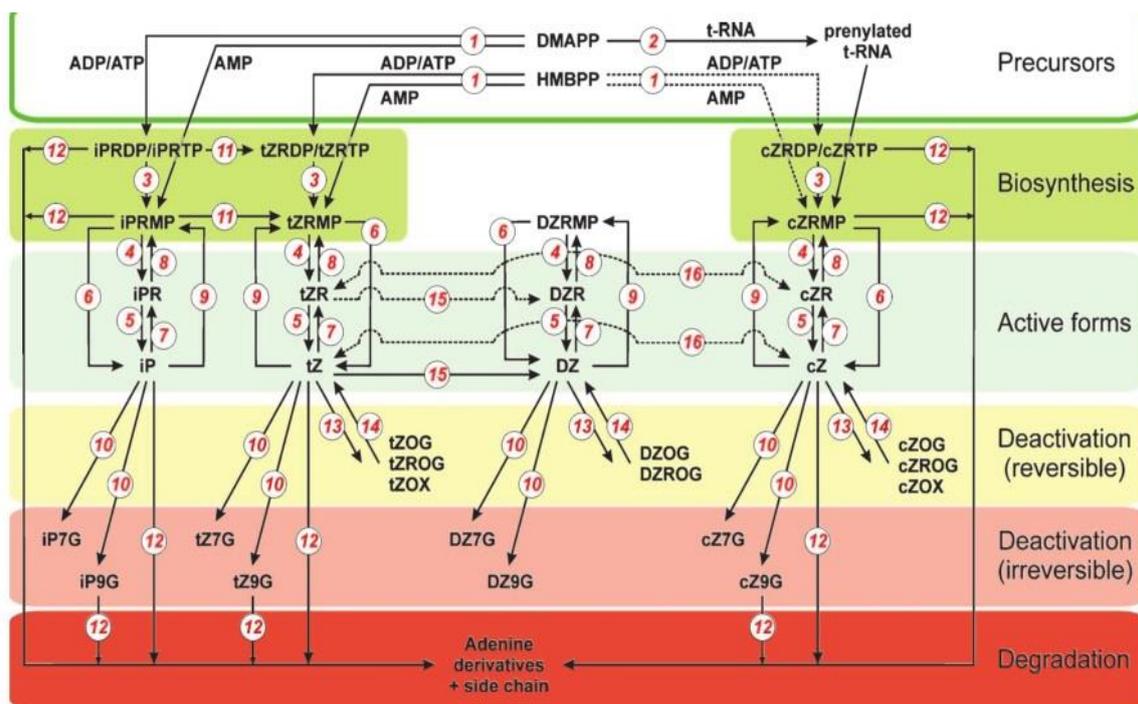


Figure I.19 : Schéma de la biosynthèse des cytokinines, leurs conversions et leur dégradation dans les plantes. Les enzymes impliquées sont indiquées par les numéros rouges. (1) adenylateisopentenyltransferase (EC2.5.1.27); (2) tRNA-specificisopentenyltransferase (EC2.5.1.8); (3) phosphatase(EC3.1.3.1); (4) 5'-ribonucleotidephosphohydrolase(EC3.1.3.5); (5) adenosine nucleosidase (EC 3.2.2.7); (6) CKphosphoribohydrolase 'Lonely guy'; (7) purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1); (8) adenosine kinase (EC 2.7.1.20); (9) adenine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.7); (10) *N*-glucosyl transferase (EC 2.4.1.118); (11) cytochrome P450 mono-oxygenase; (12) cytokinin dehydrogenase (EC 1.5.99.12); (13) zeatin-*O*-glucosyltransferase, *trans*-zeatin-specific (EC 2.4.1.203) ou *cis*-zeatin specific (EC 2.4.1.215), utilisant du xylose plutôt que du glucose (EC 2.4.2.40); (14) *b*-glucosidase (EC 3.2.1.21); (15) zeatin reductase (EC 1.3.1.69); (16) zeatin isomerase. DMAPP, dimethylallylpyrophosphate; HMBPP, 4-hydroxy-3- methyl-2-(E)-butenyl diphosphate; iPRDP, *N*⁶-isopentenyladenosine-5'-diphosphate; iPRTP, *N*⁶-isopentenyladenosine-5'-triphosphate; iPRMP, *N*⁶-isopentenyladenosine-5'-monophosphate; iPR, *N*⁶-isopentenyladenosine; iP7G, *N*⁶-isopentenyladenosine-7-glucoside; iP9G, *N*⁶-isopentenyladenosine-9-glucoside, et les équivalents pour *tZ*, *DZ* et *cZ*; *tZOG*, *trans*-zeatin-*O*-glucoside; *tZROG*, *trans*-zeatin-*O*- glucoside riboside et les équivalents pour *DZ* et *cZ*; *tZOX*, *trans*-zeatin-*O*-xyloside; *cZOX*, *cis*-zeatin-*O*-xyloside. D'après Spíchal 2012.

I.3.2.4. Autres régulateurs : éthylène, gibbérelline (GA) et acide jasmonique (JA)

Ces trois régulateurs de croissance ont un impact sur la levée de la dormance de la graine, et interviennent donc souvent tardivement dans l'embryogenèse, voire durant la germination. Les GA, comme l'éthylène, jouent aussi un rôle dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques des plantes. Les effets de l'éthylène et des GA ont été étudiés sur différents conifères ((Pullman *et al.*, 2003; Pullman *et al.*, 2005b) respectivement), et les auteurs ont montré que l'ajout d'AgNO₃ (inhibiteur de l'éthylène), ou de paclobutrazol (inhibiteur des GA) dans les milieux, augmentait les taux d'initiation, montrant l'effet néfaste de ces régulateurs sur le début de l'embryogenèse somatique. De plus, Saly *et al.* (2002) ont montré que la GA avait un effet néfaste lors de l'induction de l'embryogenèse somatique secondaire. Les JA, comme l'ABA, sont importants lors de la maturation, où leurs teneurs augmentent (de 0 à 40 nmol.g⁻¹ MF) chez *Medicago sativa* (Ruduś *et al.*, 2009). Mais l'effet des JA sur l'embryogenèse somatique des conifères n'a jamais été étudié. Ces trois régulateurs de croissances n'ont pas d'effet sur la mise en place de l'embryogenèse somatique précoce, mais le seront plus tardivement afin de moduler la qualité des embryons en fin de maturation.

I.4. Caractéristiques moléculaires des cultures embryogènes

L'aptitude à l'embryogenèse pourrait être étudiée par l'analyse des profils d'expression génétiques et protéiques. De plus, si des marqueurs nous permettent de différencier les lignées en fonction de leur potentiel embryogène, cela donnerait au sélectionneur des marqueurs de sélection précoce. Pour cela, les gènes candidats devront être universels, sensibles et détectables dans des petites quantités de matériel (Lara-Chavez *et al.*, 2012). L'expression de ces marqueurs peut être visualisée par la présence de transcrits ou de protéines. Les gènes et protéines décrits dans les paragraphes suivants, sont retrouvés durant l'embryogenèse somatique précoce (initiation et multiplication) et ont déjà été détaillés par ces auteurs, dont la plupart dans la revue de Trontin *et al.* (2016a) et Miguel *et al.* (2016). Ils sont classés en fonction de leur catégorie fonctionnelle et le **Tableau I.4** recense un nombre non exhaustif de transcrits ou protéines caractérisés au cours de la multiplication des **ME** de conifères.



Tableau I.4 Marqueurs moléculaires pouvant être caractéristiques de la capacité embryogène (**ME**) ou non-embryogène (**NE**) des conifères

Expression	Analyse	Gène/Protéine	Fonction	Nature	Technique	Organisme	Référence Biblio
	ME vs NE	14-3-3-Like protein D	Modifications post traductionnelles	Phosphoserine/phosphothreonine-binding proteins	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	60s et 40s ribosomal protein	Régulation de l'expression génétique	Ribosome	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	Actine	Réorganisation du cytosquelette	Actine	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein	Réorganisation du cytosquelette	ARF-GAPs	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	Aldose-épipimérase	Métabolisme de l'énergie	Mutarotase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	Alpha-1,4-glucan synthase	Modification de la paroi cellulaire	Glycotransférase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	Citrate synthase	Métabolisme de l'énergie	Citrate synthase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME	Cytochrome P450	Protection contre le stress oxydatif	Homéoprotéine	Banque de clones d'ADNc	<i>Pinus radiata</i>	Bishop Hurey <i>et al.</i> (2003)
	ME	Cytosolic ascorbate peroxidase	Protection contre le stress oxydatif	oxydoréductase	microarrays	<i>Picea abies</i>	Stasolla <i>et al.</i> (2004)
	ME vs NE	Enzyme glycolitique	Métabolisme de l'énergie	Triosephosphates isomerase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME	GST proteins	Protection contre le stress oxydatif	Transférase	LC-MS/MS	<i>Araucaria angustifolia</i>	Dos Santos <i>et al.</i> (2015)
	ME	Histones (HDAC) désacétylases	Régulation de l'expression génétique	Désacétylase	qRT-PCR	<i>Pinus pinaster</i>	De vega Bartol <i>et al.</i> (2013)
	ME vs NE	HSP	Réponse au stress	Heat shock cognate protein et Luminal-binding protein	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME	L1L	Régulateur du développement embryonnaire	Leafy cotyledon 1-like/ facteur de transcription	qRT-PCR	<i>Pinus pinaster</i>	De vega Bartol <i>et al.</i> (2013)
ME	ME	LEA	Régulateur du développement embryonnaire	Protéine de stockage	qRT-PCR	<i>Pinus spp</i>	Laara-chavez <i>et al.</i> (2012)
	ME	LEC1-type	Régulateur du développement embryonnaire	Leafy cotyledon 1-like/ facteur de transcription	RT-PCR	<i>Picea abies</i>	Uddenberg <i>et al.</i> (2008)



	ME	Metacaspase 9	Prolifération cellulaire	Cystéine protéase	microarrays	<i>Picea abies</i>	Vestman <i>et al.</i> (2011)
	ME vs NE	miR171	Régulation post transcriptionnelle	miRNA	Banque de clones d'ADNc	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carr.	Li <i>et al.</i> (2014)
	ME	MYB33	Régulateur du développement embryonnaire	Facteur de transcription	qRT-PCR	<i>Pinus spp</i>	Oh <i>et al.</i> (2008)
	ME	NIP	Transport des molécules d'eau	Aquaporine	Marquage histochimique GUS	<i>Pinus taeda</i>	Ciavatta <i>et al.</i> , (2001)
	ME	PCC 13-62	Protection à la dessiccation	Gène LEA	LC-MS/MS	<i>Araucaria angustifolia</i>	Dos Santos <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	PCNA	Prolifération cellulaire	Proliferating cell nuclear antigen	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	PR	Protection contre le stress oxydatif	Chitinase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME	Protéase aspartiques	Contrôle du processus de stockage	Peptidase	LC-MS/MS	<i>Araucaria angustifolia</i>	Dos Santos <i>et al.</i> (2015)
	ME vs NE	SEPR 1 et 2	Prolifération cellulaire	α -D-galactosidase et à la myo-inositol oxygénase	qRT-PCR	<i>Pinus radiata</i>	Aquea et Arce-johnson (2008)
	ME	SERK1	Régulateur du développement embryonnaire	Leucine-rich repeat receptor-like kinase	RT-PCR	<i>Araucaria angustifolia</i>	Steiner <i>et al.</i> (2012)
	ME	Thioredoxine	Protection contre le stress oxydatif	Oxydoréductase	micrograys	<i>Picea abies</i>	Stasolla <i>et al.</i> , (2004)
	ME vs NE	Tubuline alpha-1 chain	Réorganisation du cytosquelette	Tubuline	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	ME	Viciline	Protéine de stockage	Globuline	LC-MS/MS	<i>Araucaria angustifolia</i>	Dos Santos <i>et al.</i> (2015)
	ME	VP1/ABI3	Régulateur du développement embryonnaire	Facteur de transcription	Northern blot	<i>Picea abies</i>	Fischerova <i>et al.</i> (2008)
	ME	WOX 2 et WOX 9	Régulateur du développement embryonnaire	Wuschel related homeobox/ Facteur de transcription	qRT-PCR	<i>Picea abies</i>	Palovaara <i>et al.</i> (2010)
	ME	WOX 2 et WOX 9	Régulateur du développement embryonnaire	Wuschel related homeobox/ Facteur de transcription	qRT-PCR	<i>Picea abies</i>	Palovaara <i>et al.</i> (2010)
	NE	SCL6	Contrôle de la croissance cellulaire radiale	Facteur de transcription	Banque de clones d'ADNc	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carr.	Li <i>et al.</i> (2014)
	NE vs ME	6-Phosphogluconate dehydrogenase	Modification de la paroi cellulaire	Oxydoréductase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	NE vs ME	ATP-synthase	Métabolisme de l'énergie	ATP-synthase	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
	NE vs ME	Catalases	Protection contre le stress oxydatif	Catalases	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)
NE	NE vs ME	DEAD-box ATP-dependant RNA helicase	Régulation post transcriptionnelle	ATP binding	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao <i>et al.</i> (2015)



NE vs ME	Flavonoid 30-hydroxylase	Réponse au stress	Flavonoïde	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao et al. (2015)
NE vs ME	Histones 2 et 4	Régulation post traductionnelle	Structure de la chromatine	LC-MS/MS	<i>Larix principis-rupprechtii</i> Mayr	Zhao et al. (2015)
NE vs ME	miR159	Régulation post transcriptionnelle	miRNA	Banque de clones d'ADNc	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carr.	Li et al. (2013)
NE vs ME	MYB33	Régulation post transcriptionnelle	Facteur de transcription	Banque de clones d'ADNc	<i>Larix kaempferi</i> (Lamb.) Carr.	Li et al. (2013)
NE vs ME	SEPR 91, 110, 114	Prolifération cellulaire	Pectinestérase	qRT-PCR	<i>Pinus radiata</i>	Aquea et Arce-johnson (2008)



I.4.1. Régulation biologique de l'information génétique

I.4.1.1. Facteurs de transcription et gènes homéotiques

On trouve, en premier lieu des facteurs de transcription ou des gènes homéotiques qui ont un rôle clef dans l'expression de certains gènes impliqués dans l'organogenèse des tissus de l'embryon (**Fig I.20**). Ils sont considérés comme des régulateurs majeurs de l'embryogenèse des plantes, et plusieurs d'entre eux ont été identifiés au cours de l'embryogenèse des conifères (Trontin *et al.*, 2016a), ce qui en fait des marqueurs de choix pour l'étude de l'embryogenèse.

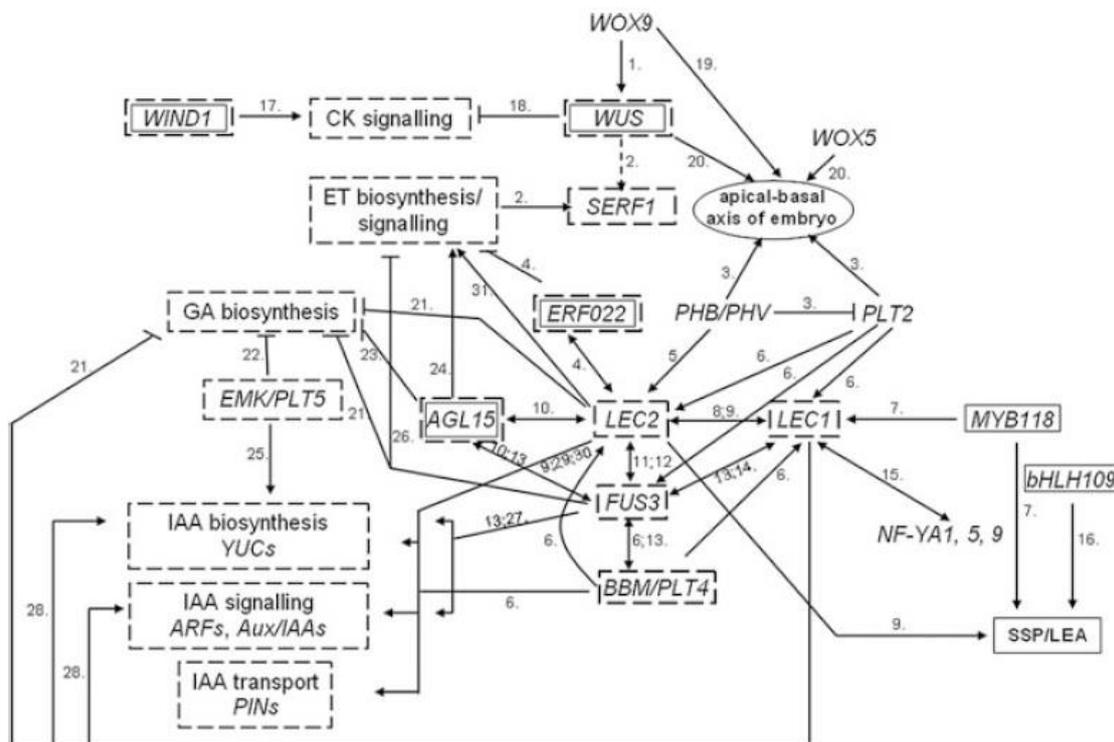


Figure I.20 Interactions entre les différents facteurs de transcription connus pour avoir un impact pendant l'embryogenèse. Les flèches indiquent l'activation de l'expression des gènes. Les lignes sans flèches indiquent une inhibition de l'expression d'un gène. Les lignes en pointillé sont des interactions suggérées entre deux gènes. Les cadres composés de lignes complètes sont des gènes liés au stress, alors que les cadres en pointillés sont des gènes liés aux hormones (Nowak et Gaj, 2016).

I.4.1.1.1. Gènes Leafy Cotylédon (*LEC*)

C'est une famille multigénique incluant de nombreux facteurs de transcription régulant la morphogenèse et les phases de maturation dans la plante entière (Nowak et Gaj, 2016). Ce groupe inclut les gènes *LEC1* et *LIL*, codant un facteur de transcription à boîte CCAAT de type HAP3 (Kwong *et al.*, 2003), ainsi que les gènes *LEC2*, *FUS3*, et *ABI3/Vp1*, qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type B3, régulant l'expression de gènes spécifiques à l'embryogenèse zygotique (Stone *et al.*, 2001). Les membres de cette famille sont les

régulateurs les plus connus pour contrôler l'embryogenèse zygotique chez les plantes (Kwong *et al.*, 2003), et sont essentiels pour la formation/développement des ES à partir des cellules somatiques tout en réprimant le développement en plantule (mutant *lec*, Gaj *et al.*, 2005). L'impact des *LEC* sur la mise en place de l'embryogenèse somatique a été observé chez de nombreuses plantes angiospermes (Zuo *et al.*, 2002 ; Harding *et al.*, 2003 ; Yazawa *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2014 ; Zhu *et al.*, 2014). Le contrôle des *LEC* par l'auxine, l'ABA et les GA, a été observé durant l'embryogenèse zygotique et semble être d'autant plus important pour l'initiation de l'embryogenèse somatique (Braybrook et Harada, 2008).

I.4.1.1.1.1. LEC1

Les *LEC1* sont impliqués dans la voie de biosynthèse et de la signalisation de l'auxine, mais aussi des sucres (saccharose en particulier) pour l'initiation de l'embryogenèse somatique (Casson et Lindsey, 2006). La cible de *LEC1* pour la biosynthèse de l'auxine est le gène YUC10 (Junker *et al.*, 2012). Les *LEC1* sont aussi connus sous le nom de NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y), et induisent l'embryogenèse somatique (Mu *et al.*, 2013). Les *LEC1* sont aussi bien retrouvés surexprimés dans les **ME** que dans les **NE** (Garcia-Mendiguren *et al.*, 2015). *LIL* (Leafy cotyledon like-1) est un facteur de transcription connu pour être exprimé durant la phase précoce de l'embryogenèse somatique (de Vega-Bartol *et al.*, 2013), et son inhibition marque la phase de maturation de l'ES chez *Picea abies* avec l'augmentation de l'expression d'ABI3 (Vestman *et al.*, 2011).

I.4.1.1.1.2. LEC2

Les *LEC2* ont été les gènes les plus étudiés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique. De plus, la biosynthèse et l'accumulation de l'auxine sont régulées par *LEC2* (Stone *et al.*, 2008) via l'activation des gènes *YUC* : YUC2, YUC4 et YUC10 (Wójcikowska *et al.*, 2013). L'expression des gènes *YUC* a pour effet d'augmenter la teneur en AIA des tissus subissant une transition vers l'embryogenèse somatique (Nowak *et al.*, 2015). Les *LEC2* contribuent donc à l'initiation de l'embryogenèse somatique par une augmentation du niveau d'auxine (les membres *IAA1*, *17*, *30* et *31*, (Stone *et al.*, 2008)), induisant par la suite le processus d'embryogenèse somatique. Le gène *FUS3* n'est pas impliqué directement dans l'embryogenèse somatique et n'est pas retrouvé surexprimé dans les cals embryogènes d'*Arabidopsis thaliana* (Ledwon et Gaj, 2011), mais il est impliqué dans le mécanisme de contrôle de *LEC2* et la régulation de l'auxine (Braybrook et Harada, 2008).

I.4.1.1.2. Agamous-like (AGL)

C'est une famille multigénique, codant des protéines à domaine MADS, qui joue un rôle dans la régulation des processus développementaux des eucaryotes (Smaczniak *et al.*, 2012). Les facteurs de transcription avec ce type de domaine, se lient au motif CARG (C-A/T rich G) de l'ADN pour activer ou réprimer l'expression du gène ciblé (West *et al.*, 1997). L'accumulation de la protéine AGL15 a été trouvée dans les stades précoces de l'embryogenèse somatique chez de nombreux angiospermes. Le contrôle de l'embryogenèse d'AGL15 serait aussi associé avec les gènes du métabolisme des gibbérellines (GA) comme GA2ox6 (Thakare *et al.*, 2008).

AGL15 inhiberait les formes actives de GA, permettant la mise en place de la division cellulaire durant l'embryogenèse somatique (Wang *et al.*, 2004). C'est aussi un composant du complexe *SERK1* (Somatic Embryogenesis-Receptor-Like Kinase1, (Karlova *et al.*, 2006)) qui est impliqué dans la transduction des signaux activant les facteurs responsables des modifications cellulaires liées au développement, ainsi que la reprogrammation cellulaire (Nolan *et al.*, 2009). *SERK1* est retrouvé dans les cellules embryogènes et interagit avec la protéine BRI1 (Brassinosteroid-Intensive1) (Aker et de Vries, 2008). *AGL15* serait donc lié par cette action à l'embryogenèse somatique, comme un marqueur de l'aptitude embryogène (Yan *et al.*, 2010).

I.4.1.1.3. *WUSHEL (WUS) et WUSCHEL-related homeobox (WOX)*

C'est une famille multigénique de facteurs de transcription présentant un motif de fixation à l'ADN très conservé, que l'on appelle boîte homéotique, codant un homéodomaine. Les boîtes homéotiques sont impliquées dans le contrôle de la division cellulaire et dans la différenciation cellulaire (Nowak et Gaj, 2016). Ils vont activer ou inhiber leurs cibles, en fonction du type cellulaire et du stade de développement (van der Graaff *et al.*, 2009). La famille des WOX est composée de 15 membres, dont seulement une partie est décrite dans la littérature. Le rôle de ces facteurs de transcription durant l'embryogenèse zygotique est la mise en place de la polarité de l'embryon, mais aussi le maintien de la division cellulaire dans l'embryon et le suspenseur (Wu *et al.*, 2007, *A. thaliana*). Parmi ces membres, *WOX2* définirait les cellules filles apicales du zygote après la division, qui donnent par la suite l'embryon proprement dit. *WOX 8* et *9* seraient à l'origine des cellules basales de l'embryon et du suspenseur (Haecker *et al.*, 2004). Ils ont été montrés comme important pour le contrôle de la division cellulaire et la différenciation cellulaire de l'embryogenèse somatique d'*A. thaliana* (Nowak et Gaj, 2016) et de *P. abies* (Palovaara et Hakman, 2008). Ce sont donc de bons marqueurs de l'aptitude à l'embryogenèse. *WOX2* est surexprimé dans les **ME** de mélèze (Rupps *et al.*, 2016) mais aussi de *P. abies*, alors qu'il serait absent des cultures non-embryogènes (Palovaara *et al.*, 2010).

I.4.1.1.4. *AP2/ERF (Apetala 2/Ethylene Response factor)*

C'est un groupe de facteurs de transcription lié aux stress et à la réponse à l'éthylène. La transition du matériel d'initiation en cellules embryogènes est connue pour entraîner des réponses aux stress. Ces réponses sont imposées par les conditions de culture, comme l'utilisation de l'auxine synthétique 2,4-D (Karami et Saidi, 2010). Lors de la multiplication des cultures embryogènes d'*A. thaliana*, Wickramasuriya et Dunweittl (2015) ont montré que 40 % des facteurs de transcription liés au stress représentaient des gènes codant AP2/ERF. Les gènes de type *AP2/ERF* ont été décrits dans des cultures embryogènes de nombreuses espèces. Les facteurs de transcription *ERF* montrent l'implication de la régulation par l'éthylène dans l'aptitude à l'embryogenèse somatique. Deux membres de cette famille ont montré être impliqués dans l'initiation de l'embryogenèse somatique, *SERF1* et *ERF022*.

I.4.1.1.4.1. *SERF1*

SERF1 et ses orthologues sont connus pour impacter significativement l'embryogenèse somatique de *Medicago truncatulata* (Mantiri *et al.*, 2008), et d'*A. thaliana* (Zheng *et al.*, 2013).

Ce gène serait une cible d'*AGL15*, essentiel pour l'induction de l'embryogenèse somatique (Zheng *et al.*, 2013), et il serait lié à la réponse au stress de ce mécanisme.

I.4.1.1.4.2. ERF022

ERF022 est impliqué dans la voie de biosynthèse de l'éthylène et dans la transduction du signal de ce régulateur de croissance (Nowak *et al.*, 2015). Il permet de réguler la biosynthèse de l'éthylène qui a un impact négatif sur l'embryogenèse somatique. Il n'est donc pas étonnant de le retrouver surexprimé dans les cultures embryogènes d'angiospermes. Son interaction avec *LEC2* a été démontrée comme importante pour l'induction de l'embryogenèse somatique (Nowak *et al.*, 2015).

I.4.1.1.5. MYB

C'est une des familles de facteurs de transcription la plus importante chez *A. thaliana*. Les *MYB* possèdent un domaine de liaison à l'ADN très conservé et sont essentiellement impliqués dans les processus développementaux des plantes et les réponses de défense. Certains des membres de cette famille sont impliqués dans le développement de l'embryon et la maturation de la graine (Nowak et Gaj, 2016). Lors d'un stress abiotique, les membres *MYB118* et *MYB115* induiraient l'accumulation de protéines de réserves, favorisant l'aptitude à l'embryogenèse des tissus durant l'embryogenèse zygotique, en contrôlant positivement les protéines LEA (Zhang *et al.*, 2009b). Les facteurs de transcription *MYB118* et *115* en collaboration avec les protéines LEA, pourraient être des marqueurs de l'aptitude à l'embryogenèse somatique (Nowak et Gaj, 2016).

I.4.1.1.6. Les protéines d'abondance tardive (LEA)

C'est une famille de protéines connue pour être généralement accumulée durant les stades tardifs de l'embryogenèse zygotique et somatique (Shih *et al.*, 2008 ; Morel *et al.*, 2014a). Du fait de leur composition en acides aminés, les protéines LEA ont un caractère hydrophile marqué et une forte résistance à la chaleur (Wise et Tunnacliffe, 2004). Ce qui permet lors de stress abiotiques, en collaboration avec le saccharose (Kermode 1997), la stabilisation de la membrane (Manfre *et al.*, 2009). L'augmentation de la tolérance au stress serait causée par l'accumulation de protéines de stockage qui induirait l'embryogenèse somatique (Stone *et al.*, 2008). Leur implication dans l'aptitude à l'embryogenèse est significative dans de nombreuses espèces d'angiospermes comme *Glycine max* (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003) ou *A. thaliana* (Gliwicka *et al.*, 2012).

I.4.1.2. Processus de l'information génétique

Ce sont tous les phénomènes d'expression des gènes, qui nécessitent la synthèse, l'assemblage, et la stabilisation des nouvelles protéines, pouvant aller jusqu'à la modification de certains peptides (modifications post traductionnelles), nécessaires pour la régulation de l'embryogenèse somatique. Se retrouvent ici tous les transcrits et protéines impliqués dans les variations génétiques (épigénétique), la transcription, la traduction, en passant par la réparation de l'ADN.

1.4.1.2.1. Les micro ARN (miRNA)

C'est une famille de « non-protein-coding RNA » qui fonctionnent comme des régulateurs négatifs de l'expression des transcrits (DeSano et Xu, 2009). Les miRNAs, qui contrôlent l'expression post-transcriptionnelle des gènes, ont un rôle dans la régulation de l'embryogenèse somatique (Oh *et al.*, 2008 ; Yakovlev *et al.*, 2010), et plus particulièrement en régulant de nombreux facteurs de transcription chez les conifères (Zhang *et al.*, 2012). Il existe de nombreux miARN, dont 11 ont été montrés comme étant des marqueurs clés des différents stades de l'embryogenèse somatique de *Larix kaempferi* (Zhang *et al.*, 2012). Les micro ARN comme miR171 montrent une augmentation de leur expression au sein des **ME** en comparaison avec des cultures non-embryogènes (Zhang *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Le miR171 est connu pour cibler les ARNm de la famille des facteurs de transcription *Scarecrow-like* (*SCL* : *SCL6-II* (*SCL27*), *SCL6-III* (*SCL22*), et *SCL6-IV* (*SCL6*)) chez *Arabidopsis* (Llave *et al.*, 2002), afin d'inhiber leur production. Une augmentation de l'expression de ce microRNA a été trouvée chez *Larix kaempferi* (*Lamb.*) *Carr.* (Li *et al.*, 2014), montrant que la régulation de *SCL6* par miR171 participe à la régulation de la division cellulaire et du maintien du potentiel embryogène des **ME**.

1.4.1.2.2. 60s et 40s ribosomal protein

Ce sont les deux sous-unités des ribosomes des eucaryotes qui seront utilisées pour la traduction des ARNm en protéines. Ces protéines ont été retrouvées surexprimées dans les **ME** du mélèze (Zhang *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2015a), pouvant expliquer l'importance de la machinerie cellulaire et l'implication forte des mécanismes traductionnels pour l'initiation de l'embryogenèse somatique.

1.4.1.2.3. Histones désacétylases (HDAC)

C'est une famille de protéines jouant un rôle important dans la régulation de l'expression génétique, en catalysant la perte du groupement acétyle sur la queue N-terminale des histones. Cela entraîne l'inhibition de certains transcrits par remodelage épigénétique de la chromatine. Certaines sont surexprimées durant l'embryogenèse précoce du pin maritime (de Vega-Bartol *et al.*, 2013), expliquant l'importance du remodelage de la chromatine dans la différenciation cellulaire en ES.

1.4.1.2.4. Protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes sont des protéines qui ont, entre autres, pour fonction d'aider au repliement tridimensionnel (structure 3D) des autres protéines durant leur synthèse ou à leur stabilisation en cas de stress. On peut ici en citer deux : les Elongation factor et les Heat shock protein.

I.4.1.2.4.1. Elongation factor

Elles ont été retrouvées durant l'embryogenèse somatique, surexprimées dans les cultures embryogènes des angiospermes (Chugh et Khurana, 2002 ; Marsoni *et al.*, 2008) mais aussi chez *Araucaria angustifolia* (Jo *et al.*, 2013) dans les lignées **ME** les plus embryogènes.

I.4.1.2.4.2. Heat shock proteins (HSP)

C'est une famille de petites protéines chaperonne impliquées dans l'acquisition de la tolérance aux stress thermiques (haute température). Il existe différentes familles de HSP : 70, 60 (dites chaperonnines), 90, 100, et les « smallHSP », dont les plus connues sont les HSP 70 et les chaperonnines. Les HSP 70 sont impliquées dans les processus de prévention d'agrégation, l'assistance au repliement des protéines, l'import de protéines et leur translocation pour la dégradation, mais aussi dans la transduction de signaux et l'activation transcriptionnelle (Wang *et al.*, 2004). Les HSP 90, sont elles, connues pour faciliter la maturation des molécules signal utilisées pour le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation des protéines et leur transport (Young *et al.*, 2001). Les smallHSP sont impliquées dans la prévention de l'agrégation et la stabilisation des protéines (Lee et Vierling, 2000 ; Wang *et al.*, 2004). Les HSP et smallHSP sont en général associées avec les protéines LEA lors de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Trontin *et al.*, 2016a) durant l'embryogenèse tardive (Teyssier *et al.*, 2014). Les HSP70 ont aussi été détectées dans les stades précoces de l'embryogenèse somatique chez la vigne (Marsoni *et al.*, 2008) et chez le mélèze (Zhao *et al.*, 2015a). Dans tous les modèles présents dans la littérature, les HSP identifiées dans les **ME** sont souvent associées à une reprise de la division cellulaire (Zhao *et al.*, 2015a). Cependant chez le Douglas des HSP ont également été trouvées dans les **NE**.

I.4.2. Réponse au stress

Lors du développement des embryons, les gènes et protéines impliqués dans la défense des plantes sont surexprimés, car ils jouent un rôle majeur dans la différenciation de l'embryon. De nombreux marqueurs de régulateurs de stress oxydatif interviennent, en réponse à l'accumulation de dérivés réactifs d'oxygènes (ROS) durant l'embryogenèse somatique, ce qui a pour effet d'induire la division cellulaire. Les ROS pourrait aussi servir dans la transduction des signaux pour l'induction de l'embryogenèse (Nagata *et al.*, 1994), mais doivent être contrôlés rapidement par la plante, car une accumulation de ces composés entraîne des dommages cellulaires (Mittler 2002). Ils sont capables d'oxyder les protéines, l'ADN (perturbant la réplication), ainsi que les membranes des cellules (destruction des lipides par peroxydation lipidique), entraînant la mort cellulaire.

I.4.2.1. Glutathione S-transferase (GST)

C'est une famille de protéines impliquées dans la réponse au stress, incluant les attaques pathogènes, le stress oxydatif et la toxicité de certains composés (Marrs 1996). Elles assurent entre autres, une protection contre les ROS surexprimés pendant l'embryogenèse somatique (Galland *et al.*, 2001; Thibaud-Nissen *et al.*, 2003) et sont induits par l'auxine (Nagata *et al.*, 1994). Les membres de cette famille protéique vont catalyser la conjugaison du tri peptide

glutathion (GSH) avec les ROS afin de dégrader ces produits. Le GSH a été rapporté comme favorisant la division et la différenciation cellulaire de la plante (Belmonte *et al.*, 2005). La formation et le développement d'embryons somatiques des cultures embryogènes d'*Araucaria angustifolia* sont augmentés en ajoutant du GSH au milieu de culture (Vieira *et al.*, 2012). Lors de l'étape de multiplication, les GSH ont été retrouvés surexprimés dans les tissus embryogènes d'espèces ligneuses angiospermes (Marsoni *et al.*, 2008). Dans le cas des conifères, le même profil a été observé, mais de manière d'autant plus marquée, que la lignée était embryogène (Dos Santos *et al.*, 2016).

I.4.2.2. Cytochrome P450 (CYP P450)

Les cytochromes P450 constituent une famille de protéines intervenant dans de très nombreuses réactions d'oxydoréduction. Chez la plante, les CYP P450 contrôlent principalement la croissance, la réponse au stress oxydatif, la biosynthèse de l'auxine, ainsi que la dégradation de l'acide abscissique (Cutler et Krochko, 1999). Lors des stades précoces de l'embryogenèse, certaines familles de CYP450 ont été montrées comme étant la deuxième plus grande famille de protéines surexprimées dans les **ME** de *Pinus radiata* (Bishop-hurley *et al.*, 2003).

I.4.2.3. Ascorbate peroxydase (APX)

Les ascorbate peroxydases sont principalement impliquées dans la détoxification des cellules par élimination de H₂O₂ ce qui leur confère un rôle majeur dans le contrôle de l'état redox cellulaire. L'ascorbate peroxydase va transformer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en utilisant l'ascorbate comme substrat. L'activité de l'ascorbate peroxydase semble avoir un rôle important dans l'équilibre entre la prolifération et la différenciation cellulaire pendant l'embryogenèse des angiospermes (Arrigoni *et al.*, 1992) et des gymnospermes (Stasolla et Yeung, 2001). Ceci peut expliquer que l'état redox cellulaire permettrait de contrôler les événements précoces du développement de l'embryogenèse (Stasolla *et al.*, 2002, Zhen et al., 2015). Cette protéine a été trouvée comme plus abondante dans la **ME** comparativement à des **ME** bloquées de *Picea abies* (Stasolla *et al.*, 2004) ou au cal non-embryogène de *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009a), et du mélèze (Zhao *et al.*, 2015a).

I.4.3. Processus du métabolisme

L'activation du métabolisme serait très importante pour l'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse des cultures (Fehér *et al.*, 2003). Un métabolisme primaire fort est la caractéristique de tissus embryogènes, car il est important pour la division et la différenciation en embryon. Il concerne chez les conifères principalement le métabolisme des sucres et des acides aminés. Le métabolisme des sucres est très important durant l'étape de multiplication, avec une importante teneur en hexoses dans les masses en multiplication car il va fournir l'énergie nécessaire (Taber *et al.*, 1998 ; Lipavská et Konrádová, 2004). Le métabolisme peut aussi être évalué par l'analyse d'activité des enzymes impliquées.



I.4.3.1. Adénylate kinase

C'est une phosphotransférase catalysant l'interconversion des nucléosides phosphates (ATP ADP et AMP) qui stockent l'énergie entre les réactions métaboliques qui en libèrent ou en absorbent. L'adénylate kinase est donc essentielle dans la production d'énergie. Le statut énergétique d'un tissu donné est un indicateur de l'état métabolique global des cellules et peut être décrit par sa charge d'énergie adénylate (Pradet et Raymond, 1983), ce qui en fait un bon marqueur. Cette protéine a été retrouvée surexprimée dans des **ME** de *Vitis vinifera* en la comparant avec des cultures non-embryogènes de *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.*, 2008).

I.4.3.2. Triosephosphate isomérase

C'est une enzyme impliquée dans la glycolyse. Elle est importante pour la génération d'énergie dans les cellules, en transformant le di-hydroxy-acéto phosphate, en glyceraldéhyde 3-phosphate. Elle favorise le fonctionnement du cycle de Krebs, qui avec la glycolyse et la production d'énergie associée, vont permettre de subvenir aux besoins énergétiques pour la division et l'élongation cellulaire au cours du développement embryonnaire (Carrari et Fernie, 2006; Fait *et al.*, 2006). La triosephosphate isomérase est surexprimée dans les **ME**, par rapport aux **NE** du mélèze (Zhao *et al.*, 2015a). L'inhibition de cette protéine, induirait l'arrêt du cycle de Krebs, qui aurait pour conséquence un arrêt du métabolisme mitochondrial en condition de stress oxydatif, conduisant à la prévention des ROS (Cabiscol *et al.*, 2000).

I.4.4. Processus cellulaires

Les processus cellulaires regroupent différentes fonctions biologiques que sont le cycle cellulaire en tant que tel, mais aussi la communication et l'organisation des composants cellulaires. L'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse est tout d'abord marquée par la dédifférenciation en l'embryon, faisant intervenir la division et l'élongation des cellules. La réactivation de la division est nécessaire pour la différenciation en embryon (Nagata *et al.*, 1994) et l'établissement de l'aptitude à l'embryogenèse (Dudits *et al.*, 1991). L'embryogenèse somatique est aussi le siège de modification de la paroi cellulaire et de la régulation des molécules signal liées à la paroi cellulaire.

I.4.4.1. Tubuline et actine

L'actine et la tubuline sont les composants cellulaires du cytosquelette, qui vont s'assembler respectivement en microtubules et microfilaments. Pendant la division, elles participent à la séparation des organites et des chromosomes dans les deux cellules filles. L'accumulation de la tubuline montre une reprise de l'activité du cycle cellulaire dans une cellule (de Castro *et al.*, 2000). L'actine joue un rôle important dans la polarité des cellules, l'orientation de la division cellulaire, l'élongation cellulaire, la mise en place de la paroi, les processus de transport et pour la mort cellulaire programmée (PCD ; Schwarzerová *et al.*, 2009). Il a été montré que dans les **ME** de *Picea abies* elles étaient présentes principalement dans les cellules du suspenseur (Schwarzerová *et al.*, 2009) et aussi surexprimées dans les cultures embryogènes de la vigne, du mélèze, et du pin noir par rapport à leurs cals non-embryogènes (Marsoni *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2015a ; Klubicová *et al.*, 2017).

I.4.4.2. SEPR

C'est une grande famille de gènes impliqués dans la modification de la paroi cellulaire. Les principaux membres sont *SEPR1* qui codent un homologue à la α -D-galactosidase, enzyme qui intervient dans la modification et la dégradation des galactomannanes de la paroi cellulaire (McCabe *et al.*, 1997) et *SEPR43*, un homologue de la myo-inositol oxygénase, qui participe à la synthèse des précurseurs de la paroi cellulaire (acide galacturonique, xylose, apiose et arabinose) (Kanter *et al.*, 2005). Les *SEPR1* et *SEPR43* sont surexprimés dans les **ME** de *P. radiata* (Aquea et Arce-johnson, 2008) et l'identification de ces gènes soutient l'idée que des altérations spécifiques de la composition de la paroi des cellules des **ME** peuvent être importantes lors du développement de l'embryon (Stasolla *et al.*, 2004). D'autres membres de cette famille codent des pectinestérases (*SEPR91*, 110 et 114) et caractérisent les cals non-embryogènes (Aquea et Arce-johnson, 2008)

I.4.4.3. ADP-ribosylation/GTPase-activating proteins (ARF-GAP)

Cet ensemble de protéines est impliqué dans le trafic membranaire, dans le contrôle du montage et démontage des protéines d'enveloppe des vésicules, ainsi que dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Randazzo *et al.*, 2000). Ce complexe est aussi requis pour le transport de l'auxine durant l'embryogenèse (Zhang *et al.*, 2012), afin de favoriser la polarisation cellulaire. Sa surexpression dans les **ME** de conifères a été montrée par Zhao *et al.* (2015a) en comparaison avec les cultures non-embryogènes.

I.4.4.4. Metacaspase (MC)

C'est une famille de protéines du groupe des cystéines peptidases. Elles sont impliquées dans les événements de mort cellulaire programmée (PCD). Deux interventions successives de PCD sont obligatoires lors de l'embryogenèse zygotique, afin dans un premier temps, de sculpter l'embryon en éliminant les cellules embryonnaires adjacentes, et ensuite pour supprimer les cellules du suspenseur (Filonova *et al.*, 2002). La mort cellulaire est donc un processus « normal » du suspenseur pour un bon développement de l'embryon. MC9 est exprimée très tôt durant l'embryogenèse somatique de l'épicéa (Vestman *et al.*, 2011).

I.4.4.5. Germines-like proteins (GLP)

C'est une superfamille de glycoprotéines très répandue dans le règne végétal qui possède un domaine conservé à feuillet- β (Dunwell *et al.*, 2008). Initialement identifiées comme des marqueurs spécifiques de la germination du blé, elles possèdent aussi diverses fonctions dans le développement des plantes. Cela peut être des enzymes, des protéines structurales, des récepteurs durant l'embryogenèse somatique, et des protéines de réponses au stress salin et pathogène (Dunwell *et al.*, 2000 ; Bernier et Berna, 2001 ; Lane 2000). GER1 a été identifiée chez *Pinus caribaea* lors d'une comparaison **ME** et **NE** (Domon *et al.*, 1995), et elle serait reliée au cycle cellulaire de cette essence (Mathieu *et al.*, 2003). Cette protéine surexprimée dans les **ME** de *Pinus radiata* (Bishop-hurley *et al.*, 2003) joue un rôle important dans la formation de l'ES en régulant le remodelage de la paroi cellulaire (mélèze ; Mathieu *et al.*, 2006).

I.4.5. Transport et stockage

I.4.5.1. Nodulin-like intrinsic protein (NIP)

C'est une famille d'aquaporines spécifiques du suspenseur qui permettent l'absorption de l'eau en agissant comme un canal hydrique dans la cellule, et favorisent l'élongation cellulaire. Cette protéine est surexprimée lors de la phase de multiplication des **ME** dans le suspenseur et sera inhibée lors de l'embryogenèse avec la disparition progressive du suspenseur par PCD (Ciavatta *et al.*, 2001).

I.4.5.2. Lipid-transfer proteins (LTP)

C'est une famille de protéines ubiquitaires qui transportent les phospholipides à travers les membranes. Elles sont des marqueurs de l'embryogenèse précoce chez la carotte (Sterk *et al.*, 1991) et contrôlent l'expansion cellulaire dans l'embryon. Elles sont aussi associées aux premiers stades de différenciation des tissus durant l'embryogenèse somatique (Chugh et Khurana, 2002).

I.4.5.3. Vicilin

C'est une protéine de stockage énergétique importante chez de nombreux conifères. Dans la nature, celle-ci s'accumule au début de la formation de l'embryon cotylédonaire et aurait donc une importance dans l'embryogenèse tardive durant la maturation (Teyssier *et al.*, 2014). Dos Santos *et al.* (2016) ont découvert chez *Araucaria angustifolia*, que cette protéine était plus abondante dans leur lignée à fort potentiel embryogène, ce qui suggère que cette protéine, en plus de son rôle de stockage, impacte le processus d'embryogenèse.



I.5. Méthodes d'étude de la physiologie moléculaire

L'embryogenèse somatique permet de produire, *in vitro*, des ES après dédifférenciation de cellules somatiques. Jusqu'à ce jour, de nombreux travaux se sont attachés à optimiser les conditions d'initiation, de multiplication et de maturation des ES sans pour autant nous donner des clés permettant de décrypter les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'aptitude à l'embryogenèse de ces cellules. Des approches technologiques nouvelles permettent de suivre l'accumulation et l'évolution des transcrits (transcriptomique) et des traduits (protéomique), et ce tout au long du développement embryonnaire. Des outils d'analyses du protéome par spectrométrie de masse (Zhao *et al.*, 2015a) et du transcriptome avec séquençage à haut débit (Li *et al.*, 2014) ont déjà été appliqués à l'étude des ME de conifères. Mais ces deux techniques n'ont jamais été croisées pour cette description. Pour un même tissu, le transcriptome ne contient que les informations des futures des protéines qui pourraient être exprimées dans nos cellules. En effet les transcrits ne seront pas forcément traduits en protéines à la suite de l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles. Le protéome présente un instantané de la composition protéique de la cellule (**Fig I.21**). De ce fait, les relations quantitatives et qualitatives entre le transcrit et son produit final ne peuvent pas être définies (Gygi *et al.*, 1999; Uesono et Toh-E, 2002). L'analyse moléculaire de ces deux entités, permet d'avoir une vision intégrative de l'expression des gènes. Ce rapprochement a déjà été réalisé pour l'ES cotylédonnaire et somatique de *P. pinaster* (Morel *et al.*, 2014a).

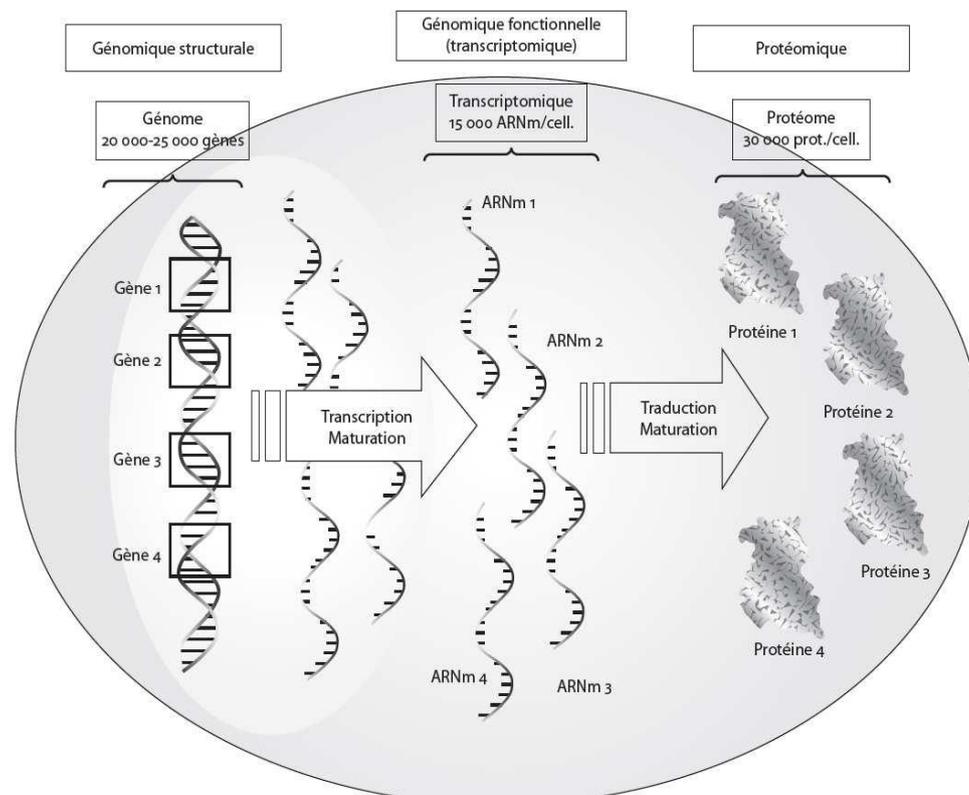


Figure I.21 Relation entre l'étude du transcriptome et du protéome dans une cellule (Bidart et Lacroix, 2006).

La détection de marqueurs moléculaires de l'embryogenèse somatique des conifères a commencé dans les années 1990 avec l'isolement de protéines différentiellement exprimées au cours du développement embryogène. Depuis les premiers profils protéiques, des analyses complémentaires d'expression des transcrits ont confirmé l'importance des bouleversements génétiques au cours du développement embryonnaire. L'utilisation d'anticorps pour les « patterns » de protéines et l'analyse comparative des séquences peptidiques des traduits et/ou nucléotidiques des transcrits ont conduit progressivement à l'identification de marqueurs majeurs exprimés chez les organismes modèles. Depuis, de nouvelles méthodes basées sur l'analyse en masse, des produits et des transcrits exprimés, ont conduit à une augmentation des taux d'identification des marqueurs moléculaires régulés lors de l'embryogenèse. Les années 2000 ont vu ainsi l'apparition et le développement des techniques dites « omiques », avec la transcriptomique et le séquençage à haut débit, mais aussi la protéomique couplée à l'identification des peptides par spectrométrie de masse. La concaténation des données permet alors de construire des références, comme pour le Douglas, un transcriptome de référence version 1.0 (août 2016). A la différence des données de génomique, la transcriptomique et la protéomique réfèrent à des données d'expression caractérisant le fonctionnement de l'embryon. Si le transcriptome et le protéome semblent complémentaires, l'information qui en découle est, elle, bien différente, puisqu'un gène peut donner plusieurs transcrits qui seront ou non traduits, et une protéine peut subir de nombreuses variations post-traductionnelles qui modifieront sa fonction.

I.5.1. Analyses de Protéomique

Le protéome représente l'ensemble des protéines qui sont exprimées dans une cellule à partir de son génome, dans des conditions données et à un moment donné. Ainsi, en fonction de la situation (stade de développement, contraintes environnementales), il existe de nombreux protéomes potentiels pour un seul génome (Zivy et Vienne, 2000). Une analyse de protéomique nécessite d'isoler des protéines (protéines totales, membranaire etc...) puis de les séparer (sur gel, ou sur colonne par exemple) pour enfin les identifier. Actuellement la technique la plus puissante pour une visualisation et quantification des protéines est la spectrométrie de masse. C'est une technique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier les protéines et les molécules, par la mesure de leur masse moléculaire. Les protéines extraites dans un tampon, sont déposées sur un gel SDS-PAGE afin d'éliminer le tampon d'extraction, et de les fractionner. Les bandes protéiques peuvent ensuite être colorées, découpées puis digérées par une Ser-peptidase, la trypsine. Les peptides ainsi générés peuvent être analysés grâce à un appareil de spectrométrie de masse, composé d'un système d'ionisation des molécules à analyser, d'un analyseur (tri des ions en fonction de leur masse/charge), d'un détecteur (comptage des ions) et d'un enregistreur (pour traiter le signal). Il existe plusieurs types de spectromètre de masse, variant principalement par leur mode d'analyse des peptides ionisés.

I.5.1.1. Etape d'ionisation

L'ionisation peut se faire à l'aide de différentes techniques, dont les principales utilisées sont la désorption/ionisation laser assistées par matrice (MALDI) et l'électro nébulisation (ESI). L'ionisation MALDI consiste à d'abord déposer en sandwich l'échantillon dans une matrice

ionisée (matrice/échantillon/matrice), afin de le cristalliser. L'ionisation de la matrice se fait ensuite à l'aide d'un laser, dans une atmosphère sous vide. Des transferts de charges positives se font alors vers les peptides. L'ionisation ESI se fait par nébulisation de l'échantillon à chaud depuis un capillaire de verre métallisé, sous champ électrique. Cela a pour effet de produire un brouillard de micro gouttelettes chargées électriquement. En chauffant, le solvant s'évapore et les gouttelettes explosent pour former des ions désolvatés. L'ESI a de nombreux avantages en comparaison au MALDI. En effet pour un même composé : **1)** les ions seront fortement chargés et caractérisés par des valeurs m/z (masse/charge) très faibles (500-3 000, contre 1 000-200 000 en MALDI) plus adéquate pour l'analyse de peptides, **2)** la source d'ionisation est continue (impulsionnelle en MALDI) ce qui autorise une alimentation par une sortie de colonne séparative pour analyser un mélange complexe de peptides et **3)** la quantité d'ions produits est plus conséquente, d'où une meilleure sensibilité. La technique MALDI permet néanmoins une meilleure tolérance à la présence de sels, ce qui en fait une technique « robuste » qui peut être complémentaire avec l'ESI.

I.5.1.2. Etape d'analyse de la masse

Les peptides ionisés seront ensuite séparés, en mesurant la réponse de leur trajectoire soumise à des champs électriques et ou magnétiques, c'est-à-dire en fonction du rapport masse/charge de ceux-ci, à l'aide d'un analyseur. Cette analyse est le mode classique appelé MS car un seul spectromètre de masse est utilisé (**Figure I.22, A**). Afin d'améliorer la précision de l'identification des masses moléculaires, de caractériser des modifications post traductionnelles tout en réduisant l'identification de faux positifs, les ions peuvent, après avoir été analysés et sélectionnés, subir une fragmentation contrôlée par collision dans une phase gazeuse dans le spectromètre de masse. La fragmentation va se faire au niveau des liaisons peptidiques amides pour obtenir des ions fragments de masses différentes. Ces fragments seront alors analysés lors d'une seconde étape de spectrométrie de masse, dite en tandem. L'analyse est dite en mode MS/MS puisqu'elle nécessite 2 étapes sollicitant un spectromètre de masse (**Figure I.22, B**).

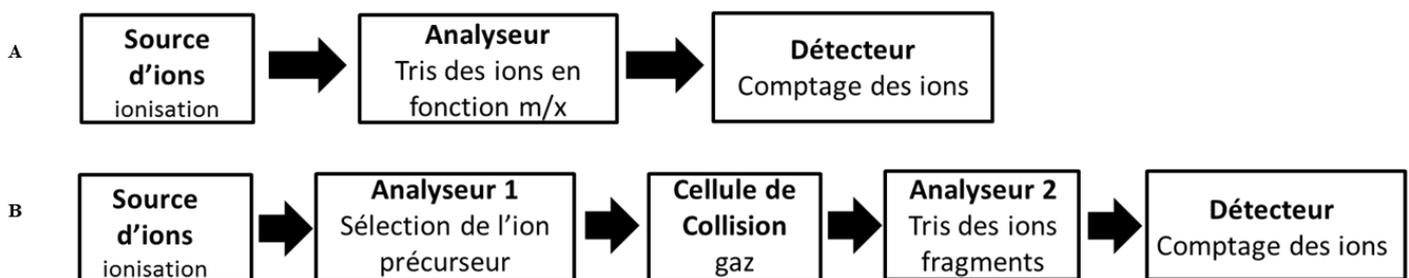


Figure I.22 Principe de la spectrométrie de masse classique (MS), B : principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

En mode MS, les ions peuvent être analysés par différents analyseurs qui se différencient par le principe de mesure qui sont : le temps de vol (TOF), ou à stabilité de trajectoire dans un champ électrique (Orbitrap, quadripôle, piège ou trappe d'ions, FTICR). Chaque analyseur a ses propriétés en termes de résolution, de précision, de gamme m/z accessible et de pouvoir de transmission.

L'analyseur TOF, consiste à mesurer le temps que met un ion à parcourir une distance donnée après accélération sous tension. Le rapport m/z est mesurable à partir du temps de vol. Afin de passer outre le problème de faux positifs (ions identiques localisés à des endroits différents, en arrivant en décalé), le mode réflectron impose un champ électrique en direction opposée de leur arrivée, réfléchissant les ions permettant une réduction de la dispersion dans le temps et une arrivée en même temps des ions identiques sur le détecteur.

Les analyseurs à stabilité de trajectoire mesurent la trajectoire des ions en fonction de leur rapport m/z en réponse à un champ électrique périodique qui sera stable ou non.

Le premier, le Quadripôle, est composé de quatre barres parallèles, entre lesquels un potentiel électrique continu et un potentiel alternatif est appliqué. Les ions suivent une trajectoire décrite par les équations de Mathieu, permettant seulement aux ions qui auront des trajectoires stables d'être détectés par l'analyseur.

Les pièges ioniques quadripolaires (IonTrap, trappe d'ions) sont des pièges ioniques, où la préparation, l'analyse et la détection des ions se fait dans le même espace. Ils sont composés de trois électrodes à sections hyperboliques, entre lesquelles une tension continue est appliquée. La stabilité est déterminée par les équations de Mathieu, quand les ions sortent de l'analyseur.

L'Orbitrap, est une trappe d'ions à champ électrostatique composé d'une électrode creuse, dans laquelle une électrode en fuseau est insérée. Le champ suit l'axe particulier des électrodes, permettant de piéger les ions par des forces électrostatiques tout en compensant les forces centrifuges. Cet analyseur permet une mesure plus précise que les pièges ioniques quadripolaires.

Le FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) est un piégeage des ions dans un champ électrique et magnétique. L'analyseur est composé d'une cellule ICR (Cellule à résonance cyclotronique ionique), qui comporte six plaques sous tension, isolées les unes des autres. Tous les ions présents vont être excités et mis en phase par un balayage de fréquence. Les ions auront donc la même trajectoire mais pas la même position. Le signal obtenu sera la combinaison des sinusoïdes décroissants exponentiellement aux fréquences des différents ions excités présents dans la cellule.

En spectrométrie de masse en tandem, ou mode MS/MS, le même analyseur peut être réutilisé en combinaison, comme le TOF-TOF (le réflectron n'est utilisé que sur le deuxième, Fig I.23. A), le triple quadripôle, ou encore plusieurs pièges d'ions quadripolaires. Une hybridation de différents analyseurs est aussi possible, permettant de combiner les points forts des deux analyseurs.

Le Q-TOF (**Fig I.23 B**) est constitué d'un double quadripôle (Q) et d'un analyseur TOF. Le quadripôle apporte la précision et le TOF une forte sensibilité, une rapidité et une précision d'analyse. Il est limité par la faible gamme de détection du TOF avec une perte d'ion.

La trappe linéaire (**Fig I.23 C**) est composée d'un quadripôle (Q) et d'un piège d'ions. Elle permet d'éviter les problèmes de charges associés aux ions. Le piège apporte une analyse plus rapide et une meilleure sensibilité, ce qui permet tous les modes d'acquisition du quadripôle.



Piège d'ions quadripolaire -TOF (Fig I.23. D) est une combinaison qui permet une analyse structurale très poussée grâce au piège et possède une forte précision en masse sur les ions précurseurs.

LTQ-Orbitrap ou Q-Orbitrap (Fig I.23. E) est un couplage qui permet d'obtenir une précision en masse et une résolution très forte avec une identification facilitée.

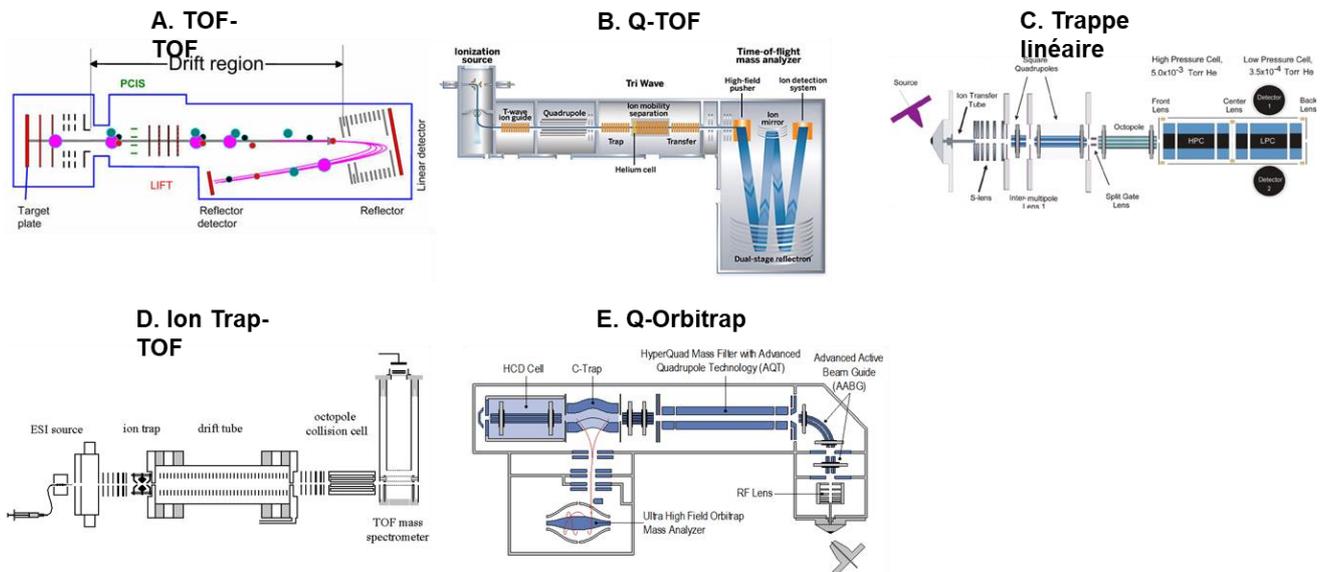


Figure I.23 Schémas de différents montages principalement utilisés pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

I.5.1.3. La détection et la détermination des peptides

L'analyse des peptides se fait à l'aide de détecteurs couplés en fin de montage afin de compter les ions sous vide. Il en existe plusieurs : le Cylindre de Faraday, le multiplicateur d'électrons ou le multiplicateur de photons. En sortie, un chromatogramme est obtenu avec différents spectres de masse qui sont les ions originels. Les peptides seront comparés à une base de données choisie (d'abord une recherche large afin de voir d'éventuelles contaminations, puis plus fine) afin d'identifier les protéines présentes. Les critères de validation sont nombreux : masses des ions parents et enfants, nombre minimum de peptides détectés par protéine, pourcentage de couverture, distribution des peptides le long de la séquence protéique etc...

La spectrométrie de masse permet la détection et la caractérisation de beaucoup de protéines, mais il existe néanmoins quelques limites. La première est la possibilité de contamination des échantillons, notamment par des kératines omniprésentes dans l'environnement, ou une mauvaise séparation/purification entraînant des faux positifs. Les modifications post-traductionnelles, ou encore un nombre trop petit de peptides détectés, peut entraîner respectivement des pics non attribués ou une extinction du signal de la protéine. Pour finir, de nombreuses espèces n'ont pas été séquencées et intégrées dans des bases de données, ce qui implique la comparaison avec des masses obtenues avec celles de peptides d'une espèce séquencée, augmentant les faux positifs. Néanmoins cette technique très robuste donne des résultats de qualité expliquant l'utilisation récente des études protéomiques par spectrométrie de masse pour suivre l'accumulation des protéines durant l'embryogenèse somatique des conifères (Teyssier *et al.*, 2014 ; Zhao *et al.*, 2015a ; Dos Santos *et al.*, 2016).

I.5.2. Analyses de Transcriptomique

La transcriptomique est l'analyse du transcriptome qui représente l'ensemble des gènes transcrits dans une cellule à un moment bien précis (stade de développement, conditions environnementales...) (Strickler *et al.*, 2012). Ces données permettent à terme de caractériser la structure transcriptionnelle des gènes, les sites d'épissage alternatif et les modifications post-transcriptionnelles, ainsi que la quantification des changements de niveaux d'expression des différents transcrits pendant le développement ou dans des conditions expérimentales différentes (Strickler *et al.*, 2012). Les techniques actuelles de transcriptomique ont pour avantage de posséder une forte résolution de détection qui permettent de visualiser les différences d'expression, même très fines, entre les gènes.

I.5.2.1. Préparation

Une étude de transcriptomique passe tout d'abord par une extraction des ARN totaux des tissus, puis par une purification (ARNm) et/ou une déplétion (ARN ribosomiques) avant le séquençage. De nombreuses techniques existent afin d'isoler les ARN à partir de tissus végétaux. Une fois la technique sélectionnée il faut préparer la banque d'ADNc. Les ARNm sont alors fragmentés (digestion par RNaseIII ou hydrolyse chimique par le zinc (Van Dijk *et al.*, 2014), puis liés à des adaptateurs, rétro transcrits en ADNc, et pour finir amplifiés par PCR.

I.5.2.2. Séquençage

Différentes techniques de transcriptomique existent, comme les méthodes d'hybridation et de séquençage. Les techniques d'hybridation reposent sur la technique d'ADNc greffés sur un support physique (membrane : macroarray ou lame de verre : microarray). Ces ADNc cibles seront hybridés contre des sondes ARN, du tissu d'intérêt, rétrotranscrites en ADNc marquées par un fluorochrome suivant une méthode de type Southern blot. Cette technique nécessite une bonne connaissance des génomes cibles afin d'avoir sur la lame une représentativité la plus exhaustive possible des gènes. De plus de nombreux travaux utilisant des puces à ADN montrent d'autres limites comme le seuil de sensibilité de la technique d'hybridation, l'impossibilité de détecter des transcrits rares ou peu exprimés (Royce *et al.*, 2007). Les techniques de séquençage, quant à elles, permettent de déterminer précisément la séquence des transcrits, tout en ouvrant de nouveaux horizons, comme l'identification des séquences peptidiques de transcrits inconnus. Les premières techniques de séquençage utilisées étaient par la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), le séquençage ADNc (Joosen *et al.*, 2006) ou le séquençage d'EST (étiquette de séquence exprimée) (Richmond et Somerville, 2000). Les méthodes de séquençage de seconde génération (NGS : Next Generation Sequencing) utilisant le RNA-Seq, ont été développées à la base afin de réduire le coût de séquençage du génome humain (Schloss 2008). Ces technologies ne nécessitent pas de clonage de fragments d'ADN dans des plasmides bactériens et permettent plusieurs millions de réactions de séquençage en parallèle. L'essor de ces techniques a permis le développement des techniques RNA-Seq.

Différentes technologies NGS ont été développées au cours des années, comme le 454 (Roche), l'Ion Torrent (Personal Genome Machine (PGM) et Proton, Life Technologies), le SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection, Applied Biosystems), l'Illumina/Solexa et le PacBio

(Pacific Biosciences). Dans le cas de l'ion Torrent, le SOLiD et le 454, les banques d'ADNc sont capturées sur des billes (un fragment par bille) et les fragments seront amplifiés individuellement dans une gouttelette grâce à une PCR en émulsion. L'ADN sera dénaturé, et les billes distribuées dans des puits sur des lames, en contact avec des fibres optiques (454 et Ion Torrent), ou accrochées sur des lames de verre après une fixation covalente (SOLiD).

En termes de séquençage, le 454 utilise le pyroséquençage, où dans les puits contenant la bille avec le fragment amplifié, sera ajouté des amorces et des enzymes de séquençage. Des nucléotides seront ensuite ajoutés individuellement pour permettre le séquençage, ce qui aura pour conséquence de produire une émission lumineuse. La technique Ion Torrent suit le même processus que la 454, mais la détection se fera grâce à un capteur d'ions pour donner suite à la libération d'un proton. La technologie SOLiD est basée sur le séquençage par ligation, où des amorces viennent d'abord s'hybrider à l'adaptateur sur la matrice. Des sondes fluorescentes vont être ajoutées et seront spécifiques aux réactions de ligation.

Pour cette étude, le séquençage par Illumina a été choisi car il apporte un débit de qualité pour une meilleure résolution. Le principe est de modifier les nucléotides incorporés par l'ADN polymérase durant la transcription inversée, en ajoutant une molécule fluorescente en 5' et un terminateur labile (nucléotide). Un fluorochrome va marquer spécifiquement les quatre nucléotides, qui seront excités par un laser qui va émettre des signaux lumineux et détectés par le séquenceur pour les traduire en nucléotides. Le fluorochrome et le terminateur seront ensuite enlevés par clivage. Le séquençage en mode « paired-end » (à l'inverse du « single-end » classique), permet de séquencer la molécule d'ADN à ses deux extrémités au lieu d'une, en regroupant les lectures en paires complémentaires, ce qui va permettre un meilleur assemblage des séquences.

La technique Illumina possède néanmoins quelques limites, comme la taille des lectures obtenues qui sont plus faibles (entre 35-120 pb) que les autres techniques et les extrémités des lectures ne sont pas fiables (nécessité de les couper avant l'assemblage).

Actuellement, les recherches chez les conifères se sont basées sur la partie transcrite du génome et l'assemblage de ces séquences permet de reconstruire le transcriptome. En cinq ans, des transcriptomes de cinq espèces de *Pinus* ont été publiés (*P. contorta* (Parchman *et al.*, 2010), *P. densata* (Wan *et al.*, 2012) ; *P. pinaster* (Canales *et al.*, 2014), *P. tabuliformis* (Niu *et al.*, 2013), *P. lambertiana* (v1.0, 2015, PineRefSeq). La seconde version du transcriptome du Douglas (v1.0) a été proposée en août 2016 (PineRefSeq).



I.6. L'embryogenèse somatique du Douglas aujourd'hui : problématiques et objectifs

Pour cette espèce, très peu d'articles ont vu le jour, la plupart étant très anciens (Durzan et Gupta, 1987), les plus récents se trouvant sur les étapes de maturation et cryogénéisation (Kong et von Aderkas, 2011) ou sur les essais en champs (Lelu-Walter *et al.*, 2013). Le reste des connaissances est sous forme de brevets (Gupta *et al.*, 2004). L'intérêt récent pour les caractéristiques du Douglas ont permis la sortie de deux publications autour de l'optimisation de l'embryogenèse somatique de cette essence (Reeves *et al.*, in press ; Lelu-Walter *et al.*, in press).

Une meilleure compréhension des marqueurs moléculaires associés aux différences entre **ME** et **NE** permettrait à terme de progresser sur la caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse. De plus, la connaissance précise des mécanismes liés au développement des embryons pourrait être appliquée au développement de nouvelles techniques adaptées à l'initiation de **ME** issues de matériels âgés. Enfin, les améliorateurs ont besoin d'une méthode performante de propagation afin d'améliorer leurs programmes de sélection, mais aussi de créations variétales. Maîtriser l'embryogenèse somatique permettrait le déploiement d'arbres dit « élites » et la diffusion de variétés plus performantes répondant aux besoins industriels (volume, qualité du bois...) ainsi que pour répondre aux besoins inhérents au changement climatique.

À la suite de ces réflexions, ma thèse s'articule autour de deux questions scientifiques, avec une première question sur la caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse du Douglas, en comparant des **ME**, et du matériel non-embryogène, servant de contrôle négatif. Pour cela nous avons décidé de réinitier l'embryogenèse somatique à partir d'ES cotylédonaires, afin d'isoler à partir du même ES des **ME** et du cal non-embryogène (**NE**), pour avoir du matériel isogénique stable en multiplication. Les lignées ont été analysées à différents niveaux : morphologiques et cytologiques, cellulaires, biochimiques et moléculaires.

Les différentes lignées peuvent être caractérisées par leur potentiel embryogène, variable entre lignées. Chez le Douglas, il existe des lignées très embryogènes (2000-3000 ES g⁻¹ MF) et des lignées peu embryogènes (30 ES g⁻¹ MF, Lelu-Walter *et al.*, in press). Réitérer l'embryogenèse somatique permet d'améliorer le potentiel embryogène des lignées primaires peu ou moyennement embryogènes (Lelu-Walter *et al.*, in press). Nous avons voulu étudier à travers la cytologie/histologie, la biologie cellulaire, la biochimie et la biologie moléculaire, les mécanismes impliqués dans l'augmentation de ce potentiel lors de la réitération de l'embryogenèse somatique.



Les objectifs plus précis sont les suivants :

Question 1 (Q1) : Caractériser les mécanismes liés à l'aptitude à l'embryogenèse somatique de **ME** du Douglas, comparée à des **NE**, à travers la cytologie (macroscopie, microscopie optique et confocale), la biologie cellulaire (potentiel embryogène), la biochimie (teneur en eau, en protéines totales, en glucides, et en régulateurs de croissance), le protéome et le transcriptome.

Question 2 (Q2) : Etude de la variation du potentiel embryogène lors de la réitération de l'embryogenèse somatique, à travers la biologie cellulaire (potentiel embryogène), la cytologie (macroscopie et microscopie optique), la biochimie (teneur en protéines totales) et la biologie moléculaire (protéome et transcriptome).

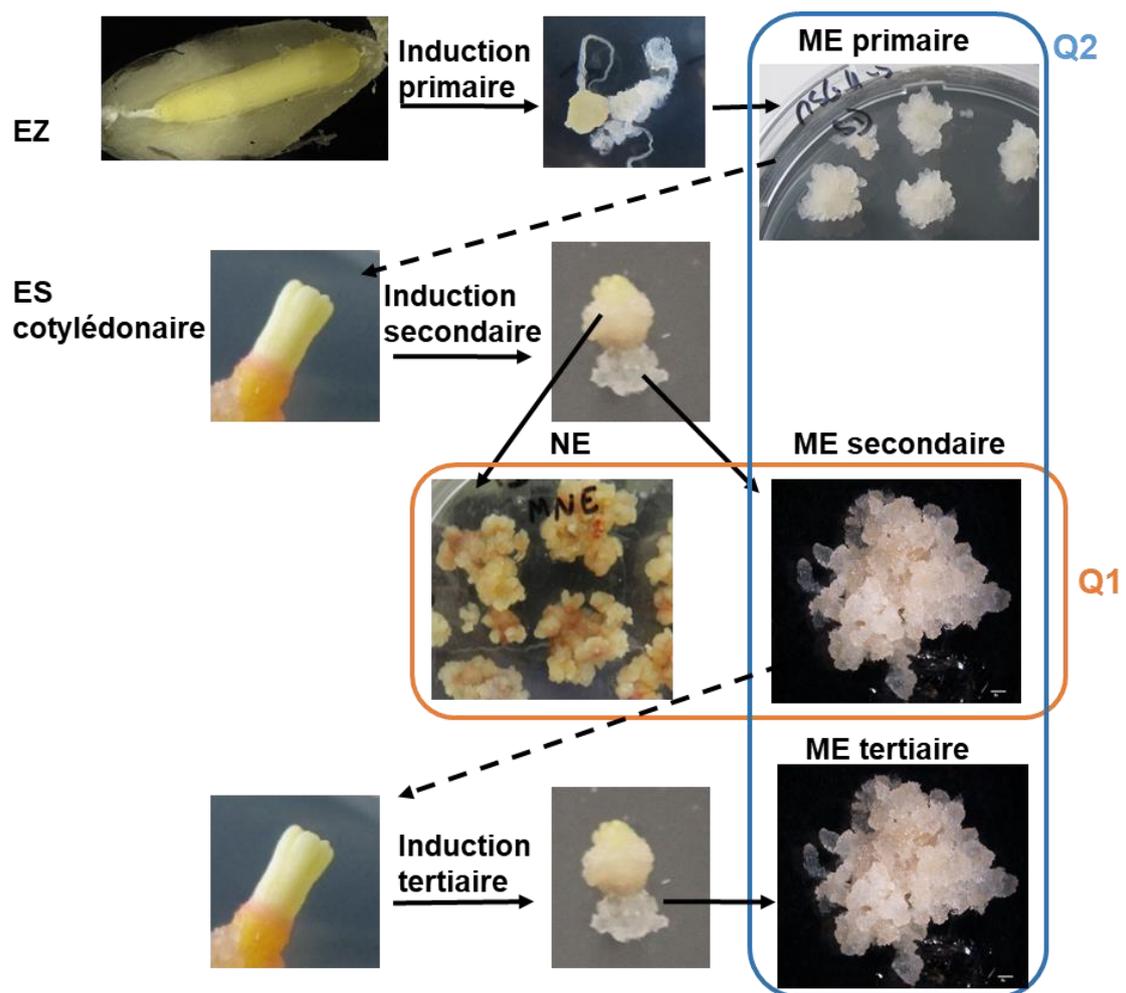


Figure I.24 Aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique : positionnement des questions de recherche (Q). Embryon somatique (ES), embryon zygotique (EZ), masse embryogène (ME), cal non-embryogène (NE).

Chapitre II - Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique





Chapitre II. Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique

II.1. Présentation de la problématique

Du fait du vieillissement des vergers à graines français et de l'importance du maintien de la compétitivité des forêts françaises, il est important d'intensifier le programme d'amélioration génétique du Douglas (Bastien *et al.*, 2013). La disponibilité d'une méthode de multiplication végétative performante permettrait de produire des arbres/individus considérés comme intéressants. Les méthodes horticoles de multiplication végétative, comme le greffage et le bouturage, existent pour le Douglas mais sont limitées de par leur faisabilité et leur faible taux de multiplication (de la Goublaye et Francllet, 1978 ; Bastien *et al.*, 2013). En culture *in vitro*, l'embryogenèse somatique est à ce jour la technique la plus performante pour la propagation clonale d'arbres forestiers (Lelu-Walter *et al.*, 2013). Cependant chez les conifères, malgré toutes les recherches entreprises sur l'initiation de l'embryogenèse somatique, celle-ci n'a été obtenue qu'à partir d'un matériel très juvénile, qui est l'embryon zygotique (**EZ**) (Trontin *et al.*, 2016a). L'aptitude embryogène, soit la capacité à initier des embryons représente un pré-requis indispensable au développement de cette technologie dans les processus d'amélioration des arbres. C'est dans ce cadre que s'inscrit la première question de recherche de ma thèse qui consiste à caractériser cet état embryogène chez le Douglas à différents niveaux d'études : cytologiques, biologiques, biochimiques et moléculaires. Chez le Douglas, il a été montré que certaines lignées de Douglas produisaient spontanément du cal non-embryogène (**NE**, Gautier *et al.*, 2017), qui est un fait propre à cette espèce (Lelu-Walter communication personnelle). La présence simultanée de masses embryogènes (**ME**) et de cal non-embryogènes représente alors un matériel de choix pour la caractérisation de l'état embryogène, les **NE** constituant le contrôle « négatif ». Afin de limiter l'hétérogénéité de notre matériel, des embryons somatiques (**ES**) cotylédonaire ont été placés sur milieu d'induction afin d'obtenir des lignées secondaires. Ainsi certains embryons ont développé simultanément des **ME** (base de l'hypocotyle/coiffe racinaire) et des **NE** (hypocotyle/base des cotylédons), ce matériel étant donc isogénique. Nous avons fait le choix de travailler sur trois lignées embryogènes non apparentées, issues de croisements contrôlés : TD15 (4474 x 4440), SD4 (4456 x 4477) et TD17 (4466 x 4455).

La caractérisation des différentes lignées **ME** et **NE**, se fera à différents niveaux. Tout d'abord au niveau biologique par la détermination de leur potentiel embryogène (= nombre ES g⁻¹ MF) et la caractérisation macroscopique de ces deux types de matériel. Ensuite au niveau cytologique par des approches cyto/histochimiques pour observer les constituants cellulaires, la viabilité cellulaires, la présence ou pas de composés phénoliques et de grains d'amidon. Les études réalisées chez les conifères dont le mélèze, montrent que les **ME** en multiplication sont constituées d'ES immatures, structures bipolaires composées d'une tête méristématique et d'un suspenseur, se différenciant des **NE** qui sont constitués de cellules rondes en division sans organisation particulière (Jourdain *et al.*, 1997 ; Zhao *et al.*, 2015a).

Nous avons aussi caractérisé les **ME** et **NE** au niveau biochimique (teneur en eau, sucres, protéines totales, régulateurs de croissance). Les **ME** sont constituées d'ES très immatures en division, et des caractéristiques métaboliques comme une réactivation de la glycolyse ou le

stockage des sucres pourrait être impliquées dans l'aptitude à l'embryogenèse somatique. Nous proposons d'étudier, dans les deux types de matériel, la teneur en glucides solubles, mais aussi la teneur en amidon, forme de stockage du glucose en corrélation avec les observations faites en histologie. Chez les conifères la teneur des différents glucides solubles a été déterminée durant les différentes phases de l'embryogenèse somatique (Lipavská et Konrádová, 2004). Les auteurs montrent que les **ME** au cours de leur multiplication ont des fortes teneurs en glucose (Glc) et fructose (Fru), les teneurs en saccharose diminuant ou restant stables (Taber *et al.*, 1998 ; Iraqi et Tremblay, 2001 ; Lipavská et Konrádová, 2004 ; Navarro *et al.*, 2017).

La formation d'embryons pourrait être caractérisée par différentes voies métaboliques. La teneur en protéines totales a été mesurée afin de mesurer de manière quantitative les protéines présentant leur permettant de réaliser leurs fonctions biologiques.

Les différents régulateurs de croissance ont un ou des rôles dans la division cellulaire ou la différenciation des **ES**. C'est pourquoi nous avons analysé par spectrométrie de masse l'acide indole 3-acétique (AIA), l'acide abscissique (ABA) et son conjugué l'acide abscissique glucose-ester (ABA-GE), et différentes isoformes de cytokinines (CKs, précurseurs, actives, et inactives). Chez le mélèze, la comparaison du profil des régulateurs de croissance endogènes entre **ME** et **NE** montre des variations au niveau de l'accumulation de l'AIA, de l'ABA-GE et des cytokinines après deux semaines de multiplication (Jourdain *et al.*, 1997).

Enfin nous avons cherché à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la caractérisation des **ME** ou des **NE**. Pour ce faire nous avons réalisé un état des lieux comparatif des protéines (protéome) et des transcrits (transcriptome) différenciellement exprimés dans les **ME** et les **NE**. Chez les conifères de nombreux travaux, décrivant l'aptitude embryogène, portent sur la caractérisation de leurs marqueurs moléculaires. Ces marqueurs moléculaires sont soit issus de l'étude des protéines (Dos Santos *et al.*, 2016 ; Klubicová *et al.*, 2017) soit de transcrits (Bishop-Hurley *et al.*, 2003 ; Stasolla *et al.*, 2004 ; Palovaara *et al.*, 2010 ; Vestman *et al.*, 2011 ; Rupps *et al.*, 2016 ; Miguel *et al.*, 2016 ; Trontin *et al.*, 2016a). Chez le mélèze, les travaux de Zhao *et al.*, (2015a) ont pu mettre en évidence grâce à des analyses de protéomique, des marqueurs protéiques associés aux **ME** et **NE** (régulation biologique, réponse au stress, régulation métabolique, et cycle cellulaire). Chez *Picea balfouriana* les analyses du transcriptome montrent que certains facteurs de transcription seraient des marqueurs de l'aptitude à l'embryogenèse (Li *et al.*, 2014). D'après la littérature, les **ME** et **NE** en multiplication, exprimeraient un programme génétique différent en fonction de cette aptitude, programme qui serait visible en protéomique et en transcriptomique. L'étude des régulations moléculaires au niveau des transcrits, correspondant aux futures protéines, complétées par une étude de protéomique, permettra de cibler plus précisément les acteurs mis en jeu dans ces différences. Nous nous proposons donc d'analyser le protéome (spectrométrie de masse, LC/MS-MS) et le transcriptome (RNAseq, séquençage illumina) des **ME** et des **NE** de Douglas, ainsi que de croiser les résultats des deux analyses.

A l'aide de ces différentes approches, nous allons essayer de caractériser l'aptitude à l'embryogenèse à partir d'un état embryogène et d'un état non-embryogène à travers différentes disciplines : biologiques, cytologiques, biochimiques, mais aussi de voir les différences qui existent dans leur programme génétique respectif. Notre étude est **originale** et

innovante, par le fait que la caractérisation de l'état embryogène (**ME**) vs matériel non embryogène (**NE**) a été réalisée à différents niveaux de comparaison. Le plan expérimental et l'ensemble des analyses réalisées sont résumés dans la **FigII.1** pour répondre à cette première question de recherche.

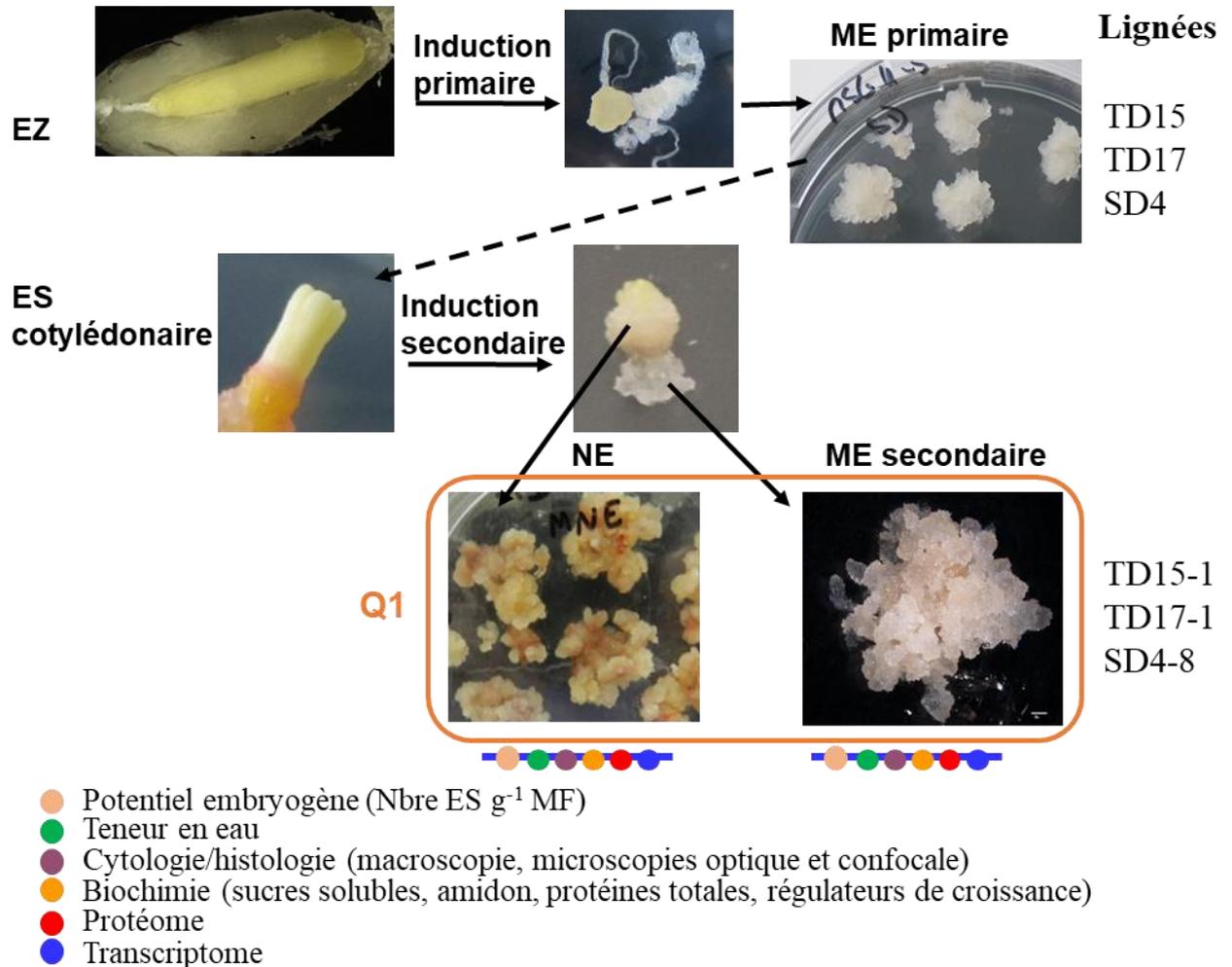


Figure II.1 Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique (question de recherche Q1) : analyses et matériel végétal utilisés. Embryon somatique (ES), embryon zygotique (EZ), masses embryogènes (**ME**), cals non-embryogènes (**NE**)



II.2. Extended Abstract : Gautier *et al.* (2017) : What is the best way to maintain embryonic capacity of embryonic lines initiated from Douglas-fir immature embryos ?



Proceedings of the Fourth International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on
“Development and application of vegetative propagation technologies in
plantation forestry to cope with a changing climate and environment”

September 19-23, 2016 • La Plata, Argentina



Gautier F et al.

What is the best way to maintain embryonic capacity of embryonic lines initiated from Douglas-fir immature embryos?

Gautier F^{1,2}, Eliášová K³, Reeves C⁴, Sanchez L¹, Teyssier C¹, Trontin J-F⁵, Le Metté C¹, Vágner M³, Costa G², Hargreaves C⁴, Lelu-Walter M-A^{1*}

¹INRA, UR 588, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, 2163 Av. de la Pomme de pin, CS 4001 Ardon, 45075 Orléans cedex 2, France.

²Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 123 avenue Albert Thomas, 87000 Limoges, France.

³Institute of Experimental Botany CAS, Rozvojová 263. Praha 6-Lysolaje 165 02, Czech Republic.

⁴Scion, Private Bag 3020, Rotorua, New Zealand.

⁵FCBA, Biotechnology and advanced Forestry Department, 71, Route d'Arcachon, Pierroton, 33610 Cestas, France.

*Corresponding author: marie-anne.lelu-walter@inra.fr

Keywords: cytology, embryonal masses, morphology, multiplication, *Pseudotsuga menziesii*, non-embryogenic cells, somatic embryogenesis.

Introduction

Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) is a native conifer from the Pacific North-West of the US and Canada, and is one of the most important timber species used in the world. Douglas-fir is highly productive in a range of climatic conditions and has valuable wood properties (quality) as well as strong tolerance to diseases and insects. In Europe, Douglas-fir is a major species for reforestation with increasing demand for its wood. Adaptation of new varieties to climate change and associated stresses is one challenging question for ongoing breeding programs. Efficient selection and vegetative propagation of improved varieties are key issues to maintain productivity in plantation forestry (Lelu-Walter *et al.* 2013), however, as in many other conifers, early maturation is preventing clonal forestry through conventional multiplication methods in Douglas-fir (Bastien *et al.* 2013). Somatic embryogenesis from immature seeds coupled with cryopreservation is a promising retroactive clonal propagation system of selected trees. This technology has been developed for an increasing number of conifer species (Klimaszewska *et al.* 2016). Excluding patents, there are only a few published studies on Douglas-fir somatic embryogenesis (Durzan and Gupta 1987; Pullman *et al.* 2005, 2009). One recurrent problem is the sustainable multiplication of initiated embryogenic material, i.e. embryonal masses (EMs). Yellowish, non-embryogenic cells (NEC), which is interspersed with EM, is frequently observed during this process. In this work, we describe EM

morphology and cytology (light and confocal microscopy) of different embryogenic lines. A suggested method to reduce the formation of NEC and sustain EM proliferation is presented.

Materials and methods

Plant material

Somatic embryogenesis was initiated from immature zygotic embryos of Douglas-fir obtained from 3 controlled crosses (74 x 44, 56 x 47, 55 x 46). Experiments were conducted with three embryogenic lines (D1, D2, D3), each originating from one of these genetically unrelated full-sib families. Proliferation was performed according to Reeves *et al.* (submitted) with the following modifications: basal multiplication medium consisted in Glitz medium (Litvay basal medium: Litvay *et al.* 1985 modified by Hargreaves *et al.* 2009) supplemented with 1 mg L⁻¹ 2-4 D, 0.5 mg L⁻¹ BA, 30 g L⁻¹ maltose, and 4 g L⁻¹ gellan gum (phytagel). EMs were routinely subcultured every two weeks in clumps on proliferation medium in darkness at 23°C. However, to ensure EMs proliferation, we also applied the proliferation method previously developed for pine species, i.e. EMs dispersed onto filter paper (Lelu-Walter *et al.* 2016). Filter paper with attached EMs was placed on the surface of fresh multiplication medium.

Histology

In this work we used high-resolution optical and confocal microscopes for cytological observations of the three proliferating embryogenic lines. Fresh EMs were collected (only the whitish parts), stained with trypan blue and observed using transmission light microscopy. The viability was assessed using confocal microscopy after double staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) (Vondráková *et al.* 2010). Green fluorescein fluorescence reveals viable cells, whereas red fluorescence of PI-DNA complexes accumulate in dead cells.

Results and discussion

Morphological and histological aspects of embryogenic lines

According to their macro-morphology EMs were classified under two types (Fig. 1A): “pure lines” (D1, D2), i.e. white-translucent EMs with immature somatic embryos (SE) as typically described in conifer species, or mixed line (D3), i.e. EMs with immature SE and NEC (brown parts). Cluster of NEC cells did not produce any cotyledonary SE after maturation treatment (Reeves *et al.* submitted). These NEC erratically appeared among EMs during the culture process and were found to reduce EMs proliferation.

Transmission light microscopy (Fig. 1B) confirmed that line D1 is only made up of embryogenic cells whereas line D3 is a mixture of immature SE and round cells (NEC). Interestingly, line D2 initially classified as a “pure line” also appeared to be a mixture of SE and NEC. NEC is tightly interspersed with SE, and it is difficult to dissociate them. We concluded that macro-morphology is far from being sufficient to describe EMs.

Using confocal microscopy with FDA/PI staining (Fig. C), dead cells were observed in embryo suspensors from all lines suggesting actively occurring apoptotic and autophagic programmed cell death (PCD) that is required for normal embryo development. For mixed lines such as D2 and D3, persistent non-embryogenic cells of unknown origin presented only viable cells.

Proliferation method

For one mixed line (D3), the transfer of EMs onto a filter paper greatly reduced the formation of NEC. Different methods are possible to reduce the production of non-embryogenic cells: frequent subculture of EMs (no aging), vigorous dissociation in liquid medium (Reeves *et al.* submitted), and transfer on filter paper (homogenization).

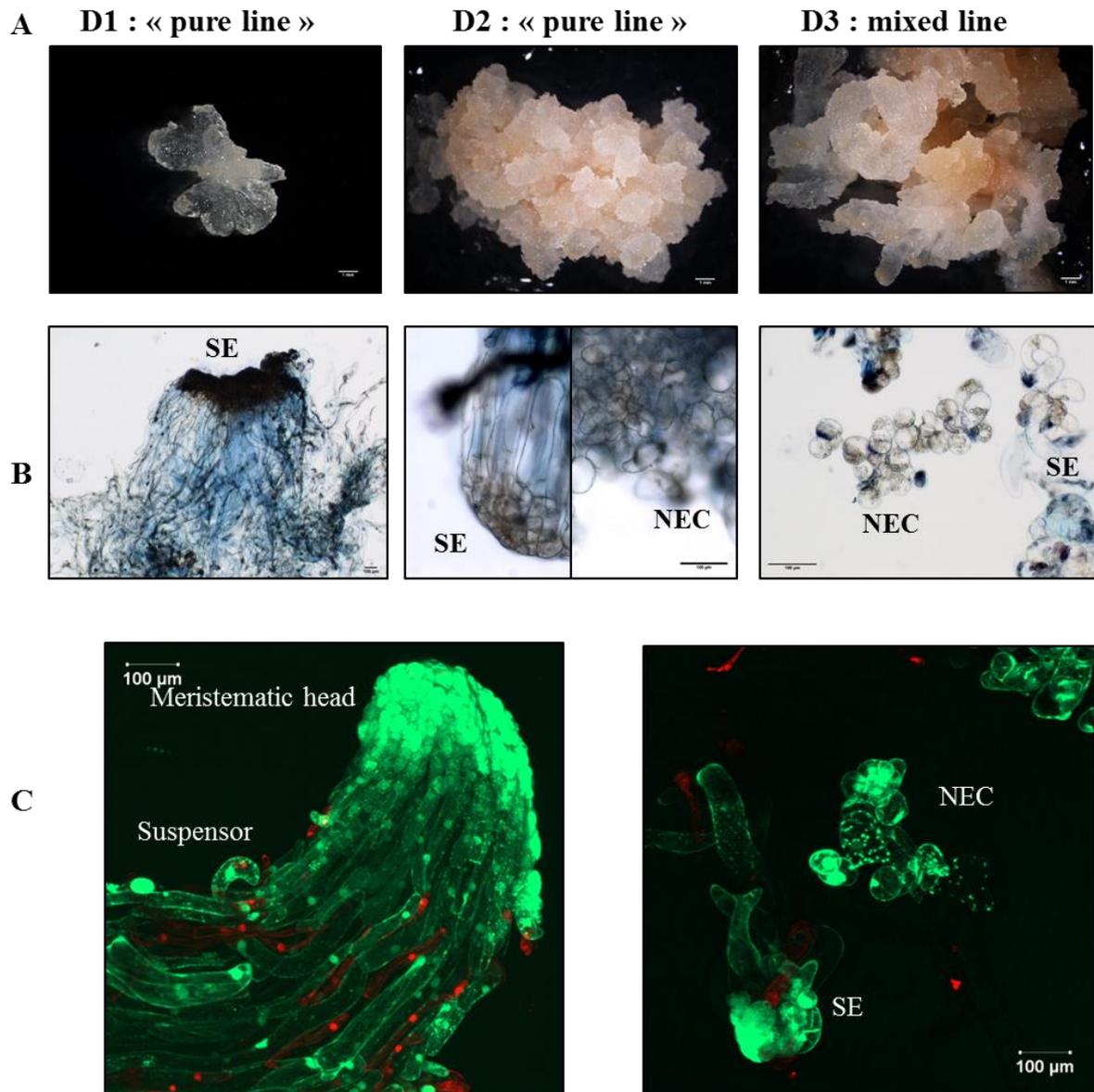


Figure II.2 Observation of three Douglas-fir embryogenic lines (D1, D2, D3)

Macro-morphology (A). Transmission light microscopy: EMS stained with trypan blue (B). Confocal microscopy: viability was determined by double staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Green fluorescein fluorescence reveals viable cells, whereas red fluorescence of PI-DNA complexes accumulates in dead cells (C). SE: somatic embryo; NEC Non Embryogenic Cells.

Conclusions

In some lines, the whitish parts of proliferating EMs were shown through microscopy to contain both immature SE and NEC. Viable non-embryogenic cells are of unknown origin.

To tentatively reduce the occurrence of non-embryogenic cells, it is recommended to frequently subculture EMs (each week), to vigorously dissociate them in liquid medium (Reeves *et al.* submitted) before transferring the resulting homogenate onto filter paper as a thin cell layer.

Acknowledgments

This research was partially funded by Future Forests NZ Research Limited and the Dumont d'Urville NZ-France Science and Technology Support Programme and Core funding provided by The Ministry of Business, Innovation and Employment. We would like to acknowledge the support of the University of Limoges, and the Chair of Excellence Forest Resources and Wood Uses supported financed by Europe, for the training course of Florian Gautier at the Institute Experimental of Botany (Prague, Czech Republic).

References

- Bastien J-C, Sanchez L, Michaud D (2013) Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). In: Pâques LE (ed) Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives. Managing Forest Ecosystems 25, Chap. 7, Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp 325-369 doi:10.1007/978-94-007-6146-9_7
- Durzan DJ, Gupta PK (1987) Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Sci* 52:229-235
- Hargreaves CL, Reeves CB, Find JI, Gough K, Josekutty P, Skudder DB, Van der Maas SA, Sigley MR, Menzies MI, Low CB, Mullin TJ (2009) Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. *Can J Forest Res* 39:1566-1574
- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germanà M-A, Lambardi M (eds) *In vitro embryogenesis in Higher plants*, Chap. 7, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, pp.131-166
- Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L-E (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes* 9:883-899
- Lelu-Walter M-A, Klimaszewska K, Miguel C, Aronen T, Hargreaves C, Teyssier C, Trontin J-F (2016) Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus* spp.: bottlenecks and recent advances. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Somatic Embryogenesis - Fundamental Aspects and Applications*, Chap 19, Springer Verlag, pp 319-365 doi:10.1007/978-3-319-33705-0_19
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4:325-328

- Pullman GS, Johnson S, Tassel S Van, Zhang Y (2005) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80:91-103
- Pullman GS, Johnson S, Bucalo K (2009) Douglas fir embryogenic tissue initiation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 96:75-84
- Reeves C, Hargreaves C, Trontin J-F, Lelu-Walter M-A (2017) Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. Submitted
- Vondráková Z, Cvikrová M, Eliášová K, Martincová O, Vágner M (2010) Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiol* 30:1335-1348



II.3. Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique : analyses cytologiques, biologiques, biochimiques et moléculaires

Gautier Florian^{1,2}, Teyssier Caroline¹, Eliasova Katerina³, Trontin Jean-François⁴, Jiří Malbeck³, Bedrich Pesek³, Anne-Marie Lomenech⁵, Boizot Nathalie¹, Marie-Claude Lesage-Descauses¹, Le Metté Claire¹, Label Philippe⁶, Costa Guy², Lelu-Walter Marie-Anne^{1*}

¹ INRA, UR 588, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, 2163 Av. de la Pomme de pin, CS 4001 Ardon, 45075 Orléans cedex 2, France.

² Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 123 avenue Albert Thomas, 87000 Limoges, France.

³ Institute of Experimental Botany CAS, Rozvojová 263. Praha 6-Lysolaje 165 02, Czech Republic.

⁴ FCBA, Biotechnology and advanced Forestry Department, Genetics & Biotechnology group, 71, Route d'Arcachon, Pierroton, 33610 Cestas, France.

⁵ Université de Bordeaux, Centre Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, F-33000 Bordeaux, France

⁶ INRA-Université Blaise Pascal, UMR_A 547 PIAF, Les Cézeaux, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.

*Corresponding author: marie-anne.lelu-walter@inra.fr

II.4. Matériels et méthodes de la thèse

II.4.1. Matériel Végétal

Les Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) utilisés dans cette étude résultent de croisements contrôlés d'arbres issus de 2 provenances nord-américaine de l'état du Washington, soit North Bend (4440, 4455, 4456), soit Enumclaw (4466, 4474, 4477). Trois lignées embryogènes ont été obtenues à partir d'embryons zygotiques immatures issus de croisements contrôlés fait à l'INRA d'Orléans (France) : TD15 (4440x4474), SD4 (4456 x 4477) TD17 (4455 x 4466), (**Tableaux II.1** ; Lelu-Walter *et al.*, in press). Ces lignées embryogènes primaires sont donc non apparentées. Ces lignées ont été mises en maturation (**Chapitre 2 § II.4.3 Maturation**), et développent des embryons somatiques cotylédonaire (ES), matériel utilisé pour obtenir l'embryogenèse somatique secondaire (Lelu-Walter *et al.*, in press). Après 6-11 semaines les ES cotylédonaire sont placés sur milieu d'induction, milieu Glitz modifié contenant 4,5 µM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 4,4 µM de benzyl adénine (BA), 0,087 M saccharose et solidifié avec 4 g.L⁻¹ phytigel. Les ES développent simultanément à la base de leur hypocotyle au niveau de la coiffe racinaire, des masses embryogènes (**ME**), et à la base des cotylédons du cal non-embryogène (**NE**) (**Fig II.1**). Ainsi les lignées primaires TD15, SD4 et TD17 donnent lieu à des lignées secondaires isogéniques (TD15-1, SD4-8, TD17-1 respectivement, **FigII.1**). Après obtention des **ME** et **NE**, les lignées secondaires sont mises en multiplication. Nous avons fait le choix de parler de génotypes différents provenant de croisements contrôlés pour une facilité d'expression, même si nous ne les avons pas testés.

II.4.2. Multiplication

Les **ME** et **NE** obtenus, sont repiqués tous les 15 jours sur un milieu de multiplication, un milieu Glitz modifié (Glitz M) complété par 0,087 M de maltose, 4,5 μM de 2.4-D, 2,2 μM de BAP, 1 g.L⁻¹ d'hydrolysate de caséine et de 4 g L⁻¹ de phytigel (**Annexe 1**, Lelu-Walter *et al.*, in press). Les boîtes de Petri sont placées à 23°C à l'obscurité pendant 2 semaines. Pour optimiser leur prolifération, les **ME** et les **NE** sont cultivés sur des filtres Whatman (N°2, diamètre 7cm, Gautier *et al.*, 2017). Pour cela 350 mg de **ME** ou 500 mg de **NE** sont dissociés par agitation manuelle dans 5 ml de milieu Glitz M liquide. Les cellules en suspension sont transférées sur filtre Whatman, ceux-ci étant placés dans une unité de filtration pour éliminer le milieu liquide par application d'un léger vide. Les filtres avec les cellules des **ME** ou des **NE** dispersées à leur surface, sont placés sur le milieu de multiplication. Les cellules (**ME**, **NE**) sont ensuite prélevées directement sur les filtres, la biomasse collectée par filtre étant suffisante pour réaliser toutes les analyses, à savoir sucres, amidon, protéines totales, régulateurs de croissance, protéome et transcriptome.

II.4.3. Maturation

Une semaine après multiplication, 50 mg de **ME** et 100 mg de **NE** sont dissociés, comme décrit précédemment, dans un milieu Glitz M sans régulateur de croissance. Les filtres avec les cellules des **ME** et **NE** sont transférés sur un milieu de maturation : milieu Glitz additionné de 0,2 M de saccharose, 60 μM MABA et 10 g.L⁻¹ de phytigel (**Annexe 1**, Lelu-Walter *et al.*, in press), les boîtes de Petri étant mises à 23°C à l'obscurité. Après 8 semaines de culture, les embryons cotylédonaire sont comptés sous loupe binoculaire. Le potentiel embryogène des lignées **ME** et **NE**, soit le nombre d'embryons par gramme de matière fraîche (MF), a été calculé. L'expérience a été réalisée 3 fois et les données présentées sont des moyennes calculées pour chacune des lignées embryogènes et non-embryogènes

II.4.4. Mesure de la teneur en eau

La teneur en eau des **ME** et des **NE** a été déterminée à partir d'un échantillon de 100 mg matière fraîche (MF) de cellules dissociées sur filtre. Après avoir pesé la MF, la matière sèche des cellules (MS) a été mesurée après dessiccation du matériel à l'étuve à 70°C pendant 24h. La teneur en eau a ensuite été calculée comme étant : $\frac{(MF-MS)}{MS}$ et exprimée en g H₂O g⁻¹ MS (Dronne *et al.*, 1997). L'expérience a été répétée 10 fois et les résultats présentés correspondent à la moyenne calculée sur les 10 répétitions.



Tableau II.1 Origine génétique des lignées embryogènes primaires de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) : TD15, TD17 et SD4.

A. Origine génétique

Peuplement (Washington)	Famille (= arbre)	Clone (=descendance)
North Bend	F0454	4440
North Bend	F0481	4455
North Bend	F0481	4456
Enumclaw	F0575	4466
Enumclaw	F0584	4474
Enumclaw	F0585	4477

B. Croisements contrôlés et origine culture in vitro

Mère	Père	lignées embryogènes
4474	4440	TD 15
4455	4466	TD 17
4456	4477	SD 4



II.4.5. Préparations histologiques et observations microscopiques (réalisées au laboratoire de Botanique Expérimentale de Prague)

Les observations ont été réalisées soit à partir du matériel préalablement enrobé dans la paraffine, soit à partir du matériel frais.

II.4.5.1. Préparation de blocs de paraffine

Les cellules issues des **ME** et des **NE** sont fixées, pendant 3 jours, dans un mélange d'alcool formolé acétique (AFA) (éthanol/acide acétique/formaldéhyde 50/5/5 v/v/v). Après fixation, les cellules sont rincées 2 fois dans une solutions d'éthanol 50 % pendant 2 h. Les échantillons sont déshydratés dans des bains de concentration croissante en butanol (**Annexe 2.1 et 2.2**). Les cellules sont ensuite immergées pendant 12h dans une solution de butanol 100 %, opération renouvelée 2 fois (**Annexe 2.3**). L'inclusion du matériel se fait dans de la paraffine (type 6, Thermo Fisher Scientific) à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG1150. Une fois les blocs constitués, les coupes de 12 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Rotatory microtome Thermo Shandon Finnesse ME+, Thermo Fisher Scientific).

II.4.5.2. Coloration des coupes

Au cours de cette étude, 5 colorations ont été réalisées : **(i)** une double coloration bleu alcian (Sigma-Aldrich, Allemagne) / « nuclear fast red » (Keernechtrot, Fluka, Suisse) **(ii)** une coloration au lugol, au bleu trypan et à l'Azur II et **(iii)** une double coloration à l'iodure de propidium/diacetate fluorescent, ces 2 dernières colorations étant réalisées sur du matériel frais écrasé et étalé entre lame et lamelle (Cell Squash).

(i) La coloration bleu alcian (0,1 % dans 3 % d'acide acétique) /nuclear fast red (0,1 % dans 5 % de sulfate d'ammonium) a été faite sur des coupes de 12 µm d'épaisseur débarrassées de la paraffine par 3 lavages de 3 min dans une solution « citrus cleaning solvent » (**Annexe 2.4**). Le D-limonène est ensuite éliminé par lavage avec une solution « citrus cleaning solvent »/éthanol 100 % (1:1 v/v). Après déparaffinage, les coupes sont réhydratées par immersion successive dans des solutions de concentration décroissante en éthanol. A la suite de cette coloration, les coupes sont une nouvelle fois déshydratées dans des bains de butanol de concentration croissante (30 %-1 min), 50 %-1 min, 70 %-1 min, 96 %-2 min, éthanol 100 %-2 min x 2, Citrus clearing solvent + éthanol 100 %-(1:1, v/v) 2 min, Citrus clearing solvent-2 min, x 3). Les coupes sont alors montées sur lame avec une solution de DPX Mountant. Les observations de ces coupes ont été faites à l'aide d'un microscope optique (Zeiss, Allemagne) équipé d'une caméra digitale SD-5M (Nikon, Tokyo,). La coloration au bleu alcian colore les parois en vert, « nuclear fast red » colore les noyaux en rouge.

(ii) Les colorations au lugol, au bleu trypan, à l'AzurII ont été réalisées à partir de matériel frais écrasé et étalé entre lame et lamelle (Cell Squash), conférant l'avantage d'être une technique simple et rapide permettant de suivre un grand nombre d'échantillons. Les cellules ont ensuite été colorées pendant 1 min, puis lavées à l'eau distillée, et observées à l'aide d'un microscope optique (Zeiss, Allemagne) équipé d'une caméra digitale SD-5M (Nikon, Tokyo).

(iii) La double coloration à l'iodure de propidium/diacetate fluorescent est réalisée dans une solution contenant 1 ml de milieu de culture Glitz M liquide, puis colorées avec 50 µl de 2,25 µM d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), et 20 µl de diacetate fluorescent (FDA, 0,02 % (v/v) H₂O, Sigma-Aldrich) en accord avec le protocole modifié de Vondráková *et al.* (2010). La fluorescence produite par les noyaux des cellules est observée à l'aide d'un microscope confocal LSM5 Duo confocal laser scanning (Zeiss, Jena, Germany) équipé d'un laser DPSS (filtre d'émission LP 650) et d'un laser Argon/2 (filtre d'émission BP 505-550). A 561 nm l'IP, qui diffuse à travers une membrane dégradée, produit au niveau des noyaux une fluorescence rouge caractéristique de cellules mortes. A l'inverse, le FDA, excité à 488 nm, émet une fluorescence verte dans le noyau typique de cellule ayant une membrane plasmique intègre, donc caractéristique de cellules vivantes. Ainsi les cellules vivantes fluorescent en vert, le noyau des cellules mortes se colorent en rouge.

II.4.6. Dosage des sucres solubles et de l'amidon

L'extraction des sucres solubles a été réalisée selon le protocole de Bonhomme *et al.* (2009). Le matériel lyophilisé (30 mg MS) est broyé ; la poudre obtenue est incubée 30 min dans 1 ml d'éthanol à 80 % à chaud (90°C) additionné de 1 mg ml⁻¹ de mannitol. Les surnageants sont purifiés sur une colonne de charbon actif (400 µl (1:1 éthanol 80 %))/PVPP (800 µl (1 :1 H₂O)). Cette manipulation est répétée 2 autres fois sans mannitol. Le filtrat obtenu (solution A) est concentré sous vide pendant 16 h (Speed vaccum, SAVANT). Le résidu sec est ensuite repris dans 250 µl d'eau ultrapure. Dix µl de solution A ainsi obtenue sont séparés par HPLC (HPLC VWR-HITACHI Chromaster) grâce à une colonne Rezex (RPM-Monosaccharide Pb+2, 8 %, 300 x 7,8 mm, Phenomenex), maintenue à 85 °C, et équipée d'un détecteur à indice de réfraction (RI) (DEDL (à diffusion de lumière, Gain 5, 60°C). La phase mobile est constituée d'eau ultra pure à un débit de 0,6 ml par min. L'identification des sucres a été réalisée par comparaison avec les temps de rétention de sucres de référence (Sigma) obtenu par injection d'un mélange sucres de référence/extrait végétal (co-élution, glucose, fructose, saccharose, galactose, raffinose, myoinositol, melibiose). La quantification a été obtenue grâce aux courbes de calibration réalisées préalablement. Les données ont été acquises et traitées avec le logiciel OpenLAB CDS version EZChrom (**Annexe 3**).

Le dosage de l'amidon a été réalisé sur le culot de la solution A préalablement placé 16 h au speed vac avant d'être pesé (pesée P1). L'amidon constituant le culot, est extrait dans 1 ml de NaOH 20 mM incubé 2 h à 95 °C à sec. Le glucose est libéré de l'amidon par l'action d'une amyloglucosidase à raison 0,6 U/ml dans un tampon citrate 0,32 M, pH 4,6 pendant 1 h à 50°C. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 14 000g, puis le culot (solution B) est pesé (pesée P2). Le Glucose libéré est converti ensuite en Glc6P par une hexokinase avant d'être réduit, en présence de β-NADP en 6P-D-gluconate par une Glc6P déshydrogénase. Le NADPH produit est dosé en colorimétrie à 340 nm. A 50 µl de la solution B on ajoute 750 µl de mélange réactionnel constitué de 250 µl tampon triethanolamine 0,75 M, 50 µl de NADP 6,4 mM, 50 µl d'ATP 41,3 mM et 450 µl d'H₂O. La DO1 est alors mesurée à 340 nm. 10 µl de G6PDH-HK (1,67 M d'ammonium sulfate, 300 U/ml d'héxokinase (HK), et 133 U/ml de Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)) sont ensuite ajoutés. Le mélange final est incubé 15 min

à 30°C, et la mesure de la DO2 à 340 nm a ensuite été faite. La concentration d'amidon est calculée suivant la formule suivante :

$$(DO2 - DO1) \times \frac{(\text{volume cuvette (810}\mu\text{l)}) \times \text{PM (du glucose)}}{(E (\text{ENADPH}) \times 100 \times 1)} \times \frac{P2 - P1}{\text{volume prélevé}} \times \frac{100}{MS}$$

Cette analyse comporte 4 répétitions par lignées **ME** et **NE**, et les résultats présentés correspondent à la moyenne des 4.

II.4.7. Dosage des régulateurs de croissance (réalisé au laboratoire de Botanique Expérimentale de Prague)

Trois familles d'hormones végétales ont été étudiées : l'acide abscissique (ABA) et son dérivé glycosylé (ABA-GE), les auxines (AIA) et les cytokinines. Cette analyse comporte 4 répétitions par lignées **ME** et **NE**, et les résultats présentés correspondent à la moyenne des 4.

II.4.7.1. Extraction

Deux cent cinquante mg de matériel frais est broyé pendant 30 s au broyeur à billes à 30 Hz dans 500 µl de tampon modifié Bielecki (Dobrev et Vankova, 2012) (méthanol, H₂O, HCOOH (15/4/1, v/v/v) et 50 µl d'un mélange d'hormone de croissance standard (H6ABA, H5-transZ, H5-transZR, H5-transZ7G, H5-transZ9G, H5-transZOG, H5-transZROG, H5-transZRMP, H3-DHZ, H3-DHZR, H3-DHZ9G, H6-iP, H6-iPR, H6iP7G, H6-iP9G, H6-iPRMP, H5-ABA-GE, C6-IAA (Olchemim)). La solution obtenue est additionnée de 800 µl de tampon Bielecki puis incubée à -20 °C pendant 24 h. Après centrifugation à 14 000 g pendant 15 min à température ambiante, le surnageant est isolé puis stocké à -20 °C (S1). Le culot est mis en suspension dans 1,6 ml de tampon modifié Bielecki, puis placé 15 min au bain à ultrasons à 40 °C avant d'être centrifugé (14 000 g pendant 15 min à température ambiante). Le surnageant a ensuite été récupéré, puis stocké à -20 °C (S2). Cette même opération a été répétée une seconde fois (S3).

II.4.7.2. Purification des extraits hormonaux

Les extraits contenant des phytohormones (S1, S2 et S3) ont été purifiés avant analyse sur des colonnes C18-T-SPE (Strata C18-T, Grace, Lokeren, Belgium) préalablement activées afin de retirer les composants non polaires. Pour ce faire, les colonnes sont nettoyées avec 10 ml de méthanol, puis activées avec 10 ml d'H₂O. Après un rinçage de la colonne avec 2 ml de tampon Bielecki, le filtrat obtenu est évaporé sous vide pour enlever le méthanol présent dans l'échantillon et obtenir une phase aqueuse. On y ajoute ensuite 1 ml d'acide formique (HCOOH) 1 M pour l'acidifier, avant de déposer l'ensemble sur des colonnes MCX (OasisMCX, Waters, Milford, MA), préalablement nettoyées avec 5 ml de méthanol, et activées avec 5 ml HCOOH. L'ABA et l'AIA sont élués avec 5 ml de méthanol, les cytokinines glycosylées avec 5 ml d'un mélange NH₃/H₂O à 2,5 % (v/v), et les autres cytokinines avec 5 ml d'un mélange NH₃/CH₃OH 2,5 % (v/v).

II.4.7.3. Détermination de l'ABA par GC-MS

L'ABA a été analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse GC-MS/MS suivant le protocole décrit par Vandebussche *et al.* (2010). Le détecteur (piège à ions), a été réglé en mode MS/MS avec un balayage complet du produit réglé sur 60-200 amu (portée de masse illimitée) pour l'ABA, et un balayage complet du produit complet à 70-200 amu pour l'ABA marqué. Lors du premier balayage, un scanner complet en 50-300 amu a été réalisé pour confirmer l'identité de la substance. Un graphique d'étalonnage pour chaque substance a été construit pour couvrir de 1 à 1000 ng.ml⁻¹ d'extrait final.

II.4.7.4. Détermination des autres hormones par LC-MS

Cinq µl d'échantillon ont été injectés dans un système de chromatographie liquide couplé à un spectromètre de masse LC-(MS), constitué d'un système HTS PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland), d'une chromatographie liquide à haute pression à gradient Rheos 2200 (Flux, Bâle, Suisse) et d'un spectromètre de masse Quantum Ultra AM triple-quadrupole (Thermo Instruments, San Jose, CA), équipé d'une interface d'ionisation par électrospray (ESI). La séparation a été effectuée sur une colonne HPLC (50 x 2.1 mm² de Kinetex C18 (Phenomenex, Torrance, CA), en utilisant une élution par gradient avec une phase mobile constituée d'acétonitrile (ACN), d'eau et d'1 % d'acide acétique. Un graphique d'étalonnage pour chaque substance a été construit pour couvrir de 1 à 1000 ng.ml⁻¹ d'extrait final.

II.4.8. Protéomique

II.4.8.1. Extraction des protéines solubles

Elle a été réalisée à l'aide d'un tampon à l'urée constitué de 4 M d'urée, 0,1 % de SDS, 0,1M de DTT, 10 % (v/v) de glycérol, 80 mM Tris-HCl pH 6,8. Cent cinquante mg de cellules issues des **ME** et des **NE** ont été broyées. La poudre est reprise dans 1 ml de tampon d'extraction urée. La solution ainsi formée est mise en rotation à 4 °C, pendant 20 min, sur un agitateur rotatif (VWR Collection). Les protéines sont dosées suivant la méthode de Bradford (Bradford 1976) contre une gamme étalon de BSA de 0-3 µg permettant d'obtenir la concentration en protéines solubles.

Pour toutes les analyses sur le protéome, quatre extractions de protéines totales, quatre séparations et quatre analyses par spectrométrie de masse (LC-MS /MS) ont été réalisées par génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) et par type de matériel (**ME** et **NE**). Sur les quatre répétitions, seules deux pour TD15-1 **ME** et trois pour SD4-8 **NE** ont pu être analysées en spectrométrie de masse pour ces génotypes à la suite de problèmes de pureté.



II.4.8.2. Séparation et purification des protéines (Etape réalisée par la plateforme de protéomique de Bordeaux)

Les protéines (10 µg) sont séparées par électrophorèse à l'aide d'un gel PAGE à 10 % (PAGE, 7 x 8 cm, 15 min à 150 V). Les protéines ont été révélées par une solution bleu Colloidal (R-250, Thermo Fisher Scientific). Chaque bande protéique révélée a été découpée du gel au scalpel, en morceaux de 1 mm x 1 mm, puis décolorée dans 25 mM de bicarbonate d'ammonium dans 50 % d'ACN. Les bandes ont ensuite été rincées deux fois dans de l'eau ultrapure, puis réduites dans de l'ACN pendant 10 min. Après élimination de l'ACN, les morceaux de gel ont été déshydratés à température ambiante, recouverts d'une solution de trypsine (10 ng.µl⁻¹ dans 40 mM de bicarbonate de d'ammonium (NH₄HCO₃), et 10 % d'ACN), réhydratés à 4°C pendant 10 min, et finalement incubés 12h à 37°C. L'extraction des protéines a été réalisée en incubant les « spots » dans 40 mM de NH₄HCO₃ et 10 % d'ACN pendant 10 min à température ambiante et sous agitation rotative. Le surnageant a été récupéré, et un tampon d'extraction (H₂O/ACN/HCOOH (47,5 : 47,5 : 5) a été rajouté sur les morceaux de gel pendant 15 min. Cette étape est répétée deux fois. Les surnageants ont ensuite été rassemblés, puis concentrés dans une centrifugeuse à vide, jusqu'à un volume de 100 µl. 2,4 µl d'acide formique (5 %, v/v) sont ajoutés afin d'acidifier les échantillons, qui seront ensuite stockés à -20°C.

II.4.8.3. Analyse en spectrométrie de masse du protéome (Etape réalisée par la plateforme de protéomique de Bordeaux)

Les peptides ont ensuite été analysés sur un système nanoLC Ultimate 3000 (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas), couplé à un spectromètre de masse Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap (Thermo Fisher ScientificTM, San José, CA, gradient de 120 min) pour l'intégration de la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (MS). Dix µl d'échantillon ont été chargés sur une colonne de piégeage C18 PepMapTM (300-µm ID x 5-mm) pour un débit de 30 µl.min⁻¹. Les peptides ont ensuite été élués sur une colonne C18 PepMapTM (75 mm x 25 cm) pour un débit de séparation de 300 nl.min⁻¹ pendant 108 min. Le spectromètre de masse a été réglé en mode « ion positif » pour une tension de pulvérisation de 1,8kV. Les données ont été acquises grâce au logiciel Xcalibur 2.2. Les balayages MS (m/z 350-1600) ont été enregistrés à une résolution de R = 70 000 (@ m/z 200) pour une vitesse de récupération de 106 ions en 100ms (liste d'exclusion 3 m/z). Des balayages MS/MS ont été réalisés avec une vitesse de récupération de 105 ions en 100ms, et une résolution de R=17 000. Les derniers réglages machines sont les suivants : pas de gaine, ni de débit de gaz auxiliaire, température de 250°C, énergie de collision normalisée à 25 %, et largeur d'isolation de 2 m/z.

Les peptides identifiés à partir des spectres de masse ont été comparés avec ceux de la base de données de *Pseudotsuga menziesii* de PineRefSeq (54 595 entrées, <http://pinegenome.org/pinerefseq/>) avec le logiciel Proteome Discover. Les peptides supérieurs à 5000 Da, ou inférieurs à 350 Da ont été rejetés. Les paramètres de recherche sont les suivants : précision de la masse du précurseur peptidique et des fragments peptidiques fixée à 10 ppm et 0,02 Da respectivement. Seules les protéines avec un minimum de deux peptides ont été gardées pour cette analyse.

II.4.9. Transcriptomique

II.4.9.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée suivant le protocole de Chang *et al.* (1993), complétée d'une purification du kit Qiagen™ RNeasy Plant. La poudre a été incubée pendant 30 min à 65°C dans 900 µl de tampon d'extraction (CTAB 2 %, NaCl 2 M, Tris 110 mM, EDTA 25 mM, PVP 2 %, spermidine 3,4 mM, β-mercaptoéthanol 2 %). Deux extractions successives avec une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1, v/v), suivies d'une centrifugation de 5 min à 14 000g (Centrifugeuse Eppendorf) ont été entreprises en récupérant le surnageant. Du chlorure de lithium 10 M (1 volume pour 3 volumes de surnageant) a été rajouté aux tubes pour précipiter les ARN totaux pendant la nuit 4 °C. Les échantillons ont ensuite été sédimentés par centrifugation à 14 000g pendant 20 min (Centrifugeuse Eppendorf) à température ambiante. Le culot a été repris dans 100 µl d'eau RNasefree (S2). La purification des ARN a alors été réalisée à partir de la solution S2 à l'aide du kit RNeasy Plant (Qiagen™) sur des mini colonnes (RNeasy mini Spin Column, Qiagen) suivant les préconisations du fabricant.

Pour toutes les analyses sur le transcriptome, sept extractions d'ARN, sept purifications, sept séquençages par RNAseq ont été réalisés par génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) et par type de matériel (**ME** et **NE**). Sur les sept répétitions, seules six pour SD4-8 **ME** et TD15-1 **ME**, et quatre pour TD17 **ME** ont pu être analysées.

II.4.9.2. Quantification et qualification des ARN totaux

La quantification et les premières données de qualification des ARN totaux ont été déterminées à l'aide d'un Nanodrop (ND-100, ThermoScientific). La pureté, comme l'absence de contaminants protéiques et polysaccharidiques a été estimée au travers des rapports DO_{260}/DO_{280} (estimation du taux de contamination protéique, phénolique...) et DO_{260}/DO_{230} (estimation du taux de contamination polysaccharidique ou autres contaminants absorbants à 230 nm). La qualité des échantillons a été mesurée ensuite à l'aide d'un Experion (Biorad) et du kit de mini d'électrophorèse RNA Stdens (Biorad). La qualité est donnée en RQI (RNA Quality index) qui est calculé en fonction du profil électrophorétique de l'échantillon au travers du rapport entre les bandes 18S et 28S des ARNr. Cette analyse permet d'avoir une idée du taux de dégradation des ARN et s'exprime sur une échelle allant de 0 à 10.

II.4.9.3. Séquençage

La purification des transcrits, la construction des banques d'ADNc, ainsi que le séquençage ont été réalisés par la plateforme GATC Biotech (Allemagne). Les échantillons ont été séquençés en paired-end sur un Illumina HiSeq 2500.

II.4.9.4. Nettoyage des données

Le traitement et l'analyse des données ont été réalisés à l'aide du workflow RNAseqTools (Philippe Label, PIAF, INRA Clermont-Ferrand). Le traitement des 5,1 giga de séquences permet tout à la fois de vérifier la qualité des séquences obtenues, de les nettoyer des

adaptateurs/amorces fixés au cours de processus de séquençage, de supprimer les Ns, les extrémités polyA et polyT, les séquences trop courtes (> 60 pb), de filtrer la complexité, et permettant de décontaminer notre jeu de séquence de contaminant potentiel (bactérie, champignon, humain, virus, ribosome, phages, mitochondrie, chloroplastes) à partir de séquences de références. Une fois nettoyées, les séquences ont été alignées sur le transcriptome de référence du Douglas version 1.0 (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>), qui est basé sur les modèles de gènes assemblés (54830 transcrits). Une filtration des transcrits a été réalisée par la suite afin de retirer les « pseudo transcrits » (transcrits théoriques valides au moment du calcul de l'assemblage, sans réalité biologique, qui contaminent les séquences peu exprimées et entraînent un biais).

II.4.10. Annotations et analyses fonctionnelles par Gene Ontology (termes GO)

En protéomique et en transcriptomique, une analyse différentielle a été réalisée (statistiques détaillées ci-après) afin de ne garder que les séquences significatives sur ou sous régulées. L'abondance d'expression de chaque séquence a été pondérée et normalisée. La différence d'expression a été calculée en comparant la moyenne de tous les peptides de tous les génotypes, d'un type de matériel à l'autre (**ME** et **NE**). Les séquences ont ensuite été annotées de termes GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) en les alignant sur la base de données du transcriptome de *Pseudotsuga menziesii* v1 (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>), et d'*A. thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/>). Ces termes GO permettent de déterminer les catégories fonctionnelles associées à chaque séquence, afin de les classer selon trois catégories de niveau 1 : processus biologiques, fonctions moléculaires, et composants cellulaires. Les identifiants d'*A. thaliana* associés à nos séquences ont été incorporés dans le logiciel Panther (<http://pantherdb.org/> ; Mi *et al.*, 2013) afin de réaliser une analyse fonctionnelle de ces termes GO à un niveau 2 de la catégorie processus biologiques (Mi *et al.*, 2013). Pour observer les variations de classification entre ME et NE de manière statistique, une analyse de surreprésentation, ou d'enrichissement (Term Enrichment), à l'aide du logiciel Panther a été réalisée en utilisant un test binomial (Cho et Campbell, 2000) et une correction de Bonferroni afin de déterminer les GO significativement impliqués par rapport à une liste de référence (**ME** ou **NE**). Cette analyse a été conduite en GO-Slim, ce qui permet de regrouper entre eux tous les GO significatifs appartenant à une même catégorie fonctionnelle d'un niveau inférieur.

II.4.11. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (Version 3.4.0 ; R Development Core Team 2017). Les différences statistiques entre **ME** et **NE** au niveau du potentiel embryogène, de la teneur en eau, en glucides, en protéines totales et en régulateurs de croissance ont été calculées à l'aide d'une analyse de variance à 1 facteur (ANOVA). Afin de différencier les groupes en fonction des génotypes, un test post hoc Tuckey HSD a été réalisé ($P < 0,05$). Dans le cas de la protéomique les séquences communes évoluant dans le même sens pour les 3 génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) dans chaque type de matériel (**ME** et **NE**) ont été gardées après analyse de variance de l'abondance normalisée moyenne à l'aide du package Limma (<https://bioconductor.org>, $P < 0,05$). Pour les analyses de transcriptomique, les

transcrits ont tout d'abord été normalisés par une transformation RLD (Love *et al.*, 2014). Un contrôle des faux positifs a ensuite été réalisé par une correction de Benjamini (Benjamini et Hochberg, 1995), pour un FDR fixé à 0,00025. L'analyse différentielle sur la base de la moyenne des comptages d'alignement des répétitions avec un contrôle FDR a été réalisée avec DESeq2 (<https://bioconductor.org>, $P < 0,05$).



II.5. Résultats

II.5.1. Comparaisons biologiques des ME et NE

Pour les trois génotypes étudiés (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), les lignées **ME**, produisent des ES cotylédonaire, et diffèrent par leur potentiel embryogène : de peu embryogène pour TD17-1 ($238,4 \text{ ES g}^{-1} \text{ MF} \pm 108,2$ (moy \pm IC)), à très embryogène pour TD15-1 ($815,1 \text{ ES g}^{-1} \text{ MF} \pm 158,1$ (moy \pm IC)), à très très embryogène pour SD4-8 ($3547 \pm 597,8 \text{ ES g}^{-1} \text{ MF}$) (**Tableau II.2**). Le génotype TD17-1, en plus d'être la moins embryogène, présente un taux de variabilité très important (IC = ~ 45 %). Les génotypes **NE** mis en maturation ne présentent jamais d'embryons somatiques cotylédonaire, le matériel se nécrosant petit à petit (**Fig II.3 A2, B2 et C2 ; Tableau II.2**) confirmant leur nature non-embryogène.

Tableau II.2 Mesure du potentiel embryogène (Nb ES g^{-1} MF) de masses embryogènes (**ME**) et de cals non-embryogènes (**NE**) pour trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8, TD17-1) après 8 semaines de maturation.

Lignée	Type de Matériel	Potentiel embryogène (Nb ES g^{-1} MF)
TD15-1	ME	$815,1 \pm 158,1^b$
	NE	0
SD4-8	ME	$3547,8 \pm 597,8^a$
	NE	0
TD17-1	ME	$238,4 \pm 108,2^c$
	NE	0

Les valeurs correspondent à 12 mesures \pm IC (5 %). Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes ($P < 0,05$), comparant les trois génotypes **ME**, sont représentés par des lettres.



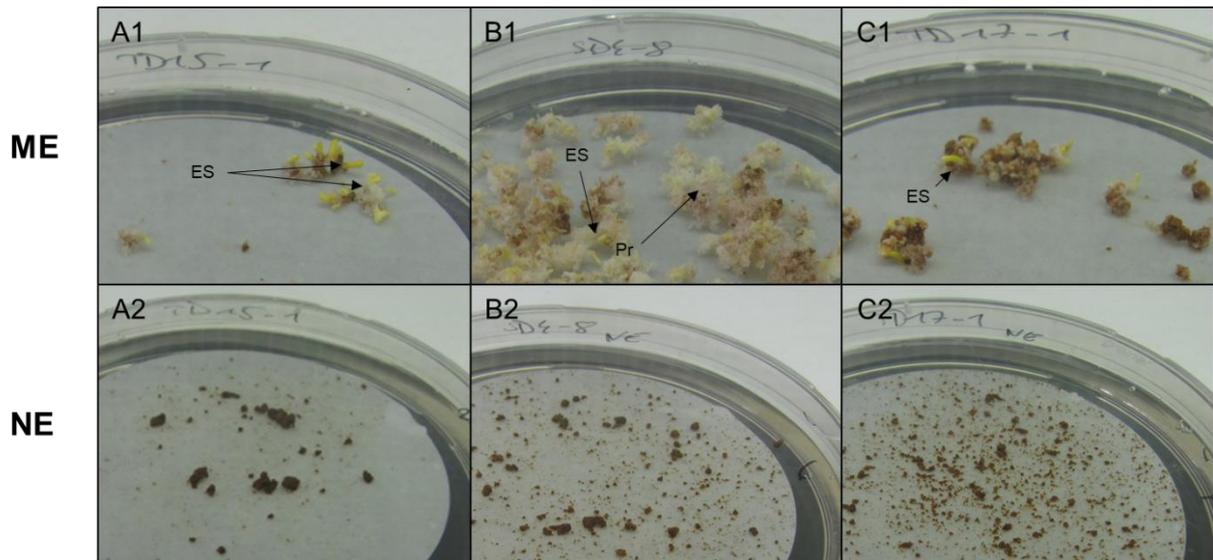


Figure II.3 Morphologie du matériel végétal de Douglas étudié : **1** masses embryogènes (**ME**), **2** cals non-embryogènes (**NE**) de trois génotypes de Douglas TD15-1 (A), SD4-8 (B) et TD17-1 (C), après 8 semaines sur un milieu de maturation. La formation d'embryons somatiques (**ES**) est visible pour les **ME**, alors que le tissu s'est nécrosé pour les **NE**. *ES = embryon somatique, Pr = prolifération.*

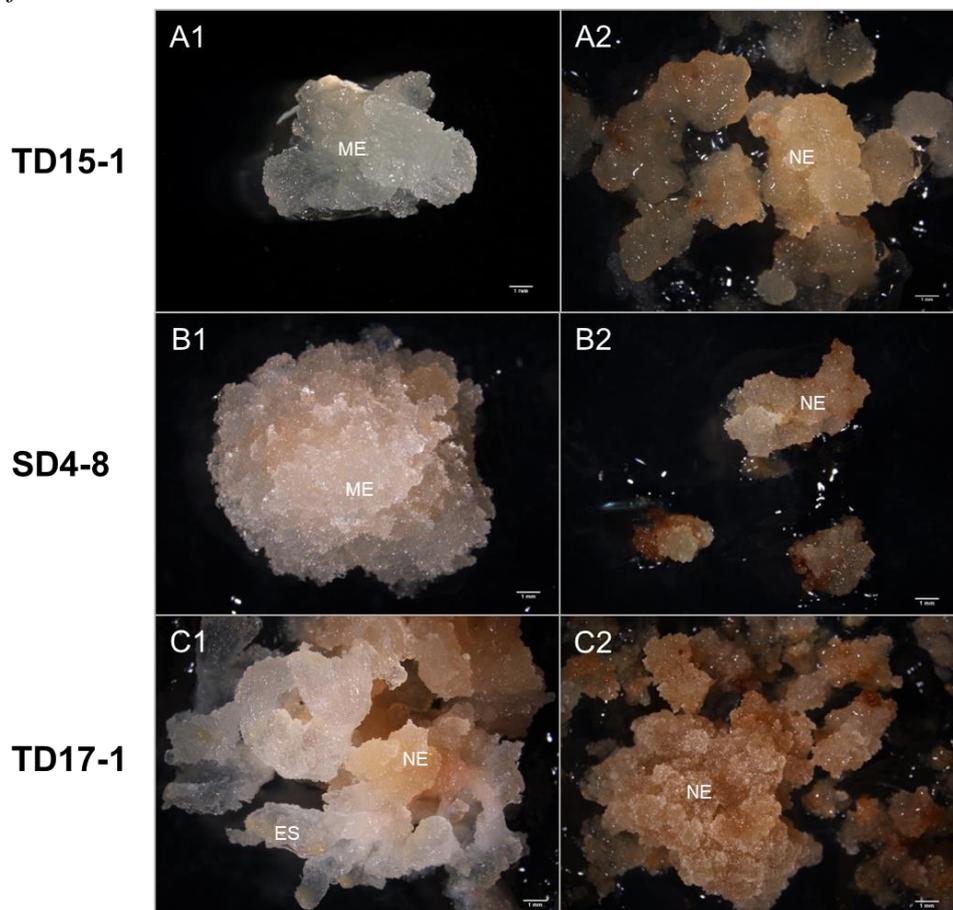


Figure II.4 Morphologie des masses embryogènes (**ME**) de trois génotypes de Douglas : A1 : TD15-1, B1 : SD4-8, C1 : TD17-1 et des cals non-embryogènes (**NE**) : A2 : TD15-1, B2 : SD4-8, C2 : TD17-1, de Douglas, après 2 semaines de multiplication. *Échelle = 1mm, ES = embryons somatiques, ME = masse embryogène, NE = cal non-embryogènes.*

II.5.2. Comparaisons morphologiques, et histologiques des ME et NE de Douglas

Les ME des trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) sont des amas blancs translucides (**Fig II.4** A1, B1 et C1). En microscopie optique, les amas blancs translucides sont constitués d'ES, structure bipolaire composée d'une tête méristématique et de longues cellules formant le suspenseur (**Fig II.5** A1, B1 et C1, et **Fig II.5** A3, B3 et C3). Deux types d'ES peuvent être observés dans les ME. Tout d'abord chez TD15-1 (**Fig II.5** A1) et chez TD17-1 (**Fig II.5** C1 et C3) sont présents des ES avec un énorme centre poly embryogénique avec de nombreuses cellules de suspenseurs, alors que les embryons somatiques de SD4-8 sont plus petits (**Fig II.5** B1 et B3). La coloration au lugol révèle la présence de grains d'amidon, entre la tête méristématique et le suspenseur (**Fig II.5** A2, B2 et C2). Biologiquement, les ES immatures présentent de nombreuses figures de mitose, à la différence des cellules présentes dans les NE (**Fig II.7** A1). Après coloration à l'iodure de propidium, seules quelques cellules de la partie distale du suspenseur sont colorées en rouge, démontrant que le matériel est essentiellement constitué d'amas de cellules vivantes (**Fig II.7** A2).

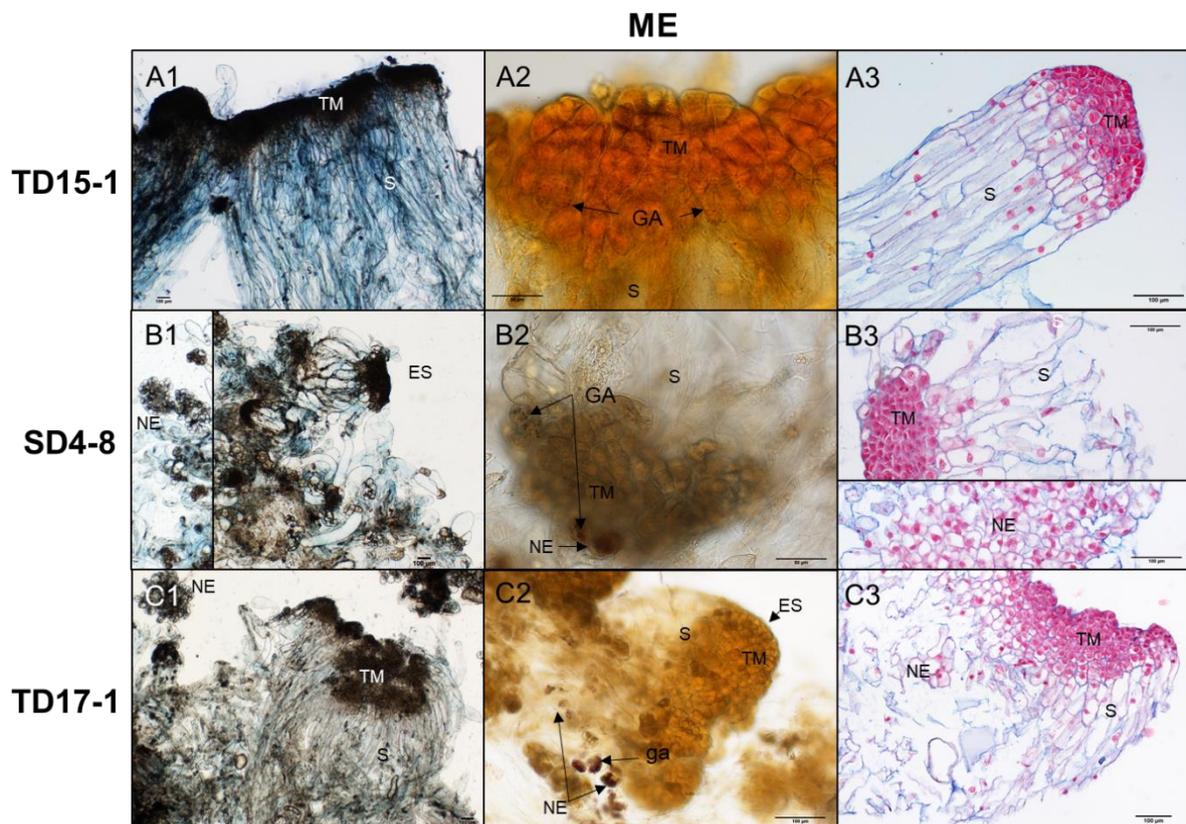


Figure II.5 Aspects cytologiques des masses embryogènes (ME) de trois génotypes de Douglas après deux semaines de multiplication : A. TD15-1 ; B. SD4-8 ; C. TD17-1. La microscopie optique montre la structure des ME (A1, B1, et C1) après une coloration au bleu trypan, les grains d'amidon (en noir) par coloration au lugol (A2, B2 et C2), et la structure de ces embryons après fixation dans de la paraffine suivi d'une double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red (A3, B3 et C3). Échelle = 100µm (A1, A3, B1, B3, C1, C2 et C3) et 50µm (A2 et B2), TM = tête méristématique, S = suspenseur, ES = embryon somatique, NE = cellules non-embryogènes, GA = grain d'amidon.

Les **NE** des trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) sont des cals granuleux de couleur orange/marron, sans réelles différences entre les génotypes (**Fig II.4** A2, B2, C2). Ces **NE** sont des amas de petites cellules rondes sans organisation fonctionnelle (**Fig II.6** A1, A2, B1, B3, C1 et C3), et dans le cas des génotypes SD4-8 et TD17-1 remplies de grains d'amidon (**Fig II.6** B2 et C2). Une coloration du matériel à l'azur II confirme la présence de composés phénoliques apparaissant alors en bleu (**Fig II.7** B1). Contrairement à ce qui a été vu dans les **ME** (**Fig II.7** A1), aucun évènement de mitose n'a pu être observé. La coloration au FDA montre que toutes les cellules des **NE** des trois génotypes sont constituées d'amas de cellules vivantes.

En résumé, les **ME** de Douglas sont des amas blancs composé d'ES immatures avec une activité mitotique forte. Des différences au niveau de la morphologie des **ME** et de la structure des ES existent entre les 3 génotypes. Les **NE** sont des amas orange/marrons composés de cellules rondes vivantes indifférenciées remplies de grains d'amidon.

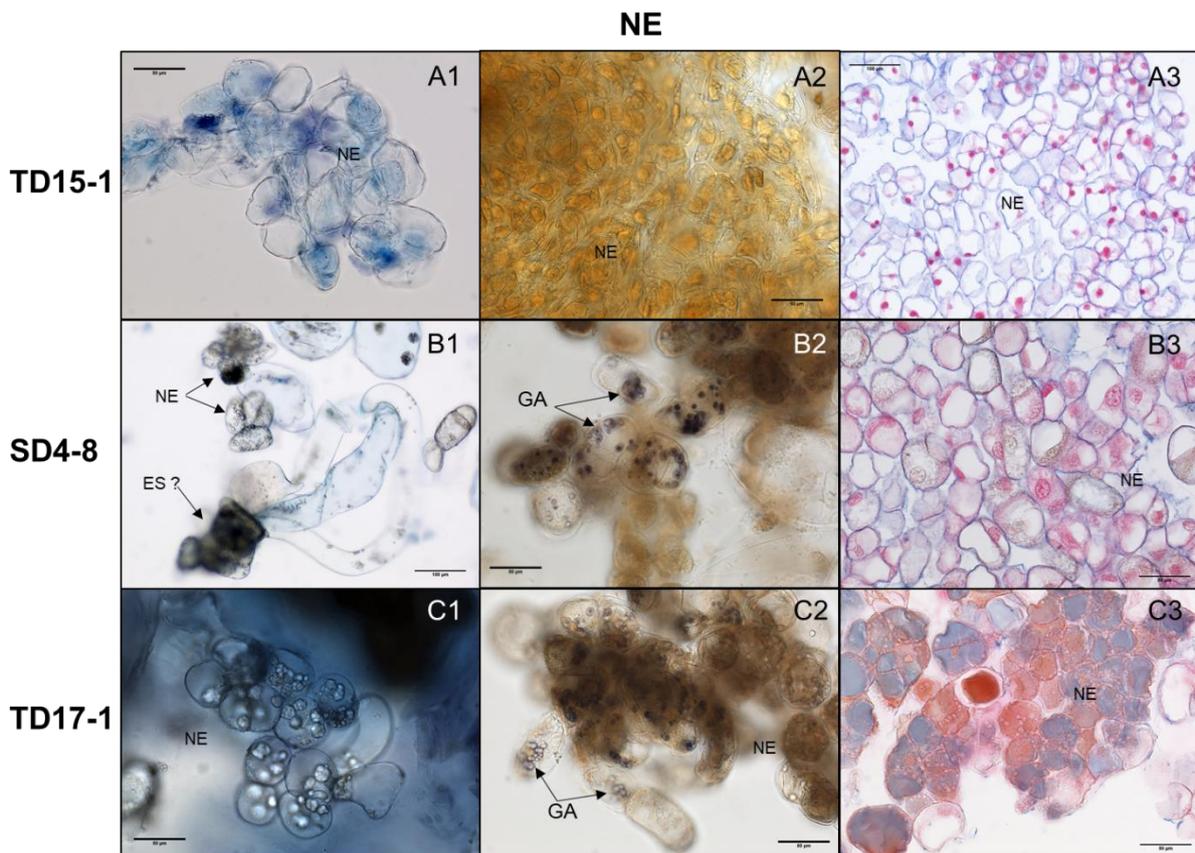


Figure II.6 Aspects cytologiques des cals non embryogènes (**NE**) de trois génotypes de Douglas après deux semaines de multiplication : A. TD15-1 ; B. SD4-8 ; C. TD17-1. La microscopie optique montre la structure des **NE** après une coloration au bleu trypan, les grains d'amidon (en noir) par coloration au lugol (A2, B2 et C2), et la structure de ces cals après fixation dans de la paraffine suivi d'une double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red (A3, B3 et C3). Échelle = 100µm (A3, B1) et 50µm (A1, A2, B2, B3, C1, C2 et C3), ES = embryon somatique, NE = cellules non-embryogènes, GA = grain d'amidon.

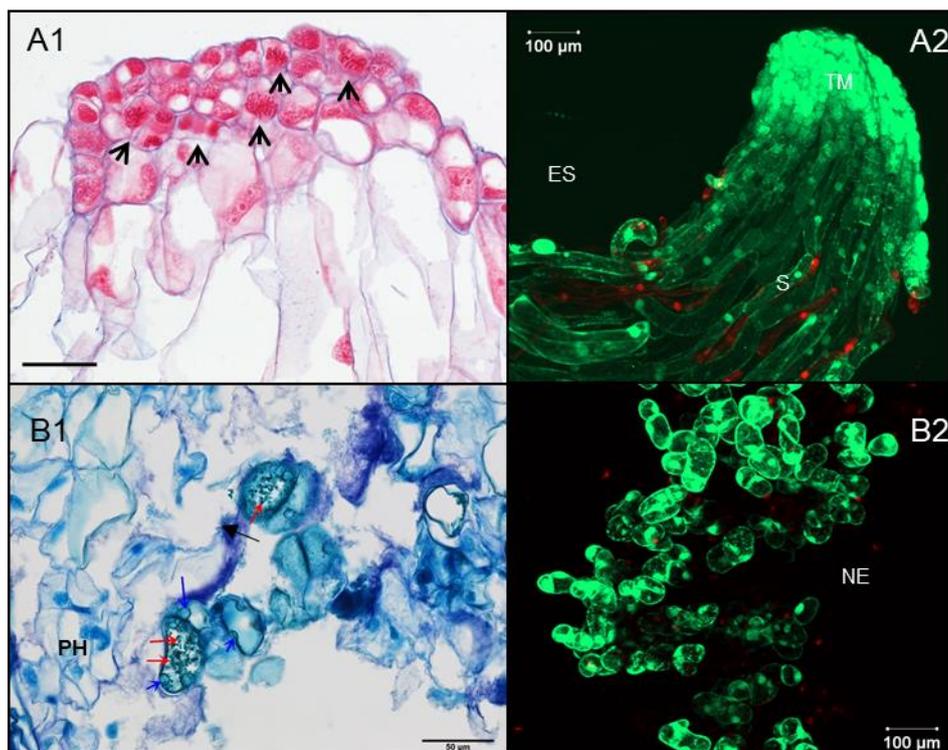


Figure II.7 Structure et viabilité des masses embryogènes (**ME** : A) et cals non-embryogènes (**NE** : B) de Douglas après deux semaines de multiplication. Les images sous microscope optique montrent la structure générale des **ME** (A1) après double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red montrant des cellules en division (flèches) et la composition en phénol (PH) des **NE** par coloration azur II montré par les flèches rouges et bleues (B1). Les images confocales des **ME** (A2) et **NE** (B2) affichent une fluorescence verte dans les noyaux des cellules vivantes (coloration FDA), et une fluorescence rouge dans les noyaux des cellules mortes (coloration IP). Les images confocales permettent de voir que dans les **ME**, seules quelques cellules du suspenseur sont mortes, et que les cellules des **NE** sont vivantes. *Échelle* = 50 μ m (A1 et B1) et 100 μ m (A2 et B2), TM = tête méristématique, S = suspenseur, ES = embryon somatique, NE = cellules non-embryogènes, PH = composés phénoliques, MIT = mitose.

II.5.3. Comparaisons biochimiques des ME et NE de Douglas

II.5.3.1. Teneur en eau

Quel que soit le génotype, les teneurs en eau des **ME** sont significativement plus élevées que celles des **NE** (**Tableau II.3**). Quel que soit le type de matériel (**ME** et **NE**), nous observons des variations significatives de la teneur en eau entre génotype. Par rapport à TD17-1 et SD4-8, TD15-1 présente des teneurs en eau plus fortes à la fois pour les **ME** et **NE** ($15,2 \pm 0,4$ et $13,3 \pm 0,3$ g H₂O g⁻¹ MS respectivement) ; TD17-1 présente les teneurs les plus faibles pour son **NE** ($7,2 \pm 0,1$ H₂O g⁻¹ MS) (**Tableau II.3**).

Tableau II.3 Mesure du potentiel embryogène (Nb ES g⁻¹ MF) de masses embryogènes (**ME**) et de cals non-embryogènes (**NE**) pour trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8, TD17-1) après 8 semaines de maturation.

Lignée	Type de Matériel	Teneur en eau (g H ₂ O.g ⁻¹ MS)
TD15-1	ME	22,2 ± 0,3 ^a
	NE	13,3 ± 0,6 ^c
SD4-8	ME	15,8 ± 0,3 ^b
	NE	8,4 ± 0,3 ^d
TD17-1	ME	15,2 ± 0,4 ^b
	NE	7,2 ± 0,1 ^e

Les valeurs correspondent à 12 mesures ± IC (5 %). Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes ($P < 0,05$), comparant les trois génotypes **ME**, sont représentés par des lettres.

II.5.3.2. Teneur en sucres solubles, amidon, et protéines totales

II.5.3.2.1. Sucres solubles

Par rapport au **NE** la teneur en sucres totaux des **ME** est significativement plus élevée. C'est plus particulièrement le cas pour TD15-1 et SD4-8, mais sans aucune différence pour TD17-1 (**Tableau II.4**). Pour les trois monosaccharides analysés et quel que soit le génotype étudié, seul le Gal n'est pas présent dans les **NE**. Pour ce qui est des disaccharides et des trisaccharides, seul le saccharose et le raffinose sont présents dans toutes les **ME** et les **NE**. Le maltose, qui est le sucre contenu dans le milieu de culture, est absent des **ME** pour SD4-8 et TD17-1. Enfin le mélibiose présente un profil de distribution identique au Gal entre **ME** et **NE** pour les trois génotypes. Le Glc est le sucre le plus représenté dans les **ME** et **NE**, de tous les génotypes à l'exception du **NE** de SD4-8. Le saccharose présente des teneurs 4 à 5 fois plus faibles que le Glc dans les **ME** et les **NE**, à l'exception de TD15-1 **ME**, et de SD4-8 **NE**. Il est possible de réaliser un ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] qui est significativement plus élevé dans les **ME**. Tous les autres sucres, lorsqu'ils sont présents, ont des teneurs très faibles, et nous avons observé une très grande variabilité entre les génotypes, et entre **ME** et **NE**.

II.5.3.2.2. Amidon

Les **NE** sont caractérisés par une teneur d'amidon significativement plus élevée ($19,01 \pm 2,43$ mg g⁻¹ de MS en moyenne) que les **ME** ($9,03 \pm 1,62$ mg g⁻¹ de MS en moyenne **Tableau II.4**). Ces teneurs varient en fonction des différents génotypes, que ce soit **ME** et **NE**, la teneur en amidon la plus faible est caractéristique de TD15-1, et la plus forte pour TD17-1.

II.5.3.2.3. Protéines totales

La mesure de la teneur en protéines totales montre qu'elle est similaire entre les **ME** et les **NE**, sans variations significatives entre les différents génotypes (**Tableau II.4**).

En conclusion, les **ME** de Douglas sont caractérisées par une teneur en eau plus forte, des teneurs en sucres totaux plus importantes essentiellement dues à une forte teneur en Glc. A l'inverse les **NE** sont caractérisés par des teneurs en amidon doublées par rapport aux **ME**. Des différences au niveau biochimique existent entre les différents génotypes. Néanmoins ces deux types de matériel ne montrent aucune différence significative pour la teneur en protéines totales.

Tableau II.4 Teneur en sucres solubles, en amidon et en protéines totales dans des masses embryogènes (**ME**) et des cals non-embryogènes (**NE**) dans nos trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) de Douglas après deux semaines de multiplication. *Les valeurs correspondent à 4 (glucides et amidon) et 5 (protéines totales) mesures \pm IC à un niveau d'erreur de 5 %. Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes ($P < 0,05$), comparant **ME** et **NE**, sont représentés par des lettres. Les valeurs en gras sont les teneurs les plus remarquables significativement.*

Sucres solubles (mg.g ⁻¹ MS)	ME			NE		
	TD15-1	SD4-8	TD17-1	TD15-1	SD4-8	TD17-1
Glucose	203,34 \pm 49,61 ^a	209,94 \pm 24,51 ^a	211,93 \pm 25,70 ^a	78,68 \pm 57,28 ^b	13,59 \pm 1,38 ^b	180,09 \pm 29,76 ^a
Fructose	17,52 \pm 6,41 ^a	18,89 \pm 1,23 ^a	15,02 \pm 3,43 ^a	5,83 \pm 0,90 ^b	3,87 \pm 0,28 ^b	27,53 \pm 10,19 ^a
Saccharose	13,23 \pm 5,62 ^a	52,87 \pm 9,46 ^a	40,19 \pm 16,72 ^a	21,15 \pm 8,90 ^a	17,34 \pm 4,54 ^b	42,12 \pm 6,37 ^a
Maltose	6,09 \pm 0,75 ^a	0 ^a	0 ^a	1,52 \pm 1,71 ^b	3,57 \pm 0,23 ^b	3,87 \pm 4,60 ^b
Galactose	3,31 \pm 0,90 ^a	2,22 \pm 0,32 ^a	2,50 \pm 0,58 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Raffinose	6,88 \pm 1,72 ^a	16,92 \pm 2,91 ^a	10,94 \pm 3,92 ^a	6,79 \pm 8,15 ^a	1,34 \pm 0,28 ^b	7,67 \pm 1,91 ^a
Melibiose	3,08 \pm 0,50 ^a	3,97 \pm 0,50 ^a	3,56 \pm 0,72 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Total (mg.g⁻¹ MS)	253,45 \pm 26,57 ^a	304,81 \pm 26,60 ^a	284,14 \pm 27,09 ^a	113,96 \pm 11,88 ^b	39,71 \pm 2,25 ^b	261,27 \pm 23,04 ^a
Amidon (mg.g⁻¹ MS)	2,56 \pm 0,37 ^a	10,22 \pm 0,21 ^a	14,91 \pm 1,76 ^a	8,69 \pm 2,42 ^b	19,30 \pm 2,44 ^b	26,87 \pm 0,66 ^a
Protéines totales (µg.g⁻¹ MS)	93,32 \pm 6,81 ^a	94,35 \pm 8,38 ^a	94,88 \pm 5,92 ^a	110,99 \pm 34,82 ^a	87,25 \pm 9,69 ^a	82,92 \pm 18,72 ^a

II.5.3.3. Régulateurs de croissance

Parmi les différents régulateurs de croissance présents chez les plantes, une auxine l'acide indole 3-acétique (AIA), l'acide abscissique (ABA), son conjugué l'ABA glucose ester (ABAGE) et plusieurs cytokinines (CKs) isoprénoïdes (*cis/trans*-Zéatine (*c/t-Z*), DehydroZéatine (DHZ), isopentenyladenine (iP)) et aromatiques (Benzyl Adénine (BA)) ont été analysés à l'institut de Botanique Expérimental de Prague.

II.5.3.3.1. Auxines et acide abscissique

Nos résultats montrent une teneur en AIA plus importante dans les **ME** ($251,7 \pm 31,3$ pmol. g⁻¹ MS en moyenne) par rapport aux **NE** ($151,5 \pm 35,5$ pmol.g⁻¹ MS en moyenne), sans différences significatives entre les trois génotypes (**Tableau II.5**).

A l'inverse de l'AIA, les teneurs d'ABA et de son conjugué l'ABA-GE sont significativement plus fortes dans les **NE** que les **ME** de tous les génotypes (**Tableau II.5**). Quel que soit l'isoforme d'ABA, des variations importantes (allant d'un facteur 4 pour l'ABA, à 40 pour l'ABA-GE) sont mesurées entre les génotypes d'un même type de matériel (**ME** ou **NE**). Les teneurs les plus importantes en ABA et en ABA-GE, ont été retrouvées dans le génotype SD4-8 **NE**.

II.5.3.3.2. Cytokinines

Pour les trois génotypes, différentes isoformes de CKs ont été détectées dans les **ME** et les **NE** (**Tableau II.5**). Parmi les quatre CKs isoprénoïdes analysées (*cis*-Zéatine : *c-Z*, *trans-Z* : *t-Z*, dehydroZ : DHZ, isopentenyladenine : iP), certaines sont actives : les CKs « free-base », et riboside (R), et d'autres sont inactives : les CKs phosphate (ph) qui sont des précurseurs de la biosynthèse des CKs, et les CKs glucosylées (O et N-glucosylées). Les isoformes glycosylées le sont soit par une zeatin-*O*-glucosyltransférase, permettant une liaison réversible du Glc sur l'aglycone, qui conduit à la formation d'une forme de stockage (7/9 ROG ou OG) de la *cis/trans-Z*. Outre la *O*-glucosylation, la *Z*, mais également l'iP peuvent être *N*-glucosylées par une *N*-glucosyltransférase conduisant à la formation d'une forme irréversiblement inactive (7/9G). Ces dérivés glucosides de la *Z* et de l'iP seront à terme dégradés en dérivé adénilique par la cytokinine déshydrogénase (Spíchal 2012) (**Fig II.18**).

Quel que soit le génotype, la proportion de CKs actives est toujours supérieure dans les **ME** (entre 37 et 50 %) par rapport aux **NE** (entre 25 et 40 %) (**Fig II.8**). Le même profil est retrouvé avec les précurseurs des CKs (ph) pour tous les génotypes (44 et 60 % contre 31 et 23 % dans les **NE**) sauf TD15-1 où les proportions sont sensiblement équivalentes entre **ME** et **NE**. A l'inverse, les formes glucosylées sont plus abondantes dans les **NE** quel que soit le génotype. Parmi toutes les isoformes de CKs isoprénoïdes analysées, les formes inactives irréversibles représentent moins de 5 % dans les **ME** alors qu'elles peuvent représenter jusqu'à 20 % des CKs isoprénoïdes dans les **NE**. Au de-là des proportions relatives des différentes isoformes de CKs isoprénoïdes, les teneurs mesurées dans le génotype SD4-8 sont toujours largement supérieures aux teneurs mesurées dans les autres lignées (**Fig II.8**). Parmi les formes actives de CKs isoprénoïdes, c'est la *cis-Z9R* qui est la plus abondante quel que soit le génotype et le matériel (**Tableau II.5**). Les teneurs en précurseur de la *cis-Z* (*cis-Z9R-ph*) sont plus

abondantes dans les **ME** par rapport **NE**. Aucune forme glucosylée de la *cis-Z* n'a été détectée dans les **ME**. Toutes les autres isoformes de *Z* (*trans-Z* et *DHZ*) analysées sont présentes à des teneurs inférieures à la *cis-Z* (moins de 2 pmol.g⁻¹ MS). Pour l'iP, seuls les précurseurs (ph) et les formes actives de cet CKs ont été détectés.

Tableau II.5 Teneur en hormones endogènes dans des masses embryogènes (**ME**) et des cals non-embryogènes (**NE**) de nos trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) de Douglas après 2 semaines de multiplication (moyenne ± IC à 5 %). AIA : acide indole 3-acétique, ABA : acide abscissique, ABA-GE : ABA glucose ester ; CKs isoprénoides : cytokinines actives de forme isoprénoides, c-Z (*cis-Zéatine*), t-Z (*trans-Zéatine*), DHZ (*DehydroZéatine*), iP (*isopentenyladenine*); CKs aromatiques : famille de la benzyl adénine (BAP). R (riboside) : forme active riboside ; R-ph : forme précurseur riboside phosphate ; OG et ROG : forme de désactivation (stockage) réversible O-glucosylée ; 3G, 7G et 9G : forme de désactivation irréversible N-glucosylée. Les valeurs correspondent à 3 ou 4 mesures ± IC à un niveau d'erreur de 5 %. Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes ($P < 0,05$), comparant **ME** et **NE**, sont représentés par des lettres.

Hormones endogènes (pmol.g ⁻¹ MS)	ME			NE		
	TD15-1	SD4-8	TD17-1	TD15-1	SD4-8	TD17-1
AIA	225,92 ± 61,04 ^a	302,35 ± 13,34 ^a	226,98 ± 54,94 ^a	128,99 ± 42,70 ^a	212,42 ± 74,80 ^a	120,66 ± 52,71 ^a
ABA	139,40 ± 51,69 ^a	176,60 ± 20,76 ^a	513,91 ± 297,39 ^a	756,49 ± 283,88 ^b	4013,45 ± 1283,30 ^b	1927,8 ± 1187,97 ^a
ABA-GE	33,58 ± 8,26 ^a	329,67 ± 76,31 ^a	128,73 ± 53,58 ^a	1401,17 ± 309,58 ^b	37055,47 ± 5590,10 ^b	6437,11 ± 4683,65 ^b
CKs isoprénoides						
t-Z	0	0	0	0	0	0
t-Z9R	0,12 ± 0,06	0	0,28 ± 0,06	0	0	0
t-Z9R-ph	0	0	0	0	0	0
t-Z9ROG	0	0	0	0	0	0
t-ZOG	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,50 ± 0,16	0,56 ± 0,18	1,77 ± 0,94	1,81 ± 0,51
t-Z7G	0	0	0	0,58 ± 0,28	3,52 ± 0,14	0,63 ± 0,37
t-Z9G	0	0	0	0	0	0
c-Z	0	0	0	0	0	0
c-Z9R	3,95 ± 0,37	4,01 ± 0,33	4,07 ± 0,44	2,63 ± 0,58	7,00 ± 0,64	1,74 ± 1,03
c-Z9R-ph	2,49 ± 0,80	6,94 ± 0,79	3,71 ± 0,59	1,97 ± 1,08	5,23 ± 1,64	1,07 ± 0,53
c-Z9ROG	0	0	0	0,42 ± 0,14	9,21 ± 0,68	0
c-ZOG	0	0	0	0	0	0
c-Z7G	0	0	0	0	3,48 ± 1,06	0,89 ± 0,51
c-Z9G	0	0	0	0	0	0
DHZ	0	0	0	0	0	0
DHZ9R	0	0	0	0	0	0
DHZ9R-ph	0,58 ± 0,39	0,53 ± 0,10	0,64 ± 0,10	0,25 ± 0,07	0,59 ± 0,49	0,58 ± 0,27
DHZ9ROG	0	0	0	0	0	0
DHZOG	0	0	0	0	0	0
DHZ7G	0	0,36 ± 0,09	0,58 ± 0,09	0	0	0,64 ± 0,13
DHZ9G	0	0	0	0	0	0
iP	0,85 ± 0,22	1,50 ± 0,66	1,10 ± 0,07	0,64 ± 0,28	1,67 ± 0,18	2,98 ± 2,16
IP9R	1,52 ± 0,48	1,00 ± 0,15	0,91 ± 0,12	0,87 ± 0,22	0	0,82 ± 0,38
IP9R-ph	3,11 ± 0,89	2,98 ± 0,60	1,55 ± 0,46	4,22 ± 0,34	1,99 ± 0,75	3,03 ± 0,49
IP7G	0	0	0	0	0	0
IP9G	0	0	0	0	0	0
Total	12,8	17,6	13,3	12,1	34,5	13,8
CKs aromatiques						
BAP	6716,8 ± 395,4 ^a	5486,1 ± 434,2 ^a	4853,4 ± 305,1 ^a	7674 ± 1894 ^a	27048,7 ± 10304,9 ^b	3086,5 ± 622,1 ^b
BA9R	172,2 ± 20,1 ^a	176,3 ± 28,2 ^a	142,6 ± 10,4 ^a	1729,5 ± 277,1 ^b	530,1 ± 95,3 ^b	133,7 ± 27,3 ^a
BA9R-ph	379,4 ± 46,9 ^a	350,7 ± 62,6 ^a	298,3 ± 42,4 ^a	5187,6 ± 1132,9 ^b	1655,1 ± 672,2 ^b	375,7 ± 96,8 ^a
BA3+7G	7,83 ± 2,27 ^a	6,19 ± 1,84 ^a	6,54 ± 2,28 ^a	22,14 ± 3,90 ^b	222 ± 36 ^b	20,5 ± 2,4 ^b
BA9G	4,55 ± 1,17 ^a	11,09 ± 1,12 ^a	3,73 ± 1,51 ^a	117,5 ± 20,39 ^b	1578,9 ± 185,7 ^b	46,99 ± 31,88 ^a
Total	7308,8 ± 2581,2^a	6056,4 ± 2100,8^a	5332,0 ± 1861,3^a	14793,8 ± 2953,3^b	31163,1 ± 10227,2^b	3686,6 ± 1159,9^a

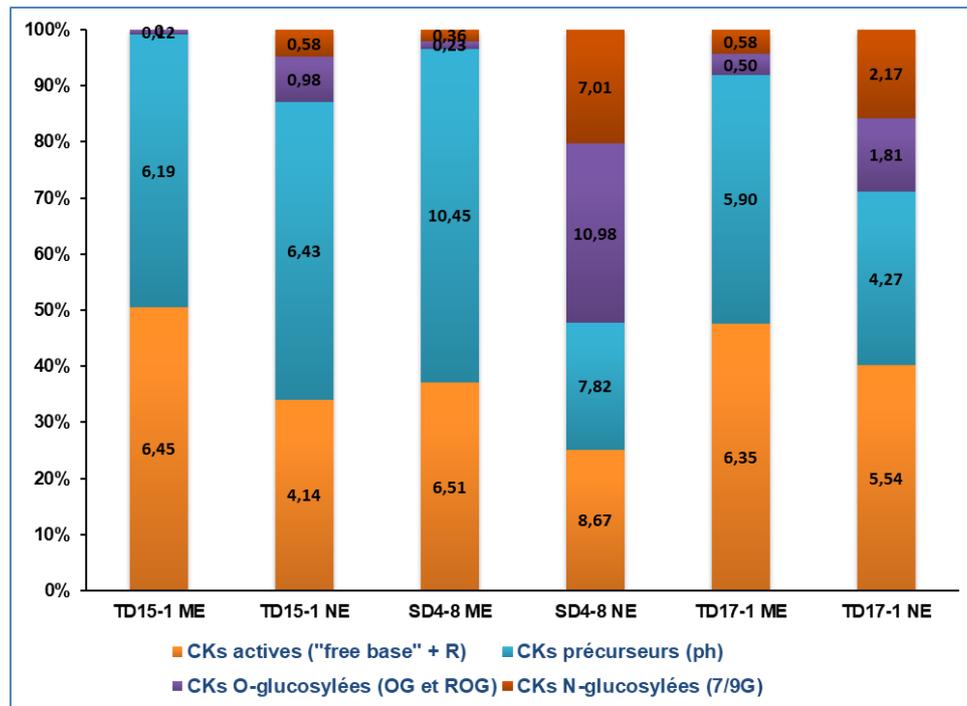


Figure II.8 Proportion des teneurs en cytokinines endogènes isoprénoïdes (actives : « free-base » et riboside, précurseurs (ph), *O*-glucosylées : OG et ROG, et *N*-glucosylées : 7/9G) dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) après 2 semaines de multiplication. La proportion est exprimée en pourcentage, et les chiffres sur les barres correspondent à la teneur (pmol.g⁻¹MS) de chaque groupe d'isoforme.

Ici c'est le précurseur, iP9R-ph qui est la forme la plus abondante sans qu'on puisse distinguer de corrélations entre génotype et type de matériel. L'isoforme actif iP9R tend à être moins abondant dans les NE par rapport aux ME quel que soit le génotype (Tableau II.5).

A la différence des CKs isoprénoïdes, les isoformes aromatiques sont plus représentées dans les NE par rapport aux ME sauf pour TD17-1 (Tableau II.5). Parmi les CKs aromatiques, nous avons analysé la BA, ainsi que ses dérivés (BA phosphate : BA9R-ph, BA active riboside : BAR, et les BA inactivées *N*-glucosylée : BA3G,7G et 9G). Quel que soit le génotype, la proportion de CKs aromatiques actives est toujours supérieure à 90 % dans les ME, et présentent des proportions plus variables mais < 90 % dans les NE (Fig II.9). Les formes *N*-glucosylées de la BAP sont présentes sous forme de trace dans les ME des trois génotypes. Si les teneurs en formes actives et inactives sont équivalentes quelles que soit les génotypes dans les ME, SD4-8 NE montre des teneurs plus de 4 fois supérieures aux autres lignées (Fig II.9). Parmi les formes actives, c'est la BAP qui est la plus représentée qu'elle que soit génotype et le type de matériel (Tableau II.5). Il est à noter que cette hormone de synthèse est ajoutée au milieu de culture pour la phase de multiplication des ME et NE pouvant expliquer ces valeurs très importantes.

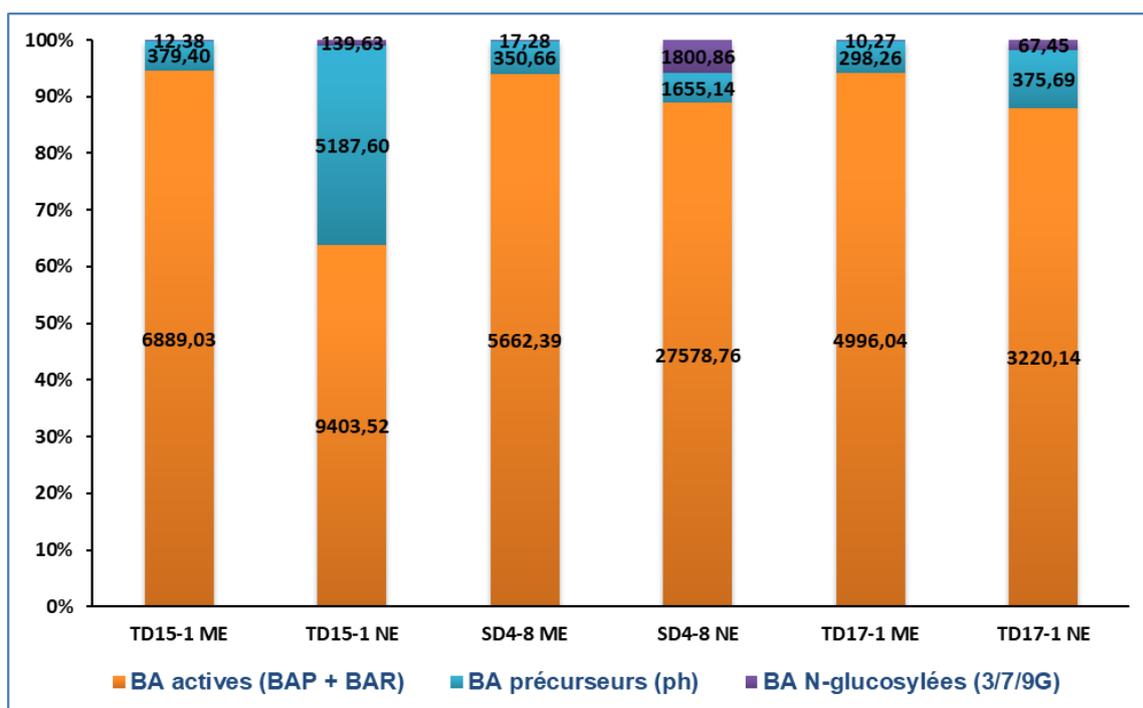


Figure II.9 Proportion des teneurs en cytokinines endogènes aromatiques (actives : BAP et BAR, précurseurs (ph), et *N*-glucosylées : 3/7/9G) dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) après 2 semaines de multiplication. La proportion est exprimée en pourcentage, et les chiffres sur les barres correspondent à la teneur (pmol.g⁻¹MS) de chaque groupe d'isoforme.

En conclusion, les ME sont caractérisées par des teneurs plus fortes en auxines et en CKs isoprénoïdes et phosphates, alors que les NE sont caractérisés par des teneurs fortes en l'ABA, l'ABAGE et cytokinines isoprénoïdes inactives (stockage et dégradation).

II.5.4. Comparaisons moléculaires des ME et NE de Douglas

II.5.4.1. Analyse des résultats de protéomique

II.5.4.1.1. Analyse fonctionnelle

Un total de 3 028 identifiants différents a été obtenu à partir des protéines des ME et NE des trois génotypes. Afin de caractériser l'aptitude à l'embryogenèse, et non les différences entre génotype, nous avons fait le choix de ne garder que les protéines différenciellement exprimées, communes dans tous les échantillons de chaque génotype de chaque type de matériel, et variant dans le même sens (sur ou sous exprimées). Parmi ces 3028 identifiants, quel que soit le génotype, 236 protéines sont surexprimées dans les ME et 177 dans les NE (Fig II.10). De ce fait 86 % des protéines identifiées ne présentent aucune expression différenciée communes pour les trois génotypes entre ME et NE. Une analyse en composante principale permet de faire ressortir, à l'échelle des échantillons, les facteurs expliquant les différences d'expression

observées pour l'ensemble des protéines identifiées. Il s'agit d'une projection de l'ensemble des caractéristiques des résultats obtenus pour chaque répétition sur le plan formé par les composantes principales 1 et 2 (axe PC1 et axe PC2), elle est illustrée par la **Fig II.11 A**. Les différentes répétitions de chaque échantillon sont bien regroupées, et ces deux axes expliquent respectivement 71 % et 9 %, soit 80% de la variabilité d'expression des protéines. Comme l'axe PC1, qui sépare très nettement les échantillons selon le type de matériel, explique 71 % de variabilité entre les échantillons, c'est donc ce paramètre qui différencie très majoritairement les échantillons. Sur la totalité des protéines différentiellement exprimées, la représentation sous forme de Heat-map (répartition graphique en fonction de l'intensité d'une grandeur) nous permet de distinguer 3 clusters correspondant aux 3 génotypes, et 2 clusters correspondant au type de matériel (**Fig II.11 B**). Des différences importantes existent donc au niveau protéomique entre **ME** et **NE**.

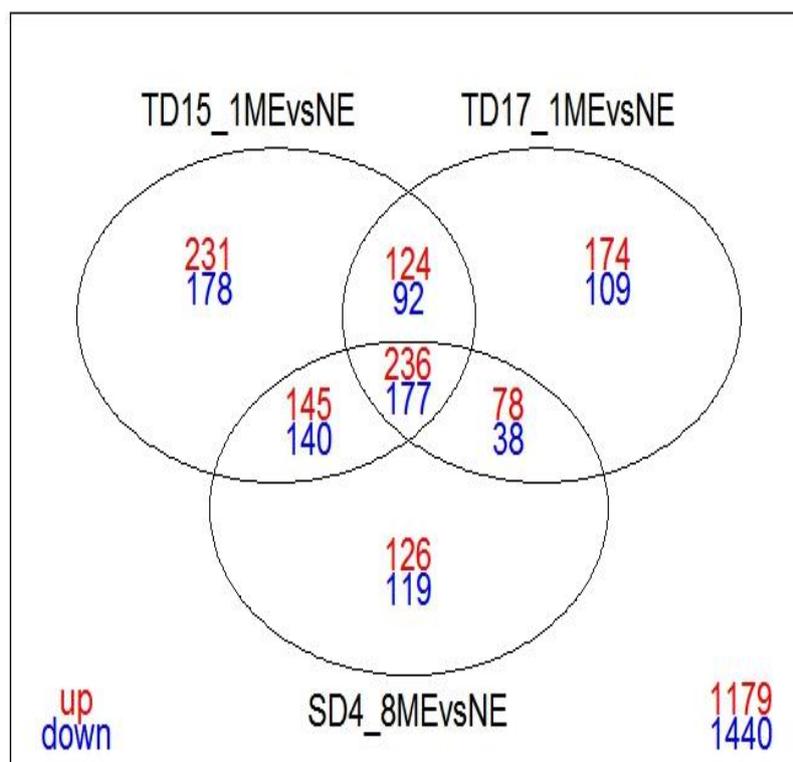


Figure II.10 Diagramme de Venn des protéines différentiellement abondantes entre **ME** et **NE** dans les génotypes TD15-1, SD4-8 et TD17-1 de Douglas. *Le rouge représente le nombre de protéines surexprimées (up) dans les **ME**, et le bleu les protéines sous exprimées (down) dans les **ME** et donc surexprimées dans les **NE**.*

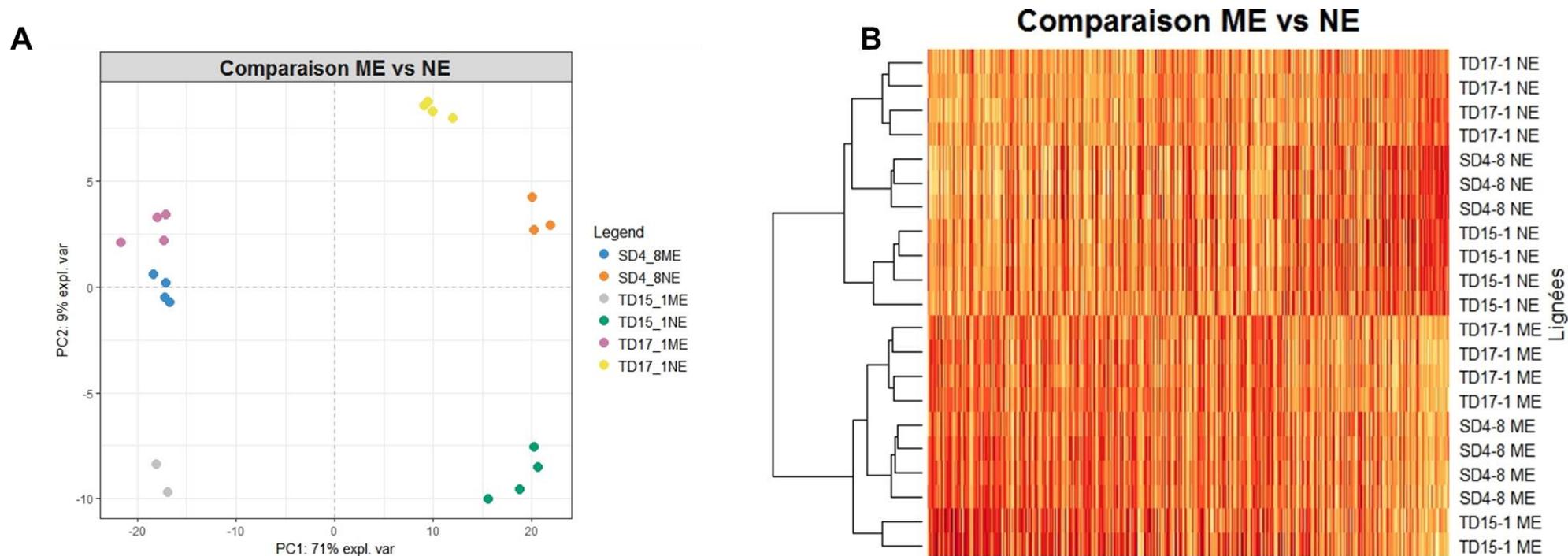


Figure II.11 Analyses des 413 protéines communes au trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) différemment exprimées entre les **ME** et les **NE**. L'identification et la quantification des protéines a été faite en spectrométrie de masse. (A) Analyse en composantes principales en fonction des génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), et du type de matériel (**ME** ou **NE**) ; (B) HeatMap représentant les changements dans les abondances des différentes protéines en fonction des génotypes et du type de matériel.

Pour toutes les protéines différentiellement exprimées, une annotation fonctionnelle a été réalisée pour ces protéines grâce au consortium « Gene Ontology » (code GO, <http://www.geneontology.org/>), à partir des bases de données des codes GO du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>) et d'*Arabidopsis* (<https://www.arabidopsis.org/>, TAIR) afin de compléter notre annotation. L'annotation fonctionnelle attribuée au travers du code GO une fonction prédictive des protéines permettant de comprendre le déterminisme de la différenciation protéique entre **ME** et **NE**. Ce consortium propose trois catégories « fonctions moléculaires » « composants cellulaires » et « processus biologiques ». Cette dernière permet une analyse de la fonction biologique des protéines différentiellement exprimées entre **ME** et **NE** (**Tableau II.6**). Dans cette catégorie, il est possible de classer nos identifiants dans 8 grandes catégories fonctionnelles sous-jacentes.

Sur les 236 protéines identifiées dans les **ME**, 220 possèdent des codes GO pour un total de 266 GO impliqués dans cette catégorie (une protéine pouvant avoir plusieurs GO, 200 GO sont présents dans la catégorie « fonctions moléculaires », et 165 dans la catégorie « composants cellulaires »). Pour les **NE**, 148 protéines possèdent un code GO sur 177 pour un total de 135 GO impliqués (108 dans la catégorie « fonctions moléculaires », et 50 dans la catégorie « composants cellulaires »).

Environ la moitié des GO attribués à nos protéines sont associés à la catégorie fonctionnelle processus métaboliques qui rassemble toutes les voies anaboliques et cataboliques des êtres vivants. Dans cette catégorie fonctionnelle, la sous-catégorie métabolisme primaire (GO:0044238) rassemble à lui seule 40 % des GO de cette catégorie. Le pourcentage des protéines des **ME** et des **NE** présentes dans les huit catégories fonctionnelles, les **ME** sont caractérisées par les catégories fonctionnelles processus cellulaires (« cellular process » GO:0009987; 31,2 % contre 24,4 % dans les **NE**) (regroupant le cycle cellulaire, la mitose, la ségrégation des chromosomes), le trafic cellulaire (« localization » GO:0051179 ; 12,8 % contre 3,7 %) et dans une moindre mesure la biogenèse ou organisation des composants cellulaires (« Cellular component organization or biogenesis » GO:0071840; 9 % contre 5,9 %). À l'inverse les **NE** sont caractérisés par des identifiants possédant des GO appartenant aux catégories fonctionnelles processus métaboliques (« metabolic process » GO:0008152; 53,3 % contre 39,8 %), et réponse aux stimuli (« response to stimulus » GO:0050896 ; 6,7 % contre 3 %).



Tableau II.6 Répartition fonctionnelle (code GO de niveau 2 ou plus, catégorie fonctionnelle « Processus Biologiques ») des protéines différemment exprimées entre **ME** et **NE** des 3 géotypes de Douglas étudiés (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). *Le tableau donne le nombre de hits impliqués dans chaque catégorie fonctionnelle. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de hits (occurrence) par groupe fonctionnel rapporté au nombre total de GO dans cette catégorie.*

Catégorie fonctionnelle	ME		NE	
	Nb hits	%	Nb hits	%
Biological regulation (GO:0065007)	7	2,6	5	3,7
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	24	9,0	8	5,9
Cellular process (GO:0009987)	83	31,2	33	24,4
<i>Cellular component movement (GO:0006928)</i>	4	1,5	2	1,5
<i>Cytokinesis (GO:0000910)</i>	2	0,8	0	0,0
<i>Cell cycle (GO:0007049)</i>	7	2,6	3	2,2
<i>Chromosome segregation (GO:0007059)</i>	4	1,5	2	1,5
<i>Cell communication (GO:0007154)</i>	4	1,5	3	2,2
Developmental process (GO:0032502)	3	1,1	3	2,2
Localization (GO:0051179)	34	12,8	5	3,7
<i>Protein localization (GO:0008104)</i>	4	1,5	0	0,0
<i>Transport (GO:0006810)</i>	34	12,8	5	3,7
Metabolic process (GO:0008152)	106	39,8	72	53,3
<i>Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)</i>	24	9,0	2	1,5
<i>Biosynthetic process (GO:0009058)</i>	21	7,9	13	9,6
<i>Vitamin metabolic process (GO:0006766)</i>	0	0,0	3	2,2
<i>Primary metabolic process (GO:0044238)</i>	102	38,3	59	43,7
<i>Catabolic process (GO:0009056)</i>	26	9,8	11	8,1
<i>Sulfur compound metabolic process (GO:0006790)</i>	6	2,3	8	5,9
<i>Coenzyme metabolic process (GO:0006732)</i>	1	0,4	6	4,4
<i>Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>	36	13,5	14	10,4
<i>Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)</i>	5	1,9	12	8,9
<i>Secondary metabolic process (GO:0019748)</i>	1	0,4	3	2,2
Response to stimulus (GO:0050896)	8	3,0	9	6,7
<i>Response to stress (GO:0006950)</i>	6	2,3	8	5,9
<i>response to abiotic stimulus (GO:0009628)</i>	1	0,4	0	0,0
<i>Response to endogenous stimulus (GO:0009719)</i>	1	0,4	0	0,0
<i>Immune response (GO:0006955)</i>	1	0,4	0	0,0
Immune system process (GO:0002376)	1	0,4	0	0,0

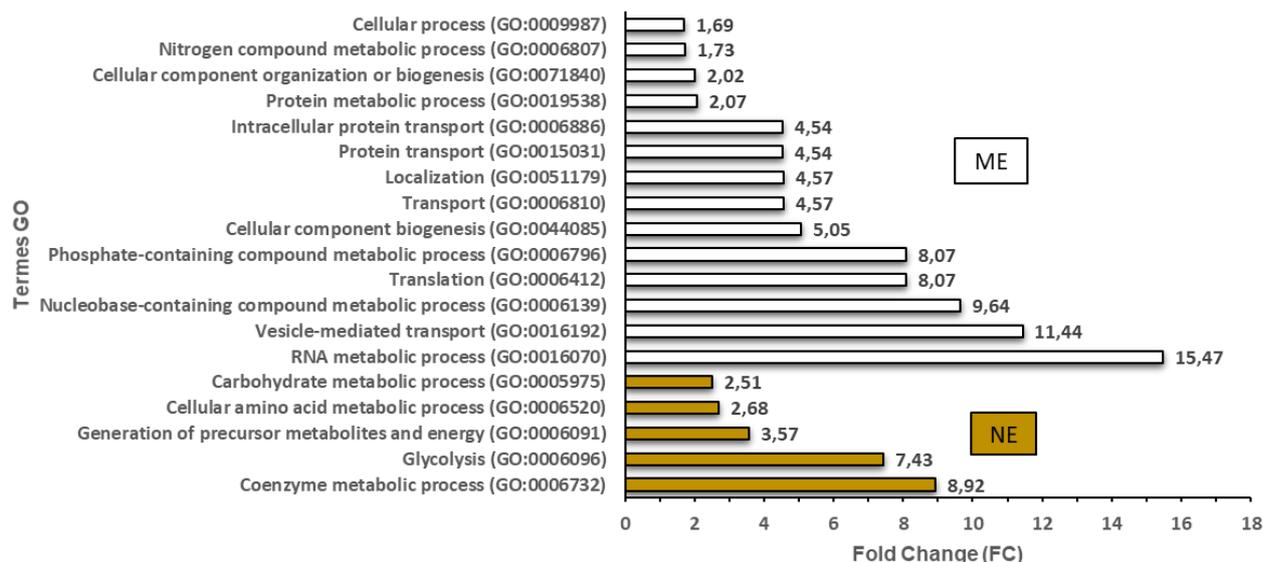


Figure II.12 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus qui sont associées aux protéines retrouvées surreprésentées significativement dans les masses embryogènes (ME) ou dans les cals non-embryogènes (NE) des trois génotypes de Douglas. Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini et Hochberg 1995). Le fold change correspond au ratio du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre. Seuls les groupes et sous-groupes de GO avec un ratio (FC) supérieur à 1,6 sont inclus dans la figure.

II.5.4.1.2. Surreprésentation des termes GO

Une analyse d'enrichissement des GO (« Term Enrichment ») a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Panther (<http://pantherdb.org/>). Cela a permis de tester statistiquement, en utilisant un test binomial (Cho et Campbell, 2000) et une correction de Bonferroni, les GO partagés entre tous les identifiants par rapport à une liste référence. L'analyse permet de déterminer si les pourcentages des catégories fonctionnelles d'annotations GO (**Tableau II.6**) sont significatifs. Un rapport d'enrichissement des GO (Fold Change : FC) est alors calculé par rapport à une référence (liste des protéines ME ou NE). L'analyse d'enrichissement avec GO-Slim permet alors de regrouper entre eux tous les GO appartenant à une même catégorie ou sous-catégorie fonctionnelle de niveau supérieur à 2. La **Fig II.12** montre la distribution des catégories ou sous-catégories fonctionnelles de GO, avec un FC supérieur à 1,6.

La catégorie fonctionnelle la plus représentée dans les ME correspond aux protéines impliquées dans la régulation biologique (« Biological regulation » (GO:0065007)) avec : « RNA metabolic process » (GO:0016070, FC : 15,47), « nucleobase-containing compound metabolic process » (GO:0006139, FC: 9,64), « translation » (GO:0006412, FC: 8,07), « phosphate-containing compound metabolic process » (GO:0006796, FC: 8,07) (**Fig II.12**). Les autres catégories fonctionnelles significatives des ME rassemblent des protéines impliquées dans le fonctionnement cellulaire avec : « vesicle-mediated transport » (GO:0016192, FC : 11,44), « cellular component biogenesis » (GO:0044085, FC: 5,05), « transport » (GO:0006810, FC: 4,57), « localization » (GO:0051179, 4,57) et « cellular process » (GO:0009987, FC: 1,69) (**Fig II.12**).

Pour les **NE** ce sont les métabolismes glucidiques et énergétiques qui prédominent avec comme sous-catégories fonctionnelles caractéristiques : « coenzyme metabolic process » (GO:0006732, FC : 8,92), « glycolysis » (GO:0006096, FC : 7,43), « generation of precursor metabolites and energy » (GO:0006091, FC : 3,57), « cellular amino acid metabolic process » (GO:0006520, FC : 2,68), et « carbohydrate metabolic process » (GO:0005975, FC : 2,51) (**Fig II.12**).

En résumé, les protéines présentes dans les **ME** régulent le métabolisme des nucléotides et le développement cellulaire, alors que dans les **NE**, c'est plutôt les métabolismes glucidiques et énergétiques qui sont sur-représentés.

II.5.4.2. Analyse des résultats de transcriptomique

II.5.4.2.1. Analyse fonctionnelle

Un total de 31 671 transcrits exprimés entre tous les génotypes (**ME** et **NE**) ont été alignés sur les 54 830 séquences du transcriptome de référence v1.0 du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>). Après analyse différentielle par comparaison de variances, 4472 et 5219 transcrits sont surexprimés respectivement dans les **ME** et les **NE** (**Fig II.13**), ce qui représente 30 % des transcrits alignés. La projection de l'ensemble des paramètres sur le plan formé par les composantes principales 1 et 3 (axe PC1 et axe PC3) est illustrée par la **Fig II.14 A**. Ces deux axes expliquent respectivement 68 % et 7 %, soit environ 80 % de la variabilité d'expression des transcrits. La projection sur le plan permet de séparer **ME** et **NE** sur l'axe PC1 indépendamment du génotype. Sur la totalité des gènes différentiellement exprimés, la représentation sous forme de HeatMap nous permet de distinguer 3 clusters correspondant aux 3 génotypes, et 2 clusters correspondants au type de matériel (**Fig II.14 B**). Des différences importantes existent entre **ME** et **NE** donc au niveau de leur transcriptome.

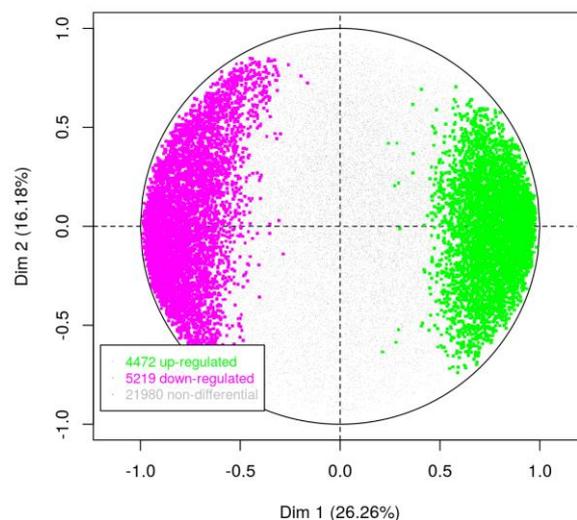


Figure II.13 Analyse en composante principale répartissant les 31 671 transcrits exprimés entre tous les génotypes des masses embryogènes (**ME**) et des cals non-embryogènes (**NE**) (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). En vert les transcrits surexprimés dans les **ME** (44 72), en rose les transcrits surexprimés dans les **NE** (5 219), et en gris les transcrits sans différence d'expression (21 980).

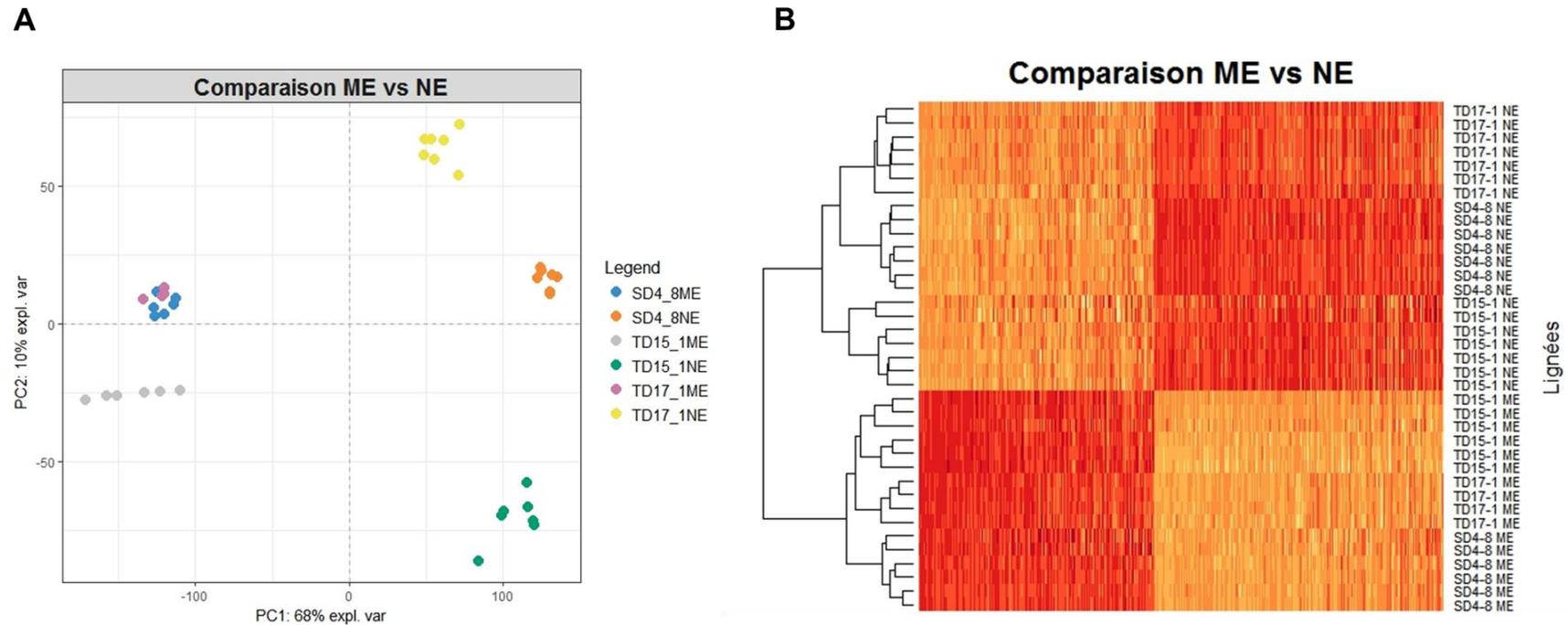


Figure II.14 Analyses des 9 691 transcrits différentiellement exprimés entre les **ME** et les **NE**. (A) Analyse en composantes principales en fonction du génotype (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), et du type de matériel (**ME** ou **NE**) ; (B) HeatMap représentant les changements dans les abondances des différents transcrits en fonction des génotypes et du type de matériel.

Tableau II.7 Répartition fonctionnelle (code GO de niveau 2 ou plus, catégorie fonctionnelle « Processus Biologiques ») des transcrits différentiellement exprimés entre **ME** et **NE** des 3 génotypes de Douglas étudiés (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). *Le tableau donne le nombre de hits (occurrence) impliqués dans chaque catégorie fonctionnelle. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de hits par groupe fonctionnel rapporté au nombre total de GO dans cette catégorie.*

Catégorie fonctionnelle	ME		NE	
	Nb hits	%	Nb hits	%
Biological regulation (GO:0065007)	93	3,5	158	6,8
<i>Regulation of biological process (GO:0050789)</i>	62	63,9	112	65,9
<i>Regulation of molecular function (GO:0065009)</i>	2	2,1	7	4,1
<i>Homeostatic process (GO:0042592)</i>	33	34,0	51	30,0
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	226	8,4	131	5,7
Cellular process (GO:0009987)	858	32,1	706	30,5
<i>Cellular component movement (GO:0006928)</i>	33	14,5	22	10,5
<i>Cell growth (GO:0016049)</i>	0	0,0	1	0,5
<i>Cytokinesis (GO:0000910)</i>	7	3,1	1	0,5
<i>Cell cycle (GO:0007049)</i>	119	52,4	78	37,3
<i>Chromosome segregation (GO:0007059)</i>	19	8,4	6	2,9
<i>Cell proliferation (GO:0008283)</i>	2	0,9	0	0,0
<i>Cell communication (GO:0007154)</i>	47	20,7	101	48,3
Developmental process (GO:0032502)	28	1,0	49	2,1
<i>Death (GO:0016265)</i>	15	60,0	24	63,2
<i>Cell differentiation (GO:0030154)</i>	4	16,0	5	13,2
<i>System development (GO:0048731)</i>	3	12,0	4	10,5
<i>Anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)</i>	3	12,0	4	10,5
Localization (GO:0051179)	283	10,6	210	9,1
<i>Protein localization (GO:0008104)</i>	28	8,9	27	11,6
<i>Transport (GO:0006810)</i>	275	87,6	202	87,1
<i>RNA localization (GO:0006403)</i>	11	3,5	3	1,3
Metabolic process (GO:0008152)	1030	38,5	854	36,9
<i>Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)</i>	184	9,3	164	11,2
<i>Biosynthetic process (GO:0009058)</i>	263	13,3	166	11,3
<i>Vitamin metabolic process (GO:0006766)</i>	11	0,6	13	0,9
<i>Primary metabolic process (GO:0044238)</i>	909	46,0	669	45,6
<i>Catabolic process (GO:0009056)</i>	171	8,7	143	9,7
<i>Sulfur compound metabolic process (GO:0006790)</i>	22	1,1	29	2,0
<i>Coenzyme metabolic process (GO:0006732)</i>	15	0,8	20	1,4
<i>Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>	335	17,0	189	12,9
<i>Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)</i>	49	2,5	46	3,1
<i>Secondary metabolic process (GO:0019748)</i>	15	0,8	28	1,9
Reproduction (GO:0000003)	9	0,3	1	0,0
Response to stimulus (GO:0050896)	142	5,3	193	8,3
<i>Response to toxic substance (GO:0009636)</i>	2	1,5	13	7,3
<i>Response to stress (GO:0006950)</i>	82	63,1	87	48,9
<i>Response to pheromone (GO:0019236)</i>	1	0,8	0	0,0
<i>Response to external stimulus (GO:0009605)</i>	2	1,5	10	5,6
<i>Response to abiotic stimulus (GO:0009628)</i>	8	6,2	12	6,7
<i>Cellular defense response (GO:0006968)</i>	3	2,3	1	0,6
<i>Defense response to bacterium (GO:0042742)</i>	26	20,0	35	19,7
<i>Immune response (GO:0006955)</i>	1	0,8	0	0,0
<i>Response to endogenous stimulus (GO:0009719)</i>	5	3,8	20	11,2
Multicellular organismal process (GO:0032501)	4	0,1	13	0,6

Les transcrits ont ensuite été annotés fonctionnellement grâce au consortium Gene Ontology (code GO, <http://www.geneontology.org/>), à partir des bases de données des codes GO du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>) et d'*Arabidopsis* (<https://www.arabidopsis.org/>, TAIR). Sur les 4 472 transcrits surexprimés dans les **ME**, 2 679 identifiants possèdent des GO, pour un total de 2 675 codes GO présent dans la catégorie processus biologique (1 907 GO dans la catégorie fonctions moléculaires et 1 447 dans composants cellulaires) (**Tableau II.7**). Dans le cas des 5 219 transcrits surexprimés dans les **NE**, 2621 possèdent des GO pour un total de 2315 présents dans la catégorie processus biologique (1 519 GO dans la catégorie fonctions moléculaires et 1 044 dans composants cellulaires) (**Tableau II.7**). Quel que soit le type de matériel, les identifiants sont regroupés dans les 9 grandes catégories fonctionnelles de cette catégorie, à l'exception de 2 identifiants qui appartiennent aux catégories fonctionnelles « Biological adhesion » (GO:0022610) et « Immune system process » (GO:0002376).

Les trois catégories fonctionnelles les plus représentées sont respectivement « Metabolic process » (GO:0008152) avec plus de 36 %, « Cellular process » (GO:0009987) avec plus de 30 %, et « Localization » (GO:0051179) avec environ 10 % des GO quel que soit le type de matériel (**Tableau II.7**). Au sein de chacune de ces catégories deux sous-catégories, « Primary metabolic process » (GO:0044238) et « Transport » (GO:0006810), ne possèdent pas de différence par rapport au type de matériel, alors qu'ils représentent à eux seuls la majorité des GO de la catégorie avec respectivement plus de 45 et 87 % des GO (**Tableau II.7**). Les différences entre les type de matériel **ME** et **NE** sont principalement retrouvées au sein des catégories fonctionnelles « Cellular component organization or biogenesis » (GO:0071840, 8,4 % contre 5,7 %), « Biological regulation » (GO:0065007, 3,5 % contre 6,8 %) et « Response to stimulus » (GO:0050896, 5,3 % contre 8,3 %) (**Tableau II.7**).

II.5.4.2.2. Surreprésentation des termes GO

Les variations dans la classification des catégories fonctionnelles (à un niveau 2) entre **ME** et **NE** ne s'observent que pour un nombre limité de GO, conduisant à une analyse statistique d'enrichissement en GO de nos transcrits (GO-Slim). La **Fig II.15** montre la distribution des catégories fonctionnelles de niveau supérieur à 2 de cette catégorie ayant un FC supérieur à 1,3.

La sous-catégorie la plus représentée dans les **ME** correspond à « Oxidative phosphorylation » impliquée dans la respiration cellulaire (GO:0006119, FC = 9,78). Ensuite se sont les sous-catégories impliquées dans le support et l'organisation de l'information génétique : « DNA recombination » (GO:0006310, FC=7,83), « RNA splicing » (GO:0000375, FC = 6,60 ; GO:0000398, FC =3,42), « DNA replication » (GO:0006260, F =4,85), « Translation » (GO:0006412, FC = 4,85), « DNA repair » (GO:0006281, FC= 4,46), « mRNA processing » (GO:0006397, FC = 3,20) (**Fig II.15**). Mais des sous-catégories du métabolisme primaire (GO :0044238) sont aussi retrouvées en relation avec le métabolisme de l'ADN, ARN et des protéines : « DNA metabolic process » (GO:0006259, FC = 3,69 ; GO:0006139, FC = 1,99), « RNA metabolic process » (GO:0016072, FC = 2,75 ; GO:0006399, FC = 2,22 ; GO:0016070, FC = 1,90) et « protein metabolic process » (GO:0015031, FC = 1,91) (**Fig II.15**). Le trafic intracellulaire et extracellulaire (« Localization » GO:0051179) est aussi surexprimé : « RNA localization » (GO:0006403, FC = 3,59), « nuclear transport » (GO:0051169, FC = 3,42), et

« protein transport » (GO:0006886, FC = 1,90) (**Fig II.15**). Les **ME** sont aussi marquées par la sous-catégorie des processus cellulaires (« Cellular process » GO:0008152) : « reproduction » (GO:0000003, FC = 8,81), « cytokinesis » (GO:0000910, FC = 6,85), « meiosis » (GO:0007126, FC = 3,59), « chromosome segregation » qui implique leur condensation mais aussi leur séparation (GO:0007059, FC = 3,10), « mitosis » (GO:0007067, FC = 1,88) et « cellular cycle » dans une moindre mesure (GO:0007049, FC = 1,49) (**Fig II.15**). Pour finir, la dernière catégorie fonctionnelle représentée est « Cellular component organization or biogenesis » (GO:0071840, FC = 1,69) : « cellular component biogenesis » (GO:0044085, FC = 2,98) et « organelle organization » (GO:0006996, FC = 1,77) (**Fig II.15**).

Les catégories fonctionnelles marqueurs des gènes différentiellement exprimés dans les **NE** sont « extracellular transport » (GO:0006858, FC = 8,18), la réponse aux stimuli (GO:0009636, GO:0009605, GO:000971), le cycle cellulaire au niveau de « intracellular signal transduction » (GO:0035556, FC = 2,22 ; GO:0007165, FC = 2,07) et « cell communication » (GO:0007154, FC = 2,20) (**Fig II.15**).

II.5.4.2.3. Découverte de certains transcrits

Parmi les 9 691 transcrits retrouvés différentiellement surexprimés dans les **ME** et les **NE**, certains se démarquent par leur ratio et leur occurrence.

Dans les **ME**, trente-deux transcrits de la famille « Cytochrome P450 », vingt et un « O-acyltransférase WSD1 », dix-neuf « ABC transporter », treize « homeobox-leucine zipper protein », douze « embryonic protein DC-8 », dix « Nuclear transcription Factor Y » de la famille des « LEC1 », cinq « APETALA 2 (AP2) » de type « BBM (BABYBOOM) », et trois facteurs de transcription de la famille « Wuschel-related homeobox » (2, 9 et 8).

Parmi les 5219 transcrits des **NE** ce ne sont pas moins de dix-neuf « dihydroflavonol-4-reductase », douze « bidirectional sugar transporter SWEET », douze « 2-oxoacid-dependent dioxygenase », neuf « Flavonol synthase », cinq facteurs de transcription « Scarecrow-like », et trois « bifunctional dihydroflavonol 4-reductase/flavanone 4-reductase ».

En conclusion, l'analyse différentielle des transcrits entre **ME** et **NE** et l'enrichissement en GO permettent de constater que dans les **ME**, les catégories fonctionnelles surexprimées sont en lien avec l'information génétique et les processus cellulaires, tandis que les **NE** sont caractérisés par la réponse au stress, la communication cellulaire et le transport extra cellulaire. Au-delà des gènes impliqués dans le métabolisme général, plusieurs facteurs de transcription différents ont été isolés dans les **ME** et les **NE**.



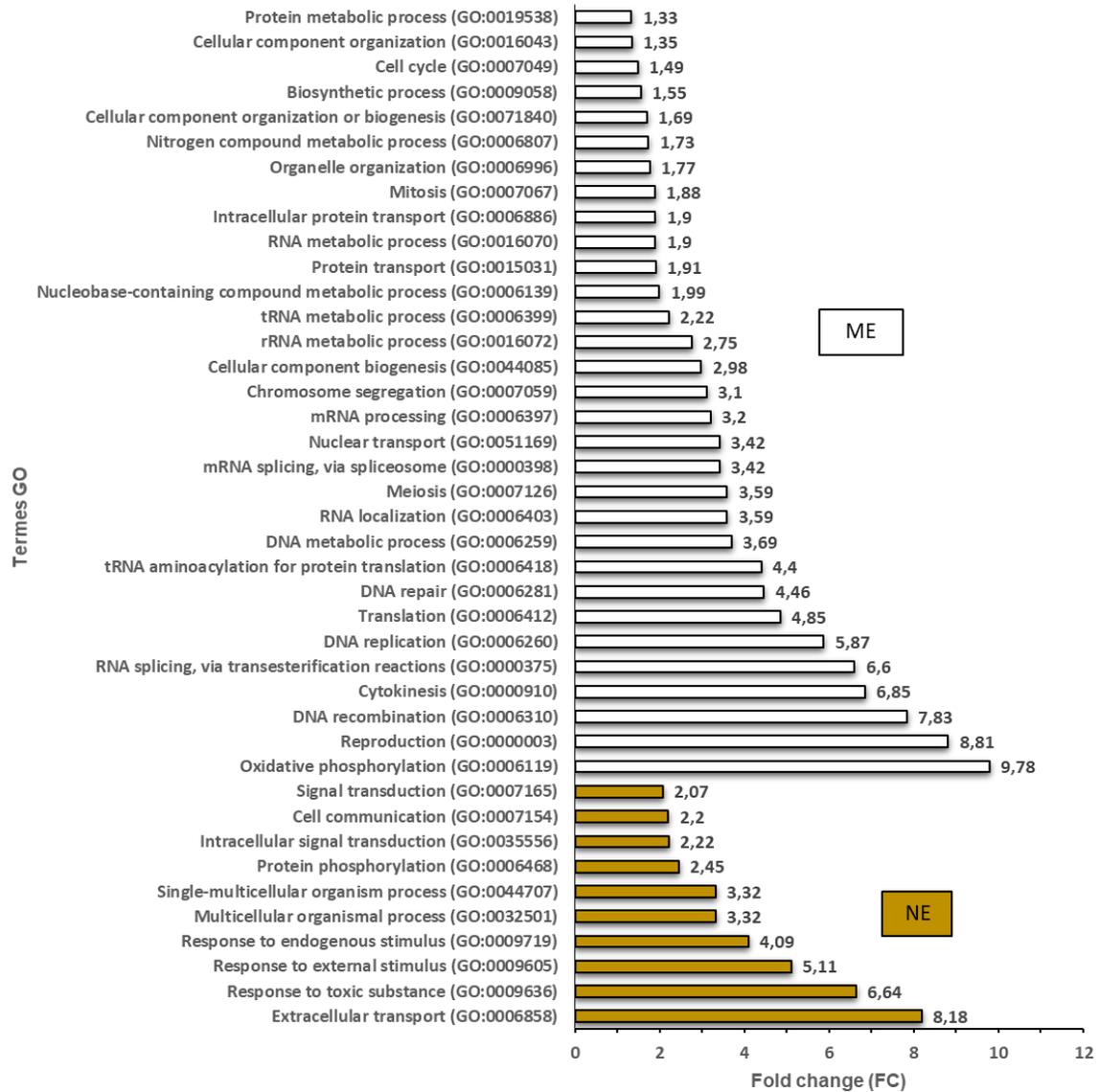


Figure II.15 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus qui sont associées aux transcrits retrouvées enrichies significativement dans les trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) **ME** ou les trois **NE** correspondants de Douglas. Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini et Hochberg 1995). Le fold change correspond au ratio du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre. Seuls les groupes et sous-groupes de GO avec un ratio (FC) supérieur à 1,3 sont inclus dans la figure.



II.5.4.3. Analyse des accessions conjuguées des données de protéomique et de transcriptomique

II.5.4.3.1. Analyse fonctionnelle

Afin d'identifier les catégories fonctionnelles nécessaires à la formation des **ME**, une analyse de la représentativité des identifiants protéiques et nucléiques communs aux 3 génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) **ME** et **NE** a été réalisée (**Fig II.16**). Cela représente 163 identifiants communs différentiellement exprimés pour les **ME**, et 130 pour les **NE** (**Annexe 4**). Une nouvelle annotation fonctionnelle (suivant la même procédure décrite précédemment) a permis de les classer dans les trois catégories de niveau 1 : processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires (**Fig II.16**). La catégorie où des différences sont le plus observées entre **ME** et **NE**, est la catégorie fonction moléculaire, regroupant 141 GO, au sein de laquelle seule la catégorie fonctionnelle « Catalytic activity » (GO:0003824) caractérise les **NE** (**Fig II.16**). Alors que ce sont les catégories fonctionnelles « Translation regulator activity » (GO:0045182), « Binding » (GO:0005488), « Structural molecule activity » (GO:0005198) et « Transporter activity » (GO:0005215) pourraient être des marqueurs des **ME** (**Fig II.16**). Dans la catégorie composants cellulaires regroupant 106 GO, seule la **ME** possède des identifiants dans la catégorie fonctionnelle « Extracellular region » (GO:0005576). La dernière catégorie, processus biologiques, regroupe pas moins de 184 GO dans nos identifiants, et les catégories fonctionnelles les plus représentées sont « Metabolic process » (GO:0008152, 41,3 % dans les **ME** et 50,5 % dans les **NE**) et « cellular process (GO:0009987, 32,6 % dans les **ME** et 24,2 % dans les **NE**) (**Fig II.16**). Les **ME** sont aussi caractérisées par les catégories fonctionnelles « Localization » (GO:0051179) et « Cellular component organization or biogenesis » (GO:0071840), et les **NE** principalement par « Response to stimulus » (GO:0050896) et « Biological regulation » (GO:0065007) (**Fig II.16**).

II.5.4.3.2. Surreprésentation des termes GO

L'enrichissement fonctionnel en GO de ces identifiants communs montre que statistiquement peu de catégories fonctionnelles sont modifiées dans les **NE** par rapport au **ME**. Les plus représentées de la catégorie de niveau 1 fonctions moléculaires dans les **ME** sont en rapport avec la catégorie fonctionnelle « binding (GO:0005488, FC = 2,90) : « nucleic acid binding » (GO:0003676, FC = 10,88), « RNA binding » (GO:0003723, FC = 6,53) et « protein binding » (GO:0005515, FC = 2,54). Nous retrouvons aussi les activités de transports cellulaires, transmembrane transporter activity » (GO:0022857, FC = 7,25) et « transporter activity » (GO:0005215, FC = 3,14), mais aussi « translation regulator activity » (GO:0045182, FC = 5,08) et « structural molecule activity » (GO:0005198, FC = 3,14) (**Fig II.17 B**). La seule catégorie marquant le caractère **NE** est « oxidoreductase activity » (GO:0016491, FC = 2,45) (**Fig II.17 B**).

Au sein de la catégorie processus biologiques, les catégories fonctionnelles impliquées dans les **ME** appartiennent au processus du métabolisme : « phosphate-containing compound metabolic process » (GO:0006796, FC = 13,78) et « nucleobase-containing compound metabolic process » (GO:0006139, FC = 11,25) ; aux régulations biologiques : « translation »

(GO:0006412, FC = 5,80), « catabolic process » (GO:0009056, FC = 2,54) ; au transport : « transport » (GO:0006810, FC =4,59), « protein transport » (GO:0015031, FC = 3,39) et « intracellular protein transport » (GO:0006886, FC = 3,39) ; et au processus cellulaire (GO:0006886, FC = 1,81) (**Fig II.17 A**). Pour les **NE**, la catégorie fonctionnelle surreprésentée est le processus métabolique des composés sulfurés (GO:0006790, FC = 4,82) (**Fig II.17 A**).

En résumé, l'analyse des identifiants communs en protéomique et transcriptomique nous montre que les **ME** sont marqué par des gènes/protéines qui régulent le métabolisme des nucléotides, l'information génétique, le transport et le cycle cellulaire, alors que c'est seulement le métabolisme secondaire qui est surreprésenté chez les **NE**.

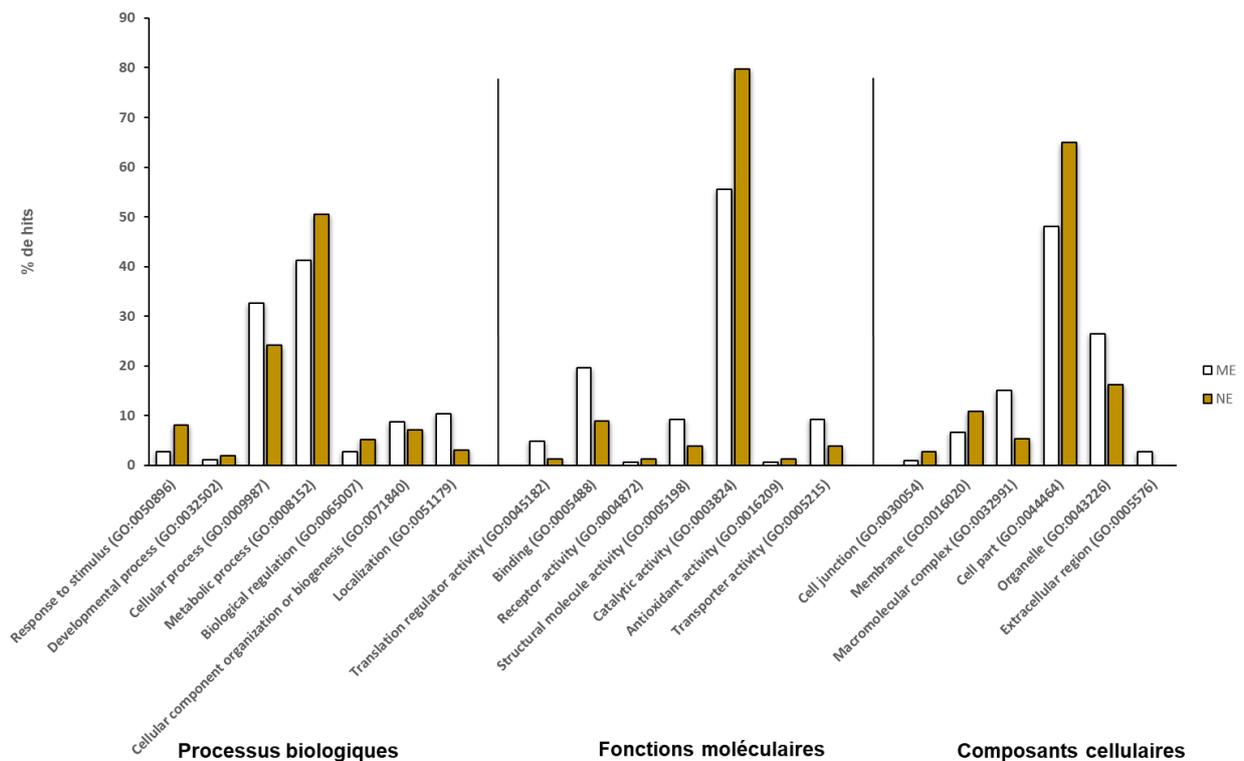
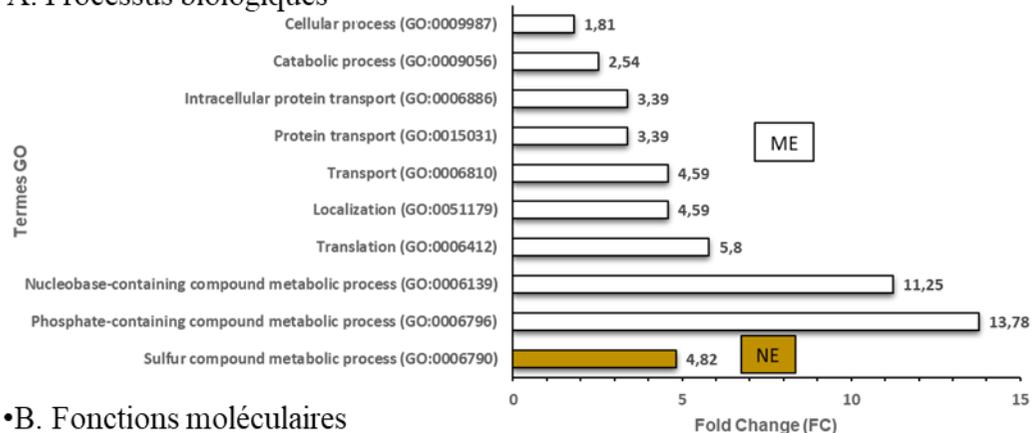
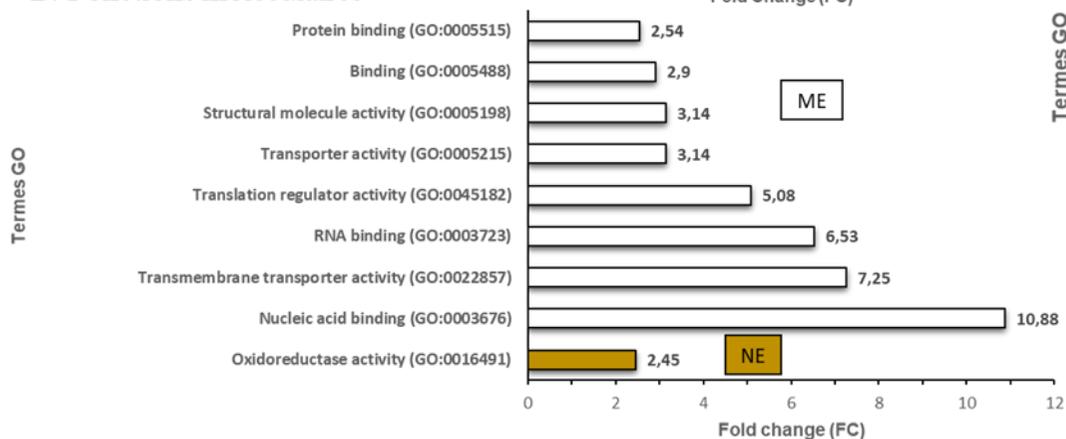


Figure II.16 Analyses fonctionnelle des GO identifiés (à un niveau 2) appartenant aux identifiants communs (protéines et transcrits) différentiellement exprimés dans les masses embryogènes (**ME**) et cals non-embryogènes (**NE**) correspondant aux 3 génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Les différentes catégories fonctionnelles de GO sont classées dans 3 catégories : processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires. Le pourcentage de hits est calculé en fonction du nombre de hits (occurrence) dans chaque catégorie GO par rapport au nombre de hits totaux dans chaque catégorie, et pour chaque type de matériel.

•A. Processus biologiques



•B. Fonctions moléculaires



•C. Composants cellulaires

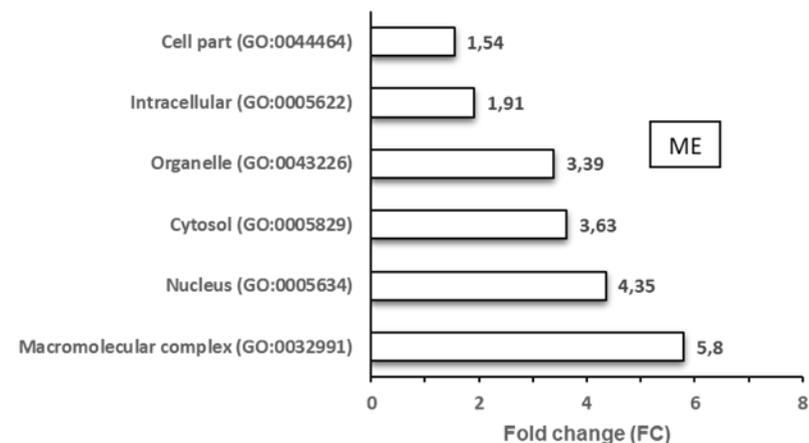


Figure II.17 Termes GO (Gene Ontology, de niveau 2 et plus) pour les trois catégories : processus biologiques (A), fonctions moléculaires (B) et composants cellulaires (C), qui sont associés aux identifiants communs des protéines et transcrits retrouvés enrichis significativement dans les masses embryogène (ME) ou les cals non-embryogène (NE) correspondants aux 3 génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini et Hochberg 1995). Le fold change correspond à la différence du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre.



II.6. Discussion

Nous avons comparé à différents niveaux d'observation, des **ME** et des **NE** de trois génotypes non apparentés de Douglas avec des potentiels embryogènes différents afin de caractériser et d'essayer de comprendre le déterminisme de l'aptitude à l'embryogenèse chez cette espèce.

Même si notre système d'étude compare 2 types de matériel totalement opposés, avec d'un côté des **ME** composé d'ES immatures avec des processus de différenciation, et de l'autre des **NE** qui sont composés de cellules simples en prolifération sans différenciation, il pourrait permettre à terme de trouver les marqueurs précoces de cette aptitude à l'embryogenèse. Pour chacun des types de matériel une caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse a été complétée par des observations morpho-histologiques (macroscopie, histologie, cytologie), puis biochimiques (teneur en eau, teneur en glucides solubles endogènes, protéines totales et régulateurs de croissance) et moléculaires (protéome et transcriptome). Ces deux types de matériel (**ME**, **NE**) ont été strictement cultivés dans les mêmes conditions environnementales et de milieu de culture (multiplication). Il est à souligner que si le milieu de multiplication est optimisé pour la multiplication des **ME** de Douglas (Reeves *et al.*, in press ; Lelu-Walter *et al.*, in press), a priori il ne l'est pas pour les **NE**. Enfin, toutes les analyses ont été faites à partir d'échantillons prélevés après deux semaines de multiplication sur filtre. Dans chaque boîte de Petri, le matériel obtenu a permis de faire l'échantillonnage pour l'analyse des sucres, des protéines totales, des régulateurs de croissance, du protéome et du transcriptome.

II.6.1. Quels sont les caractéristiques biologiques liées à l'aptitude à l'embryogenèse ?

Les premières observations morphologiques (**Fig II.4**) et cytologiques (**Fig II.5, 6 et 7**) montrent que les **ME** en multiplication sont comme pour les autres conifères, des amas blancs, composés d'embryons à un stade précoce de l'embryogenèse (Durzan et Gupta, 1987 ; von Aderkas *et al.*, 1991) et remplies d'eau (Jourdain *et al.*, 1997). L'ES immature est alors une structure bipolaire composée d'une tête méristématique et de longues cellules de suspenseur. Certains auteurs suggèrent que la polarité de l'axe embryonnaire est sous la dépendance de mécanismes impliquant des flux de nutriments et des gradients d'auxine médiés par les cellules du suspenseur (Yeung et Meinke, 1993 ; Friml *et al.*, 2003 ; Bozhkov *et al.*, 2005 ; Lopez-Fernandez et Maldonado, 2013). Les marquages à l'iodure de propidium mettent en évidence que la partie distale du suspenseur est constituée de cellules mortes (**Fig II.7 A2**). Des résultats similaires au niveau de la viabilité du suspenseur ont déjà été observés chez les gymnospermes comme par exemple chez le pin maritime (Morel *et al.*, 2014a). Au cours de l'embryogenèse zygotique, plusieurs auteurs décrivent des processus de PCD au niveau de la partie distale du suspenseur avec entre-autre l'activation de métacaspase *mcII-pa* (Suarez *et al.*, 2004 ; Bozhkov *et al.*, 2005). Ce mécanisme de PCD des cellules du suspenseur a été décrit comme indispensable dans le bon développement des ES d'épicéa. En effet le RNAi sur la *mcII-Pa* inhibe l'embryogenèse précoce (Suarez *et al.*, 2004). De ce fait la PCD du suspenseur est alors indispensable à la maturation des ES (Filinova *et al.*, 2000 ; Bozhkov *et al.*, 2005). La double coloration au bleu alcian et nuclear fast red montre que la tête méristématique présente une activité mitotique intense (**Fig II.7 A1**). La présence de grains d'amidon est visible (**Fig II.5**

A2 et B2) au niveau de l'interface tête/suspenseur pour deux des trois génotypes (TD15-1 et SD4-8), phénomène déjà observé par Breton *et al.* (2005) chez des **ME** de *P. pinaster*. Cette distribution spécifique des grains d'amidon pourrait être la conséquence de la polarisation par l'auxine de l'axe embryonnaire ce qui conférerait plutôt à ces grains d'amidon des fonctions de statolites plus que d'organites énergétiques. Les observations cytologiques montrent la présence d'une différence de taille des ES avec des embryons 2 fois plus grands pour les génotypes TD15-1 et TD17-1 que pour SD4-8.

Contrairement aux **ME**, les **NE** sont des masses granuleuses de couleur orange/marron (**Fig II.4**) qui ont déjà été décrites. Pour le Douglas, comme les autres conifères, les cellules des **NE** sont des cellules rondes, riches en amidon, sans organisation particulière (Jourdain *et al.*, 1997 ; Zhao *et al.*, 2015a ; Klubicová *et al.*, 2017) (**Fig II.5**). En s'intéressant à la composition des **NE**, nous avons vu qu'ils possèdent tous de nombreux grains d'amidon dans leurs cellules en comparaison avec les **ME**. Cette différence pourrait se traduire par une activation du métabolisme des sucres et du stockage dans les **NE** plus fort que dans les **ME**, ou bien la conséquence d'une inactivation des mécanismes d'utilisation de l'amidon. Ces **NE** sont orange/marron, et la coloration par l'Azur II semble suggérer la présence de composés polyphénoliques dans ses cellules. La couleur et l'aspect des cellules **NE** chez le Douglas se retrouvent pour les **NE** d'autres espèces (Jourdain *et al.*, 1997 ; Zhao *et al.*, 2015a). Les **NE** présentent un taux de croissance bien plus faible (données non montrées) que les **ME** qui peut être relié avec le rôle potentiel décrit des composés phénoliques dans la croissance cellulaire (Jourdain *et al.*, 1997), mais aussi par le fait que le milieu n'est pas optimisé pour leur multiplication.

Les trois lignées embryogènes ont été caractérisées par leur potentiel à produire des embryons somatiques cotylédonaire (**Tableau II.2**). Ainsi le génotype SD4-8 présente le potentiel embryogène le plus élevé (3548 ES g⁻¹ MF), TD17-1 le plus faible (238,4ES g⁻¹ MF) en passant par TD15-1 (815,1ES g⁻¹ MF). Notre étude montre donc que le potentiel embryogène varie entre les génotypes avec un facteur d'environ 15. Cette différence visible entre TD15-1, SD4-8 et TD17-1 pourrait être attribué à un effet génétique. En effet chez les conifères des différences génotypiques ont déjà été observées, notamment chez le Douglas (Lelu-Walter *et al.*, in press), mettant en avant de grosses différences entre nos 3 lignées non apparentées. Chez le Douglas, le potentiel embryogène peut atteindre plus de 2000 ES g⁻¹ MF (Lelu-Walter *et al.*, in press), comme dans notre étude pour la lignée SD4-8 avec ses 3500 ES g⁻¹ MF. SD4-8 possède le potentiel embryogène le plus fort en comparaison avec TD17-1 et TD15-1. La taille des embryons semble jouer un rôle, car SD4-8 est la seule lignée possédant de nombreux petits embryons à l'inverse de TD15-1 et TD17-1 qui possèdent de gros centres polyembryogéniques.

La mesure du potentiel embryogène des **NE** nous montre bien l'absence de toute production d'embryons (**Tableau II.2**). Ces résultats affirment que nous travaillons bien sur du matériel **NE**, permettant la caractérisation de l'aptitude à l'embryogénèse.

En conclusion, les différences morpho-histologiques entre **ME** et **NE** sont significatives (présence d'embryons, de cellules indifférenciées, imprégnation de composés phénoliques et distribution de l'amidon) et permettent de caractériser les deux types de matériel à cette échelle.



II.6.2. Relation entre marqueurs biochimiques et aptitude à l'embryogenèse

Après avoir caractérisé les **ME** des **NE** au niveau biologique et cellulaire, nous avons cherché à identifier des marqueurs biochimiques (en glucides solubles, en amidon, et en protéines totales) susceptibles de discriminer les deux types de matériels.

II.6.2.1. Sucres solubles, amidon et protéines totales

II.6.2.1.1. Teneur en sucres solubles

En comparaison avec les **NE**, les **ME** sont caractérisées par un fort ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] (entre 4,33 et 16,70) et une faible teneur en amidon (**Tableau II.4**). Le ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] permet d'analyser l'activité d'hydrolyse du saccharose en Glc et Fru, et ainsi constater le statut énergétique d'une cellule. S'il est fort, cela explique une forte teneur en Glc et ou Fru par rapport au saccharose, montrant l'implication d'invertases impliquées probablement dans une forte production d'énergie. La répartition entre Glc, Fru et Saccharose est classiquement présentée comme un régulateur des processus de stockage de carbone sous forme d'amidon *versus* les processus énergétiques. Le ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] de notre étude peut être rapproché du ratio hexose/saccharose décrit par Taber *et al.*, (1998) lors de la multiplication de Douglas. En effet une augmentation de ce ratio durant la multiplication des **ME** a été décrite pour d'autres conifères (Lipavská et Konrádová, 2004 ; Navarro *et al.*, 2017). Ce fort ratio est donc cohérent avec les nombreuses divisions cellulaires visibles en cytologie dans les **ME**. La permutation des processus de stockage vers les processus énergétiques semblerait conditionner le maintien des **ME** en multiplication. Cependant les très fortes teneurs en Glc mesurées dans notre système d'étude peuvent trouver une explication au travers de la source de carbone apportée au milieu de multiplication des **ME** et des **NE**, le maltose qui est un dimère de Glc.

Les teneurs des autres sucres solubles, comme le raffinose, généralement non détecté à ce stade (Navarro *et al.*, 2017), et le Gal sont variables entre les génotypes. Si le mélibiose et le Gal (impliqués dans les processus d'embryogenèse somatique ; van Hengel *et al.*, 2002) ne sont présents que dans les **ME**, le raffinose se retrouve dans les **ME** et les **NE** dans les mêmes proportions. Il se pourrait que le Douglas utilise, en plus du saccharose, des oligosaccharides galactosylés comme source de transport du carbone dans le futur embryon.

II.6.2.1.2. Teneur en amidon

Dans les **NE** en multiplication, la teneur en amidon est toujours plus forte que celle des **ME**. Ces résultats sont confortés par des observations cytologiques montrant de nombreux grains d'amidon dans les **NE**. Les **NE** semblent plus associés à des processus de stockage des réserves qu'à des processus de développement.



II.6.2.1.3. Marqueurs moléculaires

Le rapprochement des données de sucres solubles et des données d'expression des gènes permettent d'observer une surexpression des transcrits et des protéines impliqués dans la biosynthèse et la régulation des glucides.

Pour ce qui est des **ME**, seule l'énolase (GO:0006096, FC = 1.3), impliquée dans la transformation du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate, est surexprimée suggérant une activation de la glycolyse qui pourrait être en rapport avec le ratio [(Glc+Fru)/Saccharose]. Cependant nos résultats sont à pondérer. En effet **ME** comme **NE**, surexprime plusieurs gènes de la voie de la glycolyse : phosphoglycérate kinase, et de la pyruvate kinase. De plus nos analyses montrent une forte surexpression de l'alcool déshydrogénase (ADH) dans les deux tissus. Cette enzyme de la glycolyse joue un rôle dans la fermentation alcoolique. Il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* (Mithran *et al.*, 2014) et *Pinus pinaster* (Morel *et al.*, 2014a) que les conditions défavorables de maturation des ES modulent l'expression de cette enzyme.

Nous avons observé une surexpression des transcrits et des protéines impliqués dans la biosynthèse de l'amidon au niveau des **NE** avec la phosphoglucomutase (GO:0005975, FC = 2,58), et la alpha-1,4 glucan phosphorylase (GO:0005975, FC = 2,25).

En résumé, de nombreuses différences sont présentes au niveau des teneurs en sucres solubles et en amidon dans les 3 génotypes de Douglas d'un même type de matériel (**ME** ou **NE**). Néanmoins, les **ME** semblent être caractérisées par une teneur en sucre soluble plus forte, impactée par une forte teneur en Glc. Alors que les **NE** sont eux caractérisés par de forte teneur en amidon.

II.6.3. Existe-t-il des régulateurs de croissance caractéristiques de l'aptitude à l'embryogenèse ?

Parmi les régulateurs de croissance présents chez les plantes, seules 3 hormones et leurs isoformes ont été suivis dans les **ME** et les **NE**. Le choix des auxines et des cytokinines est directement corrélé avec la phase de multiplication des **ME** et **NE** et connues pour contrôler la multiplication et la différenciation des cellules. La 3^{ème} hormone, l'ABA a été étudiée étant donné son implication dans la différenciation et la maturation des embryons.

II.6.3.1. Auxines

Dans notre étude, les **ME** présentent une teneur plus élevée en AIA que les **NE**. Chez l'*Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1993) et chez le mélèze hybride (Jourdain *et al.*, 1997) les auteurs ont montré des différences significatives pour l'AIA entre **ME** et **NE** à l'instar de notre étude. La question du rôle de l'AIA dans le maintien des cellules en multiplication semble expliquer les résultats observés par Jourdain *et al.* (1997) et Etienne *et al.* (1993). Ici l'AIA pourrait jouer un rôle dans la différenciation des ES. La surexpression dans les **ME** de facteurs de transcription de la famille *Wuschel-related homeobox* (*WOX 11* et *WOX 9*) semble appuyer notre hypothèse. En effet nous avons aussi identifié dans les **ME** un récepteur à l'auxine (Transport Inhibitor Response 1 (TIR1), GO:0005515, FC = 1,5) connu pour être impliqué dans le gravitropisme des racines. Dans cette situation les facteurs de transcription *WOX* participeraient au

déterminisme précoce du développement des embryons à l'instar de ce qui a été décrit au cours de l'embryogenèse zygotique (Laux *et al.*, 1996 ; Mayer *et al.*, 1998 ; Brand *et al.*, 2002 ; Haecker *et al.*, 2004) et plus récemment pour l'embryogenèse somatique des conifères (Palovaraa *et al.*, 2010, Vestman *et al.*, 2011 ; Trontin *et al.*, 2016a). L'identification de gènes de la famille *PIN-like* connu pour être des transporteurs de l'AIA au cours de la polarisation des ES (Gälweiler *et al.*, 1998 ; Hadfi *et al.*, 1998 ; Steinmann *et al.*, 1999 ; Friml *et al.*, 2002) aurait pu confirmer notre hypothèse.

II.6.3.2. Cytokinines

Les CKs étudiées ici appartiennent à deux sous familles, les CKs isoprénoïdes et les aromatiques. Quel que soit le type de matériel (**ME** et **NE**) nous avons dosé 500 fois plus de CKs aromatiques que d'isoprénoïdes. La présence de BAP dans le milieu de culture explique, semble-t-il, les teneurs élevées (plus de 3 600 pmol. g⁻¹ MS) de CKs aromatiques dans les deux types de matériel. Cependant à l'exception du génotype TD17-1, une différence importante de la teneur en CKs aromatiques entre **ME** et **NE** a été mesurée à l'instar de ce qui a été trouvé chez le mélèze (Jourdain *et al.*, 1997). Ces différences peuvent s'expliquer soit par un prélèvement plus important de BAP du milieu de culture par les **NE**, soit par une moindre utilisation de la BAP par les **NE**.

Si les CKs isoprénoïdes sont moins abondantes que les aromatiques, des différences de teneur des formes actives ont été identifiées entre **ME** et **NE**. Chez le mélèze hybride (Jourdain *et al.*, 1997) des différences ont été rapportées entre **ME** et **NE** pour 3 formes actives de CKs isoprénoïdes : isopentenyladenine (iP), isopentenyladenosine (iPR), *cis/trans*-zéatine (Z). Pour notre modèle, Z et DHZ n'ont pas été détectées ; pour l'iP, l'iPR, et la *cis*-ZR il semble difficile d'identifier des différences entre **ME** et **NE** quel que soit le génotype. Parmi les gènes différentiellement exprimés nous avons identifié une adénosine kinase surexprimées dans les **ME**, qui est responsable de la phosphorylation des CKs ribosides. La surexpression de l'adénosine kinase (FC = 2,03) pourrait expliquer la présence dans les **ME** de teneurs plus importantes de *c*-ZR-ph et dans une moindre mesure d'iPR-ph. Plus étonnant encore, nous identifions des formes monophosphates de CKs isoprénoïdes dont l'aglycone est initialement indétectable (DHZR). A l'inverse, les **NE** sont caractérisés par une teneur plus importante des CKs inactives avec des formes réversibles (CK *O*-glucoside et riboside-*O*-glucoside) et irréversibles (7/9-*N*-glucosides). De plus, les *c/t*-Z7G ne sont présentes que dans les **NE**. Les formes actives ont été montrées comme promouvant l'embryogenèse zygotique chez *Pisum sativum* (Quesnelle et Emery, 2007), laissant penser que les formes inactives ne seraient pas en adéquation avec l'embryogenèse somatique. Plusieurs enzymes du métabolisme des CKs isoprénoïdes ont été identifiées. Parmi celles-ci 4 identifiants codants des zeatin *O*-glucosyltransferase-like (FC = 8,99) responsable de la *O*-glucosylation des formes actives des CKs, ainsi que des 6 identifiants codants des cytokinin dehydrogenase (FC = 8,7) permettant la dégradation des CKs sont surexprimés dans les **NE**. L'activité de ces enzymes explique en partie les plus grandes proportions des isoformes CKs isoprénoïdes inactives. Une synthèse de ces résultats est résumée dans la **Fig II.18**.

En conclusion, notre travail bien qu'ouvrant de nouvelles perspectives autour de de la famille des CKs, nécessite de nouvelles recherches, à la fois sur le métabolisme des CKs aromatiques et isoprénoïdes, afin de mieux comprendre les gènes et protéines potentiellement impliqués dans la régulation de ces hormones au cours de l'embryogenèse somatique.

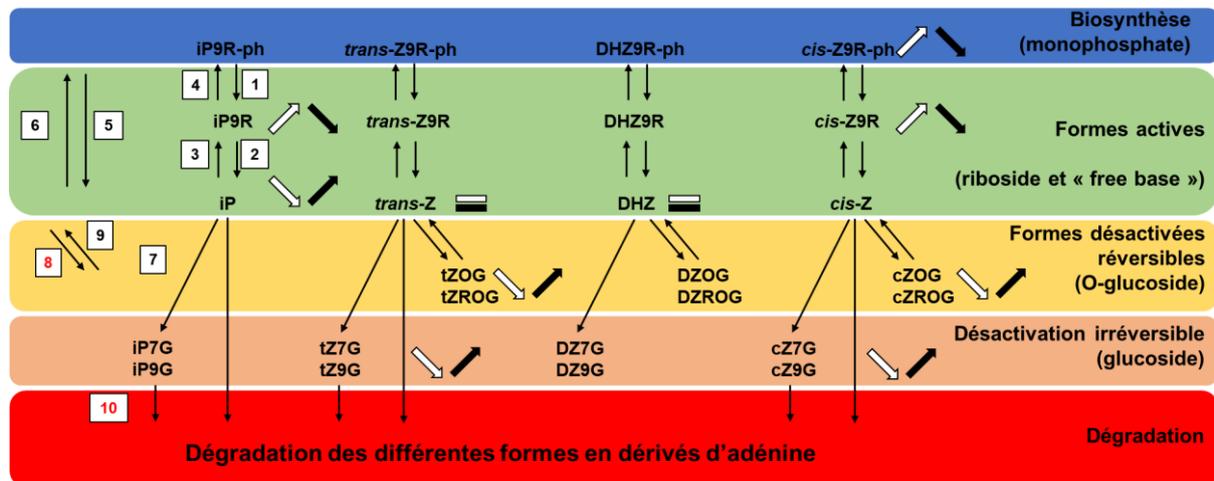


Figure II.18 Schéma de la voie de biosynthèse des différentes cytokinines isoprénoïdes retrouvées dans nos masses embryogènes (ME) et cals non-embryogènes (NE) de Douglas (iP : isopentenyladenine, Z (cis et trans) : zéatine, DHZ : dihydrozéatine), les formes actives, désactivées réversibles, désactivées irréversible, jusqu'à leur dégradation. Les enzymes impliquées dans la conversion des différentes formes sont indiquées par des numéros. 1: 5'-ribonucléotide phosphohydrolase ; 2: adénosine nucléosidase ; 3: purine nucléoside phosphorylase ; 4: adénosine kinase ; 5: CK phosphoribohydrolase ; 6: adénine phosphoribosyltransférase ; 7 : N-glucosyltransférase ; 8: zéatine-O-glucosyltransférase ; 9 :beta-glucosidase ; 10: Cytokinine déhydrogenase ; iP-ph : N⁶-isopentenyladenosine-5'-monophosphate ; iPR : N⁶-isopentenyladenosine ; iP7/9G : N⁶-isopentenyladenosine-7/9-glucoside ; et les équivalents pour tZ, DHZ et cZ ; tZOG : trans-zéatine-O-glucoside ; tZROG : trans-zéatine-O-glucoside riboside et les équivalents pour DHZ et cZ. Le sens des flèches représente une teneur régulée différemment entre les ME (blanc) ou NE (noir) dans nos analyses. Les enzymes (8 et 10) en rouge sont retrouvées surexprimées les NE. Schéma inspiré de Spíchal (2012).

II.6.3.3. Acide abscissique

Outre les hormones du cycle cellulaire, nous avons suivi dans ME et NE l'évolution de l'ABA et sa forme de stockage (réversible) l'ABA-GE. Chez le Douglas les teneurs en ABA sont toujours plus importantes dans les NE par rapport aux ME. Si ces résultats sont similaires à ceux observés chez l'hévéa (Etienne *et al.*, 1993), ils diffèrent de ceux obtenus chez le mélèze où aucune différence n'a été observée entre ME et NE (Jourdain *et al.*, 1997). Concernant l'ABA-GE, les 3 géotypes NE de Douglas ont des teneurs élevées en ABA-GE ce qui là encore diffère du mélèze, le NE ayant de faibles teneurs. Parmi les gènes différemment exprimés dans les NE on peut citer la *zeaxanthin epoxidase* (FC = 31,14), et la *9'cis-epoxycarotenoïd dioxygénase* (FC = 10), qui sont des transcrits fortement induits lors d'un stress hydrique (Cutler et Krochko, 1999). Ces enzymes sont impliquées dans l'anabolisme de l'ABA, et de façon indirecte dans son catabolisme où elles bloquent l'activité de l'ABA 8'hydroxylase (CYP78A4) (Cutler et Krochko, 1999). Si plus de 80 gènes codants des Cytochrome P450 dont font partie les CYP78A4 ont été identifiés dans les ME, aucun ABA 8'hydroxylase n'a été isolé dans ce matériel. Chez le Douglas la teneur en ABA, comme les gènes impliqués dans le métabolisme

de l'ABA suggèrent que les **NE** pourraient être en condition de stress. Les mesures de de la teneur en eau chez le Douglas mais également chez l'hévée (Etienne *et al.*, 1991) et chez le mélèze hybride (Jourdain *et al.*, 1997), montrent toujours des teneurs en eau plus faible dans les **NE** par rapport au **ME**. Cependant chez l'hévée, Etienne *et al.* (1991) ont montré que le contenu relatif en eau et le potentiel hydrique cellulaire des cals embryogènes étaient corrélés avec la formation d'ES. Dans ce modèle, un léger stress hydrique (-0,95 MPa) induit par une concentration d'ABA de 10^{-7} M est facilitateur de la formation d'ES. Au-delà de cette concentration en ABA, le potentiel hydrique cellulaire baisse sans améliorer l'initiation des **ME**. De ce fait au-delà d'une valeur seuil d'ABA, cette hormone devient plutôt un inhibiteur de l'initiation de l'embryogenèse somatique comme décrit par Pullman *et al.* (2003).

En synthèse, même si de nombreuses différences existent entre les 3 génotypes (**ME** et **NE**), l'auxine, les CKs actives (isoprénoïdes et aromatiques) et phosphates (isoprénoïdes) sont des marqueurs de la formation de **ME**, alors que les **NE** sont caractérisés par de fortes teneurs en ABA, en ABA-GE, et en CKs glucosylées (isoprénoïdes et aromatiques).

II.6.4. Quels sont les marqueurs moléculaires caractéristiques de l'aptitude à l'embryogenèse ?

Au-delà des paramètres biochimiques présentés ci-dessus, nous avons cherché à analyser de façon globale la régulation des transcrits et des traduits exprimés dans les **ME** en comparaison avec les **NE** de Douglas. Aucuns articles scientifiques ne traite de la comparaison moléculaire croisée entre deux types de matériels isogéniques (**ME** et **NE**) sur des espèces ligneuses. Une première analyse à partir des marqueurs moléculaires communs du transcriptome et du protéome des 3 génotypes de Douglas a été réalisée afin de caractériser les marqueurs moléculaires clefs de l'aptitude à l'embryogenèse. Cette analyse sera complétée par une étude plus exhaustive de l'expression différentielle entre **ME** et **NE** des gènes des trois génotypes.

Une version V1 du transcriptome du Douglas a été proposée en août 2016, mais n'est pas complète. Même si nous ne pouvons pas estimer le nombre de gènes par famille de gènes, ou si les transcrits détecté représentent des transcriptions alternatives, nous pouvons affirmer que chaque lecture obtenue a été « mappée » spécifiquement à une transcription de référence ; nos résultats indiquent que les transcrits retrouvés appartiennent à différentes familles de gènes. Ceci nécessite tout de même une caractérisation supplémentaire de ces familles de gènes, car le transcriptome publié de Douglas a été réalisé sur des plantules, et non des **ME**. Les gènes et protéines identifiées dans nos analyses ont été annotés principalement sur la base GO au niveau des processus biologiques, et les **ME** expriment des marqueurs impliqués dans des métabolismes différents par rapport aux **NE**, groupes récapitulés dans le **Tableau II.8**.



Tableau II.8 Récapitulatif des groupes fonctionnels marqueurs communs aux trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), obtenus après analyses différentielles en protéomique et en transcriptomique des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE).

Matériel	Protéome	Transcriptome	Rapprochement protéome/transcriptome
ME	Information génétique (transcription, traduction) Traffic cellulaire (transport) Cycle cellulaire	Information génétique (transcription, traduction) Traffic cellulaire (transport) Cycle cellulaire Organisation des composants cellulaires	Information génétique (transcription, traduction) Traffic cellulaire (transport) Cycle cellulaire
NE	Réponse au stress Métabolisme de l'énergie	Réponse au stress Transduction des signaux et communication cellulaires	Réponse au stress (activité oxydoréductase) Biosynthèse des composés sulfurés



II.6.4.1. Rapprochement du protéome et du transcriptome

Sur l'ensemble des identifiants produits à la suite de l'analyse du transcriptome et du protéome, 163 sont communs aux **ME**, 130 aux **NE**. Ces différents identifiants communs peuvent être regroupés dans 7 catégories fonctionnelles significatives : réponse au stress, processus développementaux, processus cellulaires, processus métaboliques, régulations biologiques, biosynthèse et organisation des composants cellulaires et les transports. Certaines catégories ont été montrées surreprésentées dans les **ME** ou les **NE**, avec une majorité des GO impliquée dans les processus cellulaires et les processus métaboliques. L'analyse de « Term enrichment » par sur représentation des termes GO a montré que les **ME** étaient marquées par des GO surtout impliqués dans l'information génétique (transcription, traduction), dans le transport des protéines et pour finir dans les processus cellulaires, alors que les **NE** c'est surtout par de la réponse au stress et le métabolisme des sucres.

II.6.4.1.1. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des ME de Douglas

Sur les 293 gènes et protéines surexprimés, 55 % le sont dans les **ME**. Sur ces 55 %, le métabolisme des nucléotides et des acides aminés, la transcription et la traduction, les transports associés, mais aussi les processus cellulaires ont été montrés surreprésentés dans les 3 géotypes. Tous ces gènes/protéines sont impliqués dans le flux de l'information génétique et l'organisation cellulaire.

II.6.4.1.1.1. Régulation de l'information génétique

La formation de l'embryon nécessite la mise en place de mécanismes de transcription et de traduction qui ont été caractérisés chez le Douglas par la surexpression d'une ARN polymérase (« DNA-directed RNA polymerases »), ainsi que plusieurs enzymes et protéines impliquées dans la traduction des protéines : 3 « tRNA ligase », plusieurs sous-unités de protéines ribosomales comprenant 4 « 60S ribosomal proteins », et 1 « 40S ribosomal protein », et 3 « Elongation factor ». La compartimentation nucléaire nécessite l'utilisation de transporteurs (NLP) permettant d'échanger protéines et ARN avec le cytoplasme. Chez le Douglas des importines alpha et beta, qui représentent la plus grande classe de récepteurs impliqués dans le transport nucléo-cytoplasmique, ont été identifiés comme surexprimés également dans les cultures embryogènes d'angiospermes et de gymnospermes (Weis 2003 ; Meier et Brkljacic, 2009 ; Zhao *et al.*, 2015a). Ces résultats montrent l'importance de la communication au niveau de la membrane nucléaire, permettant le bon fonctionnement de l'organisation nucléaire mais aussi des processus de l'information génétique.

L'ARN polymérase identifiée chez le Douglas est la sous-unité 3 présente chez les Pol II, IV et V. Si la Pol II est une polymérase ubiquiste chez les eucaryotes, la Pol IV et V sont spécifiques aux plantes et jouent un rôle non pas dans la transcription des ARNm comme la Pol II, mais dans l'épigénétisme des siRNA et l'extinction des gènes (Ream *et al.*, 2009). Outre les polymérases, plusieurs tRNA ligase (proline, leucine, glutamate/proline) impliqués dans la fixation des acides aminés sont surexprimés de façon spécifique dans les **ME** de Douglas. Des résultats similaires ont été trouvés chez la vigne avec la caractérisation d'une aspartate et d'une

lysine tRNA ligase (Marsoni *et al.*, 2008). C'est aussi le cas de plusieurs protéines ribosomales 40S et 60S qui ont été caractérisées dans les **ME** de mélèze (Zhao *et al.*, 2015a). La protéine ribosomale 60S a été décrite comme indispensable dans la formation des ribosomes 80S (Trivedi *et al.*, 2013). De plus Sydorsky *et al.* (2005) affirment que la biosynthèse des ribosomes 80S est intimement associée au transport nucléo-cytoplasmique créant des points de contrôle de la traduction. De ce fait la surexpression de la sous unité 60S pourrait être corrélée avec la surexpression du récepteur « Importin » décrit précédemment (Rout et Aitchison, 2001). Le couplage des ARNt avec le ribosome 80S est sous le contrôle de facteur d'élongation, comme le facteur eEF1 (eukaryotic Elongation Factor 1) présent dans nos **ME** de Douglas (Sasikumar *et al.*, 2012). Ce facteur d'élongation a été trouvé également, comme surexprimé, chez la carotte (Chugh et Khurana, 2001), chez la vigne (Marsoni *et al.*, 2008), et plus récemment une isoforme différente l'eEF2 chez un gymnosperme, *A. angustifolia* (Jo *et al.*, 2013).

Cependant parmi les HSP, qui renferment plusieurs familles (70, 60, 90, 100, et les « small HSP ») ; nous avons observé des HSP70 surabondantes autant dans les **ME** que les **NE**. Ceci peut être expliqué par les fonctions très diverses décrites pour cette protéine dans les processus de prévention d'agrégation, l'assistance au repliement des protéines, l'import de protéines et leur translocation pour la dégradation, mais aussi dans la transduction de signaux et l'activation transcriptionnelle (Miemyk 1997 ; Wang *et al.*, 2004). Les HSP70 ont aussi été détectées dans les stades précoces de l'embryogenèse somatique chez la vigne (Marsoni *et al.*, 2008) et chez le mélèze (Zhao *et al.*, 2015a). Dans tous les modèles présents dans la littérature, comme chez le Douglas, les HSP identifiées dans les **ME**, sont souvent associées à une reprise de la division cellulaire (Zhao *et al.*, 2015a). Cependant chez le Douglas des HSP ont également été trouvées dans les **NE**. Ce résultat n'est pas contradictoire car même si ce matériel ne montre pas en cytologie de figure de mitose, car ses divisions sont plus lentes, il est aussi en multiplication.

Tous les gènes identifiés comme étant surexprimés dans les **ME** se différencient des **NE** par une importance de l'information génétique pour la division cellulaire.

II.6.4.1.1.2. Processus cellulaires

Nous avons observé dans les **ME** chez le Douglas une surexpression de deux actines et une actine like, ainsi que 3 tubulines alpha ou beta. Ce sont les composants majeurs du cytosquelette, et l'association entre les actines et les microtubules permet de nombreux processus, comme la division cellulaire, l'orientation de l'expansion cellulaire, les mouvements des organites et la transduction des signaux (Takeuchi *et al.*, 2017). Au cours de la phase d'initiation de l'embryogenèse somatique des cellules différenciées sont différenciées pour former des amas cellulaires où une réorganisation du réseau d'actines et tubulines est observée (Nagata *et al.*, 1994). L'évolution de ces amas cellulaires en cal embryogène entraîne également une réorganisation du réseau d'actine et de tubuline et donc accompagne les modifications morphologiques des cellules (Dudits *et al.*, 1991). Au cours de l'embryogenèse somatiques des conifères, des observations similaires ont été faites (Stasolla *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2012, Trontin *et al.*, 2016a). Si l'on compare la distribution de l'actine et de la tubuline entre **ME** et **NE** on trouve dans tous les modèles biologiques étudiés une surexpression de l'actine dans les

cals embryogènes d'angiospermes (Marsoni *et al.*, 2008), mais aussi chez les gymnospermes étudiés (Zhao *et al.*, 2015a ; Klubicová *et al.*, 2017) une surexpression de l'actine et de la tubuline.

Outre le réseau de microfilaments, la différenciation cellulaire implique une réorganisation pariétale en partie sous la dépendance des expansines (Morel *et al.*, 2014a ; Bishop-Hurley *et al.*, 2003) qui ont toujours été trouvées comme surexprimées dans les **ME**. Dans nos lignées **ME**, des expansine-like ont été caractérisées dans les **ME** mais également dans les **NE**. Cependant nos résultats montrent des rapports d'expression très élevés de ces protéines dans les **ME** par rapport au **NE** : transcriptome (9,92) et protéome (7,18). Au-delà de leur rôle dans l'organogenèse cellulaire (Sampedro et Cosgrove, 2005), les expansines-like, tout comme certaines endoglucanases, sont également décrites comme des enzymes de destructuration et de dégradation de la paroi par les pathogènes (Artzi *et al.*, 2016).

L'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse, passe aussi en premier lieu par une régulation du métabolisme carboné (Feher *et al.*, 2003). Nous avons retrouvé une « fumarate hydratase 1 », une « phosphoenolpyruvate carboxylase 4 » et une « alpha-1,4-glucan-protein synthase » surexprimées dans les **ME**. Ces enzymes sont impliquées soit dans la régulation du métabolisme oxydatif (fumarate hydratase 1 et phosphoenolpyruvate carboxylase 4) soit dans la synthèse de glucanes carbonés (alpha-1,4-glucan-protein synthase). Cette dernière est habituellement retrouvée durant la maturation de l'ES car elle régule la synthèse de l'amidon dans les cellules de plantes (Teyssier *et al.*, 2014). Elle a été montrée surexprimée durant la comparaison **ME** et **NE** chez les **ME** de mélèze (Zhao *et al.*, 2015a) et de *Pinus nigra* (Klubicová *et al.*, 2017), ainsi que dans les **ME** de nos trois génotypes de Douglas. Les interconnexions entre le métabolisme du carbone et de l'azote et le rôle clef du TCA (tricarboxylic acid), ou cycle de Krebs, mettent en évidence le rôle du métabolisme primaire dans les **ME**. Le cycle de Krebs est essentiel pour l'apport en énergie et de squelettes carbonés pour d'autres voies de synthèse dans de nombreuses espèces végétales (Fait *et al.*, 2006), mais aussi durant la multiplication des **ME** de Douglas.

Tous les gènes/protéines identifiés dans les **ME** ont été retrouvés chez d'autres espèces dans des dispositifs expérimentaux similaires, mais plus généralement au cours du développement de l'embryon somatique. De ce fait, la surexpression des gènes impliqués dans la transcription et la traduction ainsi que les gènes/protéines liés à la réorganisation de la forme de la cellule peuvent être considéré comme des gènes clef du développement embryonnaire.

II.6.4.1.2. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des NE de Douglas

II.6.4.1.2.1. Réponse aux stimuli

Les marqueurs moléculaires surexprimés à la fois dans le transcriptome et dans le protéome des **NE** sont surtout impliqués dans la réponse des plantes aux stimuli : métabolisme oxydatif, molécules de défense avec les « pathogenesis-related protein » (PR), et biosynthèse de certains métabolites secondaires. Les transcrits et les traduits des **NE** de Douglas sont principalement constitués par un groupe d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif avec 4 « glutathione-S-transferase » (GST 2, 6, 10), 7 « peroxidase like (12, 55, 56, 72) », 1

« dihydroflavonol-4-reductase » (DFR, Su *et al.*, 2014), 2 « anthocyanidin reductase » (ANR, Luo *et al.*, 2016), 1 « isoflavonne reductase like » (IFR, Kim *et al.*, 2010). Des observations similaires ont été faites chez le mélèze (Zhao *et al.*, 2015a) et *Pinus nigra* (Klubíková *et al.*, 2017). Pour ce modèle, les enzymes du stress oxydatif qui sont surexprimées dans les **NE** diffèrent de celles trouvées chez le Douglas. De façon générale, l'augmentation des dérivés réactifs d'oxygène (ROS) nécessite la synthèse ou la production d'antioxydants afin de contrôler l'homéostasie oxydative cellulaire (Vestman *et al.*, 2011 ; de Vega-Bartol *et al.*, 2013). Ce contrôle est tout à la fois un processus physiologique normal et une réponse à une contrainte biotique ou abiotique. De ce fait, la dérégulation des gènes/protéines impliqués dans ces processus nécessite l'expression différenciée d'isoformes de ces enzymes.

Par exemple, les GST, qui catalysent la conjugaison du tripeptide glutathion (McGonigle *et al.*, 2000), forment une famille multigénique dont certains membres sont connus pour être impliqués dans la détoxification des xénobiotiques, des métaux, ou encore aux attaques de pathogènes, mais aussi dans la réponse à l'auxine et dans la production de métabolites secondaires (anthocyanines et acide cinnamique) durant le développement normal des plantes (Marrs 1996). Thibaud-Nissen *et al.* (2003) suggèrent que les isoformes 2 et 6, qui sont surexprimés dans les **NE** de nos Douglas, participent à la réponse à l'auxine et/ou au stress oxydatif. Levine *et al.* (1994) montrent que les dérivés réactifs en oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène pourraient induire la surexpression de GST. Dans cette hypothèse la multiplication des **NE** pourrait être associée à une augmentation de ROS entraînant à la fois la surexpression de GST mais également de gènes impliqués dans la réduction des flavonoïdes leur conférant alors des fonctions anti oxydantes. Cependant si la GST est décrite comme étant surexprimée dans les **NE** de Douglas, d'autres auteurs montrent que d'autres isoformes de GST sont surexprimées non pas dans les **NE** mais dans les cals embryogènes d'angiospermes et les **ME** de gymnospermes (Stasolla *et al.*, 2003 ; Thibaud-Nissen *et al.*, 2003 ; Marsoni *et al.*, 2008 ; Guzmán-García *et al.*, 2013 ; Noah *et al.*, 2013, Dos Santos *et al.*, 2016).

Les peroxydases sont connues pour être impliquées dans les mécanismes de défense, comme les stress oxydatifs (Stasolla *et al.*, 2003; Stasolla *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010; Elhiti *et al.*, 2013). Leurs activités sont amplifiées au cours de la phase de maturation des ES de *Pinus taeda* (Tang 2000) et des EZ de *P. massoniana* (Zhen *et al.*, 2012). Notre travail a permis d'identifier des L-ascorbates peroxydases dont certaines isoformes sont exprimées dans les **NE** comme l'APX2 retrouvée aussi dans les **NE** de *Pinus nigra* (Klubíková *et al.*, 2017) et d'autre dans les **ME** (APX1). Ces enzymes sont connues pour être impliquées dans le cycle glutathion/ascorbate où elles servent à la suppression des radicaux libres produits en excès, normalement au cours de l'activité photosynthétique. Des APX ont été, retrouvés dans des **NE** de maïs (APX1, Sun *et al.*, 2012 ; Varhaníková *et al.*, 2014), mais plus classiquement dans les cals embryogènes de *Vitis vinifera* (APX1, Marsoni *et al.*, 2008) et de *Picea abies* (APX1, Stasolla *et al.*, 2004). De ce fait même, si une surexpression des acteurs de réduction de ROS sont majoritaires dans les **NE**, les **ME** possèdent aussi certains marqueurs similaires.

A la différence des expressions différenciées de la GST et de peroxydases dans les **NE**, Zhao *et al.*, (2015a) montrent la surexpression d'une enzyme de la voie de synthèse des flavonoïdes dans les **NE** de mélèze (flavonoïde 3'-hydroxylase). Des résultats similaires sont observés dans nos lignées avec la surexpression d'une DFR (dihydroflavonol-4-reductase), d'une ANR

(anthocyanidin reductase) et d'une IFR (isoflavonne reductase like). Les flavonoïdes sont connus, chez les plantes, pour jouer de nombreux rôles comme le dialogue chimique (Denarié *et al.*, 1992 ; Buer *et al.*, 2007), le contrôle du transport de l'auxine (Peer *et al.*, 2004), de l'allélopathie (Bais *et al.*, 2004), de l'embryogenèse somatique (Imin *et al.*, 2006) et la défense (Treutter 2005). La biosynthèse et le stockage de ces métabolites secondaires dans les **NE** (sous forme de phénol pour la défense), à l'instar de ce qu'ont montré Feirer *et al.* (1995), Zhao *et al.* (2015a) et Ng *et al.* (2016), pourrait être responsables de la structure non-embryogène. En effet, lors de stress oxydatif, il a été montré que ces composés secondaires régulaient et réduisaient les ROS (Agati *et al.*, 2012), ce qui pourraient peut-être conditionner le caractère non-embryogène.

La dernière famille de marqueurs de la catégorie fonctionnelle réponses aux stimuli sont les PR 1 et PR 4 protéines. Ces protéines sont habituellement surexprimées lors d'un stress biotique ou abiotique, et sont des marqueurs de réponse d'un stress oxydatif chez *Arabidopsis thaliana* (Mur *et al.*, 2004). Chez le mélèze, Zhao *et al.* (2015a) ont isolé une PR protéine à activité chitinase, mais ici uniquement dans les **ME**.

La multiplication des **NE** est sous la dépendance d'une transcription *de novo* des gènes mais également des protéines associées à ces gènes. Si la catégorie fonctionnelle réponse aux stimuli marque les **NE** de Douglas, les analyses comparatives entre espèce montrent qu'aucun gène ou protéine n'est décrit comme spécifique des **NE**. Cependant, le nombre réduit d'articles comparant **NE** et **ME**, ainsi que le type de données présentes dans ces articles (protéome) ne nous permettent pas, à ce jour, d'identifier des marqueurs moléculaires communs de l'état non-embryogène des cellules en multiplication dans un cal. De ce fait il semble difficile à ce stade d'imputer aux **NE** par rapport au **ME**, une plus grande sensibilité ou adaptabilité au stress oxydatif. Si le rapprochement du transcriptome et du protéome permet d'avoir une idée de la modification de l'expression des gènes, il manque des données à la fois sur le niveau d'oxydation des cellules (quantification des ROS) et sur l'activité spécifiques des enzymes différenciellement exprimées entre **NE** et **ME**. L'ensemble de ces données permettrait alors d'avoir une vision plus claire sur le rôle de certains de ces gènes comme marqueurs d'un état non-embryogène de cellule.

II.6.4.1.2.2. Processus cellulaires

D'autres gènes/protéines, dont 3 pectinestérases, impliqués dans la réorganisation de la paroi cellulaire sont retrouvés surexprimés dans les **NE** de Douglas. Chez les plantes, les pectinestérases jouent un rôle dans des processus développementaux comme l'adhésion cellulaire mais aussi l'élongation cellulaire. Elles forment une famille multigénique qui catalysent l'estérification des polygalacturonanes de la paroi cellulaire (Cui *et al.*, 2017). Ces enzymes sont connues pour être régulées (sous régulées) au cours des stades précoces de l'embryogenèse somatique (Vestman *et al.*, 2011, *Picea abies*) mais aussi surexprimées dans les **NE** chez *Pinus radiata* (Aquea et Arce-johnson, 2008).

II.6.4.1.2.3. Processus métaboliques

Les **NE** sont aussi marquées par de nombreuses itérations de GO associés aux processus métaboliques, dont 50 % font partie du métabolisme primaire. Les **NE** de Douglas surexpriment des enzymes impliquées dans la biosynthèse des glucides avec 1 « transaldolase like », 3 « glucan endo-1,3-beta-glucosidase », et 2 « endoglucanase-like ».

La « Glucan endo-1,3-beta-glucosidase », pouvant être classée dans les PR protéines (Correia *et al.*, 2012), catalyse l'hydrolyse du beta-1,3-glucan (Habu *et al.*, 1996) et joue de nombreux rôles dans la défense des plantes (Gao *et al.*, 2009) en protégeant la paroi cellulaire par des dépôts de callose. Cette enzyme a été montrée comme bénéfique pour l'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse de *Cyphomandra betacea* (Correia *et al.*, 2012), mais aussi de *Picea glauca* (Dong et Dunstan, 1997). Plus récemment des études sur *Araucaria angustifolia* ont montré que cette enzyme était surexprimée dans les lignées dites « bloquées », produisant peu ou pas d'embryons, résultant sûrement d'une réponse de défense ne permettant pas l'acquisition du potentiel embryogène chez cette espèce (Dos Santos *et al.*, 2016).

Les endoglucanases-like sont généralement associées avec la dégradation de la cellulose (Nicol *et al.*, 1998). Ces enzymes sont utilisées par les pathogènes afin de pénétrer dans les racines de la plante hôte (Long *et al.*, 2012). Leur rôle est de couper les liaisons glycosidiques β (1 \rightarrow 4) des résidus de D-glucopyranose (Kundu et Sharma, 2016). Certaines endoglucanases ont été montrées comme impliquées dans la formation de la cellulose de la paroi primaire et secondaire d'*Arabidopsis* (Szyjanowicz *et al.*, 2004), mais aussi de *Populus tremuloides* (Bhandari *et al.*, 2006). Par exemple l'endoglucanase GH9, localisée dans les parois cellulaires, favoriserait la biosynthèse *de novo* de la cellulose (Yu *et al.*, 2013) jouant ainsi un rôle structurel. La sécrétion extracellulaire d'endoglucanase permettrait aussi une réponse rapide au stress (biotique et abiotique) (Kundu et Sharma, 2016). La surexpression de cette enzyme dans les **NE** pourrait résulter simplement d'une réponse de défense, et de ce fait ne contribuerait pas à l'aptitude embryogène des plantes.

La transaldolase-like est une enzyme appartenant à la voie de biosynthèse des pentoses phosphate qui va produire du NADPH et des pentoses (Kruger et von Schaewen, 2003). Deux branches de cette voie existent : oxydative et non oxydative. La transaldolase appartient à la branche non oxydative et est une enzyme clef qui va catalyser le transfert réversible d'un groupe dihydroxyacétone du fructose-6-phosphate à l'érythrose-4-phosphate, en fournissant du sedoheptulose-7-phosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate (Yang *et al.*, 2015). En plus de son rôle de régulation des flux de carbone entre le métabolisme primaire et secondaire chez les plantes, elle a été montrée comme étant surexprimée en réponse à des facteurs environnementaux, suggérant un rôle dans les réponses de défense des plantes (*Lycopersicon esculentum* ; Caillau et Quick, 2005).

En résumé, même si ces différents gènes/protéines sont classés dans la catégorie fonctionnelle « métabolismes des glucides », leur rôle est beaucoup plus large avec des réponses associées à la défense, mais aussi à l'organisation structurelle des cellules.



II.6.4.2. Marqueurs présents dans le transcriptome, et régulant l'acquisition de la capacité embryogénèse

Outre les identifiants communs entre le protéome et le transcriptome, de nombreux transcrits peuvent être importants pour caractériser l'aptitude à l'embryogénèse. Dans cette partie nous ne traiterons que des transcrits surexprimés dans les **ME** et préalablement décrits dans la littérature, mais non identifiés dans le protéome. La liste exhaustive des gènes surexprimés dans les **ME** non discutés sera fournie en annexe (**Annexe 5**). Parmi les transcrits surexprimés dans les **ME**, on retrouve des Cytochrome P450 78A7 (*CYP 78A7*), des *LEA*, des récepteurs kinases transmembranaires « *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK)*, et des facteurs de transcription *BABYBOOM (BBM)*, *LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)* et *WUSCHEL-RELATED-homeobox (WOX/WUS)* préalablement décrits comme importants durant l'embryogénèse et plus récemment dans l'embryogénèse somatique des conifères (Rupps *et al.*, 2016 ; Miguel *et al.*, 2016 ; Trontin *et al.*, 2016a) (**Fig II.19**).

Dans notre étude, le *CYP78A7* fait partie des gènes répétés de nombreuse fois (7) et le plus fortement surexprimé dans les **ME** de Douglas (allant jusqu'à 2100 fois). Il appartient à une grande famille de pigments qui est considérée comme des métalloprotéines car ils sont constitués d'un hème avec un noyau de fer. Ce sont des monooxygénases qui utilisent deux électrons du NAD(P)H pour cliver par réduction le dioxygène atmosphérique (Chapple 1998). De manière générale les P450 contrôlent la croissance, la réponse au stress oxydatif, la biosynthèse de l'auxine, ainsi que la dégradation de l'acide abscissique (Cutler et Krochko, 1999). Chez le riz, la surexpression des membres de la famille *CYP78A* augmente la multiplication cellulaire en réduisant la taille des EZ (Yang *et al.*, 2013). Ce transcrit a été retrouvé surexprimé fortement durant les stades précoces de l'EZ chez *Pinus sylvestris* (Merino *et al.*, 2016) mais aussi durant la multiplication des **ME** de *Pinus radiata* où les *CYP78A* ont été montrés comme la 2^{ème} plus grande famille de gènes surexprimés (Bishop-hurley *et al.*, 2003). Ils sont donc sûrement impliqués dans la multiplication cellulaire en corrélation avec les hormones.

A l'instar de nombreux travaux présents dans littérature, les *LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT)* forment une famille de protéines, connues depuis plus de 30 ans, associées au développement embryogène tardif des EZ (Dure *et al.*, 1981). Codées par une famille multigénique, les protéines *LEA* ont été également identifiées au cours de différentes phases du développement des ES : au cours de la phase d'initiation chez les angiospermes (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003 ; Gliwicka *et al.*, 2012) mais plus usuellement au cours de la phase de maturation chez les gymnospermes (Morel *et al.*, 2014a). Chez le Douglas, 12 gènes codant des *LEA* sont surexprimés dans les **ME** en multiplication (**Fig II.19**). Ici aucune explication quant à la présence de ces transcrits ne peut être avancé au regard de nos données et de la bibliographie chez les gymnospermes.

Les gènes *SERK* codent une famille de récepteurs kinase transmembranaires (RLK) qui sont caractérisés par la présence de répétition leucine, et ont été identifiés pour la première fois dans des cultures embryogènes de carotte (Schmidt *et al.*, 1997). Les activités kinases des *SERK* sont responsables de la transduction des signaux extracellulaires régulant le développement des plantes, et les réponses de défense (Becraft 1998 ; Torii 2000). Ils ont été

montrés comme induisant la compétence embryogène chez de nombreuses espèces d'angiospermes comme la carotte (Schmidt *et al.*, 1997), *A. thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), ou encore *M. truncatula* (Nolan *et al.*, 2009). A l'instar de ce qui a été retrouvé chez le Douglas, les transcrits *SERK* sont habituellement décrits comme surexprimés au cours de la phase de multiplication des **ME** mais également durant la phase de maturation (Palovaara *et al.*, 2010 ; Klimaszewska *et al.*, 2011 ; Vestman *et al.*, 2011; Rupps *et al.*, 2016 ; Trontin *et al.*, 2016a). Chez les angiospermes, et plus particulièrement chez *A. thaliana*, les séquences *cis* de régulation des *SERK1* sont sous le contrôle du facteur de transcription *AGAMOUS-like 15* (*AGL15*) (Harding *et al.*, 2003 ; Karlova *et al.*, 2006) qui possèdent un domaine MADS permettant de se lier au motif CARG (C-A/T rich G) de l'ADN (West *et al.*, 1997). Si les facteurs de transcription de la famille *AGL* sont connus pour réguler les processus développementaux des eucaryotes (Smaczniak *et al.*, 2012), *AGL15* a été décrit comme activateur de l'initiation de l'embryogenèse zygotique chez *A. thaliana* (Thakare *et al.*, 2008). La surexpression des gènes *SERK1* a bien été identifiée dans les **ME** de Douglas, mais nous n'avons cependant pas identifié de variation d'expression des gènes *AGL15*. Dans notre modèle, *AGL15* n'est peut-être pas l'isoforme des gènes de la famille *AGAMOUS-LIKE* impliqués dans le contrôle de la transcription des gènes *SERK*. Deux autres membres de cette famille *AGAMOUS-LIKE* (*AGL14* et *AGL80*) sont eux surexprimés dans les **ME** et pourraient peut-être jouer le rôle d'*AGL15* chez les gymnospermes.

Les facteurs de transcription jouent un rôle très important dans la régulation de l'expression des gènes. Certains facteurs de transcription sont considérés comme essentiels pour l'induction de l'embryogenèse somatique, comme les *ERF*, les *LEC*, et la famille *WOX* (Elhiti *et al.*, 2013). Chez les Douglas nous avons retrouvé plusieurs facteurs de transcription dont *BBM* (membre de la famille *ERF*), des *NUCLEAR FACTOR-Y* et des *ABI3* (membres de la famille des *LEC*), et différentes *WOX* surexprimés dans les **ME**.

Les facteurs de transcription *BBM* appartiennent à la sous-famille des *ERF* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*), membres des *AETALA 2* (*AP2*), et possédant un domaine de liaison à l'éthylène et au jasmonate (GCC-box) (Singh *et al.*, 2002 ; Boutilier *et al.*, 2002). Outre le domaine de liaison à la GCC-box, les facteurs de transcription *BBM* (*BABYBOOM*) ont été décrits comme stimulant la division cellulaire *via* le métabolisme de l'auxine (Boutilier *et al.*, 2002 ; Srinivasan *et al.*, 2007 ; Horstman 2015). Chez les conifères les facteurs de transcription de la famille *BBM* sont surexprimés tout au long du développement de l'embryon et particulièrement au cours de la phase de maturation (Rupps *et al.*, 2016). Chez le Douglas 4 *AP2*, dont 3 *BBM* (**Fig II.19**), sont fortement surexprimés dans les **ME** suggérant un rôle de ces facteurs de transcription dans la multiplication cellulaire à l'instar de ce qui a été décrit dans la littérature (Trontin *et al.*, 2016a).

Les facteurs de transcription *NF-Y* impliqués dans différentes activités physiologiques sont constitués de 3 sous unités : *NF-YA*, *NF-YB* et *NF-YC* (Mu *et al.*, 2008). Chez les plantes, chaque sous unité est codée par des familles multigéniques (Gusmaroli *et al.*, 2002). Parmi ces sous unités, la plus étudiée durant l'embryogenèse somatique est la *NF-YB* dont un des membres est *LEC1* (Mu *et al.*, 2008), facteur de transcription à domaine HAP3 (Lotan *et al.*, 1998). Les autres sous unités *NF-Y* (A et C) sont régulées par *LEC1* et ont un effet indirect sur le développement de l'ES d'*A. thaliana* (Mu *et al.*, 2013). *LEC1* contrôle aussi l'expression des

facteurs de transcription de la famille *LEC* à domaine B3 (*LEC2*, *FUS3* et *ABI3* ; Lee *et al.*, 2003). La famille B3 se lie au des motifs protéiques RY hautement conservés et régule l'expression des gènes spécifiques à la formation des EZ (Stone *et al.*, 2001 ; Braybrook *et al.*, 2006). La surexpression des *LEC1* et *LEC2/FUS3/ABI3* permet d'induire l'embryogenèse somatique (Stone *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2004). La famille *LEC* est considérée comme marqueur de l'embryogenèse somatique précoce des conifères (Park *et al.*, 2010 ; Klimaszewska *et al.*, 2011; Uddenberg *et al.*, 2011; Vestman *et al.*, 2011). La diminution de l'expression de ces facteurs de transcription est observé lors de la phase maturation des embryons somatiques (Vestman *et al.*, 2011, Rupps *et al.*, 2016). Chez le Douglas, nous retrouvons 10 de ces différentes sous unités de *NF-Y* surexprimées (A, B et C), et 1 *ABI3* fortement surexprimée dans les **ME** (**Fig II.19**). De ce fait les cinétiques d'expression des facteurs de transcription *LEC* exprimés chez le Douglas sont en accord avec la littérature et permettent, de plus, de démontrer le rôle particulier de *NF-YB* chez les gymnospermes. En effet *NF-YB* est décrit pour la première fois chez les gymnospermes et unifie les fonctions putatives de ces gènes entre les gymnospermes et angiospermes.

Les *WOX* forment une famille multigénique de gènes homéotiques impliqués dans le contrôle de la division et dans la différenciation cellulaire durant l'embryogenèse somatique précoce chez les angiospermes (Nowak et Gaj, 2016) et chez les gymnospermes (Palovaara et Hakman, 2008 ; Palovaara *et al.*, 2010 ; Park *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Uddenberg *et al.*, 2011 ; Vestman *et al.*, 2011). Les gènes homéotiques *WOX* sont également décrits comme étant impliqués dans la polarisation des cellules du SAM (Shoot Apical Meristem) et du RAM (Root Apical Meristem), mais également dans la polarisation des cellules de l'embryons. Parmi les quinze membres de cette famille, *WOX 2* définirait les cellules filles apicale du zygote et *WOX 8* et *9* seraient à l'origine des cellules basales de l'embryon et du suspenseur (Haecker *et al.*, 2004). Chez le Douglas de nombreux transcrits codant des *WOX 2*, *8* et *9* (10 gènes) sont surexprimés par un facteur pouvant aller jusqu'à 3600 pour *WOX 9* dans les **ME** (**Fig II.19**).

En résumé, chez le Douglas, tous les gènes surexprimés dans les **ME** ont été, en totalité ou en partie, décrits chez d'autre modèle biologique à l'exception des gènes codant les protéines LEA. De façon qualitative et quantitative, l'ensemble des gènes surexprimés, décrit précédemment dans les **ME** de Douglas, sont communs à la littérature et sont fortement impliqués l'acquisition de la capacité embryogène. De plus les trois familles de facteurs de transcription (*BBM*, *NF-Y* et *WOX*) retrouvées chez le Douglas ont des équivalents chez d'autres gymnospermes étudiés ainsi que chez les angiospermes. Ces familles de facteurs de transcription semblent un trait commun dans l'aptitude à l'embryogenèse chez les végétaux terrestres.



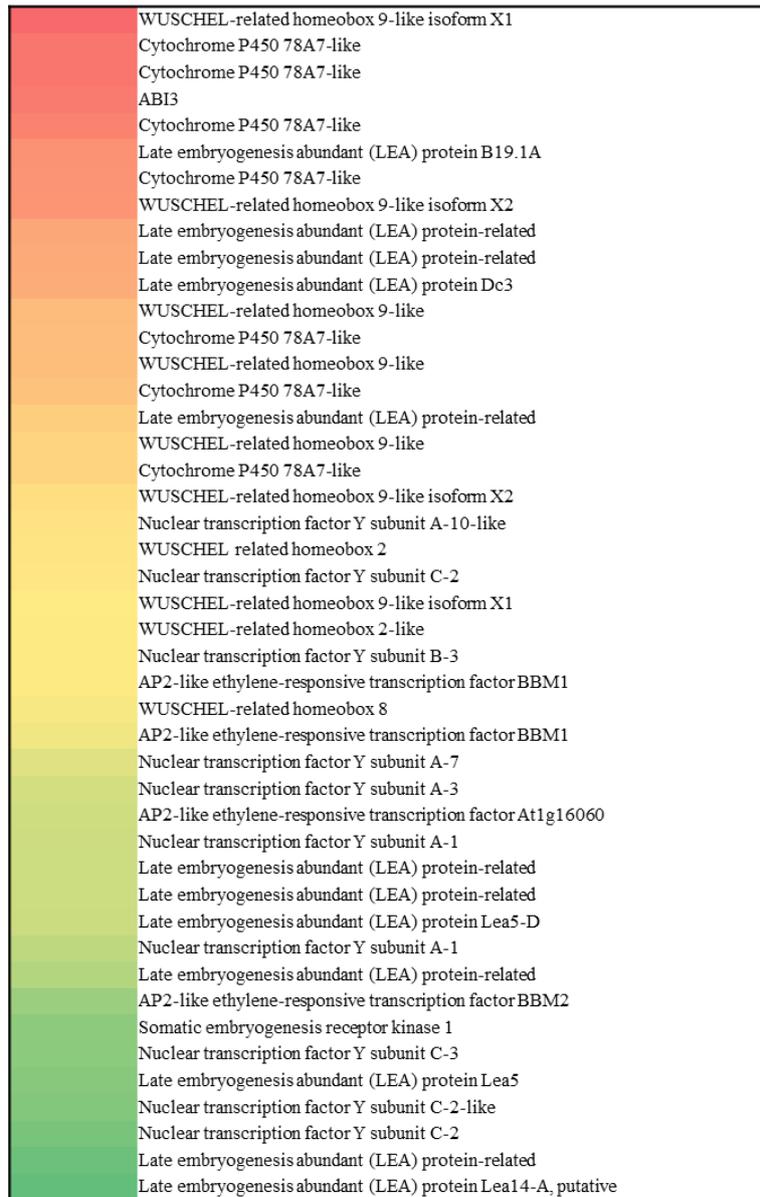


Figure II.19 Clustering hiérarchique des transcrits sélectionnés surexprimés dans les masses embryogènes (ME) par rapport aux cals non-embryogènes (NE). Le rouge indique un FC très haut et le vert un FC proche de 2.

II.6.4.3. Marqueurs présents dans le transcriptome, caractérisant l'état non-embryogène

A l'instar de ce qui a été décrit dans les **ME**, ne seront présentés ici que les gènes surexprimés dans les **NE** et préalablement décrits par la littérature. La liste exhaustive des gènes surexprimés dans les **NE** mais n'ayant aucune correspondance avec des données bibliographiques sera fournie en annexe (**Annexe 5**). Parmi les marqueurs connus pour être impliqués dans l'état non-embryogène, nous avons retrouvé surexprimés dans les **NE** de Douglas, quatre *SCL 1, 21, 27 et 9* (*Scarecrow-like*) et plusieurs gènes codant des histones.

Chez *A. thaliana*, les transcrits *SCL* appartiennent à une famille multigénique de facteur de transcription à domaine GRAS, contrôlant la différenciation cellulaire précoce, la signalisation hormonale, et les processus de développement (Llave *et al.*, 2002). Chez le mélèze, la régulation des niveaux d'expression des gènes *SCL* permet de maintenir la capacité embryogène des cellules. De ce fait, la dégradation prématurée des transcrits *SCL* par des miRNA171 oriente le devenir en **ME** (Zhang *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2014). La présence de ces facteurs de transcription dans nos **NE** par rapport au **ME**, permet d'étendre au Douglas le rôle des gènes *SCL* dans l'obtention et la conservation de matériel **NE**.

Les histones forment avec les *SCL* la deuxième famille de gènes surexprimés dans les **NE** de Douglas. Les histones sont des protéines codées par une famille multigénique impliquées dans l'organisation structurale de la chromatine. Leur présence ou absence ainsi que toute modification de leur structure tridimensionnelle affecte à la fois le repliement de l'ADN et en conséquence l'intensité de l'expression des gènes associés. Chez le Douglas plusieurs gènes codant des histones H1, H2 et H4 ont été identifiés comme surexprimés dans les **NE**. Zhao *et al.*, (2015a) ont montré que les histones H2 et H4 étaient surexprimées dans les **NE** de mélèze. La régulation négative de l'acétylation de l'histone H4 avec la régulation positive de la méthylation de l'histone H3K9 seraient caractéristiques de l'embryogenèse somatique précoce (Uddenberg *et al.*, 2011 ; de Vega-Bartol *et al.*, 2013).

En conclusion, les Histones et les *SCL* identifiés dans les **NE** du Douglas ont également été trouvés dans d'autres amas cellulaires non-embryogènes et forment un groupe de gènes pouvant être considérés comme marqueurs de cet état.



II.7. Bilan

Au cours de ce travail, les trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), embryogènes (**ME**) et non-embryogènes (**NE**) ont pu être caractérisés d'un point de vue biologique, morphologique, cytologique, biochimique et moléculaire. Cette analyse à différentes échelles a permis de relier entre eux les différents résultats afin de caractériser l'aptitude à l'embryogenèse. La caractérisation biologique a montré des différences génétiques au niveau de la production d'embryons entre les trois lignées **ME** comme cela avait déjà été montré chez le Douglas (Lelu-Walter *et al.*, in press). La caractérisation morphologique a confirmé les résultats de la littérature en montrant que la structure des deux types de matériel était différente : blanche et filamenteuse pour les **ME**, et orange/marron granuleuse pour les **NE**. Des différences entre les trois lignées embryogènes sont visibles et sont détaillées dans Gautier *et al.* (2017). Par ailleurs, les études de cytologies ont permis elles de décrire les **ME** et les **NE** au niveau de leur structure. Les **ME** sont composées d'embryons à un stade immature qui sont en forte division, et les **NE** de cellules sans organisation particulière qui stockent de l'amidon. Dans le cas de la biochimie, nous nous sommes intéressés aux glucides, aux protéines totales et aux régulateurs de croissance. Si la teneur en protéines totales ne s'est pas avérée être un bon élément de caractérisation, car nous n'avons pas vu de différences entre les deux types de matériel, la teneur en sucres solubles et en amidon a permis de différencier **ME** et **NE**. Les **ME** surexpriment les voies métaboliques de la division cellulaire (ratio hexoses/saccharose) et les **NE** le stockage de produits carbonés (amidon). Les régulateurs de croissance contenus dans les **ME** et les **NE**, ont montré des **ME** avec des plus fortes teneurs en auxine et en cytokinines actives laissant penser à un métabolisme de différenciation et de division cellulaire, ainsi que des **NE** avec des fortes teneurs en ABA, ABA-GE, cytokinines de stockage ou en voie de dégradation, suggérant un métabolisme de réponse au stress. Le dernier niveau d'étude, l'échelle moléculaire, qui a permis l'analyse du protéome mais aussi du transcriptome. Le rapprochement des deux analyses a montré de nombreux transcrits et protéines différentiellement exprimés, permettant de caractériser les **ME** et les **NE** par leurs voies métaboliques. La totalité des marqueurs moléculaires discutés dans ce chapitre est résumé par la Figure II.20 et l'Annexe 6. Les transcrits et protéines surexprimés dans les **ME** sont principalement associés à la division et à la différenciation cellulaire. De nombreux facteurs de transcription connus pour réguler le développement embryonnaire ont été retrouvés (*WOX*, *SERK*, *LEC*, *BBM*). Les transcrits et les protéines surexprimés dans les **NE** ont surtout été associés à la réponse aux stimuli biotiques et abiotiques, aux stress oxydatifs, et au stockage de produits carbonés.



MASSE EMBRYOGÈNE

CAL NON EMBRYOGÈNE

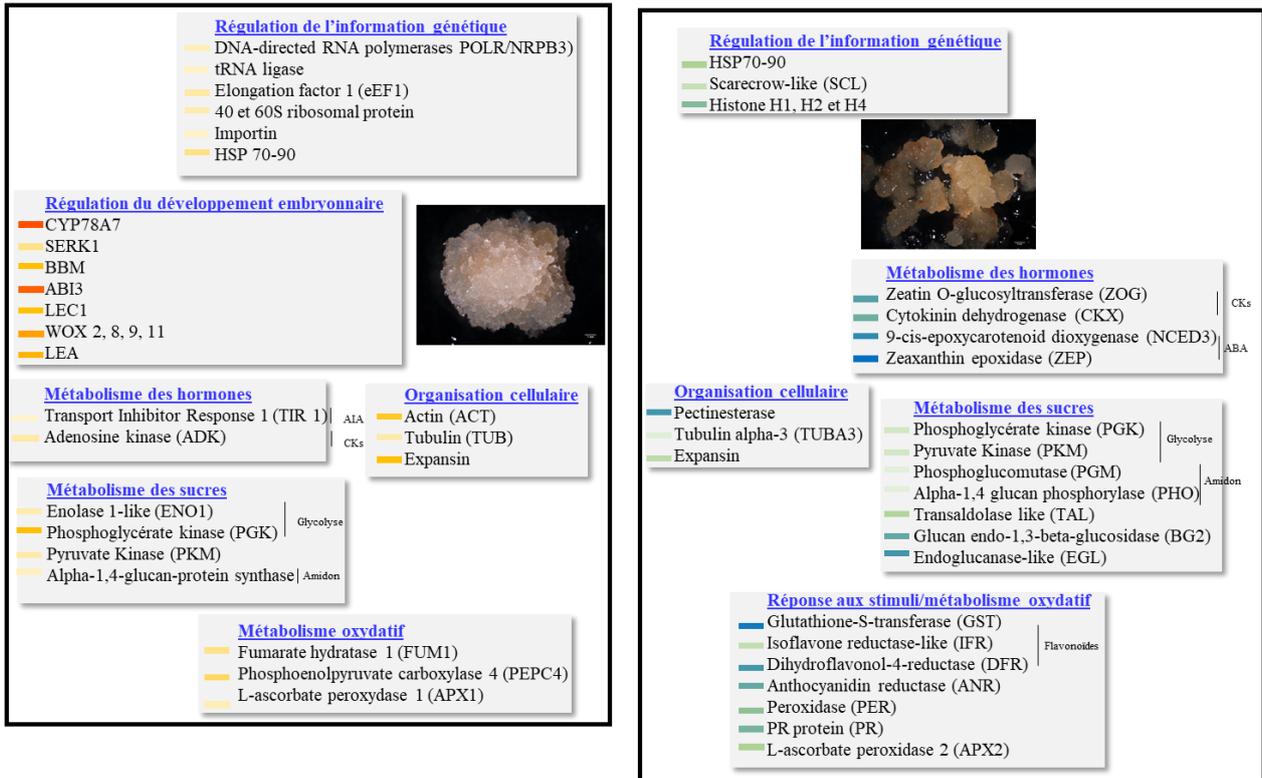


Figure II.20 Schéma récapitulatif des marqueurs moléculaires du protéome et du transcriptome caractérisant les masses embryogènes (**ME**) et les cals non-embryogènes (**NE**) de Douglas. Les rectangles avec un dégradé de couleur indiquent le niveau de surexpression entre les deux types de matériel. Dans les **ME**, cela va de jaune clair (faible surexpression) à rouge (forte surexpression), alors que dans les **NE** la faible surexpression est représentée en vert clair allant jusqu'à bleu foncé (forte surexpression).





**Chapitre III – Repetitive somatic embryogenesis
induced cytological and proteomic changes in
propagated embryogenic lines of *Pseudotsuga
menziesii* [Mirb.].**





Chapitre III. Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in propagated embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.].

III.1. Présentation de la problématique

Les lignées embryogènes des conifères peuvent être caractérisées par leur potentiel embryogène, c'est-à-dire leur capacité à donner des ES cotylédonaire. Ce potentiel est variable entre les lignées d'une même espèce, comme montré chez le mélèze hybride (Lelu-Walter et Pâques, 2009). Dans le cas du Douglas, une récente étude suggère qu'une variabilité d'ordre génétique existerait entre des lignées peu embryogènes (30 ES g⁻¹ MF) et des lignées très embryogènes (2000-3000 ES g⁻¹ MF, Lelu-Walter *et al.*, in press). Outre l'effet du génotype sur le potentiel embryogène, la réitération de cycle d'embryogenèse somatique secondaire permet d'améliorer le potentiel embryogène d'une lignée. L'embryogenèse somatique secondaire consiste en l'obtention de cultures embryogènes initiées à partir d'ES. Les masses embryogènes qui se développent constituent des lignées secondaires (**II**) et possèdent le même patrimoine génétique que les lignées primaires (**I**) d'origine. Ces lignées **II** peuvent avoir un potentiel embryogène équivalent voire nettement supérieur aux lignées **I**. Cela a été précédemment rapporté pour le mélèze hybride (Lelu *et al.*, 1994) et le pin maritime (Klimaszewska *et al.*, 2009). Chez le Douglas, ce fait a été très récemment observé sur des lignées **I** peu ou moyennement embryogènes. Ainsi les lignées **I** TD17 et SD4 ont un potentiel embryogène respectif de 30 et 478 ES g⁻¹ MF alors que les lignées **II**, TD17-3 et SD4-4, ont un potentiel embryogène respectifs de 148 et 1646 ES g⁻¹ MF, soit 4 à 5 fois plus important que les lignées **I** (Lelu-Walter *et al.*, in press). Les seuls travaux moléculaires chez les conifères, comparant le potentiel embryogène (fort potentiel *versus* faible potentiel), ont été réalisés à partir de **ME** issues de génotypes différents (par exemple, Dos Santos *et al.*, 2016). De ce fait, les expressions différenciées des protéines entre **ME** à fort potentiel et **ME** à faible potentiel ne sont pas descriptives que de l'évolution du potentiel embryogène mais prennent en compte l'expression de protéines issues de deux génotypes différents. Cependant les travaux de Dos Santos *et al.* (2016) montrent qu'une lignée à fort potentiel embryogène surexprime des protéines impliquées dans la division cellulaire et dans la défense des cellules. Par opposition les **ME** faiblement embryogènes surexpriment des protéines impliquées dans le développement de la graine.

La seconde question de recherche de ma thèse (**Q2**) concerne les marqueurs impliqués dans l'augmentation du potentiel embryogène lors de la réitération d'un cycle d'embryogenèse somatique (**Fig III.1**). Les réitérations ont été obtenues à partir de lignées **I** de Douglas génétiquement non apparentées et peu ou moyennement embryogènes (Lelu-Walter *et al.*, in press). Mes objectifs pour ce chapitre sont en premier lieu la caractérisation de marqueurs cytologiques et moléculaires impliqués dans l'augmentation du potentiel embryogène entre des lignées isogéniques (TD17 et SD4) **I** et **II**. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'effet additionnel d'une seconde réitération de l'embryogenèse somatique, c'est-à-dire la formation de lignées tertiaires (**III**), sur le potentiel embryogène et les marqueurs cytologiques

et moléculaires. Pour ce deuxième point, nous avons comparé les lignées isogéniques **II** *versus* **III**.

Pour ce faire, nous avons caractérisé le potentiel embryogène des lignées **I**, **II** et **III**, puis nous nous sommes intéressés aux modifications cytologiques des **ME** en multiplication (formes, couleur, aspect, divisions cellulaires). En effet, si des différences morpho/cytologiques ont été observées entre les lignées issues de génotypes différents (Gautier *et al.*, 2017, **Chapitre 2**) aucune information n'est disponible à ce jour quant à l'évolution des **ME** isogéniques au cours des phases de réitération. La viabilité des **ME** décrites précédemment a été déterminée par microscopie confocale suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 (**Chapitre 2 § II.4.5 Préparation histologiques et observations microscopiques**). Enfin à l'instar des travaux menés au chapitre précédent, nous avons caractérisé l'évolution du protéome des deux lignées, TD17 et SD4, après 1 et 2 réitérations (comparaison **I** *versus* **II** et **II** *versus* **III**). Nous avons donc mesuré la teneur en protéines totales, et avons cherché à identifier les protéines différentiellement exprimées au sein des différentes lignées (aspect qualitatif, protéomique, LC-MS/MS). Enfin nous avons complété ces analyses par la création de réseaux de gènes décrivant les interactions entre les marqueurs moléculaires préalablement identifiés. Dans le même temps nous avons analysé l'évolution du transcriptome, pour ces deux mêmes lignées, à la suite d'une seule réitération de l'embryogenèse somatique (comparaison **I** *versus* **II**). Les protéines et gènes identifiés ont ensuite été placés dans des groupes fonctionnels.

La comparaison moléculaire entre lignées isogénique **I** et **II** n'a, à ce jour, jamais été réalisée chez les conifères. Notre étude est donc **originale**, et **innovante** par les différents niveaux d'analyses, mais aussi du matériel puisqu'elle comporte une comparaison avec des lignées **III** permettant de pousser l'analyse à un troisième cycle d'embryogenèse somatique. Le plan expérimental et l'ensemble des analyses réalisées sont résumés dans la figure **III.1** pour répondre à cette deuxième question de recherche.



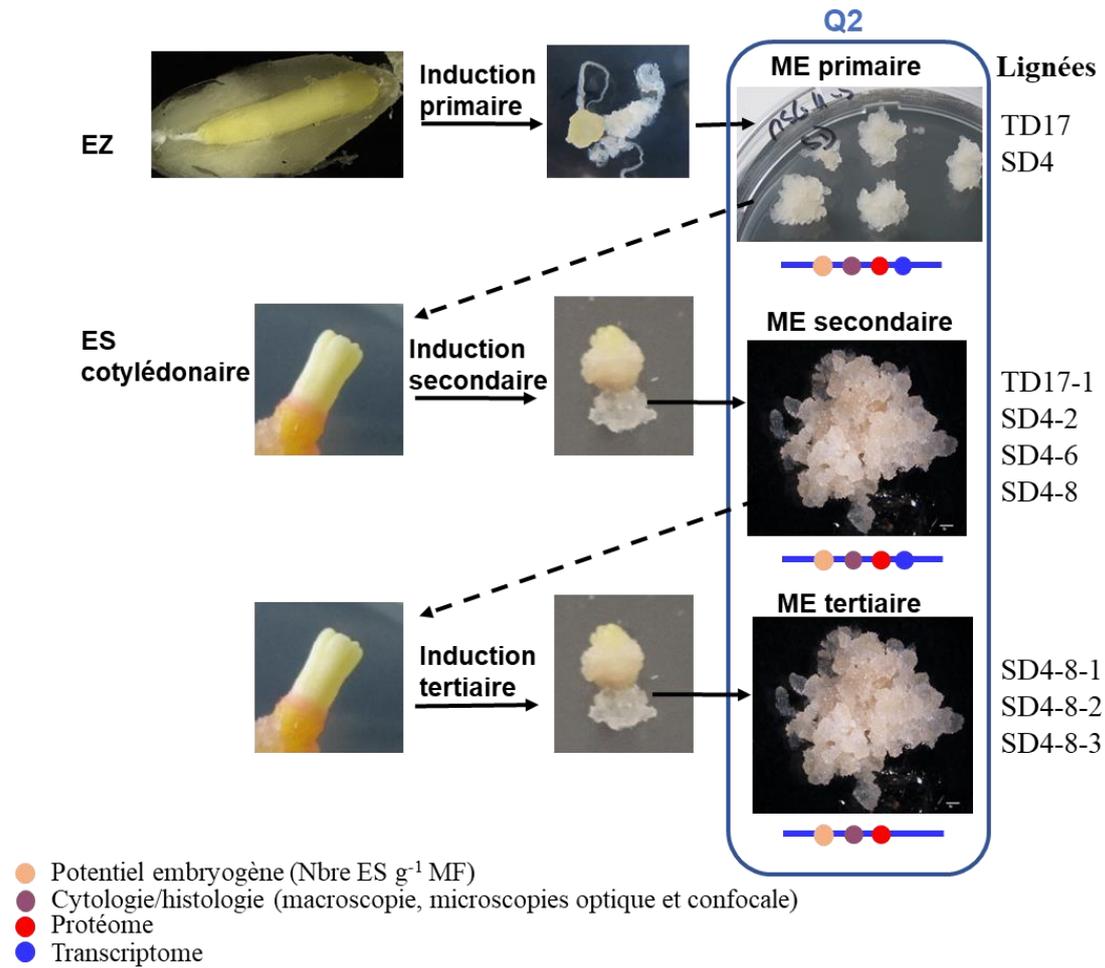


Figure III.1 Réitérer un cycle d'embryogenèse somatique augmente le potentiel des lignées peu ou moyennement embryogènes de Douglas (question de recherche Q2) : analyses et matériel végétal utilisés. Embryon somatique (ES), embryon zygotique (EZ), masses embryogènes (ME).

III.2. Lelu-Walter *et al.* (in press): High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]

Sous presse dans Plant Cell Tiss Organ Cult ; DOI 10.1007/s11240-017-1318-0

Marie-Anne Lelu-Walter¹ · Florian Gautier^{1,2} · Kateřina Eliášová³ ·
Leopoldo Sanchez¹ · Caroline Teyssier¹ · Anne-Marie Lomenech⁴ · Claire Le Metté¹ ·
Cathy Hargreaves⁵ · Jean-Francois Trontin⁶ · Cathie Reeves⁵

1 INRA, UR 0588, Amélioration, Génétique et Physiologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de pin, CS 40 001 Ardon, 45075 Orléans Cedex 2, France

2 Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 123 Avenue Albert Thomas, 87000 Limoges, France

3 Institute of Experimental Botany CAS, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6-Lysolaje, Czech Republic

4 Université de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, 33000 Bordeaux, France

5 Scion, Private Bag 3020, Rotorua 3046, New Zealand

6 FCBA, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, Campus Forêt-Bois de Pierroton, 71 Route d'Arcachon, 33610 Cestas, France

Received: 9 August 2017 / Accepted: 27 September 2017

© Springer Science+Business Media B.V. 2017

High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]

Marie-Anne Lelu-Walter¹ · Florian Gautier^{1,2} · Kateřina Eliášová³ · Leopoldo Sanchez¹ · Caroline Teyssier¹ · Anne-Marie Lomenech⁴ · Claire Le Metté¹ · Cathy Hargreaves⁵ · Jean-François Trontin⁶ · Cathie Reeves⁵

Received: 9 August 2017 / Accepted: 27 September 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract Douglas-fir is a conifer species of major economic importance worldwide, including Western Europe and New Zealand. Herein we describe some characterization and significant refinement of somatic embryogenesis in Douglas-fir, with focus on maturation. The most typical structures observed in the embryonal masses were large polyembryogenic centres (up to 800–1500 µm) with a broad meristem, creating a compact cell “package” with suspensor cells. Singulated somatic embryos composed of both a embryonal head (300–400 µm) and long, tightly arranged suspensor were also frequent. Embryo development was enhanced following embryonal mass dispersion on filter paper discs at low density (50–100 mg fresh mass).

Communicated by Sergio J. Ochatt.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11240-017-1318-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Marie-Anne Lelu-Walter
marie-anne.lelu-walter@inra.fr

¹ INRA, UR 0588, Amélioration, Génétique et Physiologie Forestière, 2163 Avenue de la Pomme de pin, CS 40 001 Ardon, 45075 Orléans Cedex 2, France

² Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 123 Avenue Albert Thomas, 87000 Limoges, France

³ Institute of Experimental Botany CAS, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6-Lysolaj, Czech Republic

⁴ Université de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, 33000 Bordeaux, France

⁵ Scion, Private Bag 3020, Rotorua 3046, New Zealand

⁶ FCBA, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, Campus Forêt-Bois de Pierroton, 71 Route d’Arcachon, 33610 Cestas, France

Moreover, increasing gellan gum concentration in maturation medium (up to 10 g L⁻¹) improved both the quantity and quality of cotyledonary somatic embryos (SEs), which were subsequently able to germinate and develop into plantlets at high frequency. Embryogenic yield was highly variable among the seven embryogenic lines tested (27–1544 SE g⁻¹ fresh mass). Interestingly secondary somatic embryogenesis could be induced from cotyledonary SEs of both low- and highly-productive lines with some useful practical outcomes: secondary lines from low-performance lines (30–478 SE g⁻¹ fresh mass) displayed significantly higher embryogenic yield (148–1343 SE g⁻¹ fresh mass). In our best conditions, the total protein content in cotyledonary SEs increased significantly with maturation duration (up to 150 µg mg⁻¹ fresh mass after 7 weeks) but remained below that of mature zygotic embryos (300 µg mg⁻¹). The protein pattern was similar in both somatic and zygotic embryos, with major storage proteins identified as 7S-vicilin- and legumin-like proteins.

Keywords Cell density · Cleavage polyembryony · Douglas-fir · Embryogenic potential · Protein pattern · Vegetative propagation

Introduction

There is a growing demand for wood products both in Europe (UN Food and Agriculture Organization-FAO 2010, IUFRO 2015) and worldwide, mostly driven by demographic pressures, continued economic growth and new “green” energy policies. By 2030, FAO predicts a 60% rise in global demand compared to present levels. These projections pose a threat to existing natural forest, including some of the most valuable ecosystems, which are already

Published online: 09 October 2017

under deforestation pressure. One of the most efficient ways to meet such demand without affecting natural forest is a rational development of planted forest, with the use of reproductive species that are improved through breeding, backed-up by a sound seed production system.

Conifers are the most important component of planted forest worldwide, generally due to their superior productivity, and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) is one of the conifers of choice. It is grown as a key plantation species in several countries in Europe, North and South America, Canada, New Zealand, and Australia, making it one of the premier timber trees in the world (Hermann and Lavender 1999; Dean et al. 2009; Dungey et al. 2012). In France, it is the second most popular species for afforestation (10.8 million planted in 2016) after maritime pine, and this demand has grown steadily in the last decade (+ 26% between 2009–2012 and 2013–2016, Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, DGPE/ SDFCB/2017-229). In New Zealand, Douglas -fir is planted on approximately 110 thousand ha and is the second most important exotic softwood after *Pinus radiata* D. Don (Min-istry of Agriculture and Forestry 2011; Miller and Knowles 1994; Shelbourne et al. 2007). There is significant interest in genetically improving this species to provide diversification of the national planted forest estate away from radiata pine.

Development of powerful clonal propagation methods, such as somatic embryogenesis, has potentially numerous application advantages over conventional rooted cuttings (Bonga 2015). Somatic embryogenesis is considered the main way to achieve true rejuvenation in vegetative propagules because somatic embryos (SEs) develop both embryonic apical and root meristems. Owing to its efficiency in plant regeneration and easy combination with long-term cryopreservation techniques, somatic embryogenesis has become a tool for accelerating clonal testing and deployment (Lelu-Walter et al. 2013). In conifers, advances in somatic embryogenesis over the last 15 years have recently been reviewed (Klimaszewska et al. 2016). The technology is now under development for numerous species and being refined for industrial application in a few important genera such as spruces and pines.

Durzan and Gupta (1987) first reported somatic embryogenesis in Douglas-fir; they achieved somatic embryo development up to the cotyledonary stage. Extensive research to improve this process has been undertaken mainly in the US (Gupta et al. 1995; Taber et al. 1998; Pullman et al. 2003, 2005; Kong and von Aderkas 2011) and much of this research is still not fully published in scientific journals but has, instead, been patented (Gupta 1996; Gupta and Pullman 1996; Timmis et al. 2011; Kong et al. 2012). In the USA, Weyerhaeuser considers somatic embryogenesis as a core part of their advanced tree improvement strategy for Douglas-fir (Dean et al. 2009). Developing improved

methods for somatic embryogenesis that are free of patent restrictions would be very helpful for France and New Zealand. Recently, there has been significant progress and simplification with respect to initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos (ZEs) of Douglas-fir (initiation frequencies up to 79%) and proliferation of embryonal masses (EMs). Maltose in the proliferation medium improved both sustained growth of EMs as well as consistently increased the production of early SEs (Reeves et al. in press).

As for other conifers, abscisic acid (ABA) enhances the maturation of Douglas-fir SEs (Durzan and Gupta 1987). In published reports and patents for Douglas -fir, racemic ABA was typically used at quite a low range of 20–70 μM (Gupta 1996; Kong and von Aderkas 2011; Kong et al. 2012). Combined with ABA, a reduction in water availability to the cultured cells was found to enhance SEs quality. Initial methods developed in Douglas-fir included the addition of polyethylene glycol (PEG, Mr 4000) as a high molecular weight solute to the maturation medium (Durzan and Gupta 1987; Gupta et al. 1995; Gupta 1996; Gupta and Timmis 2005). Osmotic stress, through water depletion is viewed as an important signal in directing proper embryo development for high germination vigour and conversion to somatic seedlings in many plant species (von Aderkas and Bonga 2000) including conifers (Klimaszewska et al. 2016). Such a reduction in water availability to the cultured cells can also be achieved by physical means, such as increasing the medium gel strength, to produce cotyledonary, mature SEs with low water content similar to that of seedlings (Klimaszewska et al. 2000; Morel et al. 2014a). Considering our previous experiences with pine (reviewed in Lelu-Walter et al. 2016) and larch species (Lelu-Walter and Pâques 2009; Teyssier et al. 2011), this method was applied to embryogenic lines of Douglas-fir in the current work.

Secondary somatic embryogenesis consists of initiation of embryogenic cultures from a single primary explant, usually a mature, cotyledonary SEs, or explants from older somatic seedlings. Secondary somatic embryogenesis is routinely used with broadleaved tree species as a method of long-term management of productive embryogenic lines (recurrent somatic embryogenesis; Merkle and Cunningham 2011; Isah 2016). However, there are currently few reports of secondary somatic embryogenesis for conifer species and most involve the use of cotyledonary SEs. Secondary somatic embryogenesis was first demonstrated using cotyledonary SEs as the explant in *Picea glauca* (Eastman et al. 1991) and *Larix* sp. (Lelu et al. 1994), and later in *Abies numidica* (Vooková and Kormuták 2006), *Pinus pinaster* (Klimaszewska et al. 2009) and *Picea abies* (Uddenberg et al. 2011). Successful initiation of secondary embryogenic cultures and regeneration of secondary somatic plants from older primary somatic seedlings has also been reported for

Larix (60–90-day-old somatic plants, Lelu et al. 1994), *Picea abies* (7–56-day-old to 3-year-old somatic plants, Ruaud 1993; Ruaud et al. 1992; Harvenget et al. 2001), and more recently *Picea glauca* (up to 10-year-old somatic trees, Klimaszewska et al. 2010). One major possible interest of secondary somatic embryogenesis is to enhance the embryo-genic potential of the culture, as first demonstrated for some lines in hybrid larch (Lelu et al. 1994) and maritime pine (Klimaszewska et al. 2009). Secondary somatic embryogenesis was therefore tested in Douglas-fir as a possible way to improve embryogenic potential of initiated lines.

Current maturation protocols lead to the development of cotyledonary SEs that morphologically resemble zygotic embryos (ZEs). SEs are kept in maturation conditions during an arbitrary period before harvesting and subsequent germination. However, such an empirical approach does not provide any information about the quality of SEs with respect to storage compounds. An approach developed in this work, as in other conifers, was to follow the pattern of storage reserve accumulation in cotyledonary SEs during maturation in relation to mature ZEs (Lelu-Walter et al. 2008; Morel et al. 2014b; Teyssier et al. 2014; von Aderkas et al. 2015).

In this paper we report on a significantly improved procedure for somatic embryogenesis in Douglas-fir, leading to high yield of cotyledonary SEs. Although storage protein accumulation remained lower in cotyledonary SEs, the protein pattern (especially major storage proteins) was similar to reference mature ZEs and somatic plants, displaying seedling-like behaviour after germination and transfer to the nursery. A cytological characterization of EMs is provided for the first time in Douglas-fir. SE development during maturation was enhanced through the use of low EMs density and high gellan gum concentration. Secondary embryogenesis could also be used to improve embryogenic potential of low-productivity genotypes (lines).

Materials and methods

Plant material

Pseudotsuga menziesii parental trees used in this study were obtained from provenances originating from Washington, either from North Bend (trees 4440, 4455, and 4456) or Enumclaw (trees 4466, 4474, and 4477). The following controlled crosses were performed at INRA, Orléans, France: 4474 × 4440; 4455 × 4466, and 4456 × 4477. Mature dry seeds (full-sibs, 4474 × 4440) were extracted from the cone scales and cotyledonary zygotic embryos (ZE) were excised from the surrounding megagametophyte. Samples (ZE and megagametophyte) were immediately frozen in liquid nitrogen prior to storage at -80°C for subsequent protein assays.

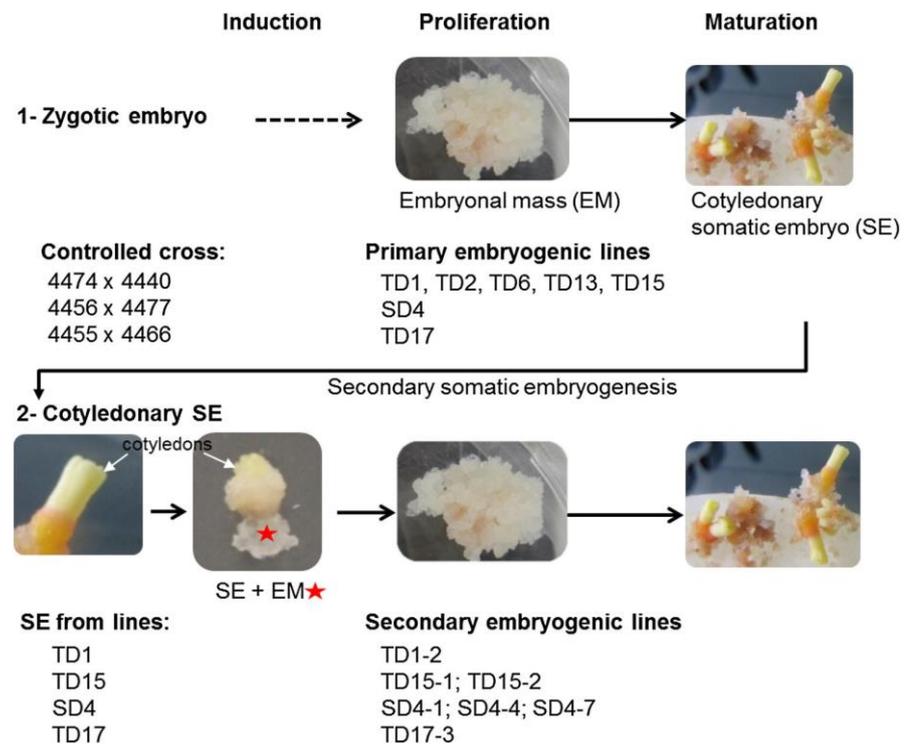
Initiation of primary embryogenic lines and sustained proliferation of embryonal masses

Somatic embryogenesis was induced according to Reeves et al. (in press). Briefly, immature ZEs at the pre-cotyledonary stage were dissected from the megagametophyte and cultured in 90 mm × 16 mm Petri dishes, containing a modified Litvay medium (Litvay et al. 1985) formulation (Glitz) that has been successfully used for both somatic embryogenesis initiation and EMs proliferation of *P. radiata* (Hargreaves et al. 2009, 2011). Basal Glitz medium was supplemented with 2.3 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2.2 μM 6-benzyladenine (BA), 0.087 M sucrose and solidified with 3 g L⁻¹ gellan gum (Phytigel™, Sigma-Aldrich). The resulting EMs were isolated and sub-cultured in clumps every 2 weeks on fresh proliferation medium which consisted of basal Glitz medium supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 2.2 μM BA, 0.087 M maltose (instead of sucrose) and solidified with 4 g L⁻¹ gellan gum. When necessary, the EMs were cultured as a thin layer dispersed onto a filter paper discs, a method initially developed for pine species (Klimaszewska and Smith 1997; Lelu et al. 1999) to promote cell proliferation. Briefly, proliferating EMs were collected and suspended in 4–5 mL of liquid proliferation medium, vigorously shaken to break up the tissue pieces into a fine suspension (Reeves et al. in press), and poured as a thin layer onto a filter paper (Whatman N° 2, diameter 7 cm) in a Büchner funnel. A low-pressure pulse was applied to drain the liquid, and then the filter paper with attached cells was placed on the surface of fresh proliferation medium and cultured in darkness at approximately 23 °C. The EMs density per filter was approximately 300 mg f.m. The pH of each medium was adjusted to 5.8 before autoclaving. Somatic embryogenesis induction from immature ZEs was performed in 2011 to obtain the SD4 embryogenic line (4456 × 4477) and in 2012 to obtain embryogenic lines TD1, TD2, TD6, TD13, TD15 (4474 × 4440) and TD17 (4455 × 4466) (Fig. 1).

Secondary somatic embryogenesis induction

Cotyledonary SEs, 6 to 11 weeks old (see maturation section below), from the primary embryogenic lines TD1, TD15, TD17 and SD4 were isolated and transferred to Glitz initiation medium supplemented with either 4.5 or 9.0 μM 2,4-D, 4.4 μM BA, 0.087 M sucrose and solidified with 4 g L⁻¹ gellan gum. Each secondary EM, developed from a single SE, was then subcultured as previously described. The primary lines TD1, TD15, TD17 and SD4 gave rise to secondary embryogenic lines (TD1-2; TD15-1, TD15-2; TD17-3; SD4-1, SD4-4, and SD4-7 respectively, Fig. 1).

Fig. 1 Genetic origin of the Douglas-fir plant material analysed in this work (primary and secondary embryogenic lines). Embryonal masse (EM) initiation during secondary somatic embryogenesis is shown at the base of the hypocotyl region, above the embryonal root cap (red star)



Histological-cytological observations during the proliferation phase

The viability of early SEs was evaluated and the histology of the EMs was examined. Viability of the SEs was determined by double staining with fluorescein diacetate (FDA; Sigma-Aldrich, Germany) and propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, Germany) as described by Cvikrová et al. (2016). The EMs were re-suspended in liquid proliferation medium and stained with 2.25 μM PI. An equal volume of 0.02% (v/v) FDA was then added. Stained early SEs were observed within 5 min under a confocal laser-scanning microscope (Zeiss LSM 5 Duo, Germany) using the following two filter sets: (i) excitation of fluorescein in viable cells at 488 nm by an Argon/2 laser, emission filter set LP 505–550; (ii) excitation of PI in dead cells at 561 nm by DPSS laser, emission filter set LP 650. Paraffin sections of EMs were prepared for histological observation as described by Vondráková et al. (2015). Briefly, samples were fixed with 50% FAA (formaldehyde/acetic acid/ethanol/water 1/1/9/9, v/v/v/v) for 24 h, gradually dehydrated in an ethanol/butanol series and infiltrated with paraffin wax. Sections (12 μm) were stained with 0.1% (w/v) Alcian blue (Sigma-Aldrich, Germany) in 3% acetic acid and 0.1% (w/v) Nuclear Fast Red in 5% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ as described by Beneš and Kamínek (1973). Preparations were examined using a Zeiss Jenaval transmission light microscope. Images were recorded using a Nikon

DS-5M digital camera and processed using the Nis-Elements AR 3.2 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic) image analysis system.

Maturation conditions

Maturation experiments were conducted with both primary embryogenic lines initiated from immature ZEs and secondary embryogenic lines initiated from cotyledonary SEs. Proliferating EMs collected from filter papers were weighed, dispersed in liquid Glitz medium without plant growth regulators and distributed onto a filter paper disc placed on the surface of Glitz maturation medium supplemented with 0.2M sucrose and various *cis-trans* (\pm)-abscisic acid (ABA) and gellan gum concentrations (see below). Maturation was conducted in darkness at approximately 23 $^{\circ}\text{C}$. The number of mature cotyledonary SEs produced after 8 weeks was counted in each of the Petri dishes and the embryogenic potential (number of SEs per g f.m.) was estimated. The number of shooty embryos (abnormal, greenish SEs, with elongated cotyledons) was also recorded.

Preliminary experiments

Preliminary maturation experiments were conducted to determine factors promoting recovery of cotyledonary SEs. Based on our previous results in different conifer species,

gellan gum concentrations and ABA appeared to be critical factors. In addition, we considered EMs density per filter as a potential factor affecting EMs proliferation during maturation and ultimately maturation yield. A first preliminary experiment was conducted with five embryogenic lines (TD1, TD2, TD6, TD15 and SD4). We tested two gellan gum concentrations (6 or 8 g L⁻¹) and three EMs densities per filter (50, 100 or 200 mg f.m.). There were five Petri dishes per treatment (150 Petri dishes overall). A second preliminary experiment was conducted with two embryogenic lines (TD1 and TD15). We tested three gellan gum concentrations (6, 8 or 10 g L⁻¹), two EMs densities per filter (50 or 100 mg f.m.) and two ABA concentrations (60 or 80 μM). There were five Petri dishes per treatment (100 Petri dishes overall).

Experiment 1: cell density and gellan gum concentrations

Following these preliminary experiments, the effects of gellan gum concentrations (8 or 10 g L⁻¹) and cell density per filter (50 or 100 mg f.m.) on recovery of cotyledonary SEs were further assessed. Experiments were carried out with all seven lines available (TD1, TD2, TD6, TD13, TD15, TD17 and SD4). There were 5–6 Petri dishes per treatment and experiments were repeated twice (302 Petri dishes overall).

Experiment 2: maturation of secondary embryogenic lines vs. primary lines

EMs from primary (TD1, TD15, TD17 and SD4) and secondary lines (TD1-2; TD15-1, TD15-2; TD17-3; SD4-1, SD4-4, and SD4-7) were matured on Glitz maturation medium supplemented with 0.2M sucrose, 60 μM ABA and 10g L⁻¹ gellan gum at a cell density of 50 mg f.m. per filter. There were 5–6 Petri dishes per cell line and experiments were repeated three times (187 Petri dishes overall).

Conversion of somatic embryos to plants

Cotyledonary SEs were removed from the maturation medium and placed horizontally, all in the same orientation, on the surface of germination medium, i.e. a Glitz medium without plant growth regulators, supplemented with 0.087 M sucrose and 4 g L⁻¹ gellan gum. In the germination phase, there were 5–15 SEs per Petri dish. The Petri dishes were tilted at an angle of approximately 35°–40° and placed in darkness for one week to promote hypocotyl elongation and reduce anthocyanin accumulation. SEs were then exposed to a 16-h photoperiod (10 μmol -m⁻² s⁻¹) at 23/20 °C day/night temperatures. The SEs were considered fully germinated as soon as their radicle emerged. Germinated SEs were considered to have become plantlets as soon as their epicotyl was developed with primary needle elongation. Germination and

plantlet recovery were assessed after 4 and 10 weeks, respectively. The plantlets were subcultured once onto fresh germination medium of the same formulation after 6–7 weeks.

Effect of the maturation duration on both germination and plantlet recovery was assessed for the lines TD1, TD13 and TD15. Cotyledonary SEs were harvested after 5, 6, 7 and 8 weeks of maturation. The number of Petri dishes varied from 6 to 10 (86 Petri dishes overall).

The effect of the presence of activated charcoal (AC) in the germination medium on germination and plantlet frequencies was assessed for lines TD1, TD2, TD6 and TD15. Cotyledonary SEs 5–6 weeks old were transferred to germination medium with or without 10 g L⁻¹ AC. The number of Petri dishes varied from 3 to 10 per treatment (46 Petri dishes overall).

Determination of total protein content

To determine whether maturation duration was associated with varying levels of storage reserve in SEs, total proteins were extracted and quantified. Cotyledonary SEs of lines TD1 and TD15 matured on medium containing 0.2 M sucrose, 60 μM ABA and 10 g L⁻¹ gellan gum, were collected after 5, 6, 7 and 8 weeks of culturing. Their protein content was compared with those of mature ZEs from the same family (dry seeds, 4474 × 4440). Methods for total protein extraction, electrophoresis and quantification in ZEs and SEs are described in Teyssier et al. (2011). Briefly, SEs (20 mg f.m.) or ZEs (10 mg f.m.) were ground in liquid nitrogen, homogenized with 0.5 mL of lysis buffer [10% (v/v) glycerol; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-mercaptoethanol; 2% (w/v) poly(vinyl) polypyrrolidone; 50 mM Tris pH 6.8]. The samples were incubated for 5 min at 95 °C, and extracted twice. Protein concentrations were assessed using Bradford assays in which BSA (Bovine Serum Albumin) was the standard.

Gel electrophoresis for protein separation

Extracted total proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12%) with stacking gel (4%) following standard protocols. The gel was stained for proteins with colloidal Coomassie Brilliant Blue G -250 (CBB-G). The main protein bands observed for SEs (7 weeks maturation), ZEs and megagametophyte were cut from a 12% gel and subjected to LC-MS/MS identification.

Protein identification by mass spectrometry

Gel pieces were destained and digested in-gel using trypsin. The peptide mixture was analysed on an Ultimate 3000 nanoLC system (C18 PepMap™ trap column; Dionex,

Amsterdam, The Netherlands) coupled to a LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Data were acquired using Xcalibur 2.1 software in a data-dependent mode. Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a database dedicated to *Pseudotsuga men-ziesii* (54,795 entries, August 2016, <http://pinegenome.org/pinerefseq/>). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.6 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+ 16 Da) was considered as variable modification and carbamidomethylation of cysteines (+ 57 Da) as fixed modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using the Percolator algorithm (Käll et al. 2007) and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false positive rate at peptide level.

Acclimatization of somatic plants

After 14–16 weeks on germination medium, plantlets were transplanted to Dalton’s cutting mix containing 40% bark fibre medium screened, 20% perlite C4, 20% pumice sand and 20% peat. Plantlets were placed in a nursery propagation house with a humidity set point of 90–95%, air conditioning set at 20 °C, fan venting set at 25 °C, bench heating of 18–22 °C and a 16 h photoperiod. After approximately 2 months, plantlets were moved to a lower humidity environment (75%) with no bench heating or photoperiod. The humidity was reduced to the ambient level over a 3–4 week period before moving the plants to a shade house for the final stage of hardening-off prior to planting in the field.

Statistical analysis

Qualitative data for the study of factors influencing maturation of SE was analysed with the R package *breedR* (Muñoz and Sanchez 2015). Mixed models were fitted involving genotypic lines, cell density per filter, gellan gum and ABA concentrations as the main fixed effects. Fixed effect estimates and their corresponding standard errors were subsequently obtained to complement the boxplots. Count data from experiment 2 and conversion of SE to plants were analysed with multiple chi-squared tests against ad-hoc randomized distributions out of 3000 permutations of the data (R Core Team 2016).

For the protein data, statistical analysis was carried out with the R software (version 0.99.903; © 2009–2016 RStudio, Inc.). Variations in total protein content during

maturation were analysed by ANOVA and with multiple comparisons of means with Tukey contrasts ($p < 0.05$).

Results

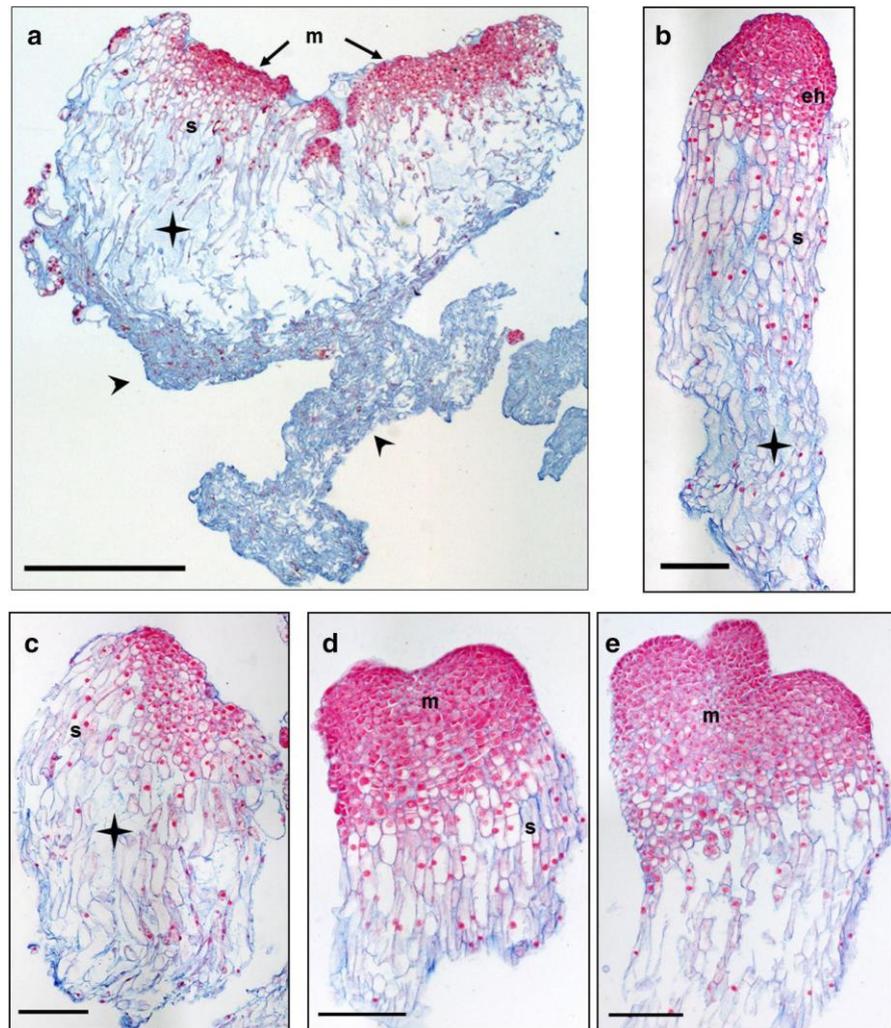
Histological–cytological description of Douglas-fir EMs

The EMs of Douglas-fir consist of different types of early SEs. The most typical structure is a huge polyembryogenic centre (Figs. 2a, 3a). Its broad meristem creates a compact cell “package” together with the suspensor part. Suspensor cells which are directly connected to meristematic cells or within a few rows beneath the meristem are alive, usually narrow and tightly interconnected (Figs. 2d, 3b, c). Further from the meristem and inside the cell “package”, suspensor cells are loosely-joined by a mucilaginous extracellular matrix (Fig. 2a, c, e) and these cells are very often dead (Fig. 3a, c). The cell “package” of the polyembryogenic centre terminates in disintegrated material consisting of the remains of dead suspensor cells (note the lower part of Figs. 2a, 3a, and the left side of Fig. 3b). This material creates an anchor which connects the polyembryogenic centre with the clump of the EMs. Besides the huge polyembryogenic centres (800–1500 µm, measured as the diameter of the cross section), smaller ones (400–700 µm) were also observed (Figs. 2c, 3b) as well as isolated embryos with one large embryonal head (300–400 µm) and a long tightly arranged suspensor (Figs. 2b, 3c). Suspensor cells within the mass of these long suspenders are stuck together by a mucilaginous extracellular matrix (Supplementary data 1). New, very small embryos consisting of several layers of meristematic cells and a few loosely arranged suspensor cells (100–250 µm and smaller) occurred usually beside the disintegrated dead mass of the polyembryogenic centres (Fig. 3c).

Factors influencing maturation of SEs

After 5 weeks of maturation, SEs reached the cotyledonary stage. After 8 weeks of maturation, there were two major and distinct morphological features among the cotyledonary SEs. The first SEs morphotype had elongated hypocotyl and cotyledons surrounding the apical meristem, with a general yellowish colour and only a few embryos turning a greenish colour. These SEs were classed as of high morphological quality (Fig. 4a) similar to the reference ZEs. The second major SEs morphotype exhibited abnormal morphologies, in particular a short hypocotyl and cotyledons (Fig. 4b). These “shooty” embryos were generally greenish in colour and were considered to be poorly developed. Our objective was to determine cultural conditions

Fig. 2 Cytological aspects of the proliferating Douglas-fir embryonal mass. **a** Extensive polyembryogenic centre with meristematic cells (m) joined to intact suspensor cells (s); Space among loosely arranged suspensor cells located below intact suspensor cells is filled with mucilaginous extracellular matrix (star); arrowheads point to disintegrated dead mass anchoring the polyembryogenic centre within the embryonal mass. **b** Individual embryo with embryonal head (eh) joined to compact long suspensor (s); suspensor cells are linked up with mucilaginous extracellular matrix (star). **c** Smaller polyembryogenic centre with loosely arranged suspensor cells (s). Note the mucilaginous extracellular matrix among these cells (star). **d, e** Two successive sections of a polyembryogenic centre showing meristematic cells (m) and tightly joined outer suspensor cells (d) and loosely arranged suspensor cells inside the cell “package” of the polyembryogenic centre (e). Paraffin sections stained with Alcian Blue/Nuclear Fast Red; Scale bars: **a** 500 μm ; **b–e** 200 μm . *m* meristem, *s* suspensor cells, arrowheads—dead cellular mass, star (asterisks)—mucilaginous extracellular matrix



promoting development of high quality cotyledonary SEs while reducing the number of shooty ones.

Preliminary experiments

The objective of these preliminary maturation experiments was to identify factors promoting recovery of cotyledonary SEs. From the first experiment, it appeared that gellan gum concentration had a significant effect ($p = 4.118e - 10$) on SEs production. Embryogenic potential was estimated to a mean of 40 cotyledonary SEs g^{-1} f.m. on medium with 6 g L^{-1} gellan gum and 178 SEs g^{-1} f.m. with 8 g L^{-1} gellan gum (Supplementary data 2). Increasing EMs density per filter paper disc similarly affected maturation yield and resulted in a significant decrease ($p = 3.16e - 13$) in yield of high quality SEs, although this effect was somewhat less important than that of gellan gum concentration

(Supplementary data 2). On average 195, 81 and 51 SEs g^{-1} f.m. were obtained for 50, 100 and 200 mg f.m. EMs per filter, respectively. Mean cotyledonary SEs production was also highly variable among lines from those with low embryogenic potential, as expressed by TD6 (133 SEs g^{-1} f.m.), to high embryogenic potential in the case of e.g. TD1 and TD15 (746 and 409 SEs g^{-1} f.m., respectively, Supplementary data 2). From the second preliminary experiment, it appeared that ABA had no significant effect on development of cotyledonary SEs at the tested concentrations. On average, embryogenic potential was estimated to be 431 and 590 SEs g^{-1} f.m. with 60 and 80 μM ABA, respectively (Supplementary data 3). Again, gellan gum concentration had a significant, strong effect on SEs production. Embryogenic potential was estimated to a mean of only 148 cotyledonary SEs g^{-1} f.m. on medium with 6 g L^{-1} gellan gum and 411 and 745 SEs g^{-1} f.m.

Fig. 3 Viability of cells in proliferating Douglas-fir early somatic embryos. Large (a) and smaller (b) polyembryogenic centres with highly viable meristematic cells and less viable suspensor cells growing out of the dead cell mass (note the red spots indicating nuclei of dead cells). c Individual, somatic embryo with highly viable meristematic cells and a mosaic of viable and dead cells within the suspensor. d Small embryos with highly viable meristematic and suspensor cells growing near or out of the dead mass. Green: fluorescence of fluorescein produced from FDA in viable cells. Red: fluorescence of PI-DNA complexes in non-viable or dead cells. Scale bars = 100 μm

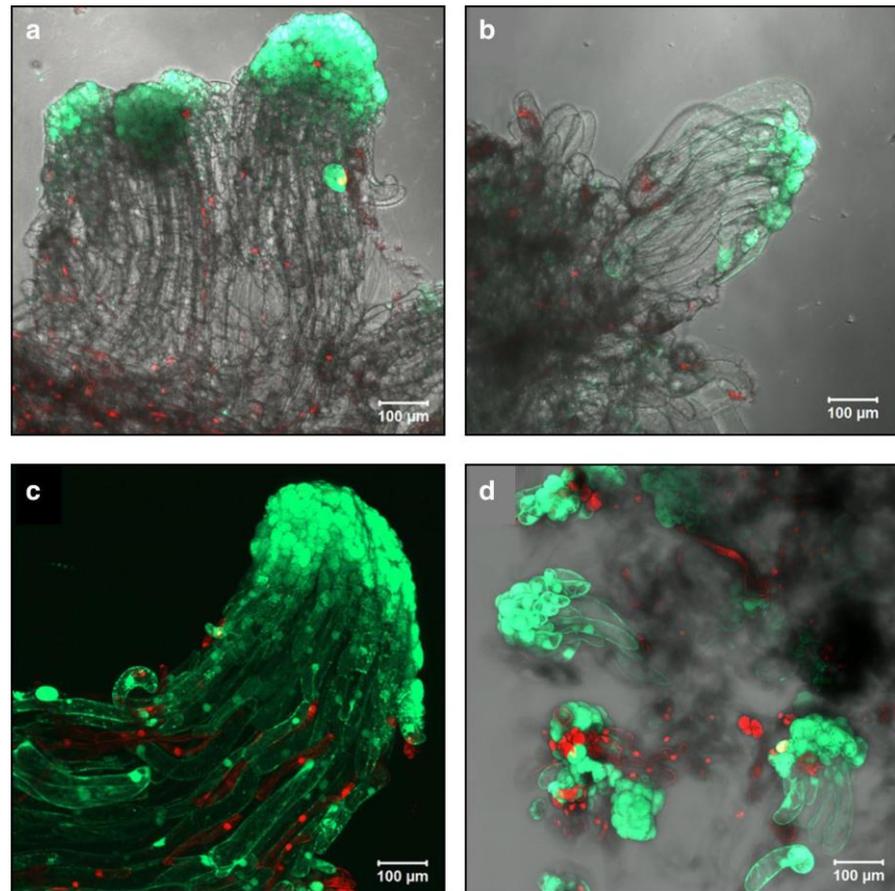
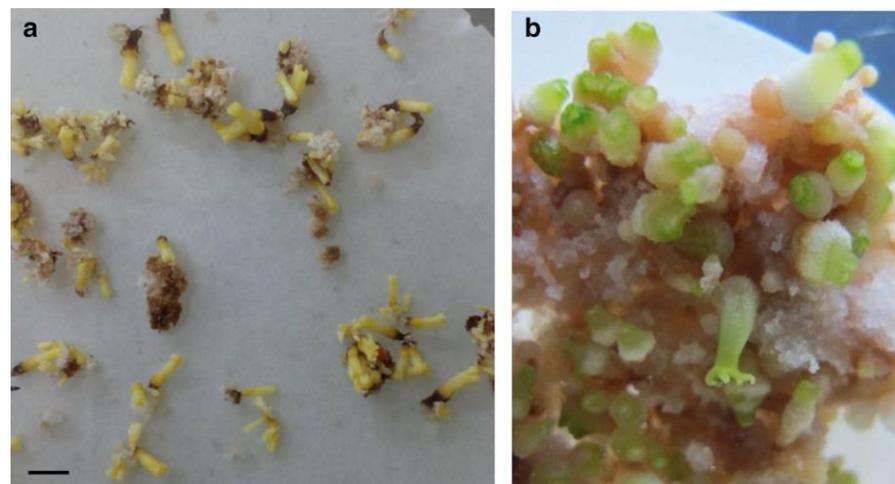


Fig. 4 Somatic embryo of Douglas-fir after maturation for 8 weeks. a Cotyledonary somatic embryos of high-quality morphological standard. b Abnormally developed somatic embryos with a shooty aspect. Note the poorly developed and/or inflated hypocotyl as well as poorly elongated and cotyledons turning a greenish colour. Scale bars: 3 mm (a), 2 mm (b)



with 8 and 10 g L^{-1} gellan gum, respectively (Supplementary data 3A). Concomitantly, the yield in terms of abnormal, shooty embryos significantly decreased as gellan gum concentration increased, varying from 315 shooty

embryos g^{-1} f.m. (6 g -L^{-1} gellan gum) to 219 (8 g -L^{-1}) and 85 (10 g -L^{-1}) (Supplementary data 3B). Interestingly, EM proliferation was apparently reduced when high gellan gum concentration was used (8 or 10 g L^{-1}).

Experiment 1: effect of cell density and gellan gum concentrations

Preliminary experiments helped us with the design of larger maturation experiments involving all available embryogenic lines (TD1, TD2, TD6, TD13, TD15, TD17, SD4). We kept ABA at the lowest concentration (60 μM) and we chose to test further the highest gellan gum treatments (8 or 10 g L^{-1}) and the lowest cell densities (50 or 100 $\text{mg f.m. EM per filter}$).

Mean SEs production significantly varied ($p = 2.2e - 16$) between the lines, as expected from the preliminary experiments, with embryogenic potential estimated to be low for TD2, TD6, TD17 (mean ranging from 27 to 61 SEs g^{-1} f.m.), moderate in the cases of SD4 and TD13 (108 and 455 SEs g^{-1} f.m., respectively) and high for lines TD1 and TD15 (860 and 1544 SEs g^{-1} f.m., respectively, Fig. 5a). The ranking was stable between experiments, although significant variation was observed. Increasing gellan gum concentration was confirmed to improve the recovery of cotyledonary SEs significantly ($p = 6.09e - 7$) with concomitant and significant reduction in the number of shooty embryos (Fig. 5b). This effect is particularly remarkable for embryogenic lines with poor or moderate capacity for SEs production. For example for 50 $\text{mg f.m. EMs per filter}$, SD4 yielded five times more cotyledonary SEs with 10 g L^{-1} instead of 8 g L^{-1} gellan gum (108 and 20 SEs g^{-1} f.m., respectively); for 100 $\text{mg f.m. EMs per filter}$, SD4 yielded 16 times more cotyledonary SEs with 10 g L^{-1} instead of 8 g L^{-1} gellan gum (58.7 and 3.5 SEs g^{-1} f.m., respectively, Fig. 5a). Finally, it was also confirmed during this experiment that reducing cell density to 50 $\text{mg f.m. per filter}$ slightly improved cotyledonary SE recovery in most lines (Fig. 5a).

Experiment 2: embryogenic potential of primary and secondary embryogenic lines

After 3 weeks of induction, secondary (2^{ry}) somatic embryogenesis was initiated from cotyledonary SEs and EMs became easily detectable after 4 weeks of culturing. Embryonal mass developed at the base of the hypocotyl region, above the embryonal root cap (Fig. 1). Cotyledonary SEs from lines TD1, TD15, TD17 and SD4 all produced 2^{ry} EM (Table 1). Successful induction of 2^{ry} somatic embryogenesis was quantified as the percentage of SEs developing EM. There was no significant difference between the two 2,4-D concentrations tested (4.5 vs. 9.0 μM). In contrast, a significant genotype effect was detected (Table 1). The highest response was obtained for line SD4 (overall 25.3% of SEs produced 2^{ry} EM). The response of other lines to the induction treatment was significantly lower, with overall initiation rates in the range 4.4–8.7% (Table 1). Once obtained,

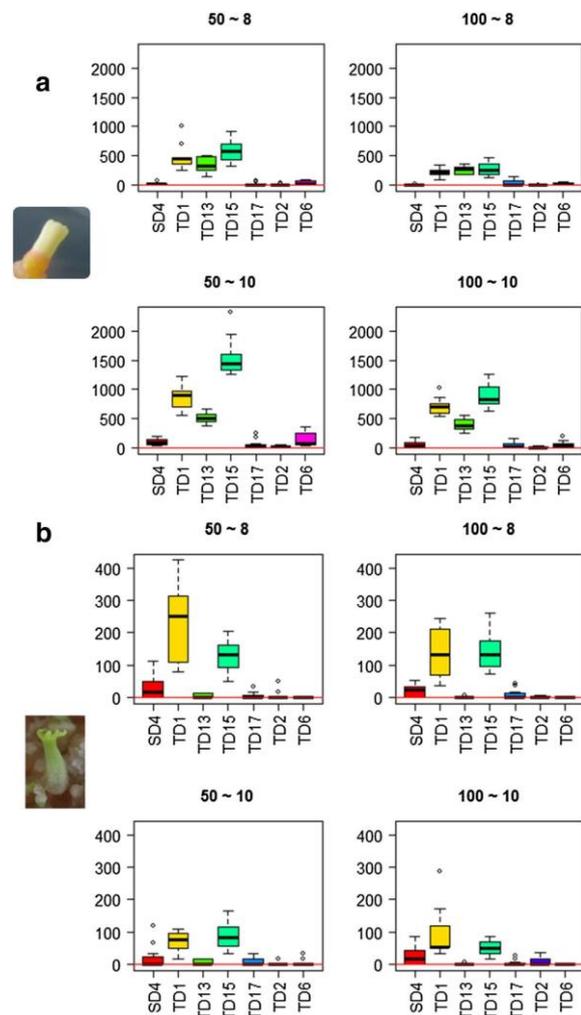


Fig. 5 Effects of gellan gum concentration (8 and 10 g L^{-1}) and cell density on the filter paper (50 and 100 $\text{mg f.m. per filter}$) during maturation of somatic embryos for seven embryogenic lines of Douglas-fir (TD1, TD2, TD6, TD13, TD15, TD17 and SD4). **a** Number of cotyledonary SEs g^{-1} f.m. (= embryogenic potential); **b** number of shooty SEs g^{-1} f.m.

2^{ry} EMs were easily proliferated in the same conditions as primary EMs.

Maturation experiments were then performed in order to compare embryogenic potential of primary and secondary EMs. As previously reported, the observed variation in mean SEs production is again significant among the primary lines. TD1 and TD15 were confirmed to be highly embryogenic (means of 1744 and 1659 SEs g^{-1} f.m., respectively), followed by SD4 (478 g^{-1} SEs f.m.) whereas TD17 exhibited very low embryogenic potential (30 g^{-1} SEs f.m.) (Table 2). Maturation yield of primary and secondary lines from the highly productive genotypes TD1 and TD15 were similarly

Table 1 Mean initiation rates of embryonal masses (EMs) from cotyledonary somatic embryos (SEs) of Douglas-fir according to 2,4-D concentration and embryogenic line

Line	2,4-D concentration (μM)	No. of SEs cultured	No. SEs with EMs	
			Total	%
TD1	4.5	80	10	12.5
	9	160	11	6.8
TD15	4.5	70	2	2.8
	9	110	6	5.4
TD17	4.5	60	7	11.6
	9	30	0	
SD4	4.5	100	31	31.0
	9	70	12	17.1

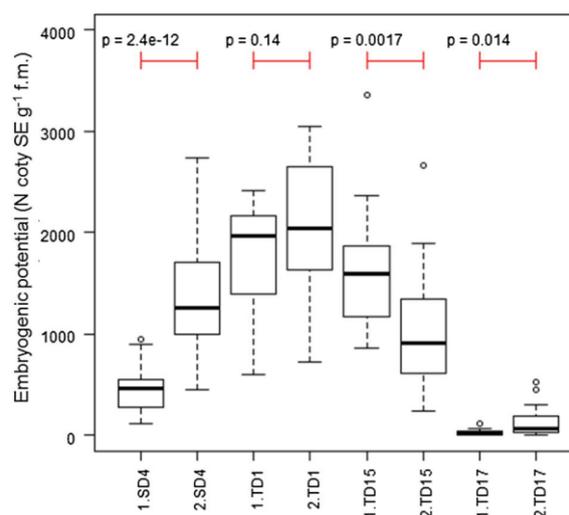
Differences between genotypes: $\chi^2 = 39.69, p = 5 \times 10^{-4}$; differences between 2,4-D concentration: $\chi^2 = 8.86, p = 0.11$

Table 2 Mean yield of cotyledonary somatic embryos (SEs) developed after 8 weeks of maturation from primary (TD1, TD15, TD17, SD4) and secondary (TD1-2, TD15-1, TD15-2, TD17-3, SD4-1, SD4-4, SD4-7) embryogenic lines of Douglas-fir

Line	No. of SEs (g^{-1} f.m.) ($\pm 95\%$ CI)
Primary	
TD1	1744 \pm 323
TD15	1659 \pm 339
TD17	30 \pm 19
SD4	478 \pm 139
Secondary	
TD1-2	2069 \pm 346
TD15-1	1117 \pm 282
TD15-2	931 \pm 312
TD17-3	148 \pm 92
SD4-1	1065 \pm 242
SD4-4	1646 \pm 292
SD4-7	1319 \pm 185

Significance of observed differences between primary and secondary lines is illustrated in Fig. 6

very high, although some significant decrease was observed in the case of TD15 -2^{ty} lines (Fig. 6). Interestingly, -2^{ty} lines of the more recalcitrant genotypes TD17 and SD4 were significantly more productive than corresponding primary lines (Fig. 6). TD17-3 yielded five times more cotyledonary SEs than the original TD17 primary line. SD4-1, SD4-4 and SD4-7 yielded two to three times more cotyledonary SEs than SD4 (Table 2). From these results, it appears that no significant gain could be obtained with an additional cycle when embryonic potential is already high during the first cycle (TD1, TD15). In contrast, for recalcitrant genotypes with low embryonic potential (SD4 and TD17), there are advantages in going through an additional cycle of somatic embryogenesis initiation.

**Fig. 6** Significance of observed differences in embryogenic potential (mean yield in cotyledonary somatic embryos (SE) after 8 weeks maturation) between primary (1) and secondary (2) embryogenic lines from Douglas-fir genotypes SD4, TD1, TD15 and TD17. Observed differences between primary and secondary embryogenic lines are significant for SD4 ($p = 2.4 \times 10^{-12}$), TD15 ($p = 0.0017$) and TD17 ($p = 0.014$) but not significant for TD1 ($p = 0.14$)

Conversion of somatic embryos to plants

Yellowish cotyledonary SEs of a morphologically high standard were harvested from primary lines TD1, TD13 and TD15 after 5, 6, 7 or 8 weeks maturation and immediately transferred onto germination medium. Germination took place rapidly, with SEs turning green and both hypocotyls and cotyledons starting to elongate during the 1-week germination period in the dark. SEs were fully rooted within

2–3 weeks in light conditions and, remarkably, root growth was characterized by a rapid elongation on the surface of the germination medium (Fig. 7 a). Development of the epicotyl and primary needles then happened within 5–6 weeks. Only germinated SEs that developed epicotyls were considered to have become plantlets (Fig. 7 b). The effect of maturation duration on SEs germination and conversion to plantlets was assessed. There was no significant effect on germination frequency. For the three lines tested, germination rates remained similarly high for SEs matured for 5, 6, 7 and 8 weeks (97–100%, Table 3). In contrast, conversion frequency of cotyledonary SEs into plantlets was significantly affected by the maturation duration ($\chi^2 = 59.83, p = 0.0004$), with the highest frequencies (91–98%) obtained when SEs were matured for only 5 weeks. Prolonging the maturation treatment for 1–3 more weeks resulted in a significant reduction in SEs conversion rates (53–89%).

The presence of AC in the germination medium was tested for five lines (TD1, TD2, TD6, TD15). No

Fig. 7 Final steps of somatic embryogenesis in Douglas-fir. Cotyledonary somatic embryo germination (**a** after 1 week in darkness) and conversion to plantlets (**b** after 8 weeks in light) on germination medium. Acclimatized plantlets of Douglas-fir at the nursery propagation house (**c** 6 months post acclimatization) or planted in soil in the field nursery (**d** 3.5 years old). Scale bars: 7 mm (**a**), 10.3 mm (**b**), 40 mm (**c**), 150 mm (**d**)



significant effect could be detected with respect to either germination or plantlet frequencies (Supplementary data 4). After 4 weeks, no significant differences were found between genotypes for germination, which remained similarly high for all lines tested (93–100% Supplementary data 4). For plantlet frequencies, significant differences were found between genotypes, with TD1 showing greater success and TD6 and TD2 the worst performances. Lines TD1 and TD15 exhibited similar conversion rates, as previously reported (Table 3).

Plantlets were acclimatized, as described in the “[Materials and methods](#)” section, in nursery propagation conditions and shade houses. Approximately 6 months after transfer to ex vitro conditions (Fig. 7c) plantlet survival in the shade house ranged from 39 to 100% depending on the genotype (data not shown). A sample of the surviving plantlets was transferred to a nursery bed where they are currently growing (Fig. 7d).

Protein analysis in cotyledonary somatic embryos

To estimate the pattern of protein accumulation in embryos as a function of maturation duration (5–8 weeks), the total protein content was estimated in SEs from two lines (TD1 and TD15) using the Bradford assay. The maturation duration had an important effect on total protein content (ANOVA, $p < 4.16 \times 10^{-13}$), which was found to increase gradually from 5 to up to 7 weeks of maturation in both lines. The maximum value was in the range $120\text{--}150 \mu\text{g mg}^{-1}$ f.m. depending on the genotype (Table 4). It was much lower than the protein content observed in reference, cotyledon-ary ZEs (ca. $300 \mu\text{g mg}^{-1}$ f.m.) as well as megagametophyte (ca. $550 \mu\text{g mg}^{-1}$ f.m.). Total protein extracts were analysed after separation through SDS-PAGE electrophoresis (Fig. 8). Protein extracts from ZEs and megagametophyte excised from dry seeds were loaded as controls. The protein pat-tern changed markedly as a function of maturation duration

Table 3 Germination and plantlet frequencies of cotyledonary somatic embryos (SEs) of Douglas fir according to maturation duration

Genotype	Maturation (week)	No. SEs germinated		No. of Plant-a	
		Total	%	Total	%
TD1	5	60	100	59	98
	6	58	97	44	76
	7	59	98	53	89
TD13	5	59	98	55	93
	6	60	100	44	73
	7	60	100	32	53
	8	58	97	40	69
TD15	5	59	98	54	91
	6	60	100	42	70
	7	60	100	44	73
	8	59	98	50	85

Test of differences between genotypes at the germination stage: $\chi^2 = 0.041$, $p = 0.98$ (non-significant); at the plantlet stage: $\chi^2 = 16.571$, $p = 0.28$ (non-significant). Test of differences between maturation duration classes at the germination stage: $\chi^2 = 2.795$, $p = 0.593$ (non-significant); at the plantlet stage: $\chi^2 = 59.83$, $p = 0.0004$ (significant)

^aGermination rate was estimated after 4 weeks and conversion rate after 10 weeks on germination medium. SEs were considered germinated as soon as radicle elongation occurred. Germinated SEs were considered to have become plantlets as soon as epicotyl development was observed

Table 4 Total protein content in cotyledonary somatic embryos (SEs) from two Douglas-fir embryonic lines (TD1, TD15) according to maturation duration and with reference to protein content in zygotic embryos (ZEs) and megagametophytes from mature dry seeds (same full-sib family as SEs)

Embryo	Maturation duration (week)	Protein content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ f.m.)
SEs—TD1	5	74.93 ± 7^b
	6	96.42 ± 9.5^c
	7	120.87 ± 12.2^{de}
	8	120.38 ± 6.8^{de}
SEs—TD15	8 green	50.44 ± 6^a
	5	105.84 ± 9.3^{cd}
	6	108.58 ± 11^{cd}
	7	150.71 ± 12.4^f
ZEs	8	130.52 ± 4.5^e
		295.25 ± 31.3^g
megagametophytes		551.46 ± 23.4^h

Values are means of five repetitions \pm standard error. Significant differences ($p < 0.05$) in a multiple comparison of means are indicated by different letters

with, in particular, accumulation of a few major bands after 7 and 8 weeks. They were not detectable in green 8-week-old SEs. The electrophoretic migration of these bands was similar to that observed for protein extracts from ZEs and megagametophyte. The protein content of these major bands was analysed using mass spectrometry for SEs matured for 7 weeks and in ZEs and megagametophyte. They were identified as two storage proteins, namely 7S-vilicin-like and legumin-like proteins (Table 5). The latter is an isoform of the 11S-globulin-like protein.

Discussion

Embryonal masses of Douglas-fir: histo-cytological characterization

In this work we propagated EMs of Douglas-fir using modified Glitz medium formulations (Reeves et al. in press), which was selected as the most suitable for the sustained growth. Refinements reported by Reeves et al. (in press) included the use of maltose as the preferred carbon and energy source during proliferation. It has been reported for a number of species, including Douglas-fir (Gupta 1996; Reeves et al. in press), that maltose promotes SEs proliferation.

On this medium, Douglas-fir EMs were composed of compact polyembryogenic centres (400–1500 μm in cross section) tightly joined to a few rows of live suspensor cells, themselves connected to loosely-aggregated material mostly composed of dead suspensor cells and a mucilaginous extracellular matrix. This disintegrated mass of cells apparently anchored the polyembryogenic centre within EMs clumps. Polyembryogenic centres have also been observed in embryonic cultures of other conifer species during proliferation, e.g. *Picea abies* (Vondráková et al. 2010) and *Abies alba* (Vondráková et al. 2011). Nevertheless, polyembryogenic centres of *Picea abies* are usually smaller, dense suspensors consisting of cells that are tightly connected in the proximity of the embryonal heads but loosely arranged in the distal part of the suspensor where the single, usually already dying cells, are released. Robust, long and very compact suspensors are usually characteristic of the polyembryogenic centres of *Abies alba*. The main difference between Douglas-fir and Norway spruce or Silver fir is the presence of dead and disintegrated cell material as an integral part of the polyembryogenic centres in Douglas-fir embryonic culture. Singulated, well-developed early embryos (of up to 400 μm in diameter) may resemble SEs of *Abies alba* (Vondráková et al. 2011) at an early stage of maturation. The compact well-arranged suspensors of this species consist of long cells that are tightly connected to each other. In contrast, cells of the quite robust suspensors of Douglas-fir

Fig. 8 SDS-PAGE total protein pattern of cotyledonary somatic embryos (SEs) from Douglas-fir embryogenic line TD1 collected after 5, 6, 7 or 8 weeks maturation. At the stage 8 weeks, both normal and green SEs were analysed. The protein patterns of reference zygotic embryos (ZEs) and megagametophyte (mega) from mature (dry) seeds of the same full-sib family (4474 × 4440) are shown. The location in the protein pattern of major storage proteins identified by mass spectrometry in SE matured for 7 weeks (see Table 5) is shown by arrows. *MM* protein size standard

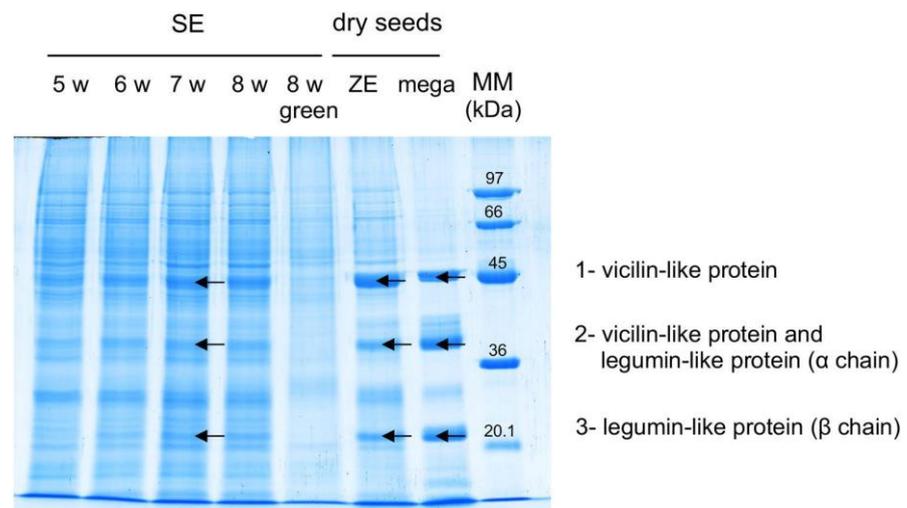


Table 5 Identification of storage proteins from cotyledonary somatic embryos (SEs) matured for 7 weeks (embryogenic line TD1), zygotic embryos (ZEs) and megagametophyte (mega) from mature dry seed (same full-sib family as SEs) of Douglas-fir

Band no.	Tissue	Accession	Protein assignment	Score	% Cov.	# Pep.	MW (kDa) ^a
1	SEs	PSME_00010512-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2, partial	409.2	52.61	30	51.66
1	ZEs	PSME_00010512-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2, partial	622.1	58.26	34	51.66
1	Mega	PSME_00010516-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2, partial	1893.8	50.22	23	51.0
2	SEs	PSME_00024935-RA	Legumin-like storage protein	31.9	31.68	8	29.63
2	SEs	PSME_00010514-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2, partial	90.2	34.72	14	51.41
2	ZEs	PSME_00016325-RA	Legumin-like storage protein	33.1	20.07	5	31.07
2	ZEs	PSME_00010514-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2, partial	98.8	38.21	15	51.41
2	Mega	PSME_00024935-RA	Legumin-like storage protein	100.0	55.73	15	29.6
2	Mega	PSME_00026698-RA	PREDICTED: vicilin-like antimicrobial peptides 2–2	113.4	24.65	15	57.8
3	SEs	PSME_00021143-RA	Legumin-like storage protein	816.1	47.21	17	30.61
3	ZEs	PSME_00021143-RA	Legumin-like storage protein	700.3	35.69	14	30.61
3	Mega	PSME_00025588-RA	Legumin-like storage protein	2014.7	58.78	20	29.6

The excised band number refers to the band label indicated in Fig. 8

% cov. protein coverage percentage, # pep. number of matching peptides

^aTheoretical molecular masses (MW) were taken from the protein used to make the assignment (in Douglas-fir)

SEs are tightly joined together on the external surface but the cells are loosely arranged inside the suspensor and are connected mostly by a mucilaginous extracellular matrix. We previously observed that particularly well-developed and singulated Douglas-fir early embryos with large embryonal heads were frequent on Glitz proliferation medium containing maltose (Reeves et al. in press). Smaller embryos (less than 100–250 μm) with usually very active meristematic cells were also observed within the disintegrated mass of dead cells connected to polyembryogenic centres.

Large polyembryogenic centres can be interpreted as resulting from continuous but incomplete cleavage polyembryony of proembryonal tube cells and/or “budding”

(somatic polyembryogenesis) of the original zygotic embryonal-suspensor mass used for initiation (Hong et al. 1992). In contrast, singulated early SEs may result from either complete cleavage polyembryony or an indirect process involving cellular dedifferentiation and re-differentiation, i.e. somatic embryogenesis (Durzan and Gupta 1987; Hong et al. 1992). Our observations suggested that de novo somatic embryogenesis could occur within the disintegrated mass of suspensor cells through dedifferentiation of a cell. Gupta and Pullman (1996) similarly reported that, in Douglas-fir, frequent and tightly aggregated early stage embryos are interspersed with individual (singulated), well-developed early embryos suggesting again that EM could develop directly

or indirectly through somatic polyembryogenesis or somatic embryogenesis. These authors also reported that somatic polyembryogenesis could result in clumped embryos which could remain united and difficult to convert into singulated cotyledonary SEs. High ABA levels negatively affected polyembryogeny in conifers and promote development of bipolar individual SEs (Hong et al. 1992; Gupta and Pull-man 1996). In the best experimental conditions, early SEs matured at high rate in some lines (> 1000 cotyledonary SEs g^{-1} f.m.), suggesting that cleavage polyembryony is some-what inhibited by the high exogenous ABA levels provided in the maturation medium.

Impaired embryo development in “recalcitrant” genotypes

Embryogenic potential of both primary and secondary embryogenic lines was strongly affected by the genotype of the primary embryogenic line, a recurrent phenomenon previously reported in Douglas-fir (Gupta et al. 1995) and in virtually all conifer species (reviewed in Klimaszewska et al. 2016). All seven tested lines (from three families) produced cotyledonary SEs under improved maturation conditions. However, although mean maturation yield across tested primary lines was high (467 SEs g^{-1} f.m.), huge variation between lines was observed from a low of 30 SEs g^{-1} f.m. (TD17) up to 1744 SEs g^{-1} f.m. (TD1). A similar variation was observed with secondary lines, with maturation yield in the range of 148 (TD17-3) to 2069 (TD1-2) SEs g^{-1} f.m. Maturation ability of any single genotype may be determined by a particular state of active gene expression and associated processes at the developmental stages and transitions from early to late embryogenesis in conifers (reviewed in Trontin et al. 2016a). A number of key genes and processes are likely to be involved in epigenetic regulation as well as tolerance and response to various stresses (Miguel et al. 2016). Genotype recalcitrance to any maturation treatment may, therefore, not only result from unfavourable genetic background but also from inappropriate environmental conditions and physiological state of the EMs culture.

Environmental conditions affecting SEs development: the significant effect of high gellan gum concentration and low cell density

Our objective was to identify major factors promoting normal cotyledonary SEs development in Douglas-fir. We considered key general issues already identified for other conifers (Klimaszewska et al. 2016; Lelu-Walter et al. 2016) such as (i) ABA and (ii) gellan gum concentrations in maturation medium as well as (iii) cell density on the selected support (filter paper). Cotyledonary SEs development was first reported in Douglas-Fir about 30 years ago by Durzan

and Gupta (1987). These authors had already demonstrated the beneficial effect of ABA (at low concentration: $0.5 \mu M$) to control somatic polyembryony (inhibition of cleavage polyembryony) and to promote individual SEs development in cell suspension cultures. In our experiments we did not detect any significant effect of ABA in the range $60\text{--}80 \mu M$, which is the typical ABA concentration effective in many conifers (Klimaszewska et al. 2016). In the present protocol, ABA was used at the lower concentration tested ($60 \mu M$) as high ABA levels for long periods can also increase the frequency of developmentally abnormal embryos (Kong et al. 2012).

SEs maturation was significantly enhanced by increasing the gellan gum concentration from 6 to $10 g L^{-1}$. If the positive effect of high gellan gum has been well described in pines and larches (reviewed in Lelu-Walter et al. 2016; Teyssier et al. 2011), this is the first report demonstrating its value for Douglas-fir. Interestingly, Kong and von Aderkas (2011) used $8 g L^{-1}$ gellan gum in a pretreatment maturation medium for inducing cryotolerance of immature SEs in Douglas-fir.

Increasing the gellan gum from 6 to $10 g L^{-1}$ not only significantly improved cotyledonary SEs yield but also SEs morphological behaviour. In addition, EMs proliferation appeared to be reduced together with cells exhibiting a dried appearance on maturation medium with high gellan gum. Overproliferation of cell/EMs during the maturation step in *Pinus pinaster* has been suggested to have antagonistic effects on SEs development (Morel et al. 2014a). Using the highest gellan gum concentrations tested (8 and $10 g L^{-1}$ gellan gum), most SEs were well-shaped with elongated hypocotyls and cotyledons. In such improved maturation conditions (compared with $6 g L^{-1}$ gellan gum), a reduced frequency of abnormal, “shooty” embryos (short hypocotyl and cotyledons) was concomitantly observed. Abnormal SEs development and/or quality (low ability for conversion into plantlets) is a critical problem that has been previously reported in Douglas-fir as well as in other conifers following various maturation treatments such as different ABA or carbohydrate contents (e.g. Kong et al. 2012; Gupta and Timmis 2005). In *Picea abies* and *Pinus sylvestris*, abnormal SEs development (i.e., malformed, aborted and/or fused cotyledons) has been reported (Hakman et al. 2009; Abrahamsson et al. 2012). It has been suggested that the resulting high frequency of supernumerary suspensor cells in early SEs promoted abnormal SEs development. This degeneration pattern could take place very early in the induction phase when somatic embryogenesis is established from immature ZEs at the cleavage polyembryony stage (Abrahamsson et al. 2017). Obviously, this was not the case in Douglas-fir during our experiments since we were able to reduce significantly the frequency of abnormal SEs using high gellan gum during maturation. In the tested conditions, the yield of abnormal shooty embryos decreased from ca. $350\text{--}420$ SEs g^{-1} f.m.

(6 g L^{-1}) to $150\text{--}300\text{ SEs g}^{-1}$ (8 g L^{-1}) and less than 100 SEs g^{-1} (10 g L^{-1}).

Besides a significant gellan gum concentration effect, cell density also had a significant impact on maturation yield and quality of cotyledonary SEs, although this effect was less important than that observed for gellan gum concentration. Reducing the cell density to $50\text{ mg f.m. per filter}$ significantly reduced the frequency of abnormal shooty cotyledonary embryos, concomitantly increasing the yield of normal cotyledonary SEs. We previously showed that EMs proliferation appeared to be reduced on high gellan gum maturation medium. The effect of low water availability as a culture constraint to activate ABA-mediated molecular and physiological responses to promote embryo development (Morel et al. 2014a) could be even more important when EMs are plated at low density, in a more uniform cell layer. Plating cells in a thin layer is thought to increase the likelihood that most cells are exposed to the physical and chemical conditions necessary for maturation.

Secondary somatic embryogenesis from cotyledonary SEs as a way to improve maturation ability of low-performance embryogenic lines

The success of somatic embryogenesis typically rapidly declines in conifer species with age and/or phase-change related effects (Klimaszewska et al. 2016; Trontin et al. 2016b). Using cotyledonary SEs, a high induction frequency of EMs has been obtained in *Larix × leptoeuropaea* (98%, Saly et al. 2002), as well as in maritime pine (13.6–81.8%, Klimaszewska et al. 2009), whereas comparatively low rates have been obtained in *Abies numidica* (5.5–9.0%, Vooková and Kormuták 2006). In this work, we initiated secondary somatic embryogenesis from cotyledonary SEs in Douglas-fir. All tested genotypes responded to the initiation treatment, although initiation rates were quite low, i.e. in the range 2.4–25.3%. Our results confirmed previous observations that secondary EMs can be induced following careful examination of explants to avoid false-positive lines (i.e. regrowth of residual embryonal cells attached to cotyledonary SEs, Klimaszewska et al. 2009). Interest in secondary somatic embryogenesis is about enhancing the embryogenic potential of the embryogenic cultures, as demonstrated in hybrid larch and maritime pine (Lelu et al. 1994; Klimaszewska et al. 2009). It is also a way to restore the embryogenic potential of lines affected by ageing effects after subculturing for several months, as observed in some conifer species such as pine. This can be particularly useful if the line is not cryopreserved or if the cryopreserved stock must be carefully managed (Klimaszewska et al. 2009). In Douglas-fir we did not detect any ageing effect after continuous culture of lines for 5 years. Therefore, possible practical applications of secondary somatic embryogenesis in this species

relate to enhancing embryogenic potential. Secondary lines displayed significantly higher embryogenic potential when the original lines exhibited poor maturation ability, i.e. SD4 (mean of $1343\text{ vs. }478\text{ SEs g}^{-1}\text{ f.m.}$), and TD17 ($148\text{ vs. }30\text{ SEs g}^{-1}\text{ f.m.}$). In contrast, no improvement could be obtained for already highly productive lines (TD1, TD15) with both primary and secondary lines producing over 1000 cotyledonary SEs $\text{g}^{-1}\text{ f.m.}$ In maritime pine, Klimaszewska et al. (2009) described a similar variable effect of secondary somatic embryogenesis on embryogenic potential of original lines compared with primary lines.

Improved embryogenic potential of the less productive genotypes after a second cycle of somatic embryogenesis initiation may result from differential expression of embryogenesis-related genes through epigenetic mechanisms. Genetic mechanisms (accumulation of mutations in embryogenesis-related genes) during somatic embryogenesis cannot be excluded (reviewed in Miguel et al. 2016), but these are unlikely to affect multiple embryogenesis-related genes simultaneously.

The question of SEs quality has changed little over the years. It is generally accepted that good quality SEs correspond to embryos with a very high germination rate, producing vigorous somatic seedlings. Thus, SE quality is often assessed by the yield of normal-shaped SEs produced and their ability to germinate. However, depending on the species, the ability to germinate does not necessarily indicate the future vigour of the somatic seedlings, as shown by the germination frequencies in this study of Douglas fir. It was very close to 100%, whatever the maturation stage of the SEs (Table 3). However, numerous studies have shown that an analysis of the content, and more precisely of the storage reserves, allows prediction of the final behaviour of the germinated embryos and their vigour, since these parameters are correlated. This is why seed producers often consider the weight of 1000 seeds (International Seed Testing Association recommendation). Recently, Noah et al. (2013) also stated that maturation is a critical feature for evaluating the potential quality and viability of somatic seedlings. Thus, in this study we measured the protein content in SEs during maturation. It increased during the last weeks of maturation, reaching a maximum at 7 weeks. Beyond this time, the content was stable or decreased. This phenomenon was more marked in green embryos that had already started germinating, as previously reported in Scots pine (Lelu -Walter et al. 2008). This process leads to a degradation of the storage proteins as confirmed by the corresponding protein profile (Fig. 8). Based on these two results, we could conclude that the Douglas-fir SEs completed their maturation after 7 weeks. Even if the SEs, after 5 or 6 weeks of maturation, appeared morphologically similar, their intrinsic quality was lower on the basis of their protein content. Nevertheless, at the

end of the maturation process, the 7-week SEs of Douglas-fir had a much lower protein content than that in mature ZEs or megagametophyte of dry seeds. This difference observed between both types of embryos differed from previous reports for Scots pine (Lelu-Walter et al. 2008), and hybrid larch (Teyssier et al. 2014; von Aderkas et al. 2015). Aberlenc-Bertossi explained such a difference on the basis of a lower accumulation of storage transcripts in SEs and protease activity, for storage mobilization, present throughout somatic embryogenesis but absent in the zygotic counterpart (Aberlenc-Bertossi et al. 2008). More basically, the difference would have been reduced if the comparison had been made with ZEs from fresh seeds (Morel et al. 2014b). The electrophoretic comparison of the proteins present in 7-week SEs and mature ZEs confirmed their equivalent quality, with major storage proteins present. We identified them and confirmed their hypothetical identities in the ZEs and megagametophyte in Douglas-fir (Green et al. 1991) as vicilin-like protein and legumin-like protein (Fig. 8).

Seeds can exhibit high levels of germination followed by low seedling vigour. We observed this in our study, with a significant difference in the total number of plantlets according to the duration of maturation ($p < 0.0004$), whilst the level of germination exhibited no difference. More surprisingly the SEs that had accumulated more storage proteins (7 weeks maturation) produced fewer plantlets than SEs matured for 5 weeks (Table 4). The maturation process consists of a phase of cell development leading to the production of cotyledonary embryos and a strict maturation phase during which the cotyledonary SEs accumulate energy reserves (see the increase in the protein content between 5 and 7 weeks) and acquire tolerance to desiccation. In the seed, the embryo then enters dormancy, and germination cannot take place before the dormancy is broken by stratification. We can then assume that the increase in protein content is counteracted by onset of dormancy. When storage reserves were high (7-week SEs), germination followed by plantlet conversion was less affected by SEs desiccation (Table 3). Another factor to consider is the progressive and sequential mobilization of the storage proteins during germination according to the nature of the storage protein (Forward et al. 2001), first the vicilin-like protein and then the legumin-like protein, the latter being more abundant. It is, therefore, to be expected that the total protein content has a greater influence on the number of plantlets obtained than the number of germinated SEs.

According to Terskikh et al. (2005) "Seedling vigour and the potential for early growth following germination is ultimately dependent upon processes that occurred earlier (during conifer seed development)...". In crops where seedling vigour is crucial, monitoring of the SEs maturation by storage protein deposition has been reported (Sterk and de Vries

1993). Therefore, in the field of conifer reproduction, any development of maturation protocol should be accompanied by a physiological analysis of SEs.

Current experiments are being conducted to examine improvement in the quality of plantlets prior to transfer to the ex-vitro environment in order to increase the likelihood of successful acclimatization.

Conclusions

In this work, somatic embryogenesis protocol for Douglas-fir was refined, resulting in enhanced embryogenic potential at the maturation step. Key factors include: high gellan gum content, low cell density per filter paper disc on the maturation medium and also initiation of secondary embryogenic lines. We demonstrated, for the first time in this species, that secondary somatic embryogenesis can be induced from mature, cotyledonary SEs. Interestingly, secondary EM cultures were able to produce a significantly higher number of cotyledonary SEs compared with the original, primary EM cultures. This effect was highlighted in the specific case of the less productive genotypes (TD17, SD4 in this study) and must now be confirmed for a wider range of embryogenic lines. Significant practical implications are expected as a result of the work in our laboratories in France and New Zealand, since low embryogenic potential is one of factors affecting breeding (field archives, clonal tests) and deployment of improved varieties (variety testing, production up-scaling) through somatic embryogenesis in Douglas-fir and other conifers (Lelu-Walter et al. 2013, 2016).

Based on the above and previously published data (Reeves et al. in press), an efficient method for production of large quantities of plants from a number of genotypes was developed and is available in the public domain. We recommend the following:

- Culturing of immature zygotic embryos on Glitz induction medium supplemented with 2.3 μM 2,4-D, 2.2 μM BA, 0.087 M sucrose and solidified with 3 g L^{-1} of gellan gum (Phytigel[®]), without subculturing during the whole initiation period.
- Proliferation of the EMs on a filter paper disc to obtain a rapid increase in tissue fresh mass, using Glitz medium supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 2.2 μM BA, 0.087 M maltose and solidified with 4 g L^{-1} of gellan gum.
- Maturation in darkness on a filter paper disc for 8 weeks on Glitz basal medium supplemented with 0.2 M sucrose, 60 μM ABA and 10 g L^{-1} gellan gum. No subculturing is necessary during the entire maturation period. Cell density on the filter may be adjusted in the range 50–100 mg per filter.

- For poorly-productive embryogenic lines, we recommend initiating secondary somatic embryogenesis. Cotyle-donary SEs 5–6 weeks old are transferred to induction medium i.e. Glitz supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 4.4 μM BA, 0.087 M sucrose and solidified with 4 g $\cdot\text{L}^{-1}$ of gellan gum.
- Mature cotyledonary SEs are harvested after 7 weeks of maturation, the best period to achieve the desired results.
- Germination of cotyledonary SEs on plant growth regulator-free Glitz medium, in darkness for an initial 7 days, followed by exposure to dim light.
- Transfer of plants from the Petri dishes to ex-vitro conditions during the vigorous growth phase, and acclimatization under shade house conditions (initially with high relative humidity). We were able to acclimatize a number of plants, however, further optimization of this step is required.

Acknowledgements This research was partially funded by Future Forests Research Limited and a grant from the French Ministry of Foreign Affairs and the French Ministry of Higher Education and Research, and Technology Support Programme and Core funding provided by The Ministry of Business, Innovation and Employment in New Zealand through the France/New Zealand Science Co-operation Programme Dumont d'Urville (No. 25815PH). We would like to acknowledge the support of the University of Limoges, and The Chair of Excellence Forest Resources and Wood Uses, for the grant to Florian Gautier.

Author contributions MALW designed and coordinated the study, carried out somatic embryogenesis and drafted the manuscript. FG participated in somatic embryogenesis and helped to draft the manuscript. KE performed histological and microscopic analyses and drafted the manuscript. LS performed the statistical analyses and drafted the manuscript. CT performed protein analysis and drafted the manuscript. AML carried out mass spectrometric analysis and helped to draft the manuscript. CLM carried out somatic embryogenesis and collected the material. CH participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. JFT participated in the design of the study and drafted the manuscript. CR performed English editing and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aberlenc-Bertossi F, Chabrilange N, Duval Y, Tregear J (2008) Contrasting globulin and cysteine proteinase gene expression patterns reveal fundamental developmental differences between zygotic and somatic embryos of oil palm. *Tree Physiol* 28:1157–1167
- Abrahamsson M, Valladares S, Larsson E, Clapham D, von Arnold S (2012) Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109:391–400

- Abrahamsson M, Valladares S, Merino I, Larsson E, von Arnold S (2017) Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 53:88–96
- Beneš K, Kamínek M (1973) The use of aluminium lake of nuclear fast red in plant material successively with alcian blue. *Biol Plant* 15:294–297
- Bonga JM (2015) A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Can J For Res* 45:1–5
- Cvikrová M, Vondrakova Z, Eliášová K, Pešek B, Trávníčková A, Vágner M (2016) The impact of UV-B irradiation applied at different phases of somatic embryo development in Norway spruce on polyamine metabolism. *Trees* 30:113–124
- Dean CA, Welty DE, Herold GE (2009) Performance and genetic parameters of somatic and zygotic progenies of coastal Douglas-fir at 71/2 -years across Washington and Oregon, USA. *Silvae Genetica* 58:212–219
- Dungey HS, Low CB, Lee J, Miller MA, Fleet K, Yanchuk AD (2012) Developing breeding and deployment options for Douglas-fir in New Zealand: breeding for future forest conditions. *Silvae Genetica* 61:104–115
- Durzan DJ, Gupta PK (1987) Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Sci* 52:229–235
- Eastman PAK, Webster FB, Pitel JA, Roberts DR (1991) Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis. *Plant Cell Rep* 10:425–430
- Forward BS, Tranbarger TJ, Misra S (2001) Characterization of proteinase activity in stratified Douglas-fir seeds. *Tree Physiol* 21:625–629
- Green MJ, McLeod JK, Misra S (1991) Characterization of Douglas-fir protein body composition by SDS-PAGE and electron microscopy. *Plant Physiol Biochem* 29:49–55
- Gupta PK (1996) Method for reproducing conifers by somatic embryogenesis using a maltose enriched maintenance medium: US Patent No. 5,563,061. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC
- Gupta PK, Pullman GS (1996) Method for reproducing Douglas-fir by somatic embryogenesis. U.S. Patent No. 5,482,857. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC
- Gupta PK, Timmis R (2005) Mass propagation of conifer trees in liquid cultures—progress towards commercialization. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:339–346
- Gupta PK, Timmis R, Timmis KA, Carlson WC, Welty EDE (1995) Somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 303–313
- Hakman I, Hallberg H, Palovaara J (2009) The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree Physiol* 29:483–496
- Hargreaves CL, Reeves CB, Find JI, Gough K, Josekutty P, Skudder DB, Van der Maas SA, Sigley MR, Menzies MI, Low CB, Mullin TJ (2009) Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. *Can J For Res* 39:1566–1574
- Hargreaves CL, Reeves CB, Find JI, Gough K, Menzies MI, Low CB, Mullin TJ (2011) Overcoming the challenges of family and genotype representation and early cell line proliferation in somatic embryogenesis from control-pollinated seeds of *Pinus radiata*. *NZ J Forest Sci* 41:97–114

- Harvengt L, Trontin JF, Reymond I, Canlet F, Pâques M (2001) Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta* 213:828–832
- Hermann RK, Lavender DP (1999) Douglas-fir planted forests. *New Forest* 17:53–70
- Hong L, Boulay M, Gupta PK, Durzan DJ (1992) Variations in somatic polyembryogenesis: induction of adventitious embryonal-suspensor masses on developing Douglas-fir embryos. In: Ahuja MR (ed) *Woody plant biotechnology*, vol 210. Plenum Press, New York, pp 105–121
- Isah T (2016) Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol Plant* 38:118–139
- Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* 4:923–925
- Klimaszewska K, Smith D (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol Plant* 100:949–957
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR, Sutton BCS (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36:279–286
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter M-A (2009) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 45:20–33
- Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge RG (2010) Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression pro-file of 11 genes followed during tissue culture process. *Planta* 233:635–647
- Klimaszewska K, Hargreaves CL, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germanà MA, Lambardi M (eds) *In vitro embryogenesis in higher plants*, chap. 7, methods in molecular biology. Springer, New York, pp 131–162. doi:10.1007/978-1-4939-3061-6_8
- Kong L, von Aderkas P (2011) A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:115–125
- Kong L, Denchev P, Radley R, Lobatcheva II, Attree SM (2012) Method of culturing conifer somatic embryos using S (+)- abscisic acid. U.S. Patent No. US 8,124,412 B2. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC
- Lelu M-A, Klimaszewska K, Charest P (1994) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can J For Res* 24:100–106
- Lelu M-A, Bastien C, Drugeault A, Gouez ML, Klimaszewska K (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol Plant* 105:719–728
- Lelu-Walter M-A, Pâques LE (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding. *Ann For Sci* 66:104
- Lelu-Walter M-A, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2008) Clonal plant production from self- and cross- pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92:31–45
- Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Gene Genomes* 9:883–899
- Lelu-Walter M-A, Klimaszewska K, Miguel C, Aronen T, Hargreaves C, Teyssier C, Trontin J-F (2016) Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus* spp.: bottlenecks and recent advances. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Somatic embryogenesis—fundamental aspects and applications*, chapter 19. Springer, Switzerland, pp 319–365. doi:10.1007/978-3-319-33705-0_19
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4:325–328
- Merkle S, Cunningham M (2011) Southern hardwood varietal forestry: a new approach to short-rotation woody crops for biomass energy. *J Forest* 109:7–14
- Miguel CM, Rupps A, Raschke J, Rodrigues AS, Trontin J-F (2016) Impact of molecular studies on somatic embryogenesis development for implementation in conifer multi-varietal forestry. In: Park Y-S, Bonga JM, Moon H- K (eds) *Vegetative propagation of forest trees*. Korea Forest Research Institute, Seoul, pp 373–421. ISBN 978-89-8176-064-9
- Miller JT, Knowles FB (1994) Introduced forest trees in New Zealand: recognition, role and seed source. *Forest Research Bulletin* No. 124. No. 14. Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco
- Ministry of Agriculture and Forestry (2011) A national exotic forest description as at April 15, 2010. Retrieved 27 Nov 2011 from <http://www.maf.govt.nz/newsresources/publications>
- Morel A, Teyssier C, Trontin JF, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, Le Metté C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, Lelu-Walter MA (2014a) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol Plant* 152:184–201
- Morel A, Trontin JF, Corbineau F, Lomenech A -M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu -Walter M-A (2014b) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240:1075–1095
- Muñoz F, Sanchez L (2015) breedR: statistical methods for forest genetic resources analysts. R package version 0.11. <https://github.com/famuvie/breedR>
- Noah AM, Niemenak N, Sunderhaus S, Haase C, Omokolo DN, Winkelmann T, Braun H-P (2013) Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J Proteomics* 78:123–133
- Pullman GS, Zhang Y, Phan BH (2003) Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep* 22:96–104
- Pullman GS, Mein J, Johnson S, Zhang Y (2005) Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep* 23:596–605
- R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>
- Reeves C, Hargreaves C, Trontin J-F, Lelu-Walter M-A (2017) Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. *Trees* (in press)
- Ruad JN (1993) Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7, 56-day-old *Picea abies*. *Plant Sci* 92:213–220
- Ruad JN, Bercetche J, Pâques M (1992) First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Rep* 11:563–566
- Saly S, Joseph C, Corbineau F, Lelu M-A, Côme D (2002) Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul* 37:287–294



- Shelbourne CJA, Low CB, Gea LD, Knowles RL (2007) Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 5: genetic improvement of Douglas-fir in New Zealand. *Aust For-est* 70:28–32
- Sterk P, de Vries S (1993) Molecular markers for plant embryos. In: Redenbaugh K (ed) *Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press, Boca Raton, pp 115–132
- Taber RP, Zhang C, Hu WS (1998) Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Can J Bot* 76:863–871
- Terskikh VV, Feurtado JA, Borchardt S, Giblin M, Abrams SR, Ker-mode AR (2005) In vivo ^{13}C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. *J Exp Bot* 56:2253–2265
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A-M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter MA (2011) Increased gel-ling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol Plant* 141:152–165
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter MA (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analysis. *Physiol Plant* 150:271–291
- Timmis R, Grob JA, Gupta PK, Rayfield SD (2011) Methods for increasing germination vigor by early singulation of conifer somatic embryos. U.S. Patent No. 7,964,404. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC
- Trontin J-F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A (2016a). Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germanà MA, Lambardi M (eds) *In vitro embryogenesis in higher plants, methods in molecular biology*, vol 1359, chapter 8. Springer, New York, pp 167–207. doi:10.1007/978-1-4939-3061-6_8
- Trontin J-F, Aronen T, Hargreaves C, Montalbán IA, Moncaleán P, Reeves C, Quoniou S, Lelu-Walter M-A, Klimaszewska K (2016b) International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. In: Park Y-S, Bonga JM, Moon H-K (eds) *Vegetative propagation of forest trees*. Korea Forest Research Institute Seoul, Korea, pp 211–260. ISBN 978-89-8176-064-9
- Uddenberg D, Valladares S, Abrahamsson M, Sundström JF, Sundås-Larsson A, von Arnold S (2011) Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta* 234:527–539
- von Aderkas P, Bonga JM (2000) Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol* 20:921–928
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier JP, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M-A (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinii*). *Ann Bot* 115:605–615
- Vondráková Z, Cvikrová M, Eliášová K, Martincová O, Vágner M (2010) Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiol* 30:1335–1348
- Vondráková Z, Eliášová K, Fischerová L, Vágner M (2011) The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Cent Eur J Biol* 6:587–596
- Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M, Martincová O, Cvikrová M (2015) Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant Growth Regul* 75:405–414
- Vooková B, Kormuták A (2006) Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. *Biol Plant* 50:785–788



III.3. Gautier et al. (to be Submitted) : Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.].

Florian Gautier^{1,2}, Caroline Teyssier^{1*}, Kateřina Eliášová³, Jean-Charles Leplé^{1,4}, Zuzana Vondráková³, Anne-Marie Lomenech⁵, Claire Le Metté¹, Philippe Label⁶, Guy Costa², Jean-François Trontin⁷, Marie-Anne Lelu-Walter¹

To be submitted to BMC plant biology

1 AGPF, INRA, F-45075 Orléans, France

2 Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 123 avenue Albert Thomas, 87000 Limoges, France

3 Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Rozvojová 263, Praha 6-Lysolaje, 165 02, Czech Republic

4 BIOGECO, INRA, Université de Bordeaux, 33610 Cestas, France

5 Université de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, F-33000 Bordeaux, France

6 Université Clermont Auvergne, INRA, PIAF, F-63000 Clermont-Ferrand, France

7 FCBA, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, Campus Forêt-Bois de Pierroton, 71 route d'Arcachon, 33610 Cestas, France

*Corresponding author: caroline.teyssier@inra.fr

Abstract

Background

Repetitive somatic embryogenesis from cotyledonary somatic embryos (SEs) has been obtained for two unrelated Douglas-fir genotypes. Two successive cycles of induction resulted in secondary (2^{ry}) and tertiary (3^{ry}) embryogenic lines. Compared to primary lines (1^{ry}) initiated from zygotic embryos, 2^{ry} lines exhibited significantly higher embryogenic potential (yield SEs g⁻¹ f.w.) for both genotypes SD4 (2155 vs 477) and TD17 (240 vs 29). Interestingly a similar trend was observed when comparing SD4 2^{ry} and 3^{ry} lines (2400 vs 3921). The origin of such differences in embryogenic potential is unknown. Our objective was to study changes induced by repetitive somatic embryogenesis by comparing 1^{ry} vs 2^{ry} and 2^{ry} vs 3^{ry} lines at the histological and molecular levels (LC-MS/MS-based proteomics).

Results

The cellular organization of proliferating lines was dramatically improved following repetitive somatic embryogenesis, notably in genotype SD4. The frequency of compact polyembryogenic centres with elongated suspensor and apparently cleavable embryonal heads as well as singulated, bipolar SEs was increased in 2^{ry} and (even more) 3^{ry} lines. Among 2300-2500 proteins identified after both cycles, 162 (2^{ry} vs 1^{ry}) and 228 (3^{ry} vs 2^{ry}) were significant with special emphasis on “Proteolysis” and “Catabolic process” categories of Gene Ontology (GO). Strikingly, a down-up pattern of expression was observed for most significant proteins (> 70 %) after repetitive somatic embryogenesis. GO category enrichment analyses highlighted such opposite adjustments for global protein pattern and particularly for processes involved in chitin catabolism, lignin and L-phenylalanine metabolisms, phenylpropanoid biosynthesis, oxidation-reduction, and response to karrikin. Sub Network Enrichment Analyses highlighted the

interactions between significant proteins and plant growth regulators or secondary metabolites after both first (especially jasmonic acid, flavonoids) and second embryogenesis cycle (especially salicylic acid, abscisic acid, lignin). Specific protein networks established after each induction affected the same "Plant development" and "Defense response" biological processes although in a more pronounced way after the third somatic embryogenesis that could explain top embryogenic performance of 3^{ty} lines.

Conclusions

This is the first report in conifers describing cellular and molecular changes occurring after repetitive somatic embryogenesis resulting in an improved status of 3^{ty} lines. Each repetition reinforces a better structuration and singularization of EMs through a different activation of the plant growth regulator pathways.

Keywords: Douglas-fir, embryogenic potential, somatic embryogenesis induction, proteomic, cytology, plant growth regulators.

Abbreviations: SE: somatic embryo; 1^{ty}: primary; 2^{ty}: secondary; 3^{ty}: tertiary; ABA: abscisic acid; d.w.: dry weight; EMs: embryonal masses; f.w.: fresh weight; LC-MS/MS: Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; GO: gene ontology; NEC: non-embryogenic cell; SNEA: sub network enrichment analysis; PCD: programmed cell death; ROS: reactive oxygen species.

Background

Plant somatic embryogenesis is the process of developing embryos from vegetative cells, usually *in vitro*. Whenever possible, it is the preferred option for true-to-type vegetative propagation of any selected genotype as both apical and root embryonic meristems are early delineated during establishment of embryo body plan. In contrast to other vegetative propagation technologies there is therefore no need for adventitious organogenesis. In recent years, there is a growing number of tree species with significant achievements and new insights at various somatic embryogenesis steps, from initiation of embryogenic culture to maturation of high-quality somatic embryos (SEs). Such progress, towards large-scale production of vigorous somatic seedlings is reported in both hardwood [1, 2] and softwood (mostly coniferous) species (reviewed in [3]). In the case of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco), a productive conifer species from the *Pinaceae* family appreciated worldwide for its wood quality, somatic embryogenesis is developed for more than 30 years [4]. There is a wealth of patented methods but some recent achievements from initiation to efficient production of somatic seedlings have just been made publicly available [5, 6] (and references therein).

Somatic embryogenesis is considered as a key promising biotechnology for scaled-up clonal propagation of forest trees, due to its high multiplication rate [7, 8]. Embryogenic cultures are amenable to both cryogenic storage for long-term preservation of genetic resources [3, 7] and genetic engineering (including genome editing) for functional characterization of genes during embryogenesis [9]. Somatic embryogenesis is also a convenient experimental model system for studying embryo development [9]. The process includes well-characterized developmental stages and pathways that are mostly similar between SEs and reference zygotic embryo [10],

as shown recently in conifers from morphological (hybrid larch, [11]) to molecular levels (maritime pine, [12]).

Once somatic embryogenesis is initiated, embryogenic cultures are proliferated to sustain new embryo formation. In angiosperms, the maintenance of embryogenic potential is achieved during a continuous process of repetitive, secondary (2^{y}) embryogenesis obtained either directly from primary (1^{y}) embryos in culture or indirectly from various cell aggregates such as proembryogenic masses or nodular calli developing from 1^{y} SEs [13, 14]. This process typically resulted in clusters of new SEs that are more or less detachable from the previous embryo explants.

In gymnosperms, embryogenic cultures proliferate as embryonal masses (EMs), i.e. clusters of multiple attached SEs that are interspersed with singulated SEs at an early stage of late embryogeny [4, 15]. EMs have typically a whitish to translucent aspect and could harbor a granular to spiky morphotype originating from a number of protruding early embryos (or clusters) at the EMs surface. These immature SEs are typically bipolar structures composed of an apical embryonal head (dense, meristematic cells) tightly connected to a basal suspensor tissue (long, vacuolated cells). Proliferation of EMs is thought to mainly result from high cleavage ability of immature, early SEs. This process is known as cleavage polyembryony in gymnosperms embryology and can naturally occur within seed in some genus (e.g. *Pinus* species). It is still unclear if cleavage polyembryony is the only process involved in early SEs proliferation.

In some conifer species such as Douglas-fir, SEs clusters developed into polyembryogenic centres of various sizes that are thought to result from continuous but incomplete cleavage polyembryony (somatic polyembryogenesis) and /or *de novo* somatic embryogenesis from proliferating early SEs [6]. In addition, in some lines of Douglas-fir proliferating EMs were shown to contain both immature SEs and non-embryogenic cells (NECs) clusters [5, 16]. The occurrence of viable NECs interspersed with early SEs is apparently a characteristic feature of Douglas-fir EMs and has never been clearly documented in other conifer species ([5], Eliášová and Lelu-Walter, personal communication). Subsequent transition from early SEs to cotyledonary SEs is stimulated when EMs are transferred to specific maturation conditions. It is usually required to supplement the medium with abscisic acid (ABA), to increase osmotic pressure (using high carbohydrate concentration such as sucrose 0.2 M), and/or to decrease water potential through the use of high molecular weight polymers (such as polyethylene glycol, PEG 4000) or by reducing the water availability to the cultured cells by physical means (increased medium gel strength) as reported in Douglas-fir [6].

In angiosperm tree species, initiation of somatic embryogenesis could be obtained not only from juvenile material but also from mature trees up to 100-years-old in *Quercus* Spp. [17] and 700-year-old in *Kalopanax septemlobus* [18]. Although direct initiation from old tree explants is difficult to achieve and require preliminary conditioning through *in vitro* and/or rejuvenation techniques (i.e. establishment of axillary shoot culture, grafting, etc.), embryogenic capacity of initiated lines can be usually maintained for years by repetitive somatic embryogenesis. In many angiosperm species, the 2^{y} embryogenesis is much more efficient than 1^{y} embryogenesis [19] (and references therein). In contrast it is still an unsolved problem in conifers to initiate somatic embryogenesis from zygotic explant material older than zygotic embryos or very young plants [20, 21] (and references therein). It was early reported in *Picea abies* that explant material of

somatic origin is much more responsive to somatic embryogenesis induction treatment than material derived from zygotic embryos (one-month-old plantlets, [22]). Accordingly, the ability of cotyledonary SEs and somatic seedlings to initiate 2^{ry} somatic embryogenesis was reported in some species including *Picea glauca* (up to 10-year-old trees, [23]), *Picea abies* (up to 3-year-old plants, [22, 24, 25]), *Picea mariana* (cotyledonary SEs, [26]), *Larix x leptoeuropaea* (up to germinated SEs, [27, 28]), *Abies numidica* (cotyledonary SEs, [29, 30]), *Pinus pinaster* (up to germinating SEs, [31]) and more recently Douglas-fir (cotyledonary SEs, [6]). In most species, 2^{ry} somatic embryogenesis could be initiated at quite high frequency from cotyledonary SEs.

In conifers, 2^{ry} somatic embryogenesis has potentially numerous applications as it can be primarily viewed as a way towards “immortal” embryogenic line [32]. Stable lines have huge interest in long-term fundamental studies of plant embryo development for reducing severe constraints during experiment such as aging cultures [19, 32]. Secondary somatic embryogenesis may be used for restoring the embryogenic capacity of aging/failing lines with decreased maturation ability and/or producing abnormal embryos or of reduced quality. One more and particularly interesting practical issue is that 2^{ry} somatic embryogenesis could also be useful for improving embryogenic potential of embryogenic lines in some species. Compared to 1^{ry} cultures, 2^{ry} EMs were reported to be more productive in some embryogenic lines from hybrid larch [27] and maritime pine [31]. In Douglas-fir, similar conclusions could be drawn by Lelu-Walter et al. [6]. Secondary lines obtained from recalcitrant genotypes with low embryogenic potential (< 500 SEs g⁻¹ EMs f.w.) were significantly more productive than 1^{ry} lines.

The origin of such differences in embryogenic potential between 2^{ry} and 1^{ry} lines is largely unknown in conifers (only one study in *Pinus pinaster*, [31]). We hypothesized that during 2^{ry} somatic embryogenesis a selection of embryogenic cells towards EMs with good abilities for proliferation and regeneration of cotyledonary SEs could be operated. There is a need for in-depth cytological and molecular studies of proliferating embryogenic lines following repetitive somatic embryogenesis.

In contrast to macromorphological observations, the cytological aspect of EMs during proliferation is a reliable indicator of embryogenic line ability to produce cotyledonary SEs. In Norway spruce, only EMs showing immature SEs with dense embryonal head clearly separated from a well-defined suspensor region were able to develop further into cotyledonary SEs [33]. In pine species, embryogenic potential is reduced in over-propagated EMs as a result of aging effects (reviewed in [8]). Such a low performance at the maturation step was shown in *Pinus pinaster* to be associated with substantial and progressive changes in cellular organization during proliferation resulting in decreased frequency of immature SEs capable of completing the last stages of late embryogenesis [34]. In both maritime pine and Douglas-fir, proliferation of the EMs in presence of maltose as main carbon source greatly improved the cytological aspect of immature SEs [5, 35].

Recently, the development of novel, high-resolution proteomic methods offered the opportunity for both untargeted qualitative proteome coverage and quantitative measurement of proteins involved in plant development. Many fundamental activities performed by proteins (especially enzymes) are involved in most metabolic and signaling pathways. As a result, proteomics already contributed to a better understanding of plant somatic embryogenesis [9, 36, 37]. In

conifers, significant changes in protein expression have been reported during early and late somatic or zygotic embryogenesis (reviewed in [21]) including in species from the *Pinaceae* family such as *Picea glauca* [38], *Picea abies* [39], *Larix* spp [40-42], *Pinus massoniana* [43] and *Pinus pinaster* [12, 44].

Our main objective in this work was to study the cellular and proteomic changes induced by repetitive somatic embryogenesis in Douglas-fir. For this purpose, somatic embryogenesis has been induced from cotyledonary SEs to obtain 2^{ry} lines. Secondary EMs have been compared to 1^{ry} EMs according to their embryogenic potential, cytological aspect and protein patterns during proliferation. In order to deepen our understanding of repetitive somatic embryogenesis, a third cycle of somatic embryogenesis has been performed to produce tertiary (3^{ry}) lines from cotyledonary SEs of 2^{ry} lines. Tertiary EMs have been then similarly compared to 2^{ry} EMs. In conifers, this is the first report describing two successive cycles of repetitive somatic embryogenesis. We compared first 2^{ry} vs 1^{ry} EMs and then 2^{ry} vs 3^{ry} EMs. We did not compare 1^{ry} and 3^{ry} lines as cells do not directly stem from each other and many subcultural steps involving physiological aging of the tissues could occur. Therefore, comparing them would introduce over-complexities hypothesis not relevant regarding aims of this study.

We provided the first evidence for cytological and proteomic changes in proliferating EMs of Douglas-fir with increasing embryogenic potential following repetitive somatic embryogenesis. Interestingly, the proteomic analysis further revealed different sets of significant proteins between 2^{ry} and 1^{ry} EMs as well as between 2^{ry} and 3^{ry} EMs suggesting that each cycle of repetitive somatic embryogenesis is promoting substantial genome-wide rearrangement of the gene expression pattern. A Sub Network Enrichment Analysis (SNEA) was performed in order to better understand the functions and interactions of identified proteins. This approach is novel and original for studying conifer somatic embryogenesis.

Methods

Plant material

Pseudotsuga menziesii trees involved in this work are descended from provenances in Washington (USA), either from North Bend (genotypes 4455 and 4456) or Enumclaw (4466 and 4477). They were used as parental trees to perform the following control crosses at INRA (Orléans, France): 4455 x 4466 and 4456 x 4477. Somatic embryogenesis was induced from seed explant (isolated immature zygotic embryos at the pre-cotyledonary stage of development) following the method described by Reeves et al. [5]. Primary embryogenic lines SD4 (4456 x 4477) and TD17 (4455 x 4466) were initiated in 2011 and 2012, respectively [6].

Methods

Proliferation of embryonal masses

EMs were sub-cultured in clumps every 2 weeks on Glitz proliferation medium which consisted of a modified Litvay medium [45, 46] supplemented with 4.5 μM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2.2 μM BA (6-benzyladenine), 0.087 M maltose and solidified with 4 g L⁻¹ gellan gum. When necessary, EMs were cultured as a thin layer dispersed onto a

filter paper disc (300 mg f.w. per filter) to promote proliferation as described in [6]. The pH of each medium was adjusted to 5.8 before autoclaving.

Repetitive somatic embryogenesis (Fig.1)

Two cycles of repetitive somatic embryogenesis were performed according to Lelu-Walter et al. [6]. Briefly, for the first cycle of induction cotyledonary SEs from 6 to 11 weeks old (see maturation section) regenerated from 1^{ty} embryogenic lines SD4 and TD17 were isolated and transferred onto Glitz initiation medium supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 4.4 μM BA, 0.087 M sucrose and solidified with 4 g.L⁻¹ gellan gum. Each 2^{ty} EMs, initiated from a single SE, was then subcultured as described above for proliferation. The 1^{ty} lines SD4 and TD17 generated 2^{ty} embryogenic lines labelled SD4-2, SD4-6, SD4-8 and TD17-1, respectively. For the second cycle of induction, cotyledonary SEs obtained from the 2^{ty} line SD4-8 were similarly used as explants to initiate 3^{ty} lines SD4-8-1, SD4-8-2 and SD4-8-3. For each cycle of repetitive somatic embryogenesis initial and resulting embryogenic lines were referred to as “mother” and “daughter” lines, respectively.

Morphology and histological-cytological observations during the proliferation phase

Samples were collected after 10 days of multiplication for morphological and histo-cytological characterizations. Morphology of EMs was documented using a SMZ 1500 stereomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan). Structure of EMs was examined using a Jenaval transmission light microscope (Zeiss, Jena, Germany) after staining of fresh material with 0.4 % (w/v) Trypan Blue (Sigma-Aldrich) as described by [47]. Localization of starch grains was determined by staining with Lugol solution (Iodine-Potassium Iodide test). Histological study was performed on paraffin sections obtained after fixation, dehydration and paraffin infiltration of EMs samples according to Lelu-Walter et al. [6]. Sections (12 μm thick) stained with Alcian Blue and Nuclear Fast Red were observed using a Jenaval light microscope. In addition to cell wall, Alcian Blue could also stained the vacuolar content of some cells and phenolic compounds accumulation could be suspected according to the colour of EMs. Therefore, another histochemical staining with dyes Azur II and Safranin (known to stain phenolic compounds) has been performed, which confirmed our assumption that Alcian Blue react also with phenolics resulting in colour complexes. All images were captured using a DS-5M camera (Nikon, Tokyo, Japan) and processed using an image analysis system NIS-Elements AR 3.2 (Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic).

Maturation conditions

Proliferating EMs from filter papers were weighed, dispersed into liquid Glitz medium without plant growth regulators and distributed onto a filter paper disc placed on the surface of Glitz maturation medium supplemented with 0.2 M sucrose, 60 μM ABA (cis-trans \pm abscisic acid), 10 g L⁻¹ gellan gum at a cell density of 50 mg f.w. per filter. Maturations were conducted in darkness at approximatively 23°C. The number of cotyledonary SEs obtained after an 8-week period was counted in each of the Petri dishes and the embryogenic potential (number of SEs per g f.w. EMs) was estimated. A first set of experiments was conducted to compare embryogenic potential of 1^{ty} lines (SD4, TD17) and 2^{ty} lines (SD4-2, SD4-6, SD4-8, TD17-1) There were 5-6 Petri dishes per conditions and 3 biological replicates for a total of 96 Petri

dishes. Subsequently a second set of experiments was designed to compare embryogenic potential of 2^{ry} line (SD4-8) and 3^{ry} lines (SD4-8-1, SD4-8-2, SD-4-8-3). There were 6 Petri dishes per conditions and experiments have been repeated three times for a total of 72 Petri dishes.

Soluble proteins extraction

Analyses were performed for all types of lines (1^{ry}, 2^{ry} and 3^{ry}), with EMs cultured as a thin layer dispersed onto filter paper. Soluble proteins extracts were prepared from four biological replicates for each samples (150 mg f.w. of frozen EMs) with 1 ml of urea extraction buffer (4 M urea, 0.1 % v/v SDS 10 %, 0.1 M DTT, 80 mM Tris HCl pH 6.8, 10 % v/v glycerol). Total protein content was determined using the Bradford assay with bovine serum albumin as a standard. Results were expressed as soluble proteins content ($\mu\text{g mg}^{-1}$ of dry weight).

Proteomic and label-free quantitative data analyses Proteomic and nLC-MS/MS analyses were performed according to Crouzet et al, [48]. Briefly, protein sample were loaded onto SDS-PAGE gel, stained with colloidal blue. Gel bands were cut out from the SDS-PAGE gel, destained and digested by trypsin. The resulting peptide mixture was analyzed on an Ultimate 3000 nanoLC system (C18 PepMapTM trap column, Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap benchtop mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 2.2 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 350-1600) were recorded at a resolution of $R = 70,000$ (@ m/z 200) and an AGC target of $3E6$ ions collected within 100 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and top 15 ions were selected from fragmentation in HCD mode. MS/MS scans with a target value of $1E5$ ions were collected with a maximum fill time of 100 ms and a resolution of $R = 17500$. Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a *Pseudotsuga menziesii* v1 transcriptome database from PineRefSeq (54,595 entries, August 2016,

http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.02 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionine (+16 Da) was considered as variable modification and carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) as fixed modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using Percolator algorithm [49] and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Discovery Rate (FDR) at peptide level. Raw LC-MS/MS data were imported in Progenesis QI for Proteomics 2.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K). Data processing includes the following steps: (i) Features detection, (ii) Features alignment across all samples, (iii) Volume integration for 2-6 charge-state ions, (iv) Raw data normalization based on ratio median calculated from LC-MS features, (v) Import of sequence information, (vi) Calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides). Noticeably, only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation at protein level. Quantitative data were considered for

proteins quantified by a minimum of 2 peptides. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [50] partner repository with the dataset identifier PXD008347.

Functional characterization and gene ontology analysis

Changes in expression were calculated in comparison with corresponding control based on the cumulative intensity in each peptide (a 1.5 fold change ratio was selected to classify proteins as up or down regulated). All sequences have been mapped with Gene Ontology (GO) terms against *Arabidopsis thaliana* database (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>) to complete functional annotation. The proteins were then classified based on their biological functions using Web Gene Ontology Annotation Plot software at level 2 for biological process (Panther, <http://pantherdb.org/>) [51]. A binomial test and Bonferroni's correction were performed with Panther software to determine significant GO identifiers occurring more often in a group. As the gene ontology is currently extremely poor for Douglas-fir, we tested also another method to perform enrichment of GO terms in our protein sets. We used the Bioconductor R package topGO 2.26.0 [52], based on the "weight" method and a Fisher's exact test. We compared our different protein sets against the 4813 Douglas protein total dataset and each protein was mapped to the best *Arabidopsis* homolog by blastP search. Then, each GO term from *Arabidopsis thaliana* was associated to the corresponding Douglas protein for topGO analysis.

Network enrichment analysis

Sub Network Enrichment Analysis (SNEA) was performed using Pathway Studio® version 11.4 (Elsevier B.V.).

Statistical analyzes

Statistical analyzes were performed with R software (version 3.3.2; R Development Core team 2011). Embryogenic potential and soluble proteins content data of 1^{ty}, 2^{ty} and 3^{ty} lines were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons of means with Tukey contrasts ($P < 0.05$). For proteomic analysis, differential expression of proteins in 1^{ty} vs 2^{ty} lines, and 2^{ty} vs 3^{ty} lines, was analyzed using two-way ANOVA with interaction and FDR, based on normalized abundance (adjusted $P < 0.05$).

Results

Embryogenic potential of Douglas-fir embryogenic lines after repetitive somatic embryogenesis

Secondary vs primary embryogenic lines of TD17 and SD4 genotypes

Maturation experiments were performed in order to compare embryogenic potential of 1^{ty} (TD17 and SD4) and 2^{ty} lines (TD17-1, SD4-2, SD4-6 and SD4-8). Primary lines showed significant variations in mean production of coyledonary SEs ($P = 3.01e^{-7}$). SD4 was moderately embryogenic (478 SEs g⁻¹ f.w.) whereas TD17 showed a very low embryogenic potential (30 SEs g⁻¹ f.w., Table 1). Interestingly 2^{ty} lines were significantly more productive than 1^{ty} lines for both SD4 ($P = 9.47e^{-7}$) and TD17 ($P = 2.88e^{-10}$). TD17-1 was 8 times more productive (241 SEs g⁻¹ f.w., Table 1) than the original TD17 line. In the case of SD4, 2^{ty} lines

yielded 3-4 (SD4-6, SD4-8) to 6 times (SD4-2) more cotyledonary SEs (1515-3131 SEs g⁻¹ f.w. Table 1).

Tertiary vs secondary embryogenic lines of SD4 genotype

A subset of maturation experiments was then performed for genotype SD4 in order to compare embryogenic potential of 2^{ry} (SD4-8) and 3^{ry} lines (SD4-8-1, SD4-8-2 and SD4-8-3). Maturation yield was similarly very high for the three 3^{ry} lines (3344-4258 SEs g⁻¹ f.w., Table 2) and increased when compared to SD4-8 line (2401 SEs g⁻¹ f.w.) although significant ($P = 0.00337$) only for SD4-8-2 (4160 SE g⁻¹ f.w.) and SD4-8-3 (4258 SEs g⁻¹ f.w.).

Histological–cytological description of Douglas–fir EMs

Macromorphological (EM colour and morphotype) and histo-cytological traits (occurrence of PEC, singulated SE and NEC) of primary (SD4, TD17), secondary (SD4-2, 6, 8; TD17-1) and tertiary (SD4-8-1, 2, 3) embryogenic lines of Douglas-fir we summarized in the Additional Table S1.

Morphology of primary, secondary and tertiary EMs

EMs of both genotypes and all types of lines (1^{ry}, 2^{ry}, 3^{ry}) harboured different colours usually in the shades of yellow and brown, even though some lines (especially SD4) were rather pink (Additional Fig. S1) indicating the local accumulation of phenolic compounds in Douglas-fir cells as confirmed by histochemical staining at the histological level (see below), and by activation of the phenolic pathways in the 1^{ry} lines (see below). The structure of immature early SEs proliferating inside EMs was hardly distinguishable in the case of 1^{ry} lines. However the granular aspect of the EMs surface is noticeable, especially for line SD4 (Additional Fig. S1), and could indicate the occurrence of large polyembryogenic centres. Some detailed observations also revealed the filamentous nature of suspensor cells attached to few of these structures escaping from the EMs surface (data not shown). In contrast, the distinct, compact and granular aspect of large polyembryogenic centres and/or singulated early SEs of whitish aspect was apparent on most EMs of 2^{ry} and 3^{ry} lines, especially for lines TD17-1, SD4-2, SD4-8-1 and SD4-8-3 where the bipolar structure of protruding early embryos could be sometimes distinguished (Additional Fig. S1, arrows). EMs from 2^{ry} line SD4-6 resembled that of 1^{ry} line, while EMs of SD4-8 did not exhibit a typical granular morphotype but a smoother aspect suggesting that polyembryogenic centres or singulated embryos are not so frequent and/or of lower size (Additional Fig. S1). EMs from 3^{ry} line SD4-8-2 most resembled EMs from 2^{ry} line SD4-2 but with lower occurrence of distinct structures with granular aspect.

Histology of secondary embryogenic lines (TD17-1; SD4-2; SD4-6; SD4-8) vs primary (SD4, TD17)

Primary lines of both genotypes TD17 and SD4 produced large polyembryogenic centres. These complexes consisted of broad meristematic parts and usually elongated suspensor cells creating together compact cell “package” with cells joined to each other by mucilaginous matrix (Fig. 2-6). Besides these polyembryogenic centres, singulated early embryos with one large well-organized embryonal head connected to a compact and long suspensor were present as well (Fig. 4F). Smaller embryos composed of several layers of meristematic cells and a few elongated suspensor cells were also often found located within or in the close proximity to dead

material that is formed by remnants of suspensor cells or disintegrated early embryos (Fig. 2E,F, 5AH, 6B,E). Meristematic cells of these small embryos were usually mitotically active (Fig. 4C).

Both genotypes produced also non-embryogenic cell (NECs) clusters that were present either as groups of loosely arranged vacuolated cells (Additional Fig. S2A) or organized, compact cell aggregates (Additional file S2B) both located in the proximity to early embryos. All observed cell clusters were judged very carefully on all successive sections to avoid the possible confusion of NECs with embryonal cells, especially with suspensor cells that are also vacuolated. Any cell cluster was considered as non-embryogenic if none of its cells on any section did not exhibit characteristics of meristematic cell, i.e. dense cytoplasm, prominent nucleus and small vacuoles without phenolic content. Large NEC clusters usually consisted of a mixture of vacuolated cells of irregular shape that were either mitotically active (Additional Fig. S2) or accumulate starch grains and/or phenolic compounds (Additional Fig. S2B,C,E,F). Phenolic compounds were apparently deposited in vacuoles as granules or droplets resulting in a brownish colour of cells that are easily recognizable in aggregates where cell walls were stained in blue and nuclei (and slightly cytoplasm as well) in pink/red (see Fig. 5C). Surprisingly, phenolics accumulating in vacuoles as amorphous deposits reacted differentially with Alcian Blue (forming complexes of various colour from grey-blue to ginger) suggesting variable chemical composition (Additional Fig. S2B, E and F). Alcian Blue staining of phenolic compounds was confirmed histochemically by other dyes (Azur II and Safranin; data not shown). The occurrence of NECs aggregates interspersed within EMs was found to vary between lines as described below. However, repetitive somatic embryogenesis globally resulted in reduced frequency of NECs clusters and, concurrently, in decreased phenolic content within EMs.

TD17 vs TD17-1. Both 1^{ry} and 2^{ry} lines of TD17 genotype produced all types of embryogenic structures mentioned above (Fig. 2A,B, 4); the most frequent ones were large polyembryogenic centres (Fig. 4A,B) while small embryos (Fig. 4C) were quite rare in both lines. Large singulated SEs with one well-organized embryonal head were more frequent in the 2^{ry} line TD17-1 (Fig. 4D). NECs were observed in TD17 as loosely arranged cells (Supplementary data 2A) or compact cell clusters (Additional Fig. S2B) in the vicinity of embryos or even within the dead material. The TD17-1 2^{ry} line produced much less NECs clusters. Only small pieces were observed in close proximity to early embryos or (more often) within the dead material.

SD4 vs SD4-2, SD4-6, SD4-8. Primary line SD4 is characterized by the production of huge structures resembling polyembryogenic centres (Fig. 2C, 5A,B). The meristem-like parts of these structures were usually formed by a mixture of densely cytoplasmic meristematic cells and vacuolated cells that accumulated often starch grains and/or phenolic compounds (Fig. 5C). Meristematic cells occurred usually in one part of the structure forming a compact meristemoid or embryonal head-like structure. This is probably only a small part or a few cell layers of the polyembryogenic centres as the inner region was mainly formed by vacuolated cells. Protodermal cells usually created smooth surface of this meristem-like region (Fig. 5B). However the arrangement of outermost cell layer could disintegrate in some parts; consequently

the protoderm was missing and local cell organization was very similar to NECs clusters (Fig. 5B). Elongated suspensor cells were present only in the outermost region of the cell “package” or were simply missing. The inner region, located distally from the meristem-like region consisted of loosely arranged cells of irregular shape. Small embryos of typical bipolar arrangement of meristematic and suspensor cells occurred rarely within the dead remnants of suspensor cells at the most distal region of the structure (Fig. 5A).

Contrary to the 1^{ry} line, 2^{ry} lines produced well-arranged polyembryogenic centres of different sizes that were formed by compact meristematic parts joined together with elongated suspensor cells. The most typical polyembryogenic centres with distinct embryonal heads were observed in SD4-2 (Fig. 2D, 5D) together with small individual embryos located within suspensors (Fig. 5E). In this line, additional large structures arranged in a similar way as polyembryogenic centres were observed but some parts were composed of vacuolated cells with starch grains resembling NECs. On the edge of these structures, cells accumulated phenolic compounds creating a frontier between compact meristem-like part and suspensor cells (Additional Fig. S2E). SD4-6 produced large amount of small embryos or small polyembryogenic centres with noticeable embryonal heads (Fig. 5F,G) as well as a few polyembryogenic centres of huge size (Fig. 2E). Large compact pieces of NECs located in the vicinity of embryos were frequent. Large, very compact and highly organized cell structures resembling meristemoids were the most typical non-embryogenic structure in SD4-6 line (Additional Fig. S2F). These “meristemoids” were isolated from other parts of the clumps by groups of cells with high phenolic content. Line SD4-8 produced only small embryos and smaller polyembryogenic centres that were not very well organized (Fig. 2F, 5H,I). As other 2^{ry} lines, SD4-8 also produced NECs that was arranged in clusters of vacuolated cells accumulating starch grains and/or phenolics, similar to that observed in TD17 (Additional Fig. S2B).

Histology of tertiary embryogenic lines (SD4-8-1; SD4-8-2; SD4-8-3) vs secondary (SD4-8)

Tertiary lines produced higher amount of much bigger polyembryogenic centres and less amount of NECs clusters when compared to the 2^{ry} line SD4-8. SD4-8-1 produced large polyembryogenic centres and clusters of large singulated early embryos with distinct embryonal heads (Fig. 3A,B, 6A,B) and with small embryos occurring within suspensors (Fig. 6B). SD4-8-2 typically produced high amount of smaller polyembryogenic centres and smaller embryos (Fig. 3D, 6C,D) while large polyembryogenic centres were found less organized with some signs of disintegration of both meristems and suspensor (Fig. 3C). Line SD4-8-3 was characterized by large polyembryogenic centres that possessed high amount of distinct embryonal heads joined to very dense suspensors formed of elongated cells. Each of these polyembryogenic centres was attached to another one by an “anchor” of dead suspensor cells. Small embryos appeared within or in the vicinity of suspensors (Fig. 3E,F, 6E,F).

Total protein content and proteomic analysis

Total protein content

The total protein content was similar in both genotypes SD4 (mean of 113.4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w.) and TD17 (98.3 $\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w.) and among 1^{ry} (107.2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w.) and 2^{ry} lines (108.9 $\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w., Additional Table S2). An increase in protein content was detected in 3^{ry} lines (mean of 137.5

$\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w.) compared to 2^{ry} lines (110.8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ d.w., additional Table S3) of genotype SD4 but the observed difference is not significant in our sampling dataset.

Proteomic of secondary embryogenic lines (TD17-1; SD4-2; SD4-6; SD4-8) vs primary (SD4, TD17) and of tertiary embryogenic lines (SD4-8-1; SD4-8-2; SD4-8-3) vs secondary (SD4-8)

The analysis of total protein extracts and of changes in protein expression was performed using OrbiTRAQ-based proteomics with four biological replicates. Strict identification and quality criteria were used (for details, see “Methods”). The analysis identified 2293 proteins in EM during the comparison between 1^{ry} and 2^{ry} lines, and 2554 proteins during the comparison between 2^{ry} and 3^{ry} lines, so a unique set of 4813 proteins.

Principal component analysis of all 2293 proteins in 1^{ry} and 2^{ry} lines (Fig. 7A) revealed as main component (PCA1 axis) the genotype (35 % of the total variance). PC2A axis is explaining 16 % of the total variance apparently revealed an interaction between genotype and type of line (1^{ry}, 2^{ry}). A similar picture was obtained in the PCA of all identified proteins (2554) in 2^{ry} and 3^{ry} lines for the genotype SD4 where the PCA1 axis explained 65 % of the total variance observed with the type of line as main component (Fig. 7B).

The statistical analyses of proteins expression in 2^{ry} vs 1^{ry} lines (first cycle of repetitive somatic embryogenesis) and 3^{ry} vs 2^{ry} lines (second cycle) were performed using a two-way ANOVA with interaction and FDR, and were based on normalized abundance (adjusted $P < 0.05$) in order to consider the possible interaction between genotype and type of line. A 1.5-fold cut-off change in expression was used to identify significant changes in the abundance of differentially expressed proteins with the factor line. A total of 162 significant proteins were identified between 1^{ry} and 2^{ry} lines and 228 between 2^{ry} and 3^{ry} lines (Additional file S1). Most significant proteins are downregulated in 2^{ry} vs 1^{ry} lines (76 %) or upregulated in 3^{ry} vs 2^{ry} lines (70 %). Surprisingly only 33 significant proteins were common between the two proteomic studies, 12 similarly expressed after both cycles (9 up-regulated, 3 down-regulated) and 21 expressed in opposite way indicating that each cycle of repetitive somatic embryogenesis resulted in specific pattern of significant proteins.

Additional Table S4 presents the functional classification of the 162 (2^{ry} vs 1^{ry}) and 228 (3^{ry} vs 2^{ry}) significant proteins which were categorized according to GO classification for plants. The first three sub-categories grouping most significant proteins between 2^{ry} and 1^{ry} or 3^{ry} and 2^{ry} are the “Metabolic Processes” (52.9 and 46.0 % of hits for the first and second cycle of repetitive somatic embryogenesis, respectively), “Cellular Processes” (27.3 and 30.7 % of hits) and “Response to Stimulus” (6.6 and 7.4 % of hits).

To represent the overall trends of the specific functional categories that are enriched in Douglas-fir lines following repetitive somatic embryogenesis, two different GO category enrichment analyses (Term Enrichment) were performed using either Panther or Biocoductor R softwares. The results of these two analyses of significant proteins after first (2^{ry} vs 1^{ry}) and second cycle of repetitive somatic embryogenesis (3^{ry} vs 2^{ry}) are shown respectively in Table 3 and Additional Fig. S3. In both cycles, the proteins involved in “Proteolysis” and “Catabolic process” categories were amplified (Additional Fig. S3). Out of different GO terms enriched in significant proteins, many are related to both cycles of repetitive somatic embryogenesis (Table 3), i.e. processes involved in chitin and polysaccharide catabolism, lignin and L-phenylalanine

metabolisms, phenylpropanoid biosynthesis, oxidation-reduction, and response to karrikin. Strikingly, assigned proteins to these GO term categories have opposite expression patterns after first (downregulated in 2^{ty} lines) and second cycle (upregulated in 3^{ty} lines) suggesting again that different protein profiles are established after each cycle of repetitive somatic embryogenesis.

A Sub Network Enrichment Analysis (SNEA) of significant proteins was performed for both comparison of 2^{ty} vs 1^{ty} lines (Fig. 8A) and 3^{ty} vs 2^{ty} lines (Fig. 8B). Such an analysis is useful to better understand the functions and interactions of significant proteins and also of their putative targets and regulators involved in metabolic pathways that are possibly affected during the process of repetitive somatic embryogenesis. Overall 70 significant proteins up or down-regulated after secondary (33 proteins) or tertiary somatic embryogenesis (51 proteins) could be integrated in these networks. Many proteins are associated to the metabolism of a class of plant growth signaling including some plant growth regulators such as jasmonic acid, ABA and salicylic acid as well as lignin-related compounds, notably after tertiary somatic embryogenesis () and secondary metabolites of the flavonoid class, especially after secondary somatic embryogenesis. . The indol-3-acetic acid (IAA) auxin is also revealed as an important regulator associated to both networks. The subsets of significant proteins and target/regulators in each network were mostly specific of each cycle of repetitive somatic embryogenesis but affected the same major biological processes, i.e. “plant development” and “defense response”. In the latter case, plant growth signaling such as jasmonic acid, salicylic acid and ABA and many other molecules identified in these networks (including secondary metabolites) are known to be involved not only in adaptation to stress, i.e. defense response, detoxification process and drought stress/hyperosmotic salinity responses, but also in non-defensive functions during plant development.

A number of significant proteins involved were found overexpressed in the 1^{ty} lines of first cycle of repetitive somatic embryogenesis and underexpressed in the 2^{ty} lines of the second cycle (PAL2, CCR1, LOX1, DOX1, ERD9, P5CS1, DFR, C17L7.80, OMT1, PKT3, ALDH2B7). Interestingly, two significant proteins were over-represented in 2^{ty} lines of both cycles (2^{ty} and 3^{ty} lines) and identified (*Arabidopsis* annotation) as endochitinase EP3 and E3 ubiquitin-protein ligase ARI1, two class of proteins involved in correct embryo development and pathways such as controlled proteolysis in conifers.

Discussion

Repetitive somatic embryogenesis enhanced embryogenic potential of embryogenic lines from different Douglas-fir genotypes

Experiments have been performed with two unrelated genotypes (TD17, SD4) exhibiting variable embryogenic potential in the tested conditions. This “genotype” effect is commonly reported in conifers [3], including in *Pinaceae* species such as pines [8] and Douglas-fir [6] [53], and may result from genotype-specific interaction with culture conditions.

Compared to 1^{ty} lines, 2^{ty} lines displayed significantly higher embryogenic potential in both genotypes SD4 (mean of 2155 vs 477 SEs g⁻¹ f.w.) and TD17 (240 vs 29 SEs g⁻¹ f.w.). This represented a 4.5 and 8.2-fold increase in embryogenic potential, respectively. Improved embryogenic potential after a second cycle of somatic embryogenesis (secondary somatic embryogenesis) has been reported previously for hybrid larch (1 genotype with 3 fold increase,

[27], maritime pine (2 genotypes with 1.4-2.3-fold increase, [31] and recently in Douglas-fir (3 genotypes with 1.2-4.9-fold increase, [6]). This is of huge interest for “recalcitrant” genotypes with too low embryogenic potential (e.g. TD17). Reduced ability of selected genotypes from breeding programmes for SE regeneration is one main impediment to multivarietal forestry in conifers [7, 8].

In this study, a third cycle of somatic embryogenesis (tertiary somatic embryogenesis) was completed for one genotype (SD4) to further investigate the cumulated effect of repetitive somatic embryogenesis on the embryogenic potential. To our knowledge, this approach is original in conifers and this is the first time that the initiation of 3^{ry} lines is reported. Interestingly, two out of the three tested 3^{ry} lines (SD4-8-2 and SD4-8-3) exhibited significantly higher embryogenic potential (mean of 4209 SEs g⁻¹ f.w.) than the original 2^{ry} line SD4-8 (2400 SE g⁻¹ f.w.). Embryogenic potential of the third 3^{ry} line (SD4-8-1) remained similarly high (3344 SEs g⁻¹ f.w.). We concluded that repetitive somatic embryogenesis enhanced embryogenic potential of SD4 genotype. However, the increase in maturation performance observed after the third cycle of somatic embryogenesis was of lower intensity than that observed after the second cycle (1.6 vs 4.5-fold increase on average). Long-term stable embryogenic potential has been demonstrated in some *Pinaceae* such as *Larix* spp. ([32] whereas ageing effects are highly significant in other species (e.g. *Pinus* spp., [8]). In this work, stable embryogenic potential of proliferating Douglas-fir lines of different physiological ages since initiation (from older 1^{ry} lines to younger 2^{ry} and 3^{ry} lines), is well supporting that increased embryogenic potential after repetitive somatic embryogenesis is mainly resulting from initiation effects and not ageing considerations. In conifers, cellular and molecular changes in proliferating lines after 1 or 2 successive cycles of somatic embryogenesis has been poorly investigated. To our knowledge, only Klimaszewska et al. [31] reported on physiological and molecular aspects of primary and secondary lines with contrasted embryogenic potential in *Pinus pinaster*. In this work, we gained new insights (discussed in the following sections) into both EMs cellular organization (cytology, histology) and molecular physiology after 1 (1^{ry} and 2^{ry} lines) or 2 cycles (2^{ry} and 3^{ry} lines) of repetitive somatic embryogenesis in Douglas-fir.

Repetitive somatic embryogenesis of Douglas-fir improved cellular organization of immature SEs

The improvement of the SEs structure, notably in the genotype SD4, was the first positive result. Both lines of the genotype TD17 produced all types of EMs that we have described recently in Lelu-Walter et al. [6], i.e. polyembryogenic centres, large singulated SEs and small SEs. On the contrary, the arrangement of EMs in lines of the genotype SD4 differed markedly. The large polyembryogenic centres that were predominant in 1^{ry} line SD4, might remotely resemble morphology of meristemoids developed during organogenesis or somatic embryogenesis of angiosperms [54, 55] or nodules formed on the needle primordia after initiation of somatic embryogenesis from shoot buds of white spruce [23]. Nevertheless, cell arrangement of these structures was closer to the arrangement of the real polyembryogenic centres that are typical for Douglas-fir, i.e. broad meristem-like part joined to suspensor part forming compact cell “package” [6]. However, cells located inside this “package” were arranged quite loosely and were not elongated as in polyembryogenic centres of all the other lines; meristem-like part consist of very thin layer of densely cytoplasmic cells while other cells were vacuolated and

accumulated 2^{ty} metabolites. Parts that could be considered as cleavable embryonal heads were rare. These structures were observed neither in 2^{ty} lines nor in 3^{ty} ones, even though in lines SD4-2 and SD4-6 some structures similar to that observed in SD4 occurred besides well-organized bipolar SEs. In conclusion, with reiteration of somatic embryogenesis the improvement of EMs organization was obvious. We can recognize two ways of improvement that probably led to the increased yield of cotyledonary SEs after maturation. One way could be the increased frequency of small SEs together with the reduction of the size of polyembryogenic centres as we observed in 3^{ty} line SD4-8-2. The second way could be organization of polyembryogenic centres into clusters of distinct embryonal heads of very similar size as was apparent in SD4-8-1 and even more pronounced in SD4-8-3.

Repetitive somatic embryogenesis decreased presence of non-embryogenic cell clusters within EMs of Douglas-fir

When EMs are cultivated in clumps, highly mitotically active and growing polyembryogenic centres or singulated early SEs occur on the surface of the clump, while inner parts usually comprise dyeing suspensor cells or whole SEs. Such an organization of EM clumps resulted in a granular aspect of most investigated Douglas-fir lines, especially 3^{ty} lines (Additional Table S1). Similar morphotypes were observed for proliferating embryogenic lines in other *Pinaceae* species such as *Pinus pinaster* and associated to some morphological traits of embryonal heads and suspendors [56] (and references therein). In this species it has been shown that the outer parts of EM clumps have improved embryogenic potential compared to the inner parts. Considering our passed experience with various conifer species, the best parts of the EMs are the most whitish parts which were collected for the detailed histological study. In spite of our careful selection of samples, the histological study surprisingly showed presence of non-embryogenic cells in the close proximity to the EMs, especially in the 1^{ty} line TD17 and in the 2^{ty} lines of the genotype SD4 (Additional Table S1). Such NECs clusters that constituted of cells accumulating not only starch grains but also phenolic compounds, were considered to be one of the main limits of *in vitro* propagation of woody plants [57]. Browning of the tissue culture (as observed in Douglas-fir lines, Additional Table S1 and Fig. S1) is typically resulting from the oxidation of accumulated phenolic compounds. Laukkanen et al [58] reported that browning is a consequence of high oxidative stress and can eventually cause cell death, thereby reducing the regeneration capacity of the culture. We observed cells with phenolic content either as a part of NECs clusters or as individual loosely arranged groups. In the 1^{ty} line SD4, cells with phenolic contents occurred also within the large meristem-like parts of polyembryogenic centres. Processes resulting in oxidation of phenols that were present in the tissues could have a detrimental effect on embryogenic potential of 1^{ty} lines, especially TD17. Thus, the reduction of the amount of NECs containing phenolic compounds was another positive result of the repetitive somatic embryogenesis. We found much less of NECs in the 2^{ty} lines TD17-1 and SD4-2 and almost none in 3^{ty} lines induced from SD4-8.

The proteomic analyses revealed the importance of the interactions between proteins and plant growth signalling, mainly in the biological process of "plant development" during repetitive somatic embryogenesis cycles

The two comparison studies of protein content and pattern between 1^{ry} and 2^{ry} lines or 2^{ry} and 3^{ry} lines were performed to identify possible repercussions on the proteome of one additional somatic embryogenesis. The number of proteins detected during both proteomic analyses (2293-2554, 4000 overall) was greater than that obtained previously based on two-dimensional gel electrophoresis [40, 44] supporting that shotgun-iTRAQ technology has improved potential for both identification and quantification of proteins. This result is independent of species but availability of the Douglas-fir transcriptome allowed a gain of about 30 % in number of successful protein identifications compared to *Picea glauca* database inquiries (results not shown). In this large set of identified proteins, principal component analysis (PCA) revealed that the type of line (1^{ry}, 2^{ry}, 3^{ry}) was the main factor accounting for the total variance observed for a given genotype.

Whatever the line, the total protein content did not show any significant difference among the compared embryogenic lines. However protein patterns were found dissimilar with a number of differentially expressed proteins affecting specific metabolic pathways. Functional analysis classified the 162 (2^{ry} somatic embryogenesis) or 228 (3^{ry} somatic embryogenesis) significant proteins mainly as involved in metabolic and cellular processes. It is well-known that embryogenic competence is accompanied in plants by active metabolic changes and developmental processes [59] as well as cellular reorganizations [36, 60], including in conifer species (reviewed in [9]). Interestingly, we observed first a “down” and then an “up” pattern of expression for most significant proteins after 2^{ry} and 3^{ry} somatic embryogenesis, respectively. As a result, specific patterns of significant proteins are established after each cycle of repetitive somatic embryogenesis in Douglas-fir (only 33 common significant proteins between the 2 proteomic studies). It is suggested that somatic embryogenesis induction treatment is promoting large, genome-wide gene expression rearrangements possibly through activation of chromatin modifiers or other epigenetic regulators. Such global changes in gene co-expression have been reported in various conifers such as *Picea abies* at the beginning of embryogenesis [61, 62], or *Pinus pinaster* at the transition between developmental stages of embryo development induced by plant growth signaling. In the latter study, a number of epigenetic regulation mechanisms were highlighted at the stage-to-stage transitions.

The determination of biological processes associated to significant proteins could be obtained according to GO analyzes (Table 3, additional Table S4 and Fig. S3) as well as to bibliographic knowledge databases. The resulting protein networks presented in Fig. 8 showed the connections between significant proteins according to their involvement in a biological process and their interaction with a regulatory factor or an induction signal. Interpretation of proteomic results based on protein networks is very powerful but such an approach has at least few limits: i) only connected proteins in the networks are visible, ii) the bibliographic database used is specific to *Arabidopsis thaliana* and consequently resulting networks do not stand out as those inherent in woody, perennial species and iii) embryo patterning is still a poorly understood and complex process involving a regulated gene network of at least 300-450 genes [9].

The discussion of significant proteins according to their assigned biological process could be complicated by the possible involvement of proteins in several pathways. Therefore, it appeared relevant, and the simplest way, to discuss our results according to major biological processes affected. Such a strategy was adopted as a thread of the following discussion.

Secondary vs primary embryogenic lines

Biological process « plant development »

Proteomic studies of embryogenesis classically reported an increase of the primary metabolism either during maturation, or between lines with no or variable embryogenic potential [63]. Our results, showing that more than 50 % of the significant proteins were involved in this pathway, were therefore consistent with previous studies. In the same way, programmed cell death (PCD) is an important process during the different steps of somatic embryogenesis. It is even considered crucial for the differentiation of proliferating early embryos within EM into cotyledonary SEs [64, 65]. Also, during the enrichment analyzes of the GOs, this process emerged, in agreement with our histological results. Few proteins are directly related to PCD, or indirectly by interaction with flavonoids, jasmonic acid, oxidative stress and proteolysis (Table 3 and additional Fig. S3). Thus, strong interactions between these protagonists are cited in the literature. They are discussed in the below sections. The ERD9 protein is in direct interaction with the biological process "Plant development". This is a glutathione S-transferase, under-expressed in 2^{vy} lines. The role of GST in oxidative stress regulation processes is well known in plants [66], as well as in somatic embryogenesis [67]. Among the over-expressed proteins in 2^{vy} lines, the putative methyltransferase DDB could explain the difference in embryogenic potential by its involvement in epigenetics, known to have a positive effect on embryonic development [63]. Therefore a high level of methylation during embryogenesis has been associated with chromatin remodeling, allowing the expression of genes involved in embryogenesis [62]. Accordingly, an E3 ubiquitin protein ligase ARI1 was upregulated in 2^{vy} lines. Ubiquitin protein ligases are known to be associated to activation of chromatin modifiers (ubiquitin-/small ubiquitin-related modifier (SUMO)-conjugating genes) resulting in global modifications of gene expression (see [44] and reference therein). EP3 chitinase is over-expressed in the lines produced by both second and third somatic embryogenesis. Non-defensive roles of chitinase in SE development and in carbon and nitrogen metabolism were also supported, whether in embryogenic lines [12, 42, 68], or in the development of somatic and zygotic embryos [69]. Chitinases are also associated with PCD in plants [69].

Biological process « proteolysis »

The increase of the obtained embryogenic potential is accompanied by a significant activity of degradation and recycling of proteins, with a constant level of total protein content (Additional Tables S2 and S3). This was suggested by the enrichments of GO (additional Fig. S3) and the presence of cathepsin proteins like-B, probable E3 ubiquitin -protein ligase ARI1 and serine carboxypeptidase (additional file S1). These three proteins are overexpressed in 2^{vy} lines, and are also found in the third somatic embryogenesis cycle, emphasizing the importance of the proteolysis biological process in increasing the embryogenic potential [62]. Cathepsin B-like, a cysteine proteases, plays a central role in the degradation of target proteins and plays a role in embryogenesis, plant defense and PCD [70]. The presence of cathepsin B-like in embryogenic calli, has been associated with its involvement in the maintenance of pluripotency and cell reprogramming in embryogenic calli [71]. The probable E3 ubiquitin-protein ligase ARI1 is also involved in protein recycling, as part of the ubiquitin/26S proteasome complex. Substantial support has been obtained in *Pinus pinaster* for proposing ubiquitin protein ligase as robust marker of correct embryo development [12]. The last protein identified in this protein renewal

pathway, is a serine carboxypeptidase, protein inducible by ABA and involved in secondary metabolism and in stress response [72]. These two biological processes were modified during induction according to the protein networks. They are discussed in a later section. A recent study revealed that serine carboxypeptidase has a positive effect in embryogenesis, and more specifically the polyembryogenesis induction [73]. Finally, the expression of this protein is regulated by the response to pathogens but also by jasmonic acid [74]. However, this plant growth signaling is as one of the connection centers of several significant proteins in the protein network (Fig. 8).

Plant growth signaling (including plant growth regulators and polyphenols)

Plant growth signaling are crucial for the control of each stage of embryogenesis, as well as EMs proliferation as their maturation, or germination. In this comparison of proteomes, the involvement of several plant growth signaling in the 2^{ry} somatic embryogenesis was demonstrated by their interaction with many significant hormone-responsive proteins. Jasmonic acid was the one that has the most connections. All were overexpressed in 1^{ry} lines relative to 2^{ry} lines except one (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase). Although several studies showed the positive effect of jasmonic acid on the maturation of SE [75], this regulator, like ABA and salicylic acid, was mainly linked to biotic and abiotic stresses [76] in the pre-embryonic stage of development as illustrated by the connections of the protein network. Proteins in connection with jasmonic acid also have GOs in relation to the synthesis of flavonoids, anthocyanidins and/or anthocynins. All are secondary metabolites acting as a signal in cell development functions [77]. The overabundance of such metabolites has been shown to be unfavorable during embryogenesis since they appear to be responsible for unpolarized or irregular structures of non-embryogenic cells [78]. During this somatic embryogenesis cycle, flavonoid-related proteins were under-expressed in 2^{ry} lines, which may explain the higher embryogenic potential observed for them. These flavonoids play an important role in the cell since several links have been established with oxidative stress responses [79, 80]. Flavonoids are polyphenols, generic molecules to call compounds derived from phenylpropanoids. The phenylalanine ammonia-lyase-like (PAL) proteins is the first enzymatic link for the synthesis of these polyphenols from the amino acid phenylalanine. We observed two phenylalanine ammonia-lyase-like overexpressed in the 1^{ry} lines. This activation of the pathway of phenylpropanoids synthesis as well as that of phenylalanine metabolism in the 1^{ry} lines could explain the important quantity of polyphenols observed in these lines (Fig. 5) and the brownish color of these 1^{ry} lines.

Stress/stress oxydatif

Among the stresses underwent by cell cultures, oxidative stress appears to be a decisive factor for somatic embryogenesis [67, 81]. Indeed, it is consecutive to the production of ROS (Reactive Oxygen Species). These molecules may have antagonistic roles in cell development depending on their concentration. Thus overproduction of ROS negatively affects embryogenic differentiation [82], but prevention of their production also inhibits the development of SEs [63]. This is explained by their toxicity to the cell, and their action as signal molecules. They act in the response of plants to biotic and abiotic stresses. As ROS are lethal to cells, their presence induces synthesis of many proteins that regulate the cellular redox system. ROS are involved in the PCD activation [83] and thus control the normal development of embryos [62].

Depending on the stage of embryogenesis, proteins involved in oxidative stress may vary slightly. Thus, catalase was more detected during proliferation and organogenesis [81] than during another stage. Thus it appeared overexpressed in non-embryogenic calli compared to embryogenic masses [78]. Our results go in the same direction since the catalase isozyme 1-like (CAT3) is overexpressed in the 1^{ry} lines less embryogenic than the 2^{ry} lines. It is an effector of the PCD. While peroxidases are among the most well-known proteins involved in defense mechanisms, such as oxidative stress [43, 81], they are involved in proliferation as well as maturation. Several peroxidases are significantly over-expressed in the 2^{ry} lines. The NAD(P)-binding Rossmann-fold protein is involved in oxidation-reduction reactions. It was also over-abundant in 2^{ry} and 3^{ry} lines of both somatic embryogenesis cycle. In opposition, other proteins possibly involved in the ROS response were under-expressed in 2^{ry} lines. This was the case of the GST ERD9 and the phenylalanine ammonia-lyase-like (PAL). Relationships have been established between this latter and flavonoids and polyphenols, discussed previously. GSTs are a multigene family that may be involved in auxin response, production of secondary metabolites (anthocyanins), and confer antioxidant activity to flavonoids [66].

In conclusion, the biological processes characteristic of embryogenesis such as "plant development", "defense" and also "stress" (mainly oxidative) "metabolism" and "proteolysis" were impacted at the proliferation level by the repetition of a cycle of somatic embryogenesis. Moreover, the major result is the identification of a large number of proteins, interacting with flavonoids and associated secondary metabolites, which were under-expressed in 2^{ry} lines during this 2^{ry} embryogenesis.

Tertiary vs secondary embryogenic lines While the embryogenic potential is even greater in the 3^{ry} lines than in the 1^{ry} or 2^{ry} ones, the comparison of the proteomes between the 2^{ry} line and the 3^{ry} ones revealed the involvement of the same activated biological processes than those discussed during 2^{ry} somatic embryogenesis. Thus, the biological processes of "Plant development", "Proteolysis", "Stress / water stress", "Defense response" and "Growth regulators" appear in the protein networks (Fig. 8B). In opposition, the proteins were often different from those identified during the 2^{ry} somatic embryogenesis, only 33 proteins were common to the two proteomic analysis among the total of 390 identified significant proteins. In addition, among them only 12 evolved in the same way. This showed that embryogenic induction is a complex phenomenon that changes the proteome composition in cells. Induction is triggered by transfer of the cotyledonary SEs to a proper culture medium containing auxin (4.5 μ M 2,4-D). This repeated intake of auxin during the different repeated somatic embryogenesis cycles (1^{ry}, 2^{ry} and 3^{ry}) seemed to significantly modify the EMs hormonal balance since auxin interacts as much with flavonoids, as with ABA, jasmonic acid and salicylic acid [84]. Salicylic acid acts in regulating the plant growth, and in biotic and abiotic stresses [85]. It interacts strongly with flavonoids [86], but also with jasmonic acid. This had repercussions on the proteome composition of 3^{ry} lines. Thus, we observed in them an over-expression of significant proteins issued of plant growth signaling-sensitive genes, or involved in the metabolism of these plant growth signaling and affiliates (Fig. 8B). These plant growth signaling regulate cell growth and differentiation [79, 87, 88]. The high number of ABA-sensitive proteins in the 3^{ry} line suggested a different stage of development for the corresponding EMs. We could hypothesize that they were more advanced in the embryogenesis

development considering the proteomic and histological results. The 3rd lines seemed to be composed by EMs with better-organized embryonal heads, with probably more divisions in the meristem (results not shown).

So the acquisition of the embryogenic character is done through the activation of all mechanisms related to stress and defense response, interacting with growth regulators, in addition to the indirect biological processes of "Metabolic process" and "Plant development".

Conclusions

Repetitive somatic embryogenesis improved the SEs structuration by increasing frequency of small SEs together with the reduction of the size of polyembryogenic centres. Each cycle of embryogenesis induced a modification of expression of proteins in connection with biological processes already known to be related to somatic embryogenesis but quite new for EMs (plant development, defense response, metabolism, proteolysis, stress). The very innovative use of protein networks in proteomic analysis had been very conclusive. It revealed the down or up expression protein pattern after the first or second cycle of somatic embryogenesis respectively. For both patterns, the interactions with different plant growth signaling (flavonoids and associates, jasmonic acid then ABA, auxin, salicylic acid, lignin) were predominant. That revealed the ability of cells to use different protein regulatory pathways to increase embryogenic potential giving SEs more suitable for maturation.

In Douglas-fir and in conifers, this is the first report describing cellular and molecular changes in EMs obtained after two successive cycles of somatic embryogenesis. All these changes contribute to a better understanding of the increase of the embryogenic potential of secondary and tertiary embryogenic lines.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Vincent Ségura for his kind help in the statistical analysis of proteomic data.

We would like to acknowledge the support of the Chair of Excellence Forest Resources and Wood Uses, for the grant to Florian Gautier. This chair, named SylvaLIM (<http://www.fondation.unilim.fr/sylvalim>), was funded by the foundation of the University of Limoges, the region Aquitaine-Limousin-Poitou-Charente (ALPC) and the Commission of European Communities.

We thank also Sees-editing (United Kingdom) for their excellent work of English editing.

References

1. Pijut PM, Lawson SS, Michler CH: Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2011, 47(1):123-147.
2. Isah T: Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol Plant* 2016, 38(5):118.
3. Klimaszewska K, Hargreaves CL, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F: Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: *In vitro embryogenesis in Higher plants*. Springer Science + Business Media, New York edn: Germanà MA, Lambardi M (eds) 2016: 131-162.
4. Durzan D, Gupta P: Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Sci* 1987, 52(3):229-235.
5. Reeves C, Hargreaves C, Trontin J-F, Lelu-Walter M-A: Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. *Trees* 2017.
6. Lelu-Walter M-A, Gautier F, Eliášová K, Sanchez L, Teyssier C, Lomenech A-M, Le Metté C, Hargreaves C, Trontin J-F, Reeves C: High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2017.
7. Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE: Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Gen Genomes* 2013, 9(4):883-899.
8. Lelu-Walter M-A, Klimaszewska K, Miguel C, Aronen T, Hargreaves C, Teyssier C, Trontin J-F: Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus* spp.: Bottlenecks and recent advances. In: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Edited by Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. Cham: Springer International Publishing; 2016: 319-365.
9. Trontin J-F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves CL, Lelu-Walter M-A: Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants Methods in Molecular Biology*. Edited by Germana M, Lambardi M, vol. 1359. New York: SpringerScience + BusinessMedia; 2016: 131-166.
10. Williams EG, Maheswaran G: Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 1986, 57(4):443-462.
11. von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J-P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M-A: Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinii*). *Ann Bot* 2015, 115(4):605-615.
12. Morel A, Teyssier C, Trontin J-F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, Le Metté C, Belal-Bessai L *et al*: Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol Plant* 2014, 152(1):184-201.
13. Merkle S: Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tiss Cult Biotech* 1995, 1:112-121.
14. Ballester A, Corredoira E, Vieitez A: Limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Edited by Park Y, Bonga J, Moon H. Seoul, Korea: Korea Forest Research Institute; 2016: 56-74.
15. von Aderkas P, Bonga J, Klimaszewska K, Owens J: Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro*. In: Edited by Ahuja M. New York: Woody Plant Biotechnology Plenum Press; 1991: 139-155.
16. Gautier F, Eliášová K, Reeves C, Sanchez L, Teyssier C, Trontin J-F, Le Metté C, Vágner M, Costa G, Hargreaves C *et al*: What is the best way to maintain embryogenic capacity of embryogenic lines initiated from Douglas-fir immature embryos ? In:

- Proceedings 4th International Conference of the IUFRO Unit 20902 on "Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a changing climate and environment"*. Edited by Bonga J, Park Y, Trontin J; 2017: 283-286.
17. Hernández I, Cuenca B, Carneros E, Alonso-Blázquez N, Ruiz M, Celestino C, Ocaña L, Alegre J, Toribio M: Application of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. In: *Tree For Sci Biotechnol*. vol. 5; 2011: 19-26.
 18. Lee NN, Moon HK, Lee J-W, Choi YE, Park S-Y: Somatic embryogenesis and plant regeneration from a 700-year-old *Kalopanax septemlobus* tree. *Trees* 2017, 31(5):1439-1451.
 19. Pinto G, Correia S, Corredoira E, Ballester A, Correia B, Neves L, Canhoto J: *In vitro* culture of Eucalyptus: where do we stand? In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Edited by Park Y, Bonga J, Moon H. Seoul, Korea: Korea Forest Research Institute; 2016: 441-462.
 20. Bonga JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P: Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Org* 2010, 100(3):241-254.
 21. Trontin J-F, Aronen T, Hargreaves C, Montalbán I, Moncaleán P, Reeves C, Quoniou S, Lelu-Walter M-A, Klimaszewska K: International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Edited by Park Y, Bonga J, Moon H, Korea Forest Research Institute edn. Seoul, Korea: Korea Forest Research Institute; 2016: 211-260.
 22. Ruaud J-N, Bercetche J, Pâques M: First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant Cell Rep* 1992, 11(11):563-566.
 23. Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge R: Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* 2011, 233(3):635-647.
 24. Harvengt L, Trontin J-F, Reymond I, Canlet F, Paques M: Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta* 2001, 213(5):828-832.
 25. Uddenberg D, Valladares S, Abrahamsson M, Sundström JF, Sundås-Larsson A, von Arnold S: Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta* 2011, 234(3):527-539.
 26. Charest PJ, Devantier Y, Lachance D: Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. *In Vitro Plant* 1996, 32(2):91-99.
 27. Lelu MA, Klimaszewska K, Charest P: Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can J For Res* 1994, 24(1):100-106.
 28. Saly S, Joseph C, Corbineau F, Lelu MA, Côme D: Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul* 2002, 37(3):287-294.
 29. Vooková B, Matúšová R, Kormuťák A: Secondary somatic embryogenesis in *Abies numidica*. *Biol plant* 2003, 46(4):513-517.
 30. Vooková B, Kormuťák A: Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. *Biol plant* 2006, 50(4):785-788.
 31. Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter M-A: Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2009, 45(1):20-33
 32. von Aderkas P, Kong L, Prior N: *In vitro* techniques for conifer embryogenesis. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Edited by Park Y, Bonga J, Moon H. Seoul, Korea: Korea Forest Research Institute; 2016: 335-350.

33. Egertsdotter U, Von Arnold S: Classification of embryogenic cell-lines of *Picea abies* as regards protoplast isolation and culture. *J Plant Physiol* 1993, 141(2):222-229.
34. Breton D, Harvengt L, Trontin J-F, Bouvet A, Favre J-M: Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2006, 87(1):95-108.
35. Breton D, Harvengt L, Trontin J-F, Bouvet A, Favre J-M: High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2005, 41(4):494.
36. Elhiti M, Stasolla C, Wang A: Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2013, 49(6):631-642.
37. Rocha D, Dornelas M: Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Rev* 2013, 8:1-17.
38. Lippert D, Jun Z, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, Ritland K, Ellis B, Douglas CJ, Bohlmann J: Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *PROTEOMICS* 2005, 5(2):461-473
39. Businge E, Bygdell J, Wingsle G, Moritz T, Egertsdotter U: The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol Plant* 2013, 149(2):273-285.
40. Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A-M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M-A: Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol Plant* 2011, 141(2):152-165.
41. Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M-A: In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol Plant* 2014, 150(2):271-291.
42. Zhao J, Li H, Fu S, Chen B, Sun W, Zhang J, Zhang J: An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLOS ONE* 2015, 10(3):e0119987.
43. Zhen Y, Zhao Z-Z, Zheng R-H, Shi J: Proteomic analysis of early seed development in *Pinus massoniana* L. *Plant Physiol Biochem* 2012, 54(0):97-104.
44. Morel A, Trontin J-F, Corbineau F, Lomenech A-M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M *et al*: Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 2014, 240(5):1075-1095.
45. Hargreaves CL, Reeves CB, Find JI, Gough K, Josekutty P, Skudder DB, van der Maas SA, Sigley MR, Menzies MI, Low CB *et al*: Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. *Can J For Res* 2009, 39(8):1566-1574.
46. Hargreaves C, Reeves C, Find K, Gough K, Menzies M, Low C, Mullin T: Overcoming the challenges of family and genotype representation and early cell line proliferation in somatic embryogenesis from control-pollinated seeds of *Pinus radiata*, vol. 41; 2011.
47. Vondráková Z, Eliášová K, Vágner M: The anti-actin drugs latrunculin and cytochalasin affect the maturation of spruce somatic embryos in different ways. *Plant Sci* 2014, 221-222(Supplement C):90-99.
48. Crouzet M, Claverol S, Lomenech A-M, Le Sénéchal C, Costaglioli P, Barthe C, Garbay B, Bonneu M, Vilain S: *Pseudomonas aeruginosa* cells attached to a surface display a typical proteome early as 20 minutes of incubation. *PLOS ONE* 2017, 12(7):e0180341.
49. Kall L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ: Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Meth* 2007, 4(11):923-925.
50. Vizcaíno JA, Csordas A, del-Toro N, Dianes JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T *et al*: 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucl Acids Res* 2016, 44(D1):D447-D456.

51. Mi H, Muruganujan A, Thomas P: PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucl Acids Res* 2013, 41:D377-386.
52. Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T: Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* 2006, 22(13):1600-1607.
53. Gupta P, Timmis R, Timmis K, Carlson W, Welty E: Somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). In: *Somatic embryogenesis in woody plants*. vol. 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands edn: Jain S, Gupta P, Newton R (eds); 1995: 303-313.
54. Pilarska M, Malec P, Salaj J, Bartnicki F, Konieczny R: High expression of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE coincides with initiation of various developmental pathways in *in vitro* culture of *Trifolium nigrescens*. *Protoplasma* 2016, 253(2):345-355.
55. Rocha DI, Monte-Bello CC, Aizza LCB, Dornelas MC: A passion fruit putative ortholog of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1* gene is expressed throughout the *in vitro* de novo shoot organogenesis developmental program. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2016, 125(1):107-117.
56. Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M: Influence of the embryonal-suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. *Plant Sci* 2001, 160(3):473-479.
57. Winkelmann T: Recent advances in propagation of woody plants. In: 2013. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium: 375-381.
58. Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, Hohtola A: Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiol* 2000, 20(7):467-475.
59. Baba AI, Nogueira FCS, Pinheiro CB, Brasil JN, Jereissati ES, Jucá TL, Soares AA, Santos MF, Domont GB, Campos FA: Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Sci* 2008, 175(5):717-723.
60. Mahdavi-Darvari F, Noor NM, Ismanizan I: Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015, 120(2):407-422.
61. van Zyl L, Bozhkov PV, Clapham DH, Sederoff RR, von Arnold S: Up, down and up again is a signature global gene expression pattern at the beginning of gymnosperm embryogenesis. *Gene Exp Pat* 2003, 3(1):83-91.
62. Stasolla C, Bozhkov PV, Chu T-M, van Zyl L, Egertsdotter U, Suarez MF, Craig D, Wolfinger RD, Von Arnold S, Sederoff RR: Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol* 2004, 24(10):1073-1085.
63. Jo L, Dos Santos ALW, Bueno CA, Barbosa HR, Floh EIS: Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree Physiol* 2014, 34(1):94-104.
64. Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S: Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Cell Sci* 2000, 113(24):4399.
65. Bozhkov PV, Filonova LH, Suarez MF: 4 - Programmed Cell Death in Plant Embryogenesis. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Edited by Schatten GP, vol. 67: Academic Press; 2005: 135-179.
66. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C: H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 1994, 79(4):583-593.
67. dos Santos ALW, Elbl P, Navarro BV, de Oliveira LF, Salvato F, Balbuena TS, Floh EIS: Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. *J of Prot* 2016, 130(Supplement C):180-189.

68. Zhang Y, Zhang S, Han S, Li X, Qi L: Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Rep* 2012, 31(9):1637-1657.
69. Wiweger M, Farbos I, Ingouff M, Lagercrantz U, Von Arnold S: Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *J Exp Bot* 2003, 54(393):2691-2699.
70. Ge Y, Cai YM, Bonneau L, Rotari V, Danon A, McKenzie EA, McLellan H, Mach L, Gallois P: Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in Arabidopsis. *Cell Death Differ* 2016, 23:1493.
71. Zhen Y, Chen J, Chen Q, Shi J: Elemental analyses of calli and developing somatic embryo of hybrid *liriodendron*. *Pakistan J of Bot* 2015, 47(1):189-196.
72. Li Z, Tang L, Qiu J, Zhang W, Wang Y, Tong X, Wei X, Hou Y, Zhang J: Serine carboxypeptidase 46 Regulates Grain Filling and Seed Germination in Rice (*Oryza sativa* L.). *PLOS ONE* 2016, 11(7):e0159737.
73. Nakano M, Kigoshi K, Shimizu T, Endo T, Shimada T, Fujii H, Omura M: Characterization of genes associated with polyembryony and *in vitro* somatic embryogenesis in *Citrus*. *Tree Gen Genomes* 2013, 9(3):795-803.
74. Liu H-H, Tian X, Li Y-J, Wu C-A, Zheng C-C: Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 2008, 14(5):836-843.
75. Ahmadi B, Shariatpanahi ME, Teixeira da Silva JA: Efficient induction of microspore embryogenesis using abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid in *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2014, 116(3):343-351.
76. Linkies A, Leubner-Metzger G: Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Rep* 2012, 31(2):253-270.
77. Pourcel L, Irani NG, Koo AJK, Bohorquez-Restrepo A, Howe GA, Grotewold E: A chemical complementation approach reveals genes and interactions of flavonoids with other pathways. *Plant J* 2013, 74(3):383-397.
78. Zhao J, Wang B, Wang X, Zhang Y, Dong M, Zhang J: iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015, 120(2):655-669.
79. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M: Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci* 2012, 196(Supplement C):67-76.
80. Luo P, Shen Y, Jin S, Huang S, Cheng X, Wang Z, Li P, Zhao J, Bao M, Ning G: Overexpression of *Rosa rugosa* anthocyanidin reductase enhances tobacco tolerance to abiotic stress through increased ROS scavenging and modulation of ABA signaling. *Plant Sci* 2016, 245(Supplement C):35-49.
81. Zhang S-G, Han S-Y, Yang W-H, Wei H-L, Zhang M, Qi L-W: Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010, 100(1):21-29.
82. Kairong C, Ji L, Gengmei X, Jianlong L, Lihong W, Yafu W: Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2002, 68(2):187-193.
83. Parent C, Capelli N, Dat J: Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies* 2008, 331(4):255-261.
84. Vondráková Z, Krajňáková J, Fischerová L, Vágner M, Eliášová K: Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. In: *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Edited by Park Y, Bonga J, Moon H. Seoul: National Institute of Forest Science; 2016: 123-169.
85. Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum NA, Khan NA: Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front Plant Sci* 2015, 6:462.
86. Gondor OK, Janda T, Soós V, Pál M, Majláth I, Adak MK, Balázs E, Szalai G: Salicylic acid induction of flavonoid biosynthesis pathways in wheat varies by treatment. *Front Plant Sci* 2016, 7(1447).

87. Imin N, Goffard N, Nizamidin M, Rolfe BG: Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures. *BMC Plant Biol* 2008, 8(1):110.
88. Ng TLM, Karim R, Tan YS, Teh HF, Danial AD, Ho LS, Khalid N, Appleton DR, Harikrishna JA: Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and non-embryogenic callus of Fingerroot ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLOS ONE* 2016, 11(6):e0156714.



Figure legends

Figure 1. Origin of the Douglas-fir material analyzed in this work (1^{ry}, 2^{ry} and 3^{ry} embryogenic lines).

EMs: embryonal masses; SE: somatic embryo; ZE: zygotic embryo.

Figure 2. Structure of embryonal masses from 1^{ry} and 2^{ry} lines of genotypes TD17 and SD4. **A** / TD17; **B** / TD17-1; **C** / SD4; **D** / SD4-2; **E** / SD4-6; **F** / SD4-8. Trypan blue staining of squashes of fresh EMs; arrowheads in E, F mark small singulated somatic embryos; m – meristem of polyembryogenic centres, s – suspensor. Scale bar = 200 µm.

Figure 3. Structure of embryonal masses from 3^{ry} lines of the genotype SD4. **A,B** / SD4-8-1; **C,D** / SD4-8-2; **E,F** / SD4-8-3. Trypan blue staining of squashes of fresh EMs, arrowhead in F marks small singulated somatic embryos; m – meristem of polyembryogenic centres, s – suspensor. Scale bar = 500 µm.

Figure 4. Histology of embryonal masses from 1^{ry} and 2^{ry} lines of the genotype TD17. **A,C** / TD17; **B,D** / TD17-1. **A,B** – polyembryogenic centres (PECs); **C** - small SEs, arrowheads point to actively dividing cells (metaphase/anaphase); **D** – singulated large SEs; m – meristem of PECs or singulated SEs, s – suspensor. Paraffin sections stained with Alcian Blue/Nuclear Fast Red. Scale bar: **A** = 200 µm; **B, D** = 500 µm; **C** = 50 µm.

Figure 5. Histology of embryonal masses from 1^{ry} (SD4) and 2^{ry} lines (SD4-2; SD4-6; SD4-8) of the genotype SD4. **A,B,C** / SD4; **D,E** / SD4-2; **F,G** / SD4-6; **H,I** / SD4-8. **A, B** – structures resembling the polyembryogenic centres (PECs) Arrow in **A** points to small somatic embryos (SEs) and the star marks the dead material in the end of suspensor region; arrow in **B** points to the smooth surface of protoderm and arrowhead marks the place without protoderm, the detail of the framed region in **B** is shown in **C**; arrow in **C** points to the brown cells with phenolic content located in the meristem-like region; **D** – PEC; **E** – singulated SEs, **F** – cluster of small SEs and PECs; **G** – well-organized SEs; **H** – small SEs; **I** – small PECs; m – meristem of PECs or singulated SEs, s – suspensor. Paraffin sections stained with Alcian Blue/Nuclear Fast Red Scale bar: **A, B** = 500 µm; **C** = 50 µm; **D, E, G, H, I** = 100 µm; **F** = 200 µm.

Figure 6. Histology of embryonal masses from 3^{ry} lines (SD4-8-1; SD4-8-2; SD4-8-3) of the genotype SD4. **A,B** / SD4-8-1; **C,D** / SD4-8-2; **E,F** / SD4-8-3. **A, B** – Polyembryogenic centres (PECs) Arrowheads in **B** points to small SEs; **C** – PECs, smaller ones with distinct embryonal heads; **D** – detail of PEC; **E** – PECs, arrowheads points to small SEs; **F** – detail of PEC with well-organized embryonal heads; m – meristem of PEC, s – suspensor. Paraffin sections stained with Alcian Blue/Nuclear Fast Red. Scale bar: **A, B, C** = 200 µm; **D, F** = 100 µm; **E** = 500 µm.



Figure 7. Principal component analysis of proteins identified during the proteomic studies. **A** / Comparison between the 1^{ry} and 2^{ry} lines; **B** / Comparison between 2^{ry} (SD4-8) and 3^{ry} lines (SD4-8-1, SD4-8-2, SD4-8-3).

Figure 8. Sub Network Enrichment Analysis (SNEA) connecting significant proteins and regulators or targets from proteomic studies.

A / Comparison of 2^{ry} vs 1^{ry} lines; **B** / Comparison 3^{ry} vs 2^{ry} lines somatic embryogenesis in Douglas-fir.

The Douglas-fir significant proteins (ratio 1.5, $p < 0.05$) are named by their *Arabidopsis* homologues. The correspondences between Douglas-fir and *Arabidopsis* protein names are given in Additional file 1. Red color: sur-expression of this protein in 2^{ry} lines in A and 3^{ry} lines in B); blue color: sur-expression of this protein in 1^{ry} lines in A, 2^{ry} line in B; grey color: protein significant in the proteomic comparison

Table 1. Mean yield in cotyledonary somatic embryos (SEs) of Douglas-fir from 1^{ry} and 2^{ry} embryogenic lines.

Line	Mean no. of SEs g ⁻¹ f.w.	
Primary		
TD17	30	± 19 ^a
SD4	478	± 139 ^c
Secondary		
TD17-1	241	± 70 ^b
SD4-2	3131	± 34 ^e
SD4-6	1515	± 297 ^d
SD4-8	1821	± 363 ^d

Values are means of 3 biological and 5-6 technical replicates ± 95% confidence limits. Significant differences ($p < 0.05$) in multiple comparisons of means are indicated by different letters

Table 2. Mean yield in cotyledonary somatic embryos (SEs) of Douglas-fir 2^{ry} and 3^{ry} embryogenic lines.

Line	Mean no. of SEs g ⁻¹ f.w.	
Secondary		
SD4-8	2401	± 534 ^a
Tertiary		
SD4-8-1	3344	± 1274 ^{ab}
SD4-8-2	4160	± 931 ^b
SD4-8-3	4258	± 829 ^b

Values are means of 3 biological and 5-6 technical replicates ± 95% confidence limits. Significant differences ($p < 0.05$) in multiple comparisons of means are indicated by different letters



Table 3. Gene Ontology (GO) terms enriched in significant proteins after repetitive somatic embryogenesis in Douglas-fir.

Secondary versus primary lines						
GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	ratio sign./exp.	Expression
GO:0015977	carbon fixation	17	2	0,13	15,38	2 ^{ry} >1 ^{ry}
GO:0009269	response to desiccation	17	2	0,13	15,38	2 ^{ry} >1 ^{ry}
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	38	2	0,28	7,14	2 ^{ry} >1 ^{ry}
GO:0015979	photosynthesis	43	2	0,32	6,25	2 ^{ry} >1 ^{ry}
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	142	5	1,05	4,76	2 ^{ry} >1 ^{ry}
GO:0043488	regulation of mRNA stability	2	2	0,05	40,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0046292	formaldehyde metabolic process	4	2	0,1	20,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006556	S-adenosylmethionine biosynthetic process	7	3	0,18	16,67	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006097	glyoxylate cycle	7	3	0,18	16,67	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0010030	positive regulation of seed germination	5	2	0,13	15,38	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0051262	protein tetramerization	6	2	0,15	13,33	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:1901663	quinone biosynthetic process	13	4	0,33	12,12	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006558	L-phenylalanine metabolic process	15	4	0,38	10,53	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009969	xyloglucan biosynthetic process	8	2	0,2	10,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009051	pentose-phosphate shunt, oxidative branch	8	2	0,2	10,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0042593	glucose homeostasis	8	2	0,2	10,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0010262	somatic embryogenesis	14	3	0,35	8,57	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006032	chitin catabolic process	22	4	0,55	7,27	1 ^{ry} >2 ^{ry}

GO:0009813	flavonoid biosynthetic process	58	9	1,46	6,16	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0002215	defense response to nematode	13	2	0,33	6,06	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006730	one-carbon metabolic process	27	4	0,68	5,88	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0080167	response to karrikin	44	6	1,11	5,41	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	93	12	2,34	5,13	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0008219	cell death	77	9	1,94	4,64	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	26	3	0,65	4,62	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006555	methionine metabolic process	28	3	0,71	4,23	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009611	response to wounding	129	13	3,25	4,00	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009787	regulation of abscisic acid-activated signaling pathway	30	3	0,76	3,95	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009411	response to UV	53	5	1,33	3,76	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009808	lignin metabolic process	85	8	2,14	3,74	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	64	6	1,61	3,73	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009626	plant-type hypersensitive response	44	4	1,11	3,60	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009636	response to toxic substance	49	4	1,23	3,25	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process	51	4	1,28	3,13	1 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0055114	oxidation-reduction process	684	36	17,22	2,09	1 ^{ry} >2 ^{ry}

Table 3. Continued.

Tertiary versus secondary lines

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	ratio sign./exp.	Expression
GO:0006433	prolyl-tRNA aminoacylation	2	2	0,06	33,33	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009871	jasmonic acid and ethylene-dependent systemic resistance, ethylene mediated signaling pathway	5	3	0,16	18,75	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009969	xyloglucan biosynthetic process	8	3	0,26	11,54	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0031640	killing of cells of other organism	11	4	0,35	11,43	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0010731	protein glutathionylation	7	2	0,22	9,09	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0010183	pollen tube guidance	14	4	0,45	8,89	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006558	L-phenylalanine metabolic process	15	4	0,48	8,33	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0046487	glyoxylate metabolic process	8	2	0,26	7,69	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0080092	regulation of pollen tube growth	17	4	0,54	7,41	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0043650	dicarboxylic acid biosynthetic process	13	3	0,41	7,32	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006032	chitin catabolic process	22	5	0,7	7,14	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0046189	phenol-containing compound biosynthetic process	9	2	0,29	6,90	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006949	syncytium formation	9	2	0,29	6,90	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0080167	response to karrikin	44	8	1,4	5,71	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006816	calcium ion transport	11	2	0,35	5,71	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009828	plant-type cell wall loosening	11	2	0,35	5,71	3 ^{ry} >2 ^{ry}



GO:0009626	plant-type hypersensitive response	44	7	1,4	5,00	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0000272	polysaccharide catabolic process	64	10	2,04	4,90	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0072329	monocarboxylic acid catabolic process	42	6	1,34	4,48	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006749	glutathione metabolic process	56	8	1,79	4,47	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process	51	7	1,63	4,29	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009718	anthocyanin-containing compound biosynthetic process	23	3	0,73	4,11	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0019395	fatty acid oxidation	39	5	1,24	4,03	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009611	response to wounding	129	15	4,11	3,65	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0050832	defense response to fungus	102	11	3,25	3,38	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	93	10	2,96	3,38	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009808	lignin metabolic process	85	9	2,71	3,32	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006952	defense response	370	31	11,79	2,63	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0044248	cellular catabolic process	472	39	15,05	2,59	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006979	response to oxidative stress	232	16	7,4	2,16	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0009617	response to bacterium	201	13	6,41	2,03	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0055114	oxidation-reduction process	684	44	21,8	2,02	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	142	9	4,53	1,99	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	414	24	13,2	1,82	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0010038	response to metal ion	393	19	12,53	1,52	3 ^{ry} >2 ^{ry}
GO:0006879	cellular iron ion homeostasis	3	2	0,03	66,67	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0010197	polar nucleus fusion	8	2	0,09	22,22	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0046274	lignin catabolic process	16	2	0,18	11,11	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0048509	regulation of meristem development	20	2	0,23	8,70	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0010051	xylem and phloem pattern formation	24	2	0,27	7,41	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	56	4	0,63	6,35	2 ^{ry} >3 ^{ry}



GO:0016310	phosphorylation	222	6	2,51	2,39	2 ^{ry} >3 ^{ry}
GO:0032774	RNA biosynthetic process	262	7	2,97	2,36	2 ^{ry} >3 ^{ry}

GO.ID: Gene Ontology Identifier; *Annotated*: number of annotated Douglas proteins with GO terms in the data set; *Significant*: number of Douglas proteins in the analysed dataset; *Expected*: expected number of interesting proteins mapped to the GO term if randomly distributed over all GO terms; *ratio sign./exp*: ratio between significant and expected proteins mapping to the GO term; *Expression*: proteins assigned to specific GO term are over-expressed in 1^{ry} (1^{ry}>2^{ry}), 2^{ry} (2^{ry}>1^{ry}) or 3^{ry} lines (3^{ry}>2^{ry}). Only results with *p*value<0.05 of the Fisher's exact test were considered.

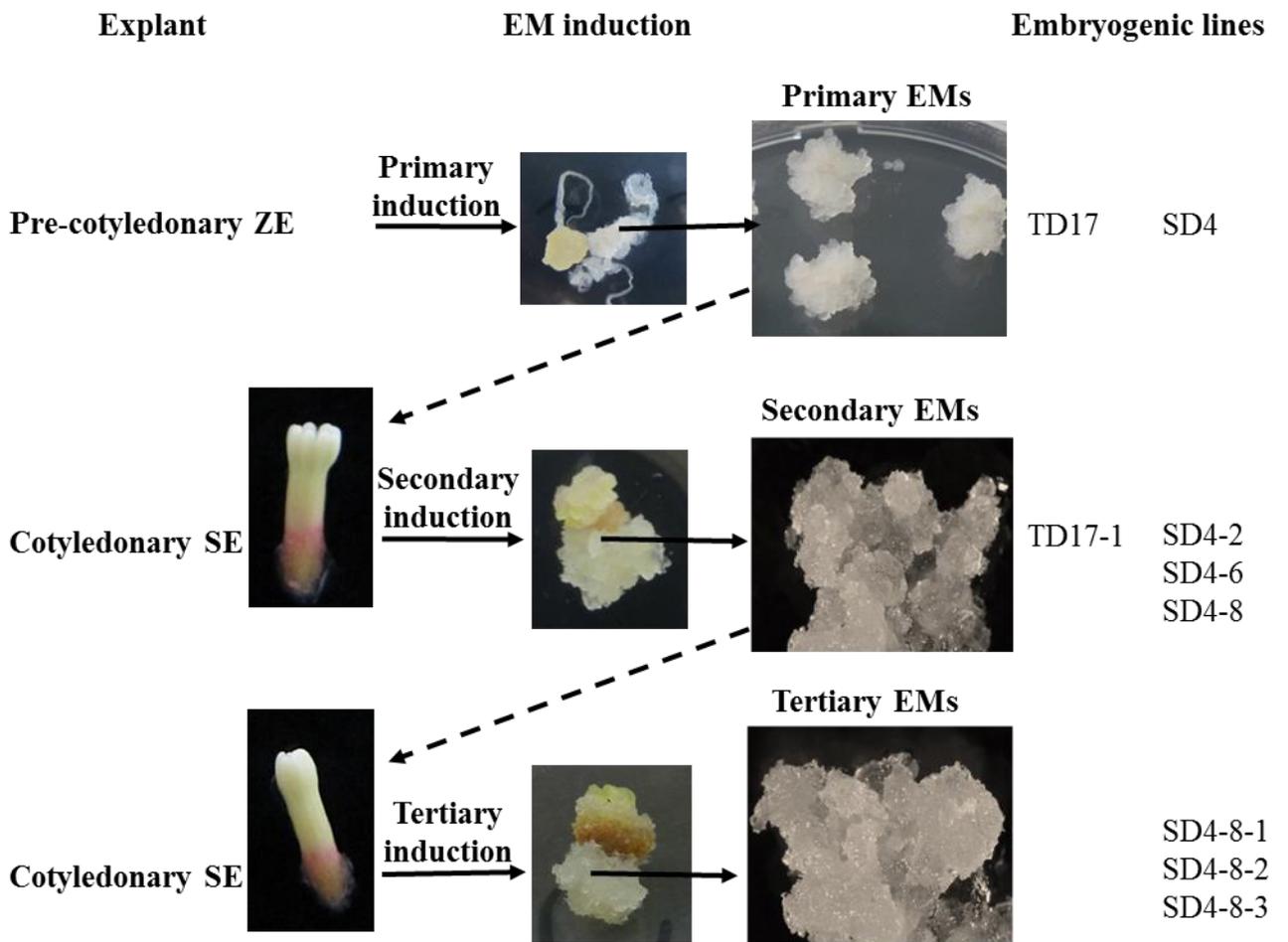


Figure 1.

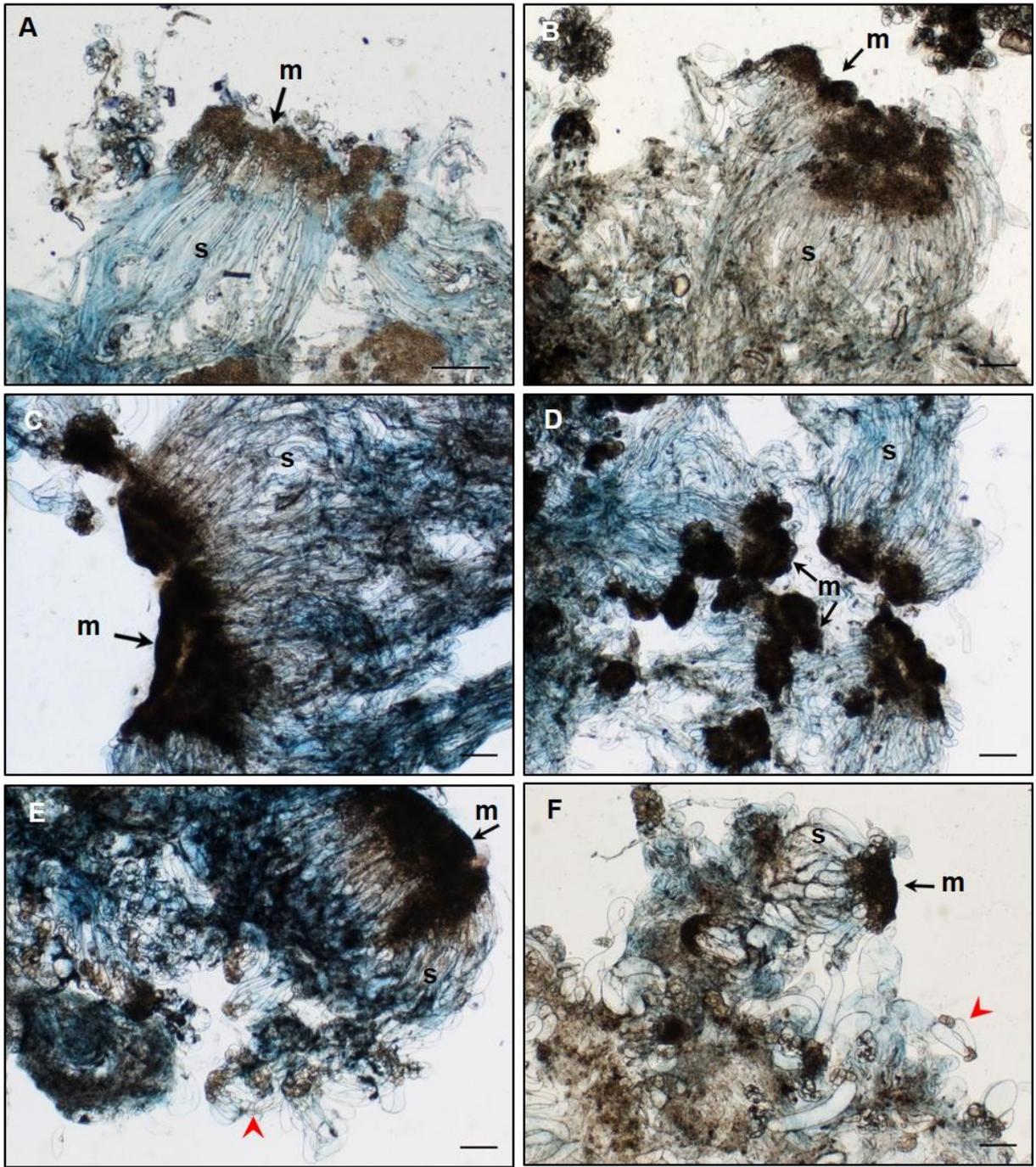


Figure 2.

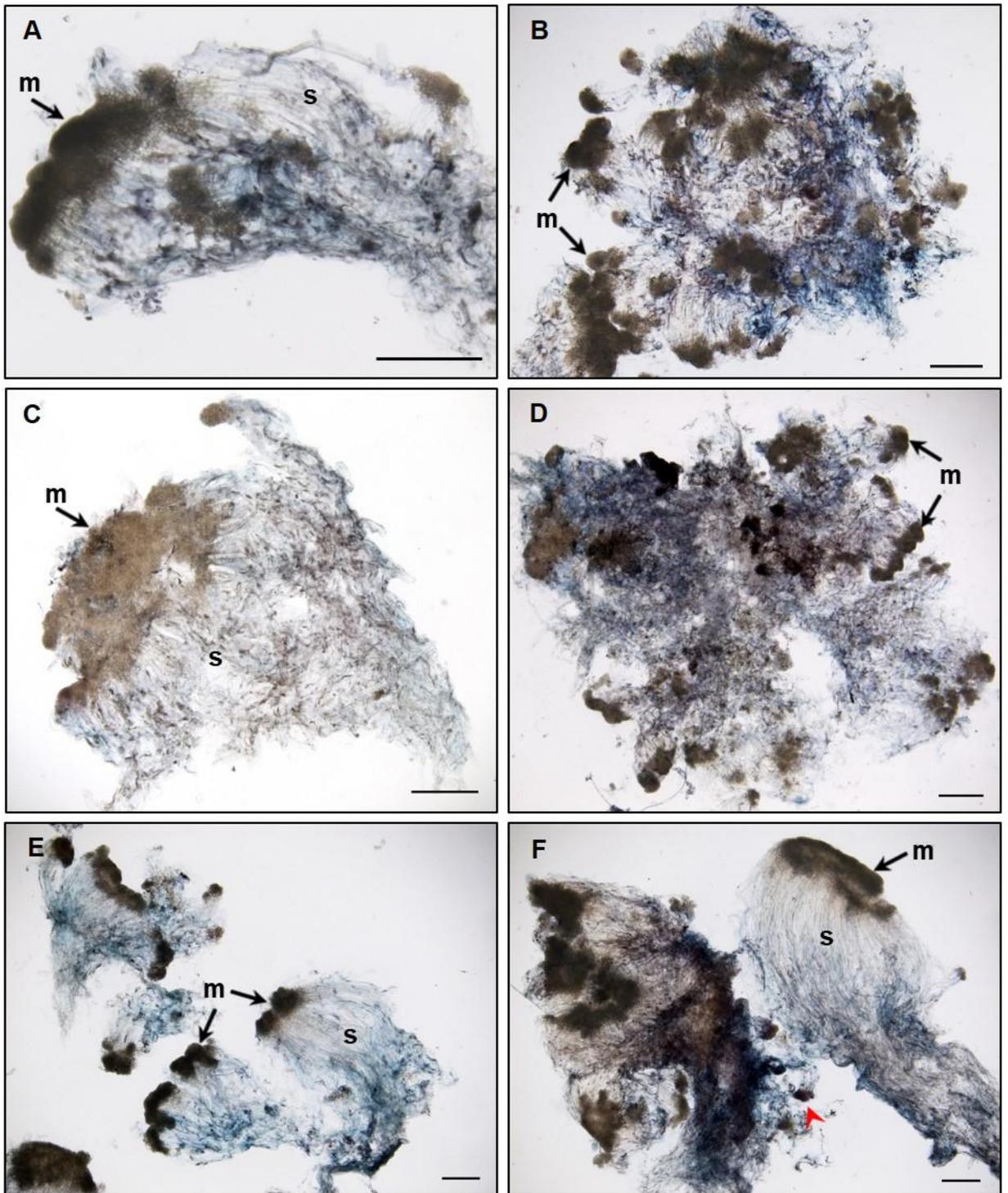


Figure 3.

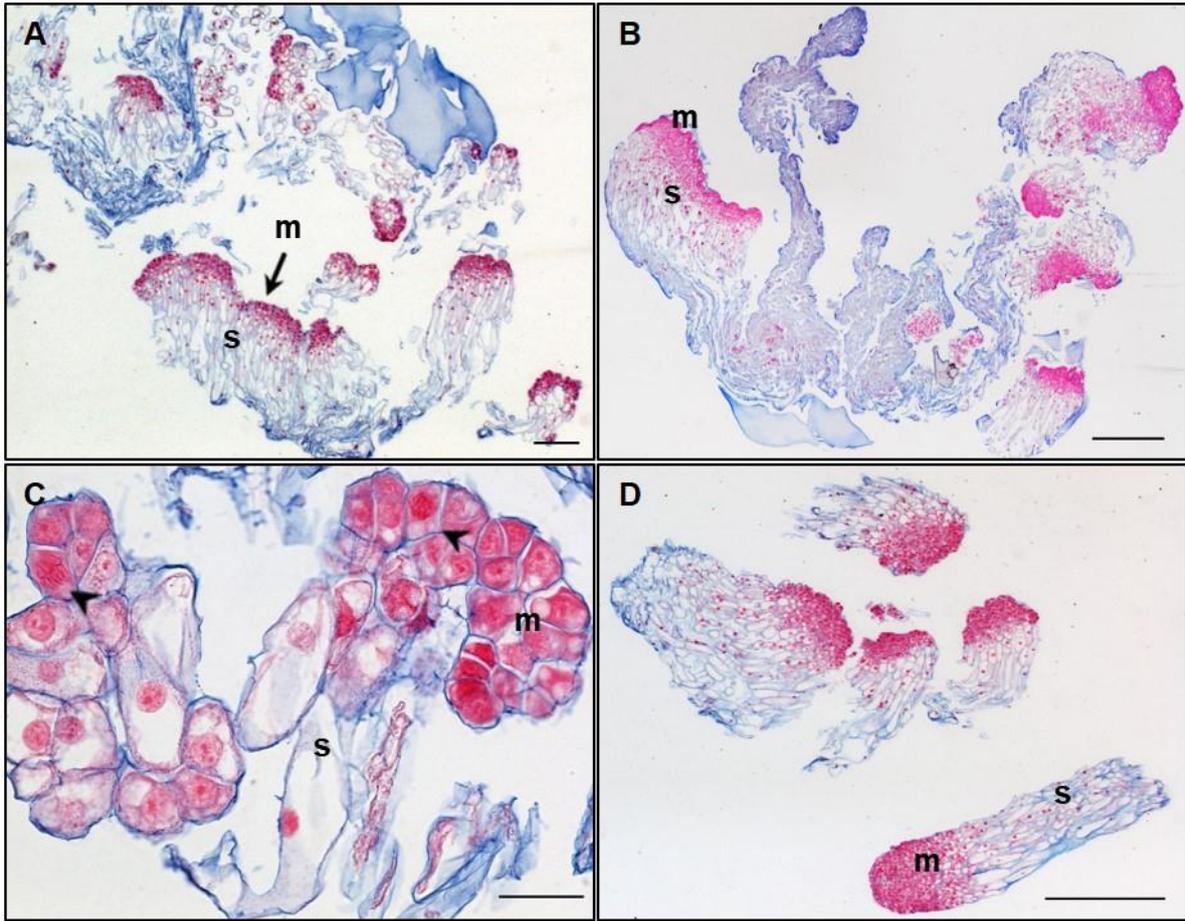


Figure 4.

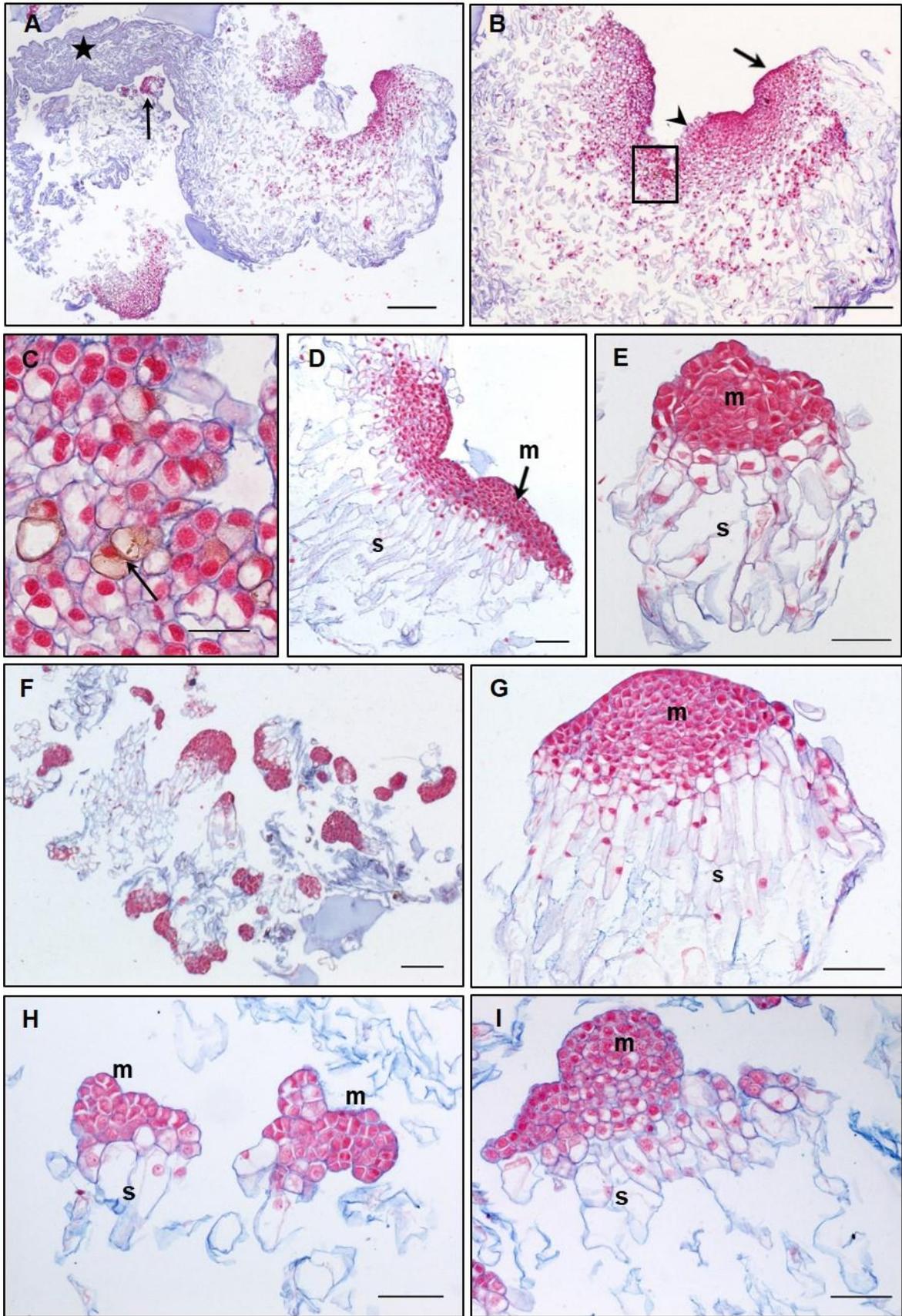


Figure 5.

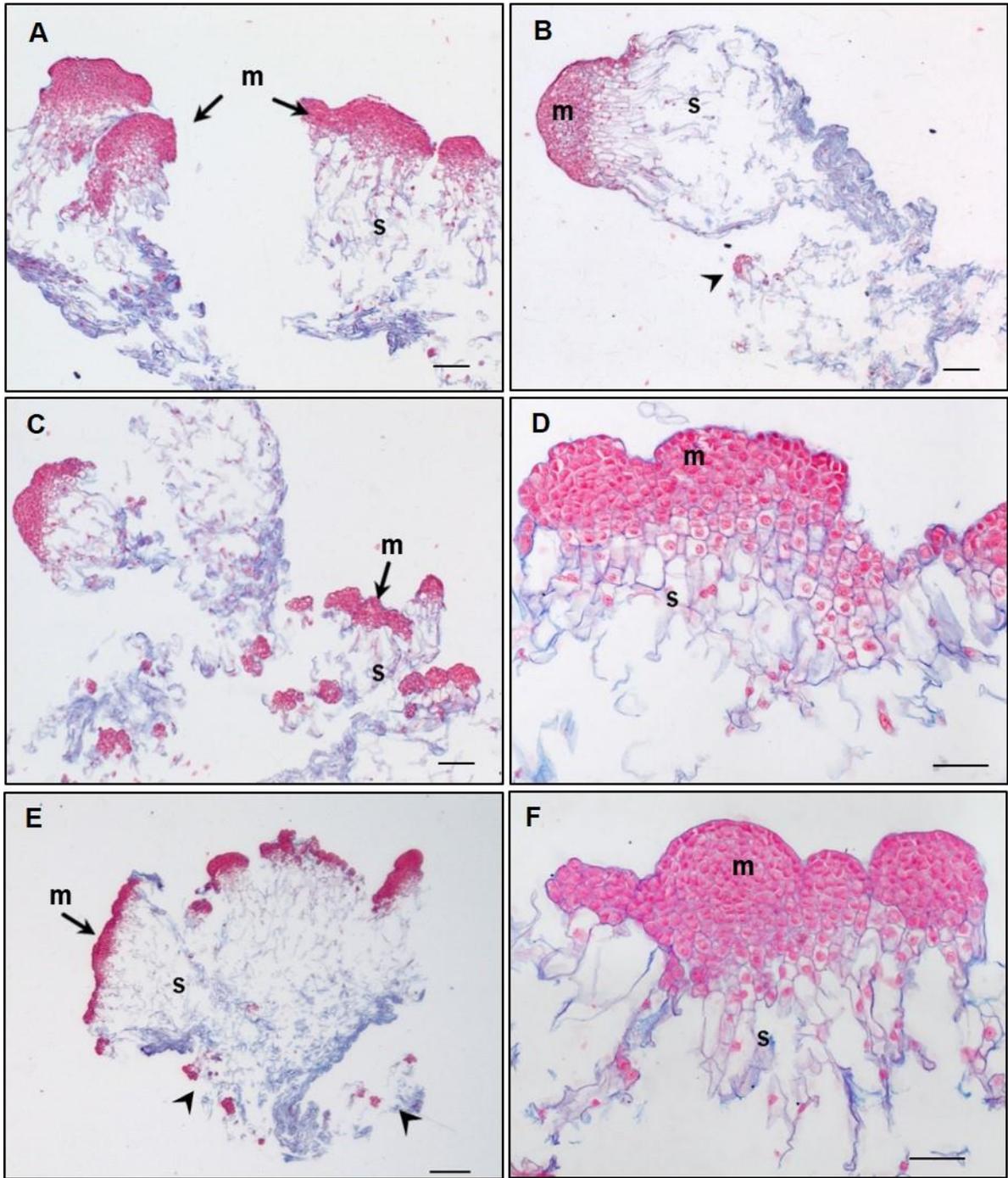
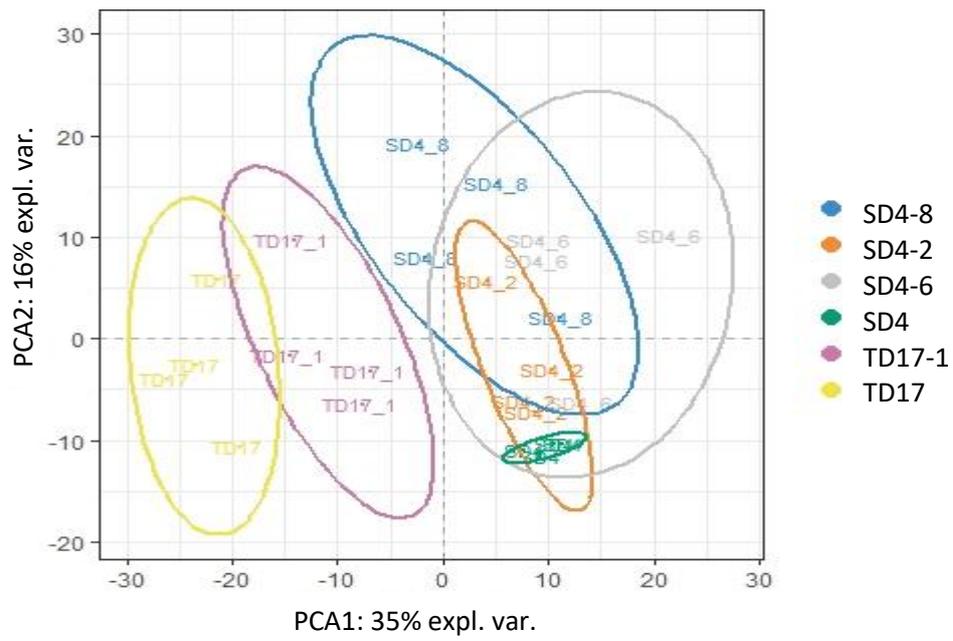


Figure 6.

A



B

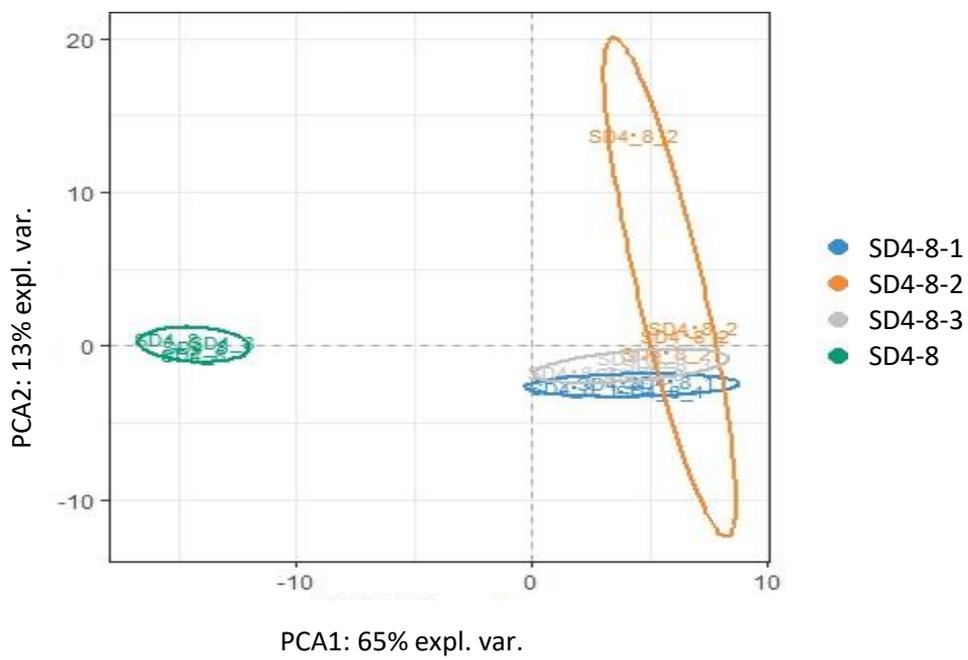
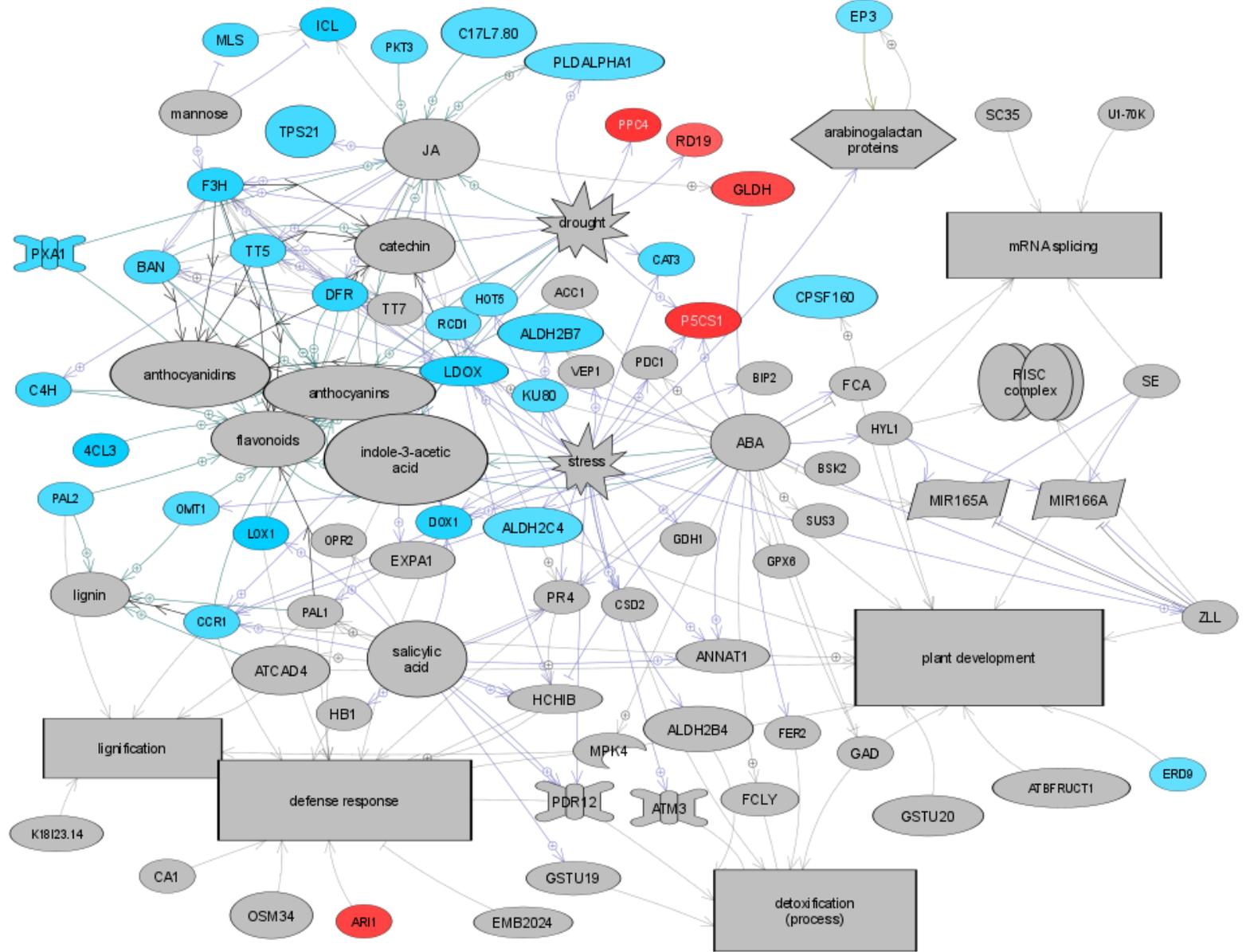
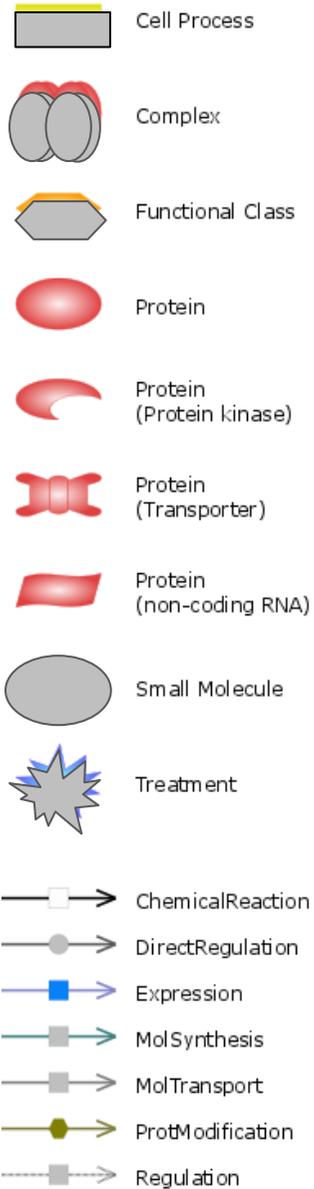


Figure 7.

A



B

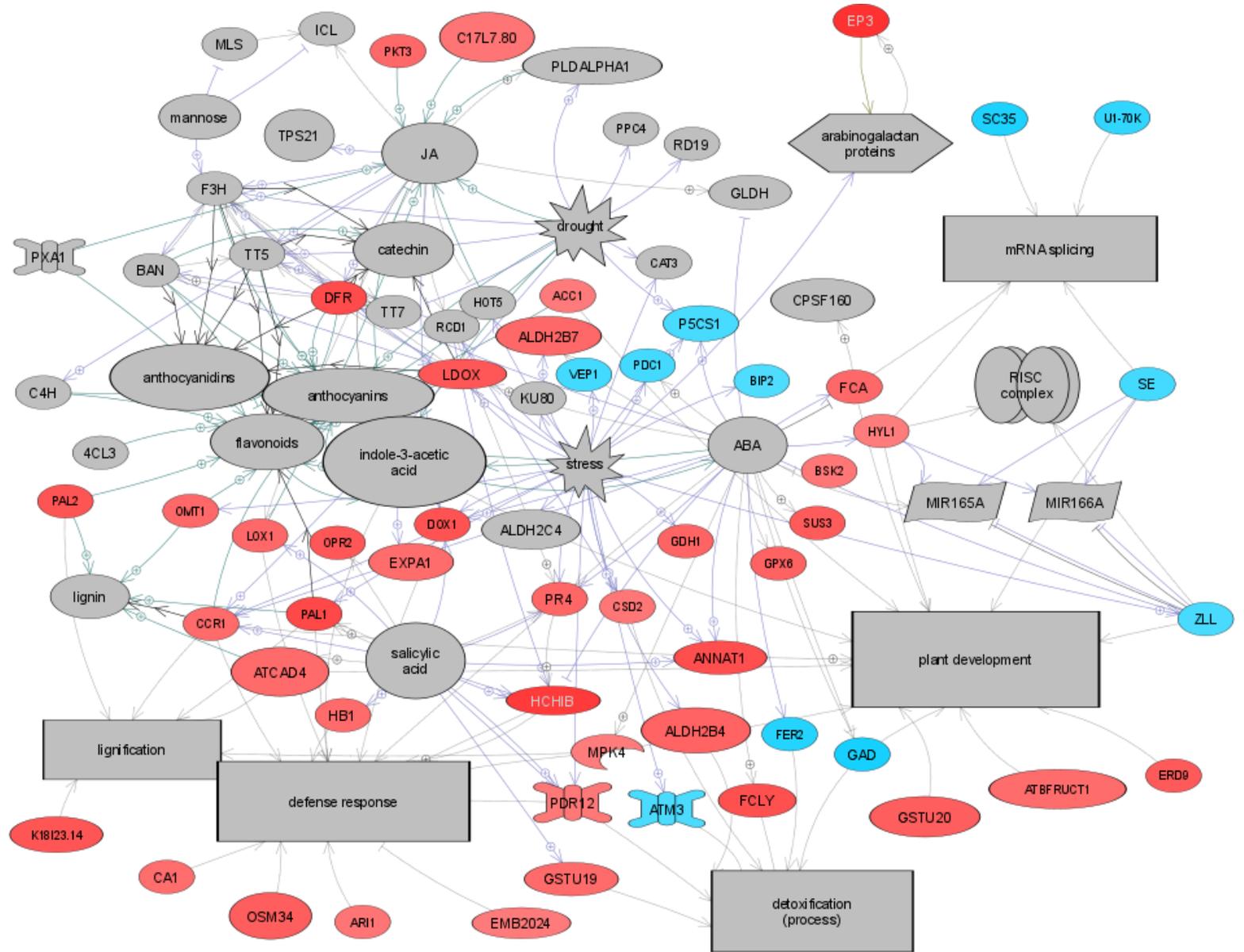
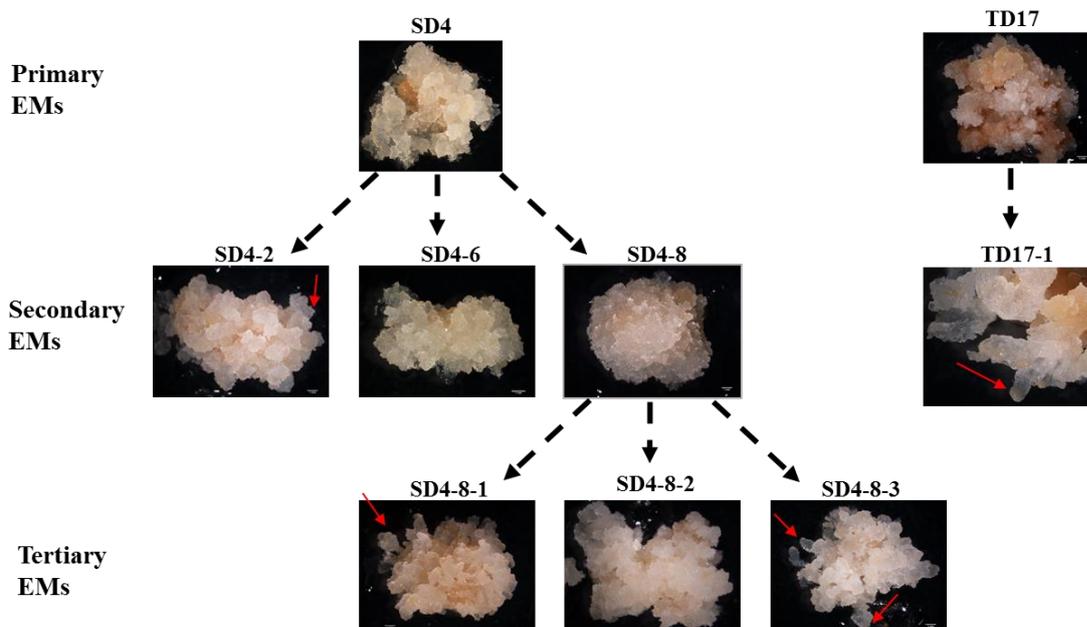


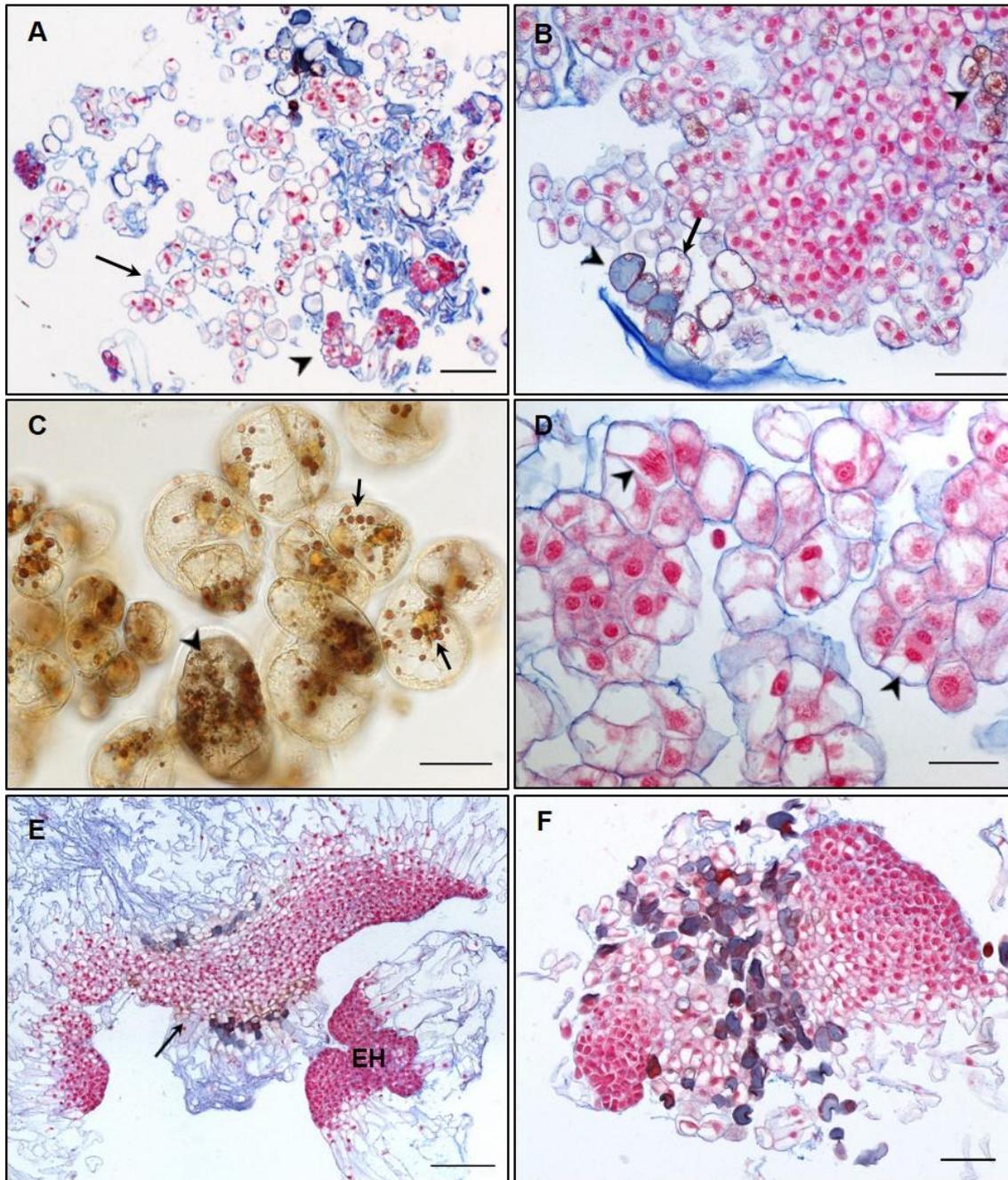
Figure 8.

Additional files

Additional file S1. Differentially expressed proteins in 2^{ry} vs 1^{ry} and 3^{ry} vs 2^{ry} embryogenic lines of two Douglas-fir genotypes.

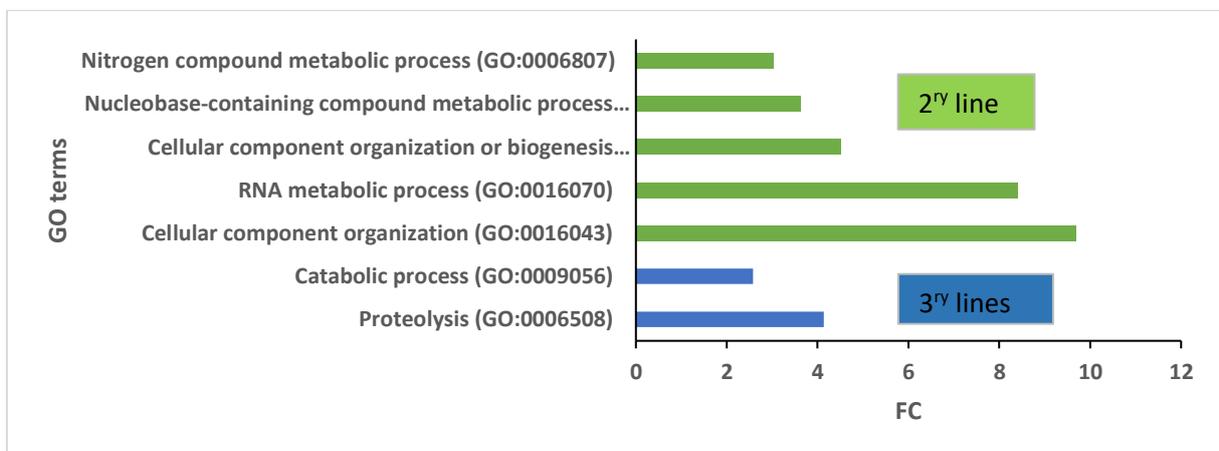


Additional file: Figure S1. Macroscopic aspect of embryonal masses (EMs) from two Douglas-fir genotypes (SD4, TD17) obtained after 1st somatic embryogenesis from zygotic embryo and two cycles (2nd and 3rd) of repetitive somatic embryogenesis from somatic embryos. Note the granular aspect of most embryonal masses indicating the occurrence of large polyembryogenic centres (arrowheads) and/or singulated early somatic embryos that are sometimes protruding from the embryonal masses surface.



Additional file: Figure S2. Histology of non-embryogenic cell (NEC) clusters from 1st and/or 2nd lines of genotypes TD17 and SD4.

A / Histology of TD17 groups of loosely arranged NECs (arrow) in the vicinity of small somatic embryos (arrowhead); **B** / histology of TD17 compact NEC cluster accumulating phenolics (blue and brown cells, arrowheads) and starch (arrow); **C** / Lugol staining of TD17 NEC cluster showing starch (arrows) and phenolic compounds (small dark granules marked with arrowhead); **D** / TD17-1 NEC cluster with dividing cells (arrowheads); **E** /SD4-2 NEC cluster (arrow) within polyembryogenic centre besides well-arranged embryonic heads (EH), note phenolic content (in dark blue-grey) of cells separating NEC from suspensor cells (in light blue); **F** / SD4-6 meristemoid-like NEC cluster; note phenolic content of cells between two meristemoid-like structures (in blue-grey). Scale bar: A, E = 200 μ m; B, F = 100 μ m; C, D = 50 μ m

A**B**

Additional file : Figure S3. GO (Gene ontology) terms (Biological Process categories at level 2 or more) found to be significantly enriched in **A/** 1st (TD17, SD4) and 2nd (TD17-1, SD4-2, SD4-6, SD4-8) embryogenic lines or **B/** 2nd (SD4-8) and 3rd (SD4-8-1, SD4-8-2, SD4-8-3) embryogenic lines of Douglas-fir. Fold change (FC) corresponds to the ratio of the number of identified hits between 2nd and 1st or 3rd and 2nd lines respectively.

Additional file : Table S1. A summary of macromorphological (EM colour and morphotype) and histo-cytological traits (occurrence of polyembryogenic centres (PECs), singulated SEs and NECs) of 1^{fy} (SD4, TD17), 2^{fy} (SD4-2, SD4-6, SD4-8; TD17-1) and 3^{fy} (SD4-8-1, SD4-8-2, SD4-8-3) embryogenic lines of Douglas-fir.

Trait	Primary lines	Secondary lines	Tertiary lines
EM colour	Mostly yellow/brown, or pink, some whitish parts	Mixture of yellowish and whitish parts	Mostly whitish, some yellowish parts
EM morphotype	Granular with few protruding SEs (SD4 > TD17)	Smooth (SD4-8) to granular (SD4-6) with frequent protruding SEs (TD17-1, SD4-2)	Granular with frequent protruding SEs (SD4-8-1, SD4-8-3 > SD4-8-2)
Occurrence of PECs	+ (moderately frequent, large PECs) TD17: frequent compact PECs SD4: huge structures resembling PEC (meristemoids/nodules) but few elongated suspensor cells and starch and/or phenolics accumulating in some vacuolated cells. Rare parts considered as cleavable embryonal heads	++ (frequent PECs of small to large size) TD17-1: frequent compact PECs SD4-2: mostly PECs with distinct embryonal heads and a few structures similar to meristemoids SD4-6: highly frequent small PECs with noticeable embryonal heads + rare PECs of huge size and a frequent structure with meristemoid aspect SD4-8: only smaller PECs with lower organization	+++ (highly frequent PECs, more fragmented into individual embryonal heads) SD4-8-1: PECs organized into clusters of distinct embryonal heads of similar size SD4-8-2: high amount of PECs of reduced size with some signs of disintegration of both meristems and suspensor SD4-8-3: PECs organized into clusters of well-organized embryonal heads of similar size joined to dense suspensors
Occurrence of singulated SEs	+ (rare small SEs in close proximity to remnants of suspensor cells or disintegrating SE, low frequency of large singulated SEs with well-organized embryonal heads) TD17: rare small SEs, higher frequency of large singulated SEs SD4: rare small to large SEs	++ (rare to highly frequent small SEs close to suspensors) TD17-1: rare small SEs, higher frequency of large singulated SEs SD4-2: small SEs located within suspensors SD4-6: highly frequent small SEs SD4-8: frequent small SEs	+++ (highly frequent small to large SEs close to suspensors) SD4-8-1: frequent clusters of large SEs with distinct embryonal heads and smaller SEs occurring within suspensors. SD4-8-2: increased frequency of small SEs SD4-8-3: frequent large SEs and smaller SEs within or in the vicinity of suspensors
Occurrence of NEC clusters	+++ (frequent small to large NEC clusters close to SE and/or within dead material) TD17: NECs in close proximity to EMs organized as compact clusters or groups of loosely arranged vacuolated cells of irregular shape accumulating starch grains and/or phenolics SD4: no organized individual clusters of NECs, some parts of huge PEC-like structures resemble NEC by chaotic	++ (moderately frequent small to large NEC clusters close to SE and/or within dead material) TD17-1: small NEC pieces, mostly within dead material SD4-2: some parts of PEC-like structures composed of vacuolated NECs containing starch grains and/or phenolics SD4-6: frequent small to large and compact NEC clusters (meristemoids surrounded by groups of cells with high phenolic content) SD4-8: NEC clusters of vacuolated cells containing starch grains and/or phenolics	+ (very low frequency of NEC clusters of smaller size)

organization of cells and accumulation of
starch grains and/or phenolic compounds

Additional file: Table S2. Total protein content (mean \pm SD, n=4) in proliferating 1^{ry} and 2^{ry} embryogenic lines of Douglas-fir.

Line	$\mu\text{g protein mg}^{-1}$ d.w.*
primary	
TD17	107.3 \pm 13.7 ^{α}
SD4	107.1 \pm 22.4 ^{$\alpha\beta$}
secondary	
TD17-1	89.3 \pm 12.4 ^{α}
SD4-2	131.2 \pm 12.6 ^{α}
SD4-6	123.9 \pm 7.0 ^{α}
SD4-8	91.5 \pm 16.0 ^{β}

*Letters represent statistical groups defined by the multiple comparisons of means ($P < 0.05$).

Additional file: Table S3. Total protein content (mean \pm SD, n=4) in proliferating 2^{ry} and 3^{ry} embryogenic lines of Douglas-fir.

Line	$\mu\text{g protein mg}^{-1}$ d.w.*
secondary	
SD4-8	110.8 \pm 29.8 ^a
tertiary	
SD4-8-1	153.7 \pm 46.1 ^a
SD4-8-2	134.4 \pm 29.1 ^a
SD4-8-3	124.5 \pm 27.8 ^a

*Letters represent statistical groups defined by the multiple comparisons of means ($P < 0.05$).

Additional Table S4. Functional classification according to gene ontology (GO) of significant proteins identified after two cycles of repetitive somatic embryogenesis in Douglas-fir.

Secondary versus primary lines				
Functional class	1st lines		2nd lines	
	no.	%	no.	%
Response to stimulus (GO:0050896)	6	7,8	2	4,5
Developmental process (GO:0032502)	0	0	1	2,3
Cellular process (GO:0009987)	16	20,8	17	38,6
Metabolic process (GO:0008152)	45	58,4	19	43,2
<i>Biosynthetic process (GO:0009058)</i>	8	12,7	4	9,3
<i>Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>	5	7,9	9	20,9
<i>Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)</i>	3	4,8	3	7
<i>Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)</i>	3	4,8	1	2,3
<i>Catabolic process (GO:0009056)</i>	7	11,1	9	20,9
<i>Primary metabolic process (GO:0044238)</i>	32	50,8	16	37,2
<i>Coenzyme metabolic process (GO:0006732)</i>	1	1,6	1	2,3
<i>Secondary metabolic process (GO:0019748)</i>	4	6,3	0	0
Biological regulation (GO:0065007)	2	2,6	1	2,3
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	3	3,9	3	6,8
Localization (GO:0051179)	5	6,5	1	2,3

Tertiary versus secondary lines				
Functional class	2nd line		3rd lines	
	no.	%	no.	%
Response to stimulus (GO:0050896)	5	7,2	7	7,4
Developmental process (GO:0032502)	0	0	1	1,1
Cellular process (GO:0009987)	21	30,4	29	31
<i>Cell cycle (GO:0007049)</i>	2	40	1	100
<i>Cytokinesis (GO:0000910)</i>	1	20	0	0
<i>Cell cycle (GO:0007049)</i>	2	40	0	0
Metabolic process (GO:0008152)	26	37,7	49	52
<i>Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)</i>	6	10,2	3	3,3
<i>Biosynthetic process (GO:0009058)</i>	6	10,2	6	6,7
<i>Vitamin metabolic process (GO:0006766)</i>	1	1,7	2	2,2
<i>Primary metabolic process (GO:0044238)</i>	25	42,4	37	41
<i>Catabolic process (GO:0009056)</i>	4	6,8	20	22
<i>Sulfur compound metabolic process (GO:0006790)</i>	0	0	2	2,2
<i>Coenzyme metabolic process (GO:0006732)</i>	1	1,7	5	5,6
<i>Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>	14	23,7	9	10

<i>Generation of precursor metabolites and energy</i> (GO:0006091)	2	3,4	2	2,2
<i>Secondary metabolic process</i> (GO:0019748)	0	0	4	4,4
Biological regulation (GO:0065007)	5	7,2	2	2,1
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	7	10,1	3	3,2
Localization (GO:0051179)	5	7,2	3	3,2

For each GO, the total number (no.) of proteins is indicated in the first column and the corresponding percentage in the second column.

III.4. Résultats complémentaires : évolution du transcriptome entre lignées I et II

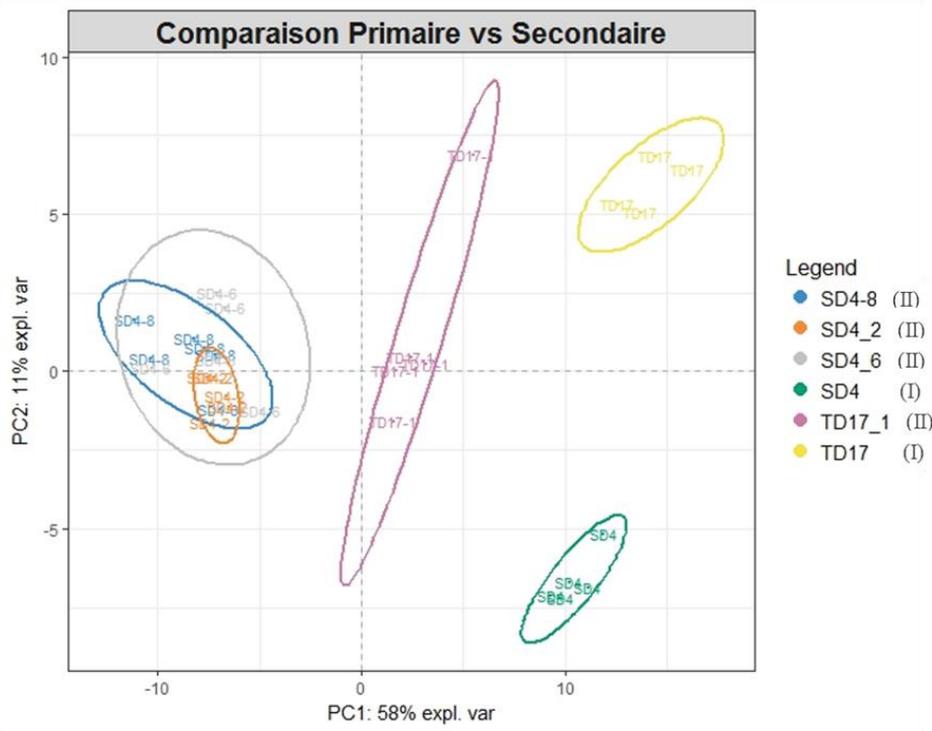
III.4.1. Analyse fonctionnelle

Pour toutes les analyses sur le transcriptome, cinq extractions d'ARN, cinq purifications, cinq séquençages par RNAseq ont été réalisés pour les lignées primaires **I** (SD4 et TD17) et secondaires **II** (SD4-2, SD4-6, SD4-8 et TD17-1). Pour TD17, seules 4 répétitions ont pu être analysées.

Un total de 29 722 transcrits exprimés entre toutes les lignées ont été alignés sur les 54 830 séquences du transcriptome de référence v1.0 du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>). Après analyse différentielle par comparaison de variances, 474 transcrits sont exprimés différentiellement entre les lignées **I** (140) et les lignées **II** (334), ce qui représente seulement 1,6 % des transcrits alignés. La projection de l'ensemble des paramètres sur le plan formé par les composantes principales 1 et 2 (axe PC1 et axe PC2) est illustrée par la **Fig II.2 A**. Ces deux axes expliquent respectivement 58 % et 11 %, soit environ 69 % de la variabilité d'expression des transcrits. La projection sur le plan permet de séparer lignées **I** et **II** sur l'axe PC1 mais pas indépendamment de la lignée. En effet les lignées **II** de SD4 sont regroupées entre elles et séparées de TD17-1. Sur la totalité des gènes différentiellement exprimés, la représentation sous forme de HeatMap nous permet de distinguer 2 clusters correspondant à la répétition d'un cycle de l'embryogenèse somatique (**Fig III.2 B**). Des différences importantes existent au niveau du transcriptome entre **I** et **II**, mais aussi au niveau génotypique.

Les transcrits ont ensuite été annotés fonctionnellement grâce au consortium Gene Ontology (code GO, <http://www.geneontology.org/>), à partir des bases de données des codes GO du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>) et d'*Arabidopsis* (<https://www.arabidopsis.org/>, TAIR). Quel que soit le cycle d'embryogenèse, les transcrits sont regroupés dans les 8 grandes catégories fonctionnelles (**Tableau III.1**). Sur les 140 transcrits identifiés dans les lignées **I**, seulement 114 possèdent un GO pour 112 GO présents dans la catégorie processus biologiques (64 dans fonctions moléculaires et 44 dans composants cellulaires). Dans le cas des lignée **II**, sur 334 transcrits, 271 gènes possèdent un GO pour 233 GO présents dans la catégorie processus biologiques (159 dans fonctions moléculaires et 203 dans composants cellulaires).

A



B

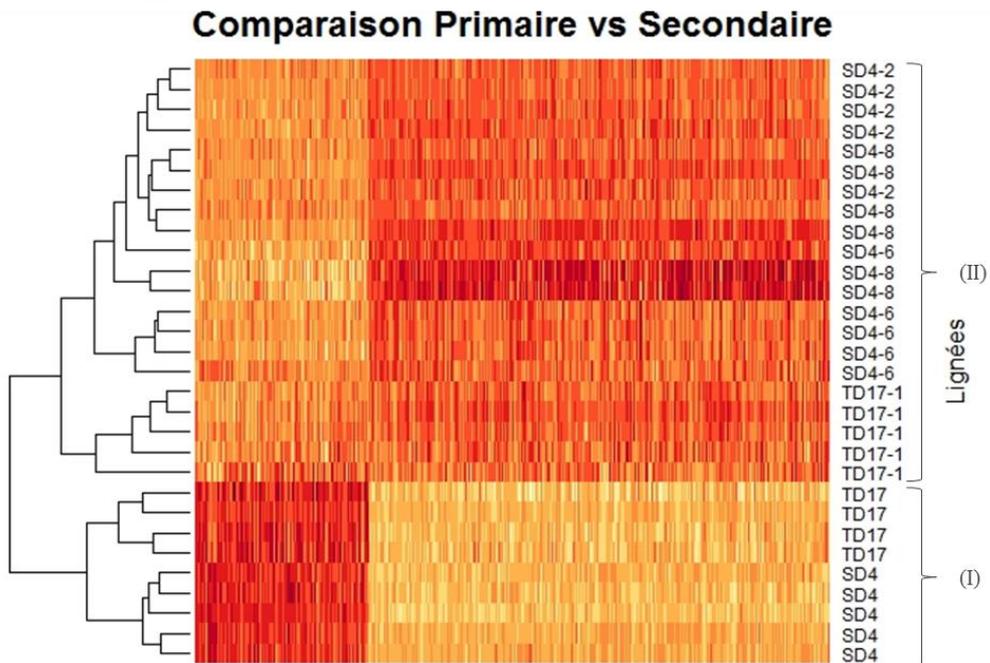


Figure III.2 Analyses des 470 transcrits différentiellement exprimés entre les lignées I (SD4, TD17) et les lignées II (SD4-2, SD4-6, SD4-8, TD17-1). (A) Analyse en composantes principales en fonction du génotype, et des lignées (I) ou (II) ; (B) HeatMap représentant les changements dans les abondances des différents transcrits en fonction des génotypes et de I et II.

Tableau III.1 Répartition fonctionnelle selon les lignées primaires (I : SD4 et TD17) et secondaires (II : SD4-2, SD4-6, SD4-8 et TD17-1) des 475 transcrits différemment exprimés en fonction de leur code GO (Gene Ontology) dans la catégorie fonctionnelle « processus biologique » chez le Douglas. *Le nombre de protéines est le nombre de celles-ci impliquées dans chaque groupe (une protéine pouvant en avoir plusieurs). Le pourcentage correspond au nombre de protéines par groupe sur le nombre total retrouvées dans tous les groupes principaux.*

Groupe Fonctionnel	Lignée I		Lignée II	
	Nb transcrits	%	Nb transcrits	%
Biological regulation (GO:0065007)	7	6,3	8	3,4
Cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	6	5,4	19	8,2
Cellular process (GO:0009987)	37	33,0	75	32,2
<i>Cellular component movement (GO:0006928)</i>	1	7,7	3	16,7
<i>Cell cycle (GO:0007049)</i>	6	46,2	7	38,9
<i>Chromosome segregation (GO:0007059)</i>	2	15,4	0	0
<i>Cell communication (GO:0007154)</i>	4	30,8	8	44,4
Developmental process (GO:0032502)	5	4,5	1	0,4
Localization (GO:0051179)	9	8,0	24	10,3
Metabolic process (GO:0008152)	38	33,9	95	40,8
<i>Phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)</i>	8	11,3	14	8,2
<i>Biosynthetic process (GO:0009058)</i>	10	14,1	25	14,7
<i>Primary metabolic process (GO:0044238)</i>	31	43,7	82	48,2
<i>Catabolic process (GO:0009056)</i>	8	11,3	11	6,5
<i>Sulfur compound metabolic process (GO:0006790)</i>	0	0,0	2	1,2
<i>Coenzyme metabolic process (GO:0006732)</i>	1	1,4	4	2,4
<i>Nitrogen compound metabolic process (GO:0006807)</i>	10	14,1	22	12,9
<i>Generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)</i>	0	0,0	8	4,7
<i>Secondary metabolic process (GO:0019748)</i>	3	4,2	2	1,2
Multicellular organismal process (GO:0032501)	3	2,7	1	0,4
Response to stimulus (GO:0050896)	7	6,3	10	4,3

Les catégories fonctionnelles les plus importantes pour les lignées **I** et **II** sont les processus métaboliques (« Metabolic process » GO : 0008121) avec environ 37 % des transcrits (33,9 % pour les lignées **I** et 40,8 % pour les lignées **II**), et les processus cellulaires (« Cellular process » GO : 0009987) avec plus de 33 %. Au sein de ces deux catégories, les sous catégories « Primary metabolic process » (GO:0044238 ; **I** = 47,7 %, **II** = 48,2 %), « Cell cycle » (GO:0007049 ; **I** = 46,2 %, **II** = 38,9 %) et « Cell communication » (GO:0007154 ; **I** = 30,8 %, **II** = 44,4 %) représentent la majorité de ces deux catégories fonctionnelles. La comparaison lignées **I** et **II** montre que les lignées **I** peuvent être caractérisées par les catégories fonctionnelles « Biological regulation » (GO : 0065007, 6,3 % contre 3,4 % dans les lignées **II**), « Developmental process » (GO :0032502, 4,5 % contre 0,4%), mais aussi la réponse aux stimuli (GO :0050896, 6,3 % contre 4,3 %) ; les lignées **II**, elles sont caractérisées par les catégories fonctionnelles en relation avec les processus métaboliques comme cité plus haut, le trafic cellulaire (« Localization » GO :0051179, 10,3 % contre 8 %), et « Cellular component organization or biogenesis » (GO :0071840, 8,2 % contre 5,4 %).

III.4.2. Surreprésentation des termes GO

Les variations dans la classification des catégories fonctionnelles (à un niveau 2) entre lignées **I** et **II** s'observent que pour un nombre limité de GO, conduisant à une analyse statistique d'enrichissement en GO (« Term Enrichment »). La **Fig III.3** montre la distribution des catégories ou sous-catégories fonctionnelles.

Les catégories fonctionnelles significatives dans les lignées **II** sont impliquées dans le trafic cellulaires : « vesicle-mediated transport » (GO:0016192, FC = 3,79), « protein transport » (GO:0015031, FC = 3,37), et « intracellular protein transport » (GO:0006886, FC = 2,73). Mais aussi dans « cellular component biogenesis » (GO:0044085, FC = 2,73), et « protein metabolic process » (GO:0019538, FC =1,96). Aucune catégorie fonctionnelle n'est ressortie significative pour les lignées **I**. En comparant avec les identifiants retrouvés en protéomique (**Chapitre 3 § III.3**), aucuns ne sont en communs dans l'analyse différentielle des lignées **I**. Dans le cas des lignées **II**, 12 identifiants ont été retrouvés en communs (**Tableau III.3**), et sont annotés fonctionnellement dans la réponse aux stimuli (stress, stress oxydatif), le métabolisme primaire et le catabolisme, la traduction, mais aussi le transport.

Figure III.3 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus associées aux protéines retrouvées enrichies significativement dans les 4 lignées secondaires (TD17-1, SD4-, SD4-6 et SD4-8) de Douglas. Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini et Hochberg 1995). Le fold change correspond à la différence du nombre de hit présents d'un type de matériel à l'autre.

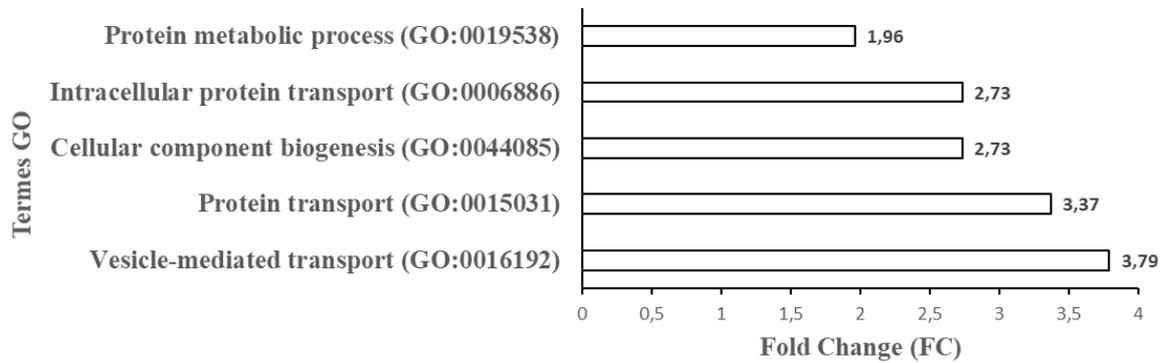


Tableau III.2 Identification des 12 transcrits communs avec le protéome, surexprimés dans lignées secondaires (TD17-1, SD4-2, SD4-6 et SD4-8) de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accension, ainsi que la description des gènes/protéines peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme.allgenes.transcripts.fasta). *FC* : ratio calculé entre les moyennes d'expression des lignées I et II dans les analyses de transcriptomique ; Nombre de GO : décompte des GO associés à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologique, fonction moléculaire, et composant cellulaire) ; GO Biological process : Groupe GO à un niveau 2 ou plus.

Accession	Description	Espèce	Tissu	FC	Nb GO	GO Biological Process
PSME_00023262-RA	V-type proton ATPase subunit E	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	25,56	4	
PSME_00007776-RA	Protein disulfide isomerase-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	II>I	21,50	6	cellular homeostasis;metabolic process;transport
PSME_00033903-RA	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	<i>Eucalyptus grandis</i>	II>I	20,15	4	metabolic process;response to stress response to cold;response to water deprivation;response to salt stress; response to cadmium ion;oxidation-reduction process
PSME_00040085-RA	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	<i>Jatropha curcas</i>	II>I	17,15	11	
PSME_00043453-RA	Nuclear transport factor 2	<i>Brassica oleracea</i>	II>I	15,45	2	transport
PSME_00044995-RA	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,98	3	response to stress
PSME_00015897-RA	60S ribosomal protein L23	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	14,85	3	translation
PSME_00042573-RA	Ras-related protein RABC1	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,59	7	signal transduction
PSME_00051718-RA	Oxidoreductase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	II>I	12,54	1	
PSME_00006614-RA	Aldehyde dehydrogenase family 3 member H1	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	12,09	5	metabolic process;cellular process
PSME_00001274-RA	Arginine/serine-rich-splicing factor RSP41-like isoform X1	<i>Prunus mume</i>	II>I	11,41	7	catabolic process
PSME_00010506-RA	Cathepsin B-like	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	9,65	4	protein metabolic process

III.5. Discussion autour de l'évolution du transcriptome des lignées II de Douglas

III.5.1. Comparaison lignées II versus lignées I des identifiants communs entre le protéome et le transcriptome

Nous avons identifié 12 gènes, communs avec le protéome, surexprimés dans les lignées II par rapport aux lignées I. Ces différents gènes sont impliqués principalement dans les processus du métabolisme, de l'information génétique et le transport (**Tableau III.2**)

III.5.1.1. Processus métaboliques

Parmi les 12 gènes/protéines communs, 4 appartiennent à la sous-catégorie fonctionnelle processus métaboliques. Les lignées II de Douglas surexpriment des transcrits codant des protéines associées au métabolisme oxydatif comme la « L-ascorbate peroxidase » (APX), une enzyme associée au complexe du cycle ascorbate/glutathion, 1 « Oxidoreductase family protein » et 1 « Aldehyde dehydrogenase family 3 member H1 » (ALDH3H1). L'APX joue un rôle dans la réduction de la quantité de composés ROS, mais contribue aussi à la plasticité de la paroi cellulaire durant l'embryogenèse des plantes (Stasolla 2010). L'ALDH3H1 appartient à la superfamille ALDH qui sont des enzymes NAD dépendante permettant la détoxification des cellules, et serait associées à la réponse à la déshydratation et à l'ABA (Missihoun *et al.*, 2012). L'APX et des isoformes d'ALDH ont déjà été retrouvés dans les ME de *Picea abies* (Stasolla *et al.*, 2004), dans les lignées très embryogènes d'*Araucaria angustifolia* (Dos Santos *et al.*, 2016), mais aussi dans les ME et NE de Douglas (**Chapitre 2 § II.6.4.1.1 Régulation de l'information génétique**). L'APX surexprimée ici (PSME_00033903-RA) est la même que l'APX retrouvée en commun dans le protéome et le transcriptome des ME des 3 génotype de Douglas. Cette APX pourrait être associée à l'acquisition de l'aptitude embryogène tout en favorisant le potentiel embryogène, et donc la production d'embryons *via* la réduction de la quantité de ROS présents.

Un autre gène a été retrouvé associé au métabolisme des sucres, et spécifiquement à la biosynthèse du sorbitol, le « NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase ». Habituellement le sorbitol est associé à la translocation et au stockage temporaire des produits de la photosynthèse dans la famille des *Rosaceae* (Kanayama *et al.*, 1992). Cette enzyme réduit le glucose-6-phosphate en sorbitol-6-phosphate en utilisant du NADPH (Kanayama *et al.*, 1992). Si sa relation avec l'embryogenèse somatique n'a jamais été décrite chez les conifères, sa présence dans les ME de Douglas ayant un fort potentiel embryogène pourrait être associée à un stockage et à la translocation du glucose présent.

III.5.1.2. Régulation de l'information génétique et métabolisme des protéines

D'autres gènes impliqués dans l'information génétique, et plus spécifiquement la traduction, sont surexprimés dans les II. Nous avons identifié 1 « 60S ribosomal protein L23 » et 1 « Arginine/serine-rich-splicing factor RSP41-like isoform X1 » (SRSF). Déjà retrouvés dans les ME de Douglas (**Chapitre 2 § II.6.4.1.1 Régulation de l'information génétique**), les

60S sont indispensables dans la formation des ribosomes 80S (Trivedi *et al.*, 2013), et sont associés au transport nucléo-cytoplasmique en créant des points de contrôle de la traduction (Sydorskyy *et al.*, 2012). Le ribosome 80S est sous le contrôle du facteur d'élongation eEF1 (Sasikumar *et al.*, 2012), que nous retrouvons surexprimé dans le transcriptome des **II**, et dont un isoforme a été montré surexprimés dans les **ME** de Douglas dans le chapitre 2. Les SRSF appartiennent à une famille de protéines qui reconnaissent les motifs RRM, et qui ont diverses fonctions cellulaires dans la régulation de la transcription, la polyadénylation, la traduction et le transport des ARN (Guo *et al.*, 2015). Leur rôle est inconnu chez les plantes, mais elles sont généralement associées à la prolifération des cellules tumorales (Jang *et al.*, 2014), et à la protection contre l'apoptose (Kim *et al.*, 2014). Le contrôle de la traduction, mais aussi la gestion des ARN à traduire en amont semble être important pour la gestion de la prolifération des cellules et leur viabilité afin de promouvoir le potentiel embryogène.

Afin de rendre les protéines fonctionnelles, le contrôle de leur repliement, par des protéines chaperonnes est primordial. Les lignées **II** de Douglas surexpriment plusieurs gènes codant des protéines chaperonnes : une « cathepsin B-like », une « protein disulfide isomerase-like » (PDI) et une « activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog » (AHSA). La cathepsin B-like appartient à la famille des cystéines protéases, et joue un rôle dans l'embryogenèse, la défense des plantes et la mort cellulaire programmée (PCD) (Ge *et al.*, 2014). La PCD est un processus normal et important du développement de l'embryon (Bozhkov *et al.*, 2005), car le suspenseur est voué à disparaître lors de la maturation. Une Cathepsin B-like a été retrouvée dans les cals embryogènes du *Liriodendron*, et serait impliquée dans la maintenance de la pluripotence et de la reprogrammation cellulaire pour les cals embryogènes (Zhen *et al.*, 2015). Les PDI sont les protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique qui font partie de la superfamille des thioredoxines. Elles catalysent la formation de liaisons disulfures et l'isomérisation des protéines en inhibant leur agrégation (Wilkinson et Gilbert, 2004). Ces liaisons disulfures permettent de stabiliser chimiquement les protéines. Les PDI ont été retrouvées surexprimées dans les cals embryogènes de *Zea mays* (Sun *et al.*, 2012), mais aussi sur dans les ES immatures de *Pinus pinaster* en début de maturation, où l'accumulation de protéines de réserves est importante (Morel *et al.*, 2014a). Pour finir l'AHSA est une protéine co-chaperonne qui joue un rôle dans l'activation de l'activité ATPase des HSP 90 en facilitant les changements de conformation nécessaires à l'acquisition de cette activité (Panaretou *et al.*, 2002 ; Woodford *et al.*, 2016). Chez les animaux cette protéine a été montrée comme régulant la prolifération, l'apoptose et l'invasion de cellules tumorales (Shao *et al.*, 2016). Les HSP 90 sont impliquées dans la maturation des molécules signales utilisées pour le contrôle du cycle cellulaire, la dégradation des protéines et leur transport (Young *et al.*, 2001). La présence de ces protéines chaperonnes indique l'importance du métabolisme des protéines et du suivi de leur conformation, ainsi que de leur transport.

III.5.1.3. Transport

Les lignées **II** de Douglas surexpriment aussi des gènes impliqués dans le transport nucléaire (« Nuclear factor 2 » : NTF2 ; « V-type proton ATPase subunit E »), et protéiques (« Ras-related protein » : RABC1). Les NTF2 sont impliqués dans la stimulation de l'import de la protéine Cargo-NLS qui permet les échanges entre le cytoplasme et le noyau (Weis 2003), mais

aussi dans l'import de la small GTPase Ran dans le noyau (Smith *et al.*, 1998). Les V-ATP codant des transporteurs de protons dont la famille de protéines est impliquée dans de nombreux processus biologiques et physiologiques (Kluge *et al.*, 2003). Une étude sur des mutants de ce gène chez *Arabidopsis* a montré que les V-ATPase ont un rôle dans les processus cellulaires, et particulièrement la division cellulaire durant l'embryogenèse (Strompen *et al.*, 2005). Chez *A. angustifolia* la même isoforme a été identifiée mais dans les lignées dites « bloquées », c'est-à-dire produisant peu ou pas d'embryons (Dos Santos *et al.*, 2016). Les RAB codent des small GTP binding protein qui appartiennent à la famille des protéines RAS, tout comme les GTPase Ran, et sont impliquées dans le transport des vésicules et des protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elles jouent un rôle dans la polarité de la cellule, la migration, et la division cellulaire en relation avec les actines du cytosquelette (Hall 1992). Des isoformes de protéines RAS ont été retrouvées durant la maturation des ES du mélèze hybride (Teyssier *et al.*, 2011), mais aussi dans les lignées très embryogènes d'*A. angustifolia* (Dos Santos *et al.*, 2016). Les gènes surexprimés associés au transport semblent jouer un rôle dans l'information génétique et l'organisation cellulaire, afin de favoriser un potentiel embryogène plus fort chez le Douglas comme chez *A. angustifolia*.

En conclusion, la réitération de l'embryogenèse somatique semble être principalement contrôlée et reliée aux processus cellulaires, comme la division et l'organisation des cellules afin de promouvoir le potentiel embryogène de ces lignées **II**.

III.5.2. Marqueurs présents dans le transcriptome, et régulant le potentiel embryogène

Sur les 334 gènes surexprimés dans les lignées **II** par rapport aux **I**, seuls 10 possèdent un ratio de surexpression inférieur à 2 et 180 au-dessus de 10. Sur les 180 gènes fortement surexprimés, 10 d'entre eux sont au moins répétés 2 fois, et 13 gènes présentent entre 2 et 15 isoformes différentes. Sur la totalité des gènes surexprimés dans le transcriptome la régulation de l'information génétique semble être la fonction physiologique la plus importante lors de la réitération d'un cycle d'embryogenèse somatique. On entend ici par régulation de l'information génétique, tous les processus moléculaires liés à la régulation métabolique des nucléotides et de la traduction. Ce n'est pas moins de 20 gènes associés au métabolisme des nucléotides et 34 gènes au métabolisme des protéines qui sont ici surexprimés. Les processus cellulaires et l'organisation des cellules (94 transcrits au total), mais aussi le métabolisme primaire (82 transcrits), semblent être importants dans cette réorganisation cellulaire. Les transcrits discutés peuvent être retrouvés en **Annexe 7**.

III.5.2.1. Régulation de l'information génétique

III.5.2.1.1. Régulation de la transcription et de la traduction

La réitération de l'embryogenèse somatique est le siège d'une reprogrammation génétique pouvant mettre en place des événements d'épigénétisme (Isah 2016). Cela a déjà suggéré chez nos lignées de Douglas (Lelu-Walter *et al.*, in press ; article lignée), et nous avons identifié ici une « Histone-lysine N-méthyltransférase setd3 » dans les lignées **II**. Ce nouveau cycle

embryogène nécessite la mise en place de mécanismes de transcription et de traduction (Elbl *et al.*, 2015), et est marqué par la surexpression de 3 ARN polymérase « DNA-directed RNA polymerases », 1 complexe protéique de liaison au site d'initiation de la transcription « TATA-box binding protein (TBP) component of TFIID and TFIIB » et 1 protéine ubiquiste de régulation « 14-3-3-like protein ».

Parmi les ARN polymérase nous retrouvons une Pol II, qui est une polymérase ubiquiste chez les eucaryotes (**chapitre 2 § II.6.4.1.1 Régulation de l'information génétique**), mais aussi deux Pol I et III (POLR1C) qui participent à la synthèse des ARN ribosomiaux et la biogenèse des ribosomes (Lafontaine et Tollervy, 2001 ; Watt *et al.*, 2016). Les protéines 14-3-3 appartiennent à une famille de protéines très conservées chez les animaux et les plantes (Pan *et al.*, 1999). Ces protéines 14-3-3 peuvent être des récepteurs de phytotoxines (De Boer 1997), des inhibiteurs de l'activité nitrate réductase (Bachmann *et al.*, 1996), ou encore avoir un rôle durant l'embryogenèse somatique d'*Arabidopsis thaliana* (Karlova *et al.*, 2006). Certaines isoformes de la protéine 14-3-3 sont présentes dans le noyau et peuvent interagir avec les facteurs de transcription TFIID et TFIIB afin de participer à la régulation de la transcription des Pol I, II et III (Pan *et al.*, 1999). Jamais montré chez les conifères, le rôle de ce complexe dans la régulation de la transcription reste à démontrer, mais pourrait être un marqueur dans la reprogrammation génétique nécessaire lors de la réinduction de l'embryogenèse somatique des conifères.

Parmi les transcrits fortement surexprimés, les gènes codant des protéines ribosomiales 40S et 60S sont au nombre de 25 dont la fonction est décrite dans le paragraphe **III.5.1.2 (Régulation de l'information génétique et métabolisme des protéines)**.

III.5.2.1.2. Expression des gènes

La répétition des cycles d'induction à l'embryogenèse, si elle entraîne une augmentation du potentiel embryogène (**Chapitre 3 § III.3**), elle se traduit également par l'accumulation de marqueurs moléculaires décrits usuellement lors de la phase de maturation des conifères (Elbl *et al.*, 2015 ; Miguel *et al.*, 2016). Au cours de la phase de multiplication des **ME** de lignées **II** de Douglas, 5 facteurs de transcription différents sont surexprimés : 2 WRKY, 2 NAC domain containing protein 68 like, 1 ARF, 1 ERF017 et 2 MYB.

Les protéines WRKY appartiennent à une famille de facteurs de transcription chez les plantes avec un domaine de liaison à l'ADN constitué de la séquence peptidique WRKYGQK (Rushton *et al.*, 2010). Ces facteurs de transcription initialement décrits comme impliqués dans la défense des plantes contre les pathogènes (Eulgem et Somssich, 2007), sont également impliqués dans les régulations de la production d'embryons (Elbl *et al.*, 2015). Les facteurs de transcription WRKY modulent l'expression des gènes de réponses à l'ABA (ABF2-4, ABI4-5, MYB2, DREB1a-2a, RAB18 (Rushton *et al.*, 2012)), qui sont importants durant la formation des ES cotylédonaire.

Les facteurs de transcription NAC sont des protéines spécifiques aux plantes et font parties d'une famille possédant un domaine N-terminal NAC et un domaine variable C-terminal (Olsen *et al.*, 2005). Ce domaine variable agira comme un activateur ou un répresseur de la transcription (Kim *et al.*, 2007). Ces facteurs de transcription sont généralement associés aux

processus développementaux (Weir *et al.*, 2004), les réponses de défense (Xie *et al.*, 1999), et les réponses aux stress (Hegedus *et al.*, 2003). Ces facteurs de transcription sont régulés par les PIN1 (récepteur de l'auxine) et ont un impact sur la croissance des cellules des plantes. Ils permettraient aussi de réguler l'embryogenèse somatique (Kunieda *et al.*, 2008 ; Vestman *et al.*, 2011).

La protéine ERF017, membre de la famille AP2, est un facteur de transcription de réponse à l'éthylène à domaine de liaison GCC box (Singh *et al.*, 2002). Ces facteurs de transcription sont impliqués principalement dans la transduction du signal de l'éthylène en réponse au stress (Nowak *et al.*, 2015). Durant l'embryogenèse somatique, les ERF stimuleraient la division cellulaire *via* le métabolisme de l'auxine (Horstman 2015 ; Trontin *et al.*, 2016a). Leur profil d'expression s'étale tout au long du développement de l'ES, avec un pic majoritaire au cours de la phase de maturation (Rupps *et al.*, 2016). Chez le Douglas, la protéine ERF est surexprimée par un facteur d'environ 3 quel que soit la lignée après une réitération de l'embryogenèse somatique (de lignées **I** vers lignées **II**).

Les MYB appartiennent une famille de facteur de transcription avec 3 domaines de liaison à l'ADN en tandem R1, R2 et R3 (Yanhui *et al.*, 2006). Impliqués dans de nombreux processus développementaux et dans les réponses de défense (Kranz *et al.*, 1998), certaines isoformes de MYB régulent la différenciation des embryons (Petroni *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009b). Chez le Douglas la transcription des gènes MYB augmente après un nouveau cycle embryogène. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux (Li *et al.*, 2013 ; Nowak et Gaj, 2016) démontrant un rôle de ces facteurs de transcription dans le maintien de l'aptitude à l'embryogenèse somatique chez les angiospermes et gymnospermes.

Les facteurs de transcription ARF, appartenant à la famille des small GTPases RAS (**Chapitre 3 § III.5.1.3 Transport**), ont la capacité de fonctionner comme des cofacteurs d'ADP ribosylation (D'Souza-Schorey et Chavrier, 2006). Cette famille de protéines est aussi impliquée dans la régulation de l'ultrastructure cellulaire (Randazzo *et al.*, 2000) et dans le transport de l'auxine lors de la polarisation de l'embryon (Zhang *et al.*, 2012). Les ARF ont été montrés surexprimés à la fois au cours de la multiplication (Zhao *et al.*, 2015a) et surtout durant la maturation des ES des conifères (Stasolla *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2012 ; de Vega-Bartol *et al.*, 2013).

En conclusion, la réitération des cycles d'induction à l'embryogenèse entraîne une augmentation de l'expression d'un groupe de facteurs de transcription plus impliqués dans la maturation des ES que dans leur multiplication. Ce que l'on imagine comme rejuvénalisation du matériel biologique au cours des cycles embryogènes se traduit ici à l'échelle moléculaire par une activation plus précoce des gènes régulateurs liés à la maturation. Il semblerait donc que l'augmentation du potentiel embryogène dans notre dispositif expérimental se traduise par une activation de la différenciation des ES immatures en ES matures.

III.5.2.2. Processus cellulaires

Le développement des embryons nécessite la coordination de la division cellulaire et de la différenciation. De nombreux facteurs de transcription ont été montrés comme important dans

la reprogrammation génétique et la régulation de la différenciation dans le paragraphe **III.5.2.1.1 (Chapitre 3 § Régulation de l'information génétique)**.

Parmi la catégorie des processus cellulaires, une trentaine de transcrits sont annotés dans ces fonctions. Nous avons principalement retrouvé 14 gènes codants des Kinesin (12 kinesin 4 et 2 kinesin KP1) dont j'ai fait le choix de discuter ci-après. Ces protéines appartiennent à une famille de protéines contrôlant les microtubules et possèdent de nombreuses autres fonctions (transport des vésicules, des organites et des chromosomes, Hirokawa 1998). Il existe au total 14 familles de Kinesin classées en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles (Lawrence *et al.*, 2004). Si la KP1 pourrait être une Kinesin classique de contrôle des microtubules, la Kinesin 4 contient entre autres des signaux de localisation nucléaires NLS (Nuclear Localization Signal). Quatre homologues de Kinesin 4 ont été décrits comme impliqués dans la réorganisation du cytosquelette au cours de mitose chez *A. thaliana* (Vanstraelen *et al.*, 2006). Les Kinesin 4 sont aussi impliquées dans l'orientation des microfibrilles de cellulose de la paroi cellulaire chez *A. thaliana* (Zhou *et al.*, 2007 ; Kong *et al.*, 2015). Le niveau d'expression (~3 fois entre lignées I et II) ainsi que le nombre de copies de ce gène suggère que la réitération des cycles embryogène est associé à un remodelage du cytosquelette. Ce processus semble important à l'augmentation du potentiel embryogène des **ME** de Douglas. Sans pouvoir discriminer précisément le mécanisme associé à l'expression de ces kinesin, et plus particulièrement de la kinesin 4 dite « chromokinesin », nos données suggèrent que l'augmentation du potentiel embryogène pourrait être corrélée à l'ancrage des chromosomes sur les microtubules au cours de la mitose.

III.5.2.3. Processus métaboliques

Au-delà des gènes impliqués dans les processus cellulaires, le métabolisme primaire semble également jouer un rôle important dans le développement normal d'un embryon (Lyngved *et al.*, 2008 ; Noah *et al.*, 2013). Nous retrouvons surexprimés chez les lignées **II** de Douglas plusieurs enzymes de la glycolyse dont 1 « fructose-bisphosphate aldolase 3 », 1 « Glucose-6-phosphate isomerase », 2 sous-unité d'ATP synthase mitochondriales : « Mitochondrial ATP synthase subunit G protein » et une enzyme du métabolisme de l'azote la « glutamate dehydrogenase ». La mitochondrial ATP synthase subunit G protein retrouvée dans les lignées **II**, code une protéine qui participe à la formation du complexe F0 impliqué dans la synthèse de l'ATP (Stock *et al.*, 1999). Jo *et al.* (2013) ont retrouvé une isoforme de cette protéine chez *Araucaria angustifolia*. Au-delà du rôle dévolu à cette enzyme au cours du développement des ES de conifères, ces auteurs suggèrent qu'elle serait un marqueur de lignées très embryogènes. A l'instar d'*A. angustifolia* la surexpression de ce gène chez le Douglas lors de la réitération d'un cycle embryogène confirme les travaux de Jo *et al.* (2013). L'augmentation du métabolisme énergétique implique aussi la surexpression des enzymes de la glycolyse comme la fructose-bisphosphate aldolase 3 et la glucose-6-phosphate isomerase dans nos lignées **II**. A la différence du Douglas, l'augmentation du potentiel embryogène de deux génotypes différents d'*A. angustifolia* se traduit par une augmentation de l'immobilisation du carbone dans l'amidon *via* l'activation d'une phosphoglucan phosphatase (Dos Santos *et al.*, 2016). Ces travaux sont contredits par la publication de Navarro *et al.* (2017). Ces auteurs suggèrent que le potentiel embryogène est inversement corrélé avec le stockage de l'amidon durant la multiplication. Dans

notre modèle c'est le catabolisme des sucres simples qui est stimulé au cours de la répétition de l'embryogenèse somatique. L'activation du métabolisme énergétique va conduire à l'accumulation d'ATP mais également de cofacteurs réduits comme le NADH₂. En conditions de stress oxydatif la surproduction de NADH₂ permet d'activer le fonctionnement des NADH déshydrogénase cytosolique capable de détoxifier les radicaux libres présents en excès (Pastore *et al.*, 2007). Chez le Douglas 2 NADH déshydrogénases sont surexprimées dans les lignées **II**. L'augmentation du potentiel embryogène pourrait être associé à une augmentation du stress oxydatif au regard des données de transcriptomique mais également au regard des données de protéomique. De ce fait la stimulation du métabolisme énergétique pourrait s'expliquer soit par un besoin d'augmenter l'énergie chimique dans la cellule, soit par l'obligation de produire des cofacteurs susceptibles de participer à la détoxification des cellules. Il semblerait important d'avoir une idée de l'évolution du statut redox des **ME** de Douglas au cours des cycle de répétition. Cependant les travaux de Jo *et al.* (2013) mettent également en évidence une surexpression de NADH déshydrogénase mais ici dans des lignées peu embryogènes. La question qui se pose ici est : est ce que les lignées peu embryogènes d'*A. angustifolia* sont en conditions de stress oxydatif, ce qui expliquerait ce très faible statut embryogène de ces **ME** ? Ainsi l'augmentation du potentiel embryogène pourrait être associé à une augmentation contrôlée de l'accumulation de ROS dans les lignées **II** justifiant la surexpression d'enzymes de détoxification. Au-delà du métabolisme du carbone, la présence de la surexpression d'une « glutamate déshydrogénase » dans les lignées secondaires suggère une remobilisation des composés azotés au cours de la phase de multiplication consécutive à la répétition d'un cycle de l'embryogenèse somatique.

III.6. Bilan

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé les variations biologiques, cytologiques et moléculaires de deux génotypes de Douglas (SD4 et TD17) après une (lignées secondaires) et deux (lignées tertiaires) répétitions de cycle d'embryogenèse somatique. Cette analyse à différentes échelles a permis de relier entre eux les différents résultats afin de caractériser finement l'augmentation du potentiel embryogène après répétition de l'embryogenèse somatique à partir de génotypes peu embryogènes. La caractérisation biologique a montré des différences génétiques au niveau de la production d'embryons entre les deux lignées primaires comme cela avait déjà été montré chez le Douglas (Lelu-Walter *et al.*, in press). Les lignées secondaires et tertiaires sont significativement plus embryogènes que les lignées utilisées pour l'initiation. Si d'un point de vue morphologique, il est difficile de différencier les différentes lignées, la cytologie a permis de classer les différentes répétitions. En effet, les lignées primaires sont marquées par de gros centres polyembryogéniques, quelques petits embryons, et des amas de cellules non-embryogènes (dépendant aux deux génotypes étudiés chez le Douglas). Lors des répétitions successives, nous avons pu remarquer la réduction de cette proportion de centres polyembryogéniques et de cellules non-embryogènes, pour laisser place à d'avantage d'embryons de petites tailles. La teneur en protéines totales ne semble pas jouer sur cette différence de potentiel car nous n'avons pas observé de variations. L'échelle moléculaire a permis l'analyse des protéines, mais aussi des transcrits (seulement pour la comparaison **I** vs **II**) différenciellement exprimés. L'analyse du protéome, comparant tout

d'abord les lignées **I** vs **II**, puis les lignées **II** vs **III**, a montré que la réitération de l'embryogenèse somatique était associée à des protéines impliquées dans le métabolisme de ces dernières. Les réseaux de protéines présentés dans Gautier *et al.* (b, rédaction, **Chapitre 3 § III.3**), ont permis de connecter toutes les protéines différentiellement surexprimées entre elles selon leurs interactions. Même si entre les deux réitérations, les protéines impliquées sont différentes, l'acquisition du caractère embryogène (phénomène complexe) se ferait grâce à l'activation des processus biologiques de « Metabolic process », « plant development » et de tous les mécanismes liés aux stress et à la réponse de défense, tout en étant en interaction avec les régulateurs de croissance. Le rapprochement des données des deux analyses a fait ressortir la présence de protéines et de transcrits communs dans les lignées **II**, associés principalement au métabolisme des protéines. L'analyse des transcrits différentiellement exprimés dans les lignées **II** a montré que la réitération et l'augmentation du potentiel embryogène pouvait aussi être caractérisées par différentes voies métaboliques. L'ensemble des transcrits discutés dans ce chapitre est résumé dans la Figure **III.4**. L'augmentation du potentiel embryogène est surtout marquée par les processus de divisions et différenciations cellulaires. Néanmoins, différents facteurs de transcription généralement associés à la maturation de l'embryon somatique (*WRKY*, *NAC*, *ARF*, *ERF* et *MYB*) ont été retrouvés fortement surexprimés dans les lignées **II** par rapport aux lignées **I**. La régulation précoce de ces gènes pourrait être un marqueur de sélection des lignées les plus embryogènes.

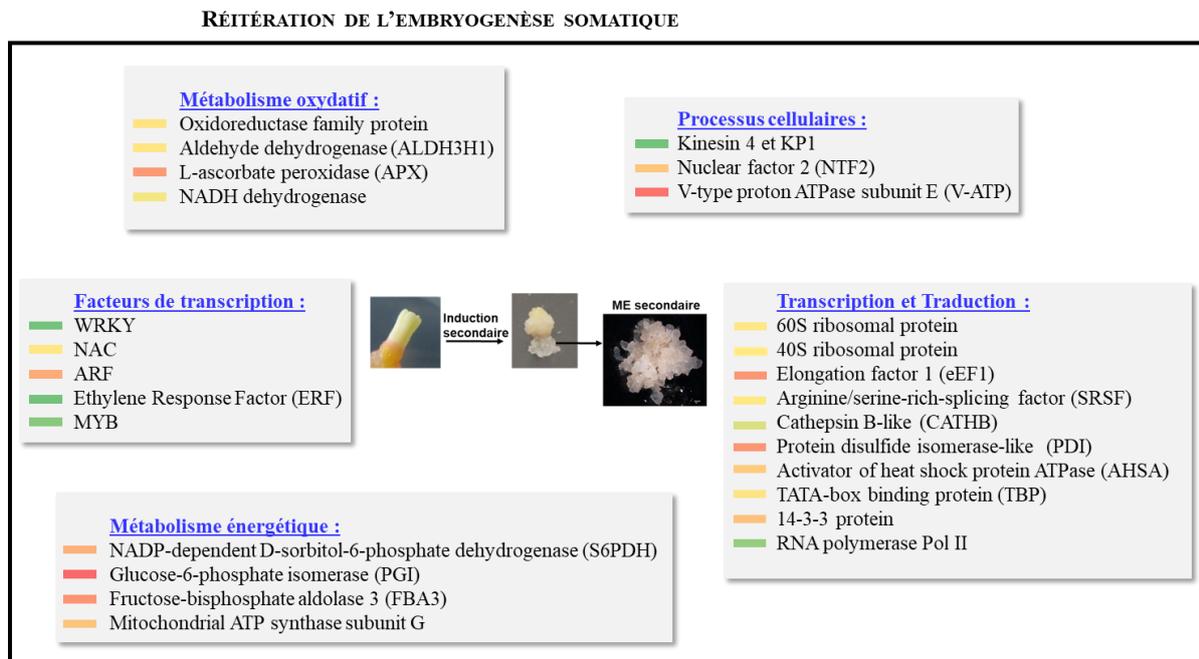


Figure III.4 Schéma récapitulatif des marqueurs du transcriptome caractérisant l'augmentation du potentiel embryogène des lignées **II** de Douglas. Le dégradé de couleur représenté dans les rectangles indique le niveau de surexpression entre les deux types de matériel. Cela va du vert clair (faible surexpression) au rouge (forte surexpression).

Chapitre IV – Discussion générale

Chapitre IV. Discussion générale

IV.1. La caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse du Douglas

Du fait de la hausse mondiale de la demande en bois, il est important de posséder une méthode performante de propagation clonale d'arbres matures. En effet les arbres avec des caractéristiques connues sont les cibles des améliorateurs. Si l'embryogenèse somatique est la technique la plus performante pour multiplier les arbres forestiers, elle n'est pas réalisable à ce jour à partir de matériel âgé (Trontin *et al.*, 2016a). Des résultats récents à partir de bourgeons chez les conifères sont tout de même encourageants (Trontin *et al.*, 2016b). Les limites de multiplication ne sont pas que culturelles, et nous avons besoin de nouvelles approches telle que la physiologie moléculaire pour répondre à cette demande. Chez les conifères les récentes recherches ont permis la mise en lumière de certains marqueurs moléculaires, notamment en relation avec l'embryogenèse somatique (Trontin *et al.*, 2016a). Ma première question de recherche portait sur la caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse somatique du Douglas à travers différentes approches (biologiques, cytologiques, biochimiques et moléculaires). Cette technique est à ce jour maîtrisée chez le Douglas (Reeves *et al.*, in press, Lelu-Walter *et al.*, in press), mais elle n'est pas encore optimisée. Si l'embryogenèse somatique des conifères a bien été étudiée, caractériser l'aptitude à l'embryogenèse, et comprendre les phénomènes associés pourrait permettre à terme d'initier l'embryogenèse somatique à partir de matériel âgé. Afin d'atteindre ce premier objectif nous avons réalisé un rapprochement de données de protéomique et de transcriptomique permettant l'analyse de deux niveaux de régulation moléculaire de l'embryogenèse somatique du Douglas. Chez les conifères cette approche est **originale** car jamais entreprise. Elle est par ailleurs **innovante** par le fait que nous avons complété ces analyses par des observations biologiques, cytologiques, et biochimiques. Ceci a permis d'imaginer de manière globale tous les processus impliqués durant l'embryogenèse somatique précoce. Pour finir, cette approche a été réalisée en comparant des masses embryogènes (**ME**) donnant des embryons, et des cals non-embryogènes (**NE**) isogéniques de trois génotypes différents. En effet, dans la littérature, les études sur l'aptitude à l'embryogenèse des conifères comparent, soit des **ME** donnant des embryons et des **ME** donnant peu ou pas d'embryon (Jo *et al.*, 2013 ; Dos Santos *et al.*, 2016 par exemple), soit du matériel **ME** et du matériel **NE** isogéniques sur un seul génotype (Zhao *et al.*, 2015a), ou plus récemment sur deux génotypes (Klubíková *et al.*, 2017). Nos résultats ont montré des variations entre ces différents génotypes (composition, couleur, teneur en sucres...), mais les profils d'expression entre **ME** et **NE** sont sensiblement les mêmes entre les 3 génotypes. En effet, les processus associés à l'embryogenèse somatique semblent trop importants par rapport aux différences génotypiques. Cela nous a permis de nous affranchir de l'effet génotype et de se focaliser que sur les résultats pouvant caractériser l'aptitude à l'embryogenèse. La quantité de données apportées, principalement dans les analyses moléculaires (de nombreux gènes et protéines identifiés), nous a conduits à trouver une manière d'analyser les résultats en relation avec cette aptitude à l'embryogenèse. En effet le nombre de protéines/transcrits identifiés significativement dans notre étude dépasse largement le nombre que propose la littérature. Pour ce faire, j'ai fait le choix de ne conserver que les protéines communes, qui variaient dans le même sens pour les trois génotypes. Afin de compléter cette approche, j'ai choisi d'analyser les identifiants en

commun entre le protéome et le transcriptome. Cela nous a permis de nous focaliser principalement sur les gènes et protéines qui pourraient être des marqueurs clés de cette aptitude à l'embryogenèse, du fait de leur redondance dans les deux analyses. Au détour de nos résultats (résumés par la **Fig IV.1**), nous avons pu mettre en lumière les différentes voies métaboliques impliquées dans cette aptitude que nous allons détailler ici.

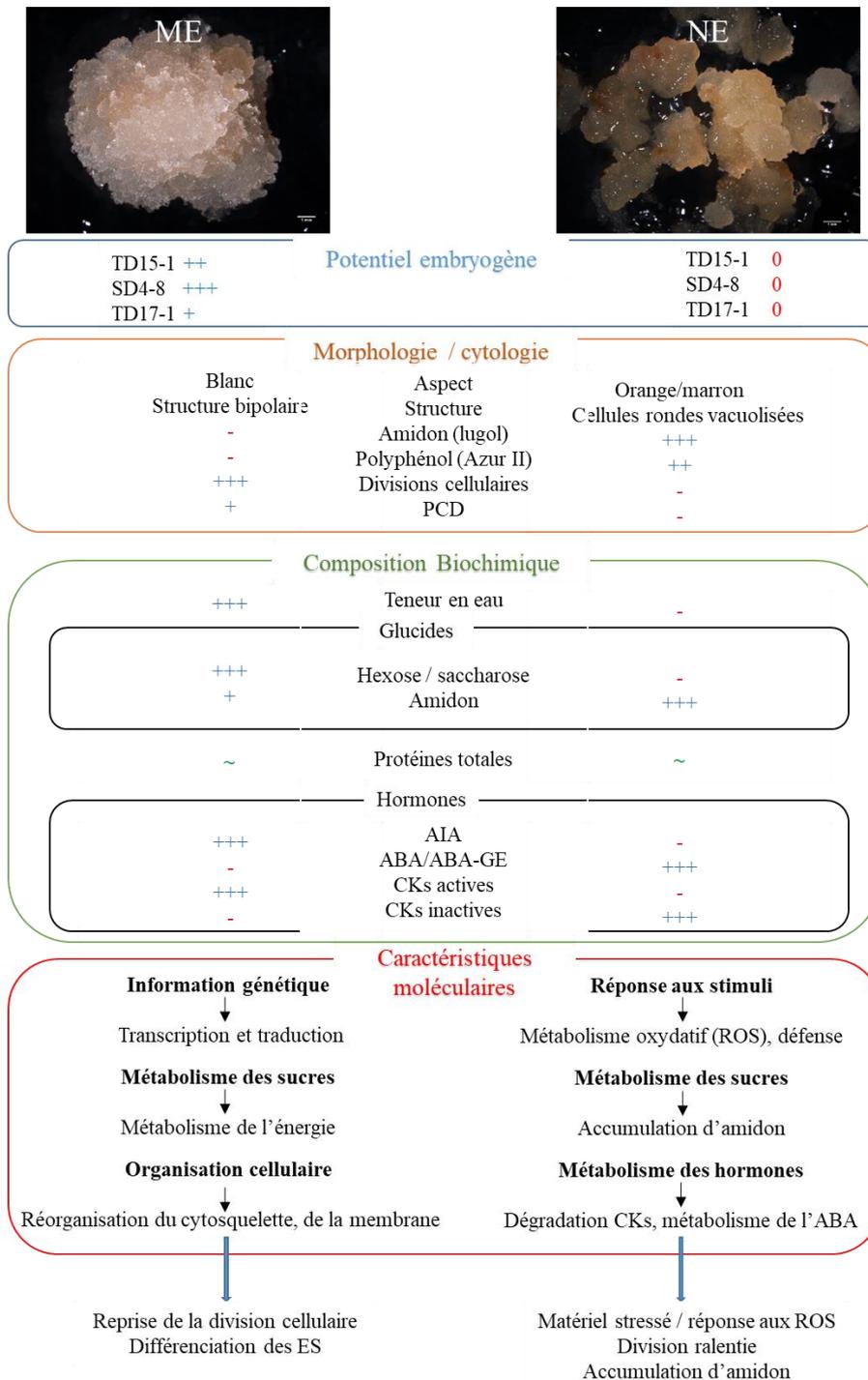


Figure IV.1 Caractéristiques biologiques, cytologiques, biochimiques et moléculaires caractérisant les différences entre les masses embryogènes (**ME**) et les cals non-embryogènes (**NE**) de trois génotypes de Douglas : TD15-1, SD-8 et TD17-1. *PCD* : mort cellulaire programmée ; *AIA* : Acide indole acétique/ auxine ; *ABA* : acide abscissique ; *ABA-GE* : ABA glucose ester ; *CKs* : cytokinines. *Potentiel embryogène* = Nbre ES g⁻¹ MF.

IV.1.1. Les processus cellulaires, marqueurs de l'état embryogène des ME

Nous savons que l'induction de l'embryogenèse nécessite la reprise de la division cellulaire, et la différenciation des cellules allant constituer les ME. Toutes ces modifications affectent le métabolisme cellulaire comme le suggère différents auteurs (Elhiti *et al.*, 2013 ; Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015). Nous allons donc nous focaliser sur les marqueurs précoces de l'embryogenèse somatique, autour des processus cellulaires, en relation avec la division cellulaire, l'organisation cellulaire, mais aussi la différenciation.

IV.1.1.1. La division

Avec les analyses de cytologie nous avons pu voir que les ME présentent une activité mitotique très forte au sein de la tête méristématique des ES immatures. La reprise de la division cellulaire nécessite des apports énergétiques importants, qui peuvent être reliés au fort ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] qui caractérise nos ME. Ce ratio est similaire à ce qui a été montré au cours de la multiplication de ME de conifères, comme récemment chez *A. angustifolia* (Navarro *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que la stimulation de la voie de la glycolyse serait associée avec la multiplication cellulaire en hydrolysant les réserves carbonées. Nous avons retrouvé au sein du transcriptome et du protéome de nos ME de Douglas une Enolase 1, une phosphoglycérate kinase et une pyruvate kinase qui sont des enzymes associées à la glycolyse, et qui pourraient expliquer le fort ratio [(Glc+Fru)/Saccharose] des ME de Douglas. L'analyse des transcrits a fait ressortir d'autres gènes de la famille des cytochrome P450, particulièrement les membres de *CYP78A*. Ces membres sont la deuxième famille de marqueurs surexprimés durant la multiplication (Bishop-Hurley *et al.*, 2003). Dans les ME de Douglas, nous avons aussi identifié un facteur de transcription impliqué dans la multiplication cellulaire : *BBM*. Les *BBM* sont membres de la famille des *ERF* (Ethylene Response Factor), et stimuleraient la division cellulaire *via* le métabolisme de l'auxine (Boutilier *et al.*, 2002 ; Srinivasan *et al.*, 2007 ; Horstman 2015).

La reprise de la division cellulaire peut aussi être associée avec la néosynthèse des protéines, et donc une surexpression de la transcription et la traduction. Parmi les acteurs associés à la transcription, nous avons trouvé une DNA-directed RNA polymerase (sous unité 3, Pol II, IV et V) qui est une protéine impliquée dans la transcription des ARNm (Ream *et al.*, 2009). La traduction médiée par les ribosomes, est montrée surexprimée dans les ME de Douglas par les 40S ribosomal protein, et les 60S ribosomal protein, composants des ribosomes, et dont le couplage se fait sous le contrôle des facteurs d'élongation eEF1 et eEF2 (Sasikumar *et al.*, 2012). Ces protéines avaient déjà été montrées surexprimées dans les ME d'*A. angustifolia* (Jo *et al.*, 2013). Il y a aussi dans les ME de Douglas, 3 tRNA ligase (proline, leucine, glutamate/proline) qui ont un rôle dans la fixation des acides aminés entre eux. Après traduction des ARN en protéines, le contrôle de leur structure est primordial. Pour cela, la présence de 2 HSP communes entre protéome et transcriptome dans les ME de Douglas n'est pas inattendu. Ce sont des protéines chaperonnes favorisant le repliement des protéines, leur transport ou encore leur dégradation (Wang *et al.*, 2004). Les HSP présentes dans les ME pourraient aussi être associées à une reprise de la division cellulaire comme l'a suggéré Zhao *et al.* (2015a). La dégradation des protéines, libérant de nombreux acides aminés, peut servir pour la production

de nouvelles protéines. C'est pourquoi nous avons retrouvé dans le transcriptome quatre proteasome subunit beta type-3, dont l'activité protéase peut servir dans la dégradation des protéines redondantes, et dont les acides aminés issus servent à la synthèse de nouvelles protéines (Alamillo et Bartels, 1996 ; Bauer *et al.*, 1997).

IV.1.1.2. Réorganisation cellulaire et expansion

Les modifications autour des processus cellulaires englobent aussi des modifications du cytosquelette, de la paroi cellulaire, mais aussi la réorganisation des cellules durant la division. Nous avons trouvé trois actines et trois tubulines fortement surexprimées dans les **ME** de Douglas. La réorganisation du réseau d'actines et de tubulines a été observé durant l'initiation de l'embryogenèse somatique (Stasolla *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2012, Trontin *et al.*, 2016a), mais aussi durant la multiplication des **ME** (Zhao *et al.*, 2015a). Une des premières modifications structurales observée durant le développement embryonnaire, est l'altération des propriétés physico-chimiques des parois cellulaires (Dixon et Paiva, 1995). Nous retrouvons dans les transcrits non discutés dans le **chapitre 2 (Annexe 5)**, six lipid transfer protein surexprimés jusqu'à 500 fois chez le Douglas. Ces protéines de transfert jouent un rôle dans les modifications membranaires par le transfert de phospholipides à travers la membrane, et sont connus pour être fortement impliquées dans les stades précoces de l'embryogenèse (Zeng *et al.*, 2006). C'est aussi le cas pour trois phospholipases C, qui sont des enzymes intervenant dans le catabolisme des lipides et sont capables d'hydrolyser les arabinogalactanes protéines (AGP) pour les libérer dans la matrice extracellulaire (Johnson *et al.*, 2003). Les AGP sont impliquées dans la signalisation cellulaire durant l'embryogenèse des conifères (von Arnold *et al.*, 2005).

IV.1.1.3. La différenciation cellulaire

Les **ME** sont un matériel produisant des embryons et dont le potentiel embryogène varie entre les trois génotypes étudiés. Les ES immatures des **ME** sont bipolaires, composés d'une tête méristématique et d'un suspenseur (Durzan et Gupta, 1987 ; von Aderkas *et al.*, 1991). La différenciation en structure embryonnaire est souvent associée avec les régulateurs de croissance des plantes. Les auxines, que nous avons retrouvé en forte teneur dans les **ME** de Douglas, permettent le maintien de la différenciation en embryon (Tautorius *et al.*, 1991). Les gradients auxiniques régulent entre autres la symétrie de l'embryon (polarisation cellulaire). Les récepteurs à l'auxine TIR1, surexprimés dans les **ME** de Douglas, sont connus pour être impliqués dans le gravitropisme des racines, ce qui pourrait être rapproché de la polarisation de l'embryon. La présence des grains d'amidon (Friml et Palme, 2002) retrouvés au niveau de l'interface tête méristématique/suspenseur pourrait en être la conséquence et servir de statolithes. Les facteurs de transcription *WOX* sont associés aux auxines, dans leur contrôle et leur transport (Palovaara et Hakman, 2008; Palovaara *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Uddenberg *et al.*, 2011; Vestman *et al.*, 2011). Nous avons retrouvé deux types différents de *WOX* dans les **ME** qui sont impliqués dans l'orientation et le devenir de l'embryon. Les *WOX2*, impliqués dans la formation des cellules apicales, et les *WOX 8* et *9* impliqués dans la formation des cellules basales ainsi que le suspenseur. Les formes actives des CKs, favoriseraient le développement précoce des EZ d'angiospermes (Quesnelle et Emery, 2007). Ainsi les CKs actives présentes en teneur plus forte dans les **ME** que dans les **NE** du Douglas,

pourraient être associées à la formation de ces embryons. La dernière hormone qui a été étudiée est l'ABA et sa forme de stockage ABA-GE. L'ABA est le régulateur de croissance associée à la maturation de l'EZ (Dodeman *et al.*, 1997 ; von Arnold *et al.*, 2002) et de l'ES (Morel *et al.*, 2014a). Elle peut aussi être associée au devenir des cellules et la différenciation en embryon dans certaines concentrations (Pullman *et al.*, 2003). L'analyse des transcrits des **ME** de Douglas a montré deux familles de transcrits surexprimés, les *NF-Y (LEC1)* et les *SERK1*. Leur profil d'expression a été montré comme variant au cours des différentes étapes de l'embryogenèse somatique des conifères. Ces transcrits sont considérés comme des marqueurs de l'embryogenèse (Rupps *et al.*, 2016 ; Miguel *et al.*, 2016 ; Trontin *et al.*, 2016a). Ces facteurs de transcription sont des marqueurs de la totipotence des cellules chez les plantes (Elhiti *et al.*, 2013). A l'instar de ce qui a été décrit (Rupps *et al.*, 2016), nos *NF-Y* sont fortement surexprimés durant la multiplication des **ME** de Douglas, et les *SERK1* sont faiblement surexprimés. La présence de *WOX*, *LEC* et *SERK* confirme la surexpression de la différenciation dans les **ME** de Douglas.

En conclusion, les **ME** de Douglas surexpriment les voies de division mais aussi de différenciation cellulaire afin d'assurer la formation et la multiplication des ES immatures.

IV.1.2. Le stockage d'amidon et la réponse aux stimuli : un marqueur de l'état non-embryogène des NE

Les **NE** de Douglas sont un matériel biologique ne produisant pas d'embryon (potentiel embryogène = 0) d'aspect orange/marron et granuleux, se divisant lentement et sans structure définie quel que soit le génotype. Cet aspect et cette couleur suggère une accumulation de composés phénoliques défavorables à une bonne division. Les **NE** ont aussi la particularité d'être remplis de grains d'amidon, laissant penser à une surexpression de l'anabolisme du carbone et non du développement. Une récente étude sur *A. angustifolia* émet l'hypothèse qu'une accumulation précoce d'amidon dans un tissu mis ensuite sur milieu de maturation, entraîne la dégradation au lieu du stockage de l'amidon, et pourrait expliquer ce caractère non-embryogène (Navarro *et al.*, 2017). Le rapprochement entre les résultats de transcriptomique et de protéomique a permis d'identifier une phosphoglucomutase et une alpha-1,4 glucan phosphorylase. Ce sont deux enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon. Nous avons vu que ce matériel arbore une forte teneur en ABA, hormone de réponse au stress. L'analyse des transcrits a montré une *zeaxanthin epoxidase* et une *9'cis-epoxycarotenoïd dioxygenase* fortement surexprimées. Elles régulent la biosynthèse d'ABA. L'accumulation de la forme active et de stockage en forte concentration, au lieu de dégrader l'ABA, indique une fois de plus l'état de stress des **NE**. Le rapprochement entre le protéome et le transcriptome a permis d'identifier de nombreuses protéines de réponse au stress oxydatif. Nous avons identifié dans le rapprochement des données quatre glutathione-S-transferase (GST), huit peroxydases et une L-ascorbate peroxydase. Habituellement retrouvées dans les **ME** en multiplication chez les conifères pour la bonne formation des ES (Dos Santos *et al.*, 2016), leur présence dans les **NE** de Douglas, mais aussi récemment du pin noir (Klubíková *et al.*, 2017), soulève les conditions de stress des **NE**. Comme chez le mélèze (Zhao *et al.*, 2015a), nous avons identifié des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de flavonoïdes : dihydroflavonol-4-reductase, anthocyanidin reductase, isoflavonne reductase like dans les **NE**. Outre leur rôle dans le

dialogue chimique des plantes, la biosynthèse et le stockage de ces composés pourraient servir à la régulation et la réduction des ROS (Zhao *et al.*, 2015a ; NG *et al.*, 2016). La dernière famille discutée est celle des pathogenesis protein (PR) qui sont associées aux réponses de défense, dont nous retrouvons deux isoformes. Nous concluons donc que le matériel **NE** de Douglas est un matériel stressé, entraînant de nombreuses réponses à ces stimuli, et surexprimant un métabolisme de stockage carboné important.

IV.2. La caractérisation des modifications cellulaires et protéiques induites lors de la réitération d'un cycle d'embryogenèse somatique chez le Douglas

Les lignées embryogènes des conifères peuvent être caractérisées par leur potentiel embryogène. Chez le Douglas, le potentiel embryogène varie en fonction des génotypes, mais aussi lors de la réitération d'un cycle embryogène (Lelu-Walter *et al.*, in press). Ma deuxième question de recherche consistait à caractériser le potentiel embryogène lors de la réitération de plusieurs cycles d'embryogenèse somatique. Cette comparaison biologique, cytologique et moléculaire (protéome et transcriptome) est une approche **originale** et **innovante**. En effet, c'est la première fois que la variation du potentiel embryogène est comparée sur des lignées issues de deux réitérations de l'embryogenèse somatique (primaire, secondaire et tertiaire) et à différentes échelles. Cette approche a été réalisée pour ce fait sur deux génotypes montrés peu (TD17) ou moyennement (SD4) embryogènes chez le Douglas. Nous les avons comparés avec leurs lignées secondaires disponibles, et les lignées tertiaires obtenues pour la lignée secondaire SD4-8. Comme la comparaison entre **ME** et **NE**, nous nous sommes posés la question de l'effet génotypique et le nombre de répétitions par génotype (2 lignées primaires *versus* 4 lignées secondaires et 2 génotypes ; 1 lignée secondaire *versus* 3 lignées tertiaires et 1 génotype). Les résultats ont montré que la séparation entre les différentes réitérations était visible, mais également entre les différents génotypes. Comme défini par Lelu-Walter *et al.* (in press), l'augmentation du potentiel embryogène de ces lignées primaires pourrait résulter d'une expression différentielle de gènes à travers des mécanismes épigénétiques. La mutation de gène n'est pas à exclure (Miguel *et al.*, 2016) mais la probabilité qu'elle affecte tous les gènes associés à l'embryogenèse est faible. Les changements épigénétiques durant l'induction peuvent réguler des processus génétiques, cellulaires, et physiologiques et peuvent être causé par les conditions de cultures par exemple (2-4-D dans le milieu ; Isah 2016). Ces changements sont médiés par des remodelages de la chromatine qui comprennent les modifications d'histones, la méthylation de l'ADN et le « silencing » par les miRNA (Isah 2016). L'initiation d'un nouveau cycle d'embryogenèse somatique secondaire, mais aussi tertiaire dans notre cas, pourrait aussi affecter l'expression de gènes liés à l'embryogenèse somatique, qui améliorerait le potentiel embryogène de ces lignées. Grâce à ces données nous allons émettre certaines conclusions quant aux mécanismes surexprimés marqueurs de l'augmentation de ce potentiel embryogène.

IV.2.1. Les variations structurelles des embryons somatiques, marqueurs de l'augmentation du potentiel embryogène

La répétition de l'embryogenèse somatique chez des lignées **I** peu embryogènes de Douglas a entraîné une augmentation du potentiel embryogène. Cette augmentation était de 8 fois pour le génotype TD17, et de 3 à 6 fois pour SD4 pour les lignées **II**. Lors de la répétition de l'embryogenèse somatique chez SD4-8, l'augmentation du potentiel embryogène était d'environ 2 fois pour les lignées **III**. Le potentiel embryogène peut donc encore être augmenté lors d'une deuxième répétition. Néanmoins le ratio d'augmentation entre les lignées **II** et **III** a diminué, ce qui laisse penser que l'on est proche d'une limite. Une troisième répétition de l'embryogenèse somatique serait intéressante à étudier afin de montrer s'il existe un « plateau ». L'augmentation du potentiel embryogène correspond à une augmentation du nombre d'ES cotylédonaire produit après maturation. Cela implique donc une stimulation de l'information génétique et des processus cellulaires autour de la division. La cytologie nous a permis de voir la réduction de la taille des embryons avec la répétition. En effet les lignées primaires SD4 et TD17 étaient caractérisées par des grands centres polyembryogéniques, alors que les lignées secondaires de SD4 puis tertiaires possèdent des embryons de plus en plus petits, montrant de nombreux événements de mitose. La réduction de la taille des embryons pourrait être un marqueur de la bonne multiplication des ES : moins de vieillissement et donc un potentiel embryogène plus élevé. D'autant que TD17-1 montre encore de grands centres polyembryogéniques qui pourraient être en relation avec son faible potentiel en comparaison avec les lignées **II** de SD4.

IV.2.2. Les processus cellulaires, marqueurs de l'augmentation du potentiel embryogène

L'analyse des transcrits a montré la surexpression de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et la division cellulaire. Ils sont aussi connus pour être des marqueurs de la maturation des ES. C'est le cas des WRKY, des NAC, des ARF, des ERF et des MYB. Il semblerait que l'augmentation du potentiel embryogène se traduise par une régulation précoce des gènes impliqués dans la maturation des ES.

Comme déjà défini en amont (**Chapitre 4 § IV.1.1.1. La division**) la reprise de la division cellulaire peut aussi être associée avec la néosynthèse des protéines. Nous avons retrouvé de nombreux protéines/transcrits impliqués dans la régulation de la transcription et la traduction. Parmi les identifiants en relation avec la transcription, nous avons trouvé une RNA polymérase (Pol II) et une Arginine/serine-rich-splicing factor qui sont des régulateurs de la transcription des ARNm. De manière plus spécifique, nous avons identifié dans les lignées **II** un facteur de transcription TATA-box binding protein et une protéine 14-3-3 qui auraient un rôle dans la régulation de la transcription durant l'embryogenèse somatique (Karlova *et al.*, 2006). La surexpression de la traduction est visible par la présence de nombreuses 40S ribosomal protein, et 60S ribosomal protein, composants des ribosomes, et dont le couplage se fait sous le contrôle de facteurs d'élongation eEF1 aussi présents dans les lignées **II** de Douglas (Sasikumar *et al.*, 2012). Pour continuer, le contrôle de la structure 3D des protéines peut être réalisé à l'aide des trois protéines chaperonnes retrouvées en commun dans le protéome et le transcriptome des

lignées **II** de Douglas : la cathepsin B-like, une protein disulfide isomerase-like (PDI) et une activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog (AHSA). Enfin, la dégradation et le recyclage des protéines semblent être impliquées dans l'augmentation du potentiel embryogène comme l'a suggéré Stasolla *et al.* (2004), et la présence des E3 ubiquitin-protein ligase ARI2 et de serine carboxypeptidase vient confirmer leur rôle.

Nous avons identifié différents marqueurs du métabolisme énergétique comme la fructose-bisphosphate aldolase 3, la Glucose-6-phosphate isomerase, et 2 Mitochondrial ATP synthase subunit G protein chez les lignées **II** de Douglas. Ces marqueurs suggèrent une surexpression de la voie de biosynthèse de la glycolyse à l'instar de ce qu'a montré Navarro *et al.* (2017) chez *A. angustifolia* pour les deux premiers, et une surexpression de la synthèse d'ATP importante pour l'augmentation du potentiel embryogène (Jo *et al.*, 2013).

Parmi les stress que peuvent subir les cultures cellulaires, le stress oxydatif apparait comme un élément décisif pour l'embryogénèse somatique (Nagata *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 2010 ; Dos Santos *et al.*, 2016). La surexpression du métabolisme oxydatif pourrait aussi être un marqueur de la régulation des composés ROS, néfastes pour la division, et l'augmentation du potentiel embryogène. Nous avons retrouvé au sein des transcrits des lignées **II** des Aldehyde déshydrogénase, une L-ascorbate peroxydase, et différentes NADH dehydrogenase. Les résultats de protéomique ont montré une surexpression de plusieurs peroxydases dans les lignées issues de la réitération (**II** puis **III**). Différentes formes de flavonoïdes ont été identifiées dans les lignées **III**, dihydroflavonol-4-reductase et anthocyanidin reductase, qui pourraient avoir une activité antioxydante (Levine *et al.*, 1994). Outre le stress oxydatif, une chitinase EP3 a été retrouvée surexprimée dans les lignées issues de la réitération. Cette protéine de défense contre les pathogènes a déjà été décrite comme favorable au développement embryogène (Zhao *et al.*, 2015).

En conclusion, la réitération de l'embryogénèse somatique nécessite la remise en place de la division et de la différenciation. Mais une nouvelle initiation fait intervenir des changements modifiant le protéome et le transcriptome de ces lignées, montrant des différences entre les deux réitérations. Ces modifications entraînent une régulation des stress oxydatifs, mais des variations de teneur d'hormones, qui montrent leur importance dans les lignées tertiaires.

Chapitre V – Conclusions et perspectives

Chapitre V. Conclusions et perspectives

V.1. Conclusions

En conclusion, ce travail de thèse avait deux objectifs majeurs. Nous avons pu dans un premier temps, (1) caractériser l'aptitude à l'embryogenèse du Douglas à différentes échelles biologiques. Il est important de noter que le milieu de culture a été optimisé pour la multiplication des **ME** et non des **NE**. Dans un second temps, nous avons pu (2) caractériser les marqueurs impliqués dans les variations du potentiel embryogène après réitération de l'embryogenèse somatique.

(1) Nous avons montré au niveau moléculaire que les **ME**, et donc la formation d'ES, surexpriment des marqueurs précoces du développement des plantes mais aussi des embryons, en comparaison avec les **NE**. Nous avons rapproché des données de protéomique et de transcriptomique afin de permettre l'analyse de deux niveaux de régulation de l'embryogenèse somatique du Douglas. Cette approche est **originale** car elle n'a jamais été entreprise pour répondre à cette question. Elle est par ailleurs **innovante** puisque nous avons complété ces analyses par des observations biologiques, cytologiques, et biochimiques. Associés ensemble, tous ces résultats nous ont permis de montrer que l'aptitude à l'embryogenèse oriente le métabolisme vers la division et la différenciation des cellules. Ces résultats nous permettent de dresser un certain nombre de conclusions. Dans les **ME**, les faits suivants les plus remarquables sont observés :

* La présence de marqueurs du développement embryonnaire précoce (*WOX*, *LEC*, *SERK*, *BBM*) mais aussi de *CYP450 78A*, suggère l'importance des mécanismes de division et de la différenciation des cellules. Ces marqueurs moléculaires peuvent être associés aux profils des trois familles de régulateurs de croissance étudiés (*AIA*, *CKs*, *ABA*). Ces hormones sont intimement reliées à la réponse de division des cellules, mais aussi à la différenciation des cellules et à la polarisation de l'embryon.

* Des marqueurs moléculaires en relation avec la glycolyse (*ENO1*, *PGK* et *PKM*), peuvent être reliés au ratio [(Glc+Fru)/Saccharose], et soulignent l'importance du métabolisme énergétique pour la division des embryons.

* Plusieurs marqueurs impliqués dans la réorganisation du cytosquelette (actine, tubuline), indiquent l'importance du remodelage cellulaire associé à la division cellulaire dans l'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse.

* D'autres marqueurs en relation avec la régulation de l'information génétique (*RNA* polymérase, *EF1*, 40 et 60 ribosomal protein, *HSP*, **APX**), laisse imaginer l'importance du métabolisme des protéines lors de la réactivation des processus cellulaires. Il a été montré chez de nombreuses espèces que les *APX* pouvaient être des marqueurs de l'embryogenèse somatique. Nous avons retrouvé la même *APX* dans les **ME** vs **NE**, et dans le transcriptome des lignées **II**, laissant supposer son importance dans l'aptitude à l'embryogenèse, et dans la formation de l'embryon somatique chez le Douglas.

En opposition, le matériel **NE** isogénique, ne donnant pas d'embryons et possédant une organisation non structurée, oriente le métabolisme vers une accumulation des réserves carbonées (amidon) et une réponse aux stimuli, ce qui va à l'encontre de l'aptitude à l'embryogenèse somatique précoce. Les marqueurs isolés caractérisant les **NE** permettent ces conclusions :

* Des identifiants clés impliqués dans la biosynthèse de l'amidon (phosphoglucomutase et alpha-1,4 glucan phosphorylase), peuvent facilement être associés aux teneurs d'amidon observées en biochimie, et à la présence de nombreux grains d'amidon dans les cellules (cytologie). Ces éléments suggèrent que l'accumulation des réserves carbonées est une des caractéristiques principales des **NE** de Douglas.

* Les fortes teneurs d'ABA et ABA-GE endogènes supposent une importante réponse aux stress qui peut être due soit à un environnement non adapté pour la multiplication des **NE**, soit à un état biologique non stable. Nous avons entre autres identifié la présence de composés phénoliques, mais aussi de marqueurs moléculaires impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (ANR, DFR et IFR). Pour finir nous avons trouvé de nombreux marqueurs en relation avec la réponse au stress oxydatif (GST, peroxydase, L ascorbate peroxydase 1), indiquant que la régulation des ROS dans les **NE** est nécessaire du fait de son statut redox.

(2) Afin de répondre à ce deuxième objectif, les analyses biologiques, histologiques et moléculaires (protéomique et transcriptomique) ont permis de caractériser l'augmentation du potentiel embryogène lors de la répétition du cycle d'embryogenèse somatique. Cette étude est **innovante** car c'est la première fois qu'une étude sur les variations du potentiel embryogène des **ME** de conifères est réalisée en comparant des lignées **I** avec leurs lignées **II** et **III**. A la différence des résultats obtenus pour la première question de recherche, la répétition de l'embryogenèse somatique n'entraîne qu'une évolution plus réduite de l'expression des gènes. En effet, en fonction des lignées cela ne représente que 20 à 50 % du nombre de gènes différentiellement exprimés dans les **ME**. La caractérisation de l'augmentation du potentiel embryogène possède néanmoins des similitudes avec les mécanismes impliqués dans l'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse. Nous avons retrouvé des marqueurs surexprimés en relation avec la division cellulaire et la différenciation permettant une plus grande production d'embryons. A partir de nos résultats, nous avons pu dresser quelques conclusions sur les marqueurs clés de l'augmentation du potentiel embryogène.

* Les observations cytologiques ont montré une réduction de la taille des embryons, provenant d'une forte activité mitotique de ceux-ci, et d'une réduction des cellules non-embryogènes qui pourrait être marqueur d'un plus fort potentiel embryogène.

* La surexpression des facteurs de transcription, marqueurs clés de la phase de maturation des embryons somatiques (*WRKY*, *NAC*, *ARF*, *ERF* et *MYB*), suggère l'importance de l'expression précoce de ces transcrits pour le développement des futurs embryons.

* Des marqueurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'information génétique (RNA polymérase, 40 et 60 ribosomal protein, protéines chaperonnes, Cathepsin B-like, E3 ubiquitin-protein ligase ARI2 et serine carboxypeptidase), mettent en avant le métabolisme des protéines lors de la division cellulaire.

* Des marqueurs en relation avec le métabolisme énergétique (ATP synthase, fructose-bisphosphate aldolase 3 et la glucose-6-phosphate isomerase) suggèrent l'importance de cette voie métabolique dans les lignées à plus fort potentiel et pourraient être des marqueurs clés d'une division plus intense.

* La répétition d'un cycle d'embryogenèse somatique modifie les balances hormonales au niveau des flavonoïdes, de l'ABA, de l'acide jasmonique, et de l'acide salicylique. La surexpression de protéines associées à ces régulateurs de croissance, et particulièrement dans les lignées **III**, pourrait réguler la croissance et la différenciation cellulaire.

* Pour finir, nous avons isolé différents identifiants associés à la détoxification et la réponse au stress oxydatif (**APX1**, **AOX1A**, **NADH** déshydrogénase, **ALDH**, flavonoïdes). La capacité de régulation des composés ROS pourrait être une caractéristique importante pour réguler et maintenir la division cellulaire et la différenciation des embryons dans le but d'une augmentation du potentiel embryogène.

V.2. Perspectives

Les techniques moléculaires de pointe utilisées au cours de cette thèse ont permis l'acquisition de nombreuses données, qui n'ont cependant pas pu être toutes discutées dans ces travaux. La production de telles données montre la richesse que peuvent apporter ces techniques, mais aussi la limite de l'analyse de celles-ci. Les données récentes sur le transcriptome du Douglas (<http://pinegenome.org/pinerefseq/>) ont permis l'annotation de nos données de transcriptomique mais aussi de protéomique. Cette base de données est un début pour l'analyse de séquences du Douglas, mais nécessite d'être complétée. En effet, un certain nombre de nos séquences identifiées (transcrits et protéines) n'a pas pu être annoté fonctionnellement. Si à terme le transcriptome du Douglas est complété, il sera alors possible de recomparer nos séquences afin de leur attribuer un rôle fonctionnel, ce qui permettra d'enrichir nos résultats.

L'ensemble de nos données moléculaires a fait ressortir de nombreux candidats pouvant être des marqueurs de l'aptitude à l'embryogenèse, ou encore des variations du potentiel embryogène. Ils pourront être spécifiquement suivis par l'expression de ces gènes par qRT-PCR pour une sélection sur critère défini (de Vega-Bartol *et al.*, 2013).

Dans cette étude, nous avons isolé des ARNm. Ils constituent le niveau transcriptionnel de la régulation de l'embryogenèse somatique. L'expression différentielle des ARNm a été réalisée sur la comparaison **ME** vs **NE**, et lignées **I** vs lignées **II**. Il serait intéressant, afin de compléter nos résultats de protéomique, d'analyser l'expression différentielle des transcrits entre les lignées **II** et **III**. En effet, le suivi de certains facteurs de transcription pourrait être important afin de venir confirmer nos hypothèses lors d'une deuxième répétition. Mais la transcription d'un gène n'entraîne pas forcément la traduction de celui-ci en protéine. D'autres niveaux existent, comme la régulation post transcriptionnelle par les miARN (He et Hannon, 2004 ; Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Ce sont des petits ARN non codants, permettant la répression de certains gènes par dégradation. Pour l'instant chez les conifères, peu d'études concernant les miARN ont vu le jour. Nous pouvons principalement citer Oh *et al.* (2008) chez le pin taeda, Zhang *et al.* (2012) chez le mélèze. Des travaux plus récents se rapprochant de notre étude, ont étudié les miARN régulant le maintien du potentiel embryogène chez le mélèze (Li *et al.*, 2013).

Le miARN171 régulerait spécifiquement le transcrite SCL6 dans les ME. La répression de SCL permettrait le maintien de l'embryogenèse somatique. La présence de ce transcrite surexprimé dans nos NE montre sa non régulation et pourrait être une caractéristique de son état non-embryogène. La dynamique d'expression des miARN pourrait être un autre moyen d'étude transcriptionnel de l'aptitude à l'embryogenèse somatique. Pour cela il faudrait adapter notre méthode d'extraction, afin qu'elle soit spécifique de ces miARN.

Une autre forme d'étude moléculaire, la métabolomique, permet d'étudier les profils qualitatifs et quantitatifs de tous les métabolites (acides aminés, sucres non structuraux, polyamines, hormones, acides gras, composés organiques volatils, alcools, composés phénoliques et polyphénoliques, alcaloïdes, terpènes...). Les données acquises permettent de renseigner sur l'état biochimique des tissus, permettant alors la caractérisation fonctionnelle des gènes dans la description des réponses physiologiques des cellules aux conditions biotiques et abiotiques (Weckwerth 2003). Récemment quelques auteurs se sont intéressés au métabolome de l'embryogenèse somatique des conifères (Silveira *et al.*, 2006 ; Robinson *et al.*, 2009 ; Jo *et al.*, 2013) et montrent l'importance de ces analyses pour une caractérisation de l'aptitude à l'embryogenèse et de l'augmentation du potentiel embryogène.

Nous avons aussi identifié de nombreux marqueurs enzymatiques en rapport avec le métabolisme énergétique (phosphoglycérate kinase, pyruvate kinase, alpha-1,4-glucan-protein synthase et phosphorylase, phosphoglucomutase...), hormonal (Zeatin O-glucosyltransferase, Zeaxanthin epoxydase...), ou encore avec le métabolisme oxydatif (peroxydase, APX, flavonoïdes...). Il serait intéressant de suivre l'activité enzymatique de certains de ces marqueurs. Des études chez le mélèze ont montré que la voie métabolique répondant le plus durant les premiers stades de l'embryogenèse somatique était l'oxydoréduction (Zhao *et al.*, 2015b). L'étude du statut redox des ME de Douglas permettrait de mieux comprendre les mécanismes mis en place lors de l'acquisition de l'aptitude à l'embryogenèse et de l'augmentation du potentiel embryogène.

Pour finir, nous avons travaillé au cours de cette étude sur trois génotypes dits différents, puisqu'ils sont issus de croisements contrôlés. Le génotypage de ces lignées permettrait de confirmer que nous travaillions sur des génotypes bien différents.

Les conclusions de ces travaux laissent entrevoir de nombreuses possibilités pour la sélection précoce de matériel embryogène. Cette étude à différentes échelles a permis de relier différents niveaux de comparaison sur des catégories fonctionnelles communes. Nous disposons à présent de marqueurs permettant de caractériser l'aptitude à l'embryogenèse somatique, mais également des lignées les plus embryogènes. Des questions restent néanmoins en suspens. En effet, afin de répondre à nos deux objectifs, notre étude s'est portée sur le stade de la multiplication des ME. L'état de différenciation de nos ES au sein de ces ME pourrait aussi être remis en question. Avons-nous travaillé au bon moment pour répondre à ces objectifs ? Est-il possible d'isoler des marqueurs plus précoces ? L'impossibilité de prédire le lieu de différenciation au moment de l'induction, et le fait que personne n'a jamais pu observer les premières étapes de l'initiation sont des freins. Nous étions donc au stade le plus précoce que nous pouvions étudier. S'il était possible de prédire avec nos marqueurs spécifiques (teneur en glucides, hormones, suivi de l'expression de certains gènes) le lieu de formation des ME, nous

pourrions peut-être isoler des marqueurs permettant une sélection encore plus précoce. Ces travaux offrent un nouveau souffle et pourrait permettre à terme de mettre à disposition aux sélectionneurs une technique de multiplication végétative puissante pour la sélection d'arbres élites.

Références bibliographiques

A

- Abrahamsson, M., Valladares, S., Merino, I., Larsson, E., & von Arnold, S.** (2017). Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(2), 86-96.
- von Aderkas, P., Bonga, J., Klimaszewska, K., & Owens, J.** (1991). Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro*. Dans : Ahuja, M. R. (éd.), *Woody Plant Biotechnology* Plenum Press, New York, pp. 139-155.
- von Aderkas, P., Lelu, M. A., & Label, P.** (2001). Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(6), 495-502.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M.** (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, 67-76.
- Aker, J., & de Vries, S. C.** (2008). Plasma membrane receptor complexes. *Plant Physiology*, 147(4), 1560-1564.
- Alamillo, J. M., & Bartels, D.** (1996). Light and stage of development influence the expression of desiccation-induced genes in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant, Cell & Environment*, 19(3), 300-310.
- Allen, G. S., & Owens, J. N.** (1972). The life history of Douglas Fir. Environment Canada, *Canadian Forestry Service*, Ottawa.
- Aquea, F., & Arce-Johnson, P.** (2008). Identification of genes expressed during early somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(5), 559-568.
- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L., & Marion-Poll, A.** (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science*, 4, 63.
- von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L.** (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
- von Arnold, S., Bozhkov, P., Clapham, D., Dyachok, J., Filonova, L., Högberg, K. A., Ingouff, M., & Wiweger, M.** (2005). Propagation of Norway spruce *via* somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 81(3), 323-329.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., & Liso, R.** (1992). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiology*, 99(1), 235-238.
- Artzi, L., Morag, E., Shamshoum, M., & Bayer, E. A.** (2016). Cellulosomal expansin: functionality and incorporation into the complex. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 61.

B

- Bachmann, M., Huber, J. L., Athwal, G. S., Wu, K., Ferl, R. J., & Huber, S. C.** (1996). 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase

in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS letters*, 398(1), 26-30.

Bais, H. P., Park, S. W., Weir, T. L., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant science*, 9(1), 26-32.

Bastien, J. C., Sanchez, L., & Michaud, D. (2013). Douglas-Fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). Dans : Pâques, L. E. (éd.), *Forest Tree Breeding in Europe: Current State-of-the-Art and Perspectives*. Managing Forest Ecosystems 25, Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp. 325-369.

Bauer, D., Biehler, K., Fock, H., Carrayol, E., Hirel, B., Migge, A., & Becker, T. W. (1997). A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiologia Plantarum*, 99(2), 241-248.

Becraft, P. W. (1998). Receptor kinases in plant development. *Trends in plant science*, 3(10), 384-388.

Becwar, M. R., Nagmani, R., & Wann, S. R. (1990). Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research*, 20(6), 810-817.

Beneš, K., & Kaminek, M. (1973). The use of aluminium lake of nuclear fast red in plant material succesively with alcian blue. *Biologia Plantarum*, 15(4), 294-297.

Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, 289-300.

Belmonte, M. F., Donald, G., Reid, D. M., Yeung, E. C., & Stasolla, C. (2005). Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*). *Journal of experimental botany*, 56(419), 2355-2364.

Benowicz, A., Grossnickle, S. C., & El-Kassaby, Y. A. (2002). Field assessment of Douglas-fir somatic and zygotic seedlings with respect to gas exchange, water relations, and frost hardiness. *Canadian Journal of Forest Research*, 32(10), 1822-1828.

Bernier, F., & Berna, A. (2001). Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7), 545-554.

Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W., & Nonogaki, H. (2013). Development and maturation. Dans : Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W., Nonogaki, H. (éds), *Seeds* Springer New York, pp. 27-83.

Bhandari, S., Fujino, T., Thammanagowda, S., Zhang, D., Xu, F., & Joshi, C. P. (2006). Xylem-specific and tension stress-responsive coexpression of KORRIGAN endoglucanase and three secondary wall-associated cellulose synthase genes in aspen trees. *Planta*, 224(4), 828-837.

Bidart, J., & Lacroix, L. (2006). Méthodes d'étude du génome et du transcriptome. Dans : Bidart, J., Lacroix, L. (éds), *Méthode d'étude en biologie moléculaire*, pp. 372-384.

- Bishop-Hurley, S. L., Gardner, R. C., & Walter, C.** (2003). Isolation and molecular characterization of genes expressed during somatic embryo development in *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 267-281.
- Blackig, M., Corbineau, F., Grzesikit, M., Guyi, P., & Come, D.** (1996). Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 161-169.
- Bonga, J. M.** (2014). A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Canadian Journal of Forest Research*, 45(4), 379-383.
- Bonhomme, M., Peuch, M., Ameglio, T., Rageau, R., Guillot, A., Decourteix, M., Alves, G., Sakr, R., & Lacoïnte, A.** (2009). Carbohydrate uptake from xylem vessels and its distribution among stem tissues and buds in walnut (*Juglans regia L.*). *Tree Physiology*, 30(1), 89-102.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, K., Liu, C-M., van Lammeren, A. A. M., Miki, B. L. A., & Custers, J. B.** (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.
- Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., & Suarez, M. F.** (2005). Programmed cell death in plant embryogenesis. *Current topics in developmental biology*, 67, 135-179.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M., & Simon, R.** (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 129(2), 565-575.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J.** (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13(12), 624-630.
- Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., Golberg, R. B., & Harada, J. J.** (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3468-3473.
- Breton, D., Harvengt, L., Trontin, J. F., Bouvet, A., & Favre, J. M.** (2005). High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(4), 494-504.
- Buer, C. S., Muday, G. K., & Djordjevic, M. A.** (2007). Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 145(2), 478-490.

C

- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., & Ros, J.** (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 27393-27398.
- Caillau, M., & Paul Quick, W.** (2005). New insights into plant transaldolase. *The Plant Journal*, 43(1), 1-16.
- Cairney, J., & Pullman, G. S.** (2007). The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New phytologist*, 176(3), 511-536.
- Canales, J., Bautista, R., Label, P., Gómez-Maldonado, J., Lesur, I., Fernández-Pozo, N., Rueda-López, M., Guerrero-Fernández, D., Castro-Rodríguez, V., Benzekri, H., Cañas, R. A., Guevara, M-A., Rodrigues, A., Seoane, P., Teyssier, C., Morel, A., Ehrenmann, F., Le Provost, G., Lalanne, C., Noirod, C., Klopp, C., Reymond, I., García-Gutiérrez, A., Trontin, J-F., Lelu-Walter, M-A., Miguel, C., Cervera, M-T., Cantón, F. R., Plomion, C., Harvengt, L., Avila, C., Gonzalo Claros, M., Cánovas, F. M.** (2014). De novo assembly of maritime pine transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology. *Plant biotechnology journal*, 12(3), 286-299.
- Carrari, F., & Fernie, A. R.** (2006). Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 57(9), 1883-1897.
- Casson, S. A., & Lindsey, K.** (2006). The turnip mutant of *Arabidopsis* reveals that LEAFY COTYLEDON1 expression mediates the effects of auxin and sugars to promote embryonic cell identity. *Plant Physiology*, 142(2), 526-541.
- de Castro, R. D., van Lammeren, A. A., Groot, S. P., Bino, R. J., & Hilhorst, H. W.** (2000). Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. *Plant Physiology*, 122(2), 327-336.
- Chalupa, V.** (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.). *Commun Inst For Cech 14*, 57-63.
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J.** (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter*, 11(2), 113-116.
- Chapple, C.** (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annual review of Plant Biology*, 49(1), 311-343.
- Cho, R. J., & Campbell, M. J.** (2000). Transcription, genomes, function. *Trends in Genetics*, 16(9), 409-415.
- Chugh, A., & Khurana, P.** (2002). Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. *Current Science-Bangalore*, 83(6), 715-730.
- Ciavatta, V. T., Morillon, R., Pullman, G. S., Chrispeels, M. J., & Cairney, J.** (2001). An aquaglyceroporin is abundantly expressed early in the development of the suspensor and the embryo proper of loblolly pine. *Plant Physiology*, 127(4), 1556-1567.

Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A. S., Veríssimo, P., & Canhoto, J. M. (2012). Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *Journal of proteome research*, 11(3), 1666-1675.

Cui, K., Wang, H., He, C., Sun, D., Zhang, J., Liao, S., Cui, Y., & Li, L. (2017). Analysis of culm elongation in photoheterotrophic status of *Dendrocalamus sinicus* by comparative proteomics. *Trees*, 31(2), 687-704.

Cutler, A. J., & Krochko, J. E. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4(12), 472-478.

Cvikrova, M., Vondráková, Z., Eliasova, K., Pesek, B., Travnickova, A., & Vagner, M. (2016). The impact of UV-B irradiation applied at different phases of somatic embryo development in Norway spruce on polyamine metabolism. *Trees*, 30(1), 113-124.

D

Dean, C. A. (2008). Genetic parameters of somatic clones of coastal Douglas-fir at 5 1/2-years across Washington and Oregon, USA. *Silvae Genetica*, 57(4-5), 269-275.

Dean, C. A., Welty, D. E., & Herold, G. E. (2009). Performance and genetic parameters of somatic and zygotic progenies of coastal Douglas-fir at 71/2-years across Washington and Oregon, USA. *Silvae Genetica*, 58(5/6), 212-219.

De Boer, B. (1997). Fusicoccin—a key to multiple 14-3-3 locks?. *Trends in Plant Science*, 2(2), 60-66.

Dénarié, J., Debelle, F., & Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual reviews in Microbiology*, 46(1), 497-531.

De Diego, N., Montalbán, I. A., Fernandez de Larrinoa, E., & Moncaleán, P. (2008). *In vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian journal of forest research*, 38(10), 2607-2615.

DeSano, J. T., & Xu, L. (2009). MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. *The AAPS journal*, 11(4), 682.

van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Experimental Cell Research*, 322(1), 12-20.

Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.

Dobrev, P. I., & Vankova, R. (2012). Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Dans: Shabala, S., & Cuin, T. A. (eds.), Plant salt tolerance: methods and protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol. 913, Chap. 17, Springer Science+Business Media, pp. 251-261.

Dodeman, V. L., Ducreux, G., & Kreis, M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48(8), 1493-1509.

Dogra, P. D. (1967). Seed Sterility and disturbances in Embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in *Pinaceae*. *Studia Forestia Suecica*, 45,5-97.

Dogra, P. D. (1978). Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology*, 28(3), 307-322.

Domon, J. M., Dumas, B., Lainé, E., Meyer, Y., David, A., & David, H. (1995). Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiology*, 108(1), 141-148.

Dong, J. Z., & Dunstan, D. I. (1997). Endochitinase and β -1, 3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*, 201(2), 189-194.

Dronne, S., Label, P., & Lelu, M. A. (1997). Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 99(3), 433-438.

D'Souza-Schorey, C., & Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), 347.

Dudits, D., Bögre, L., & Györgyey, J. (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science*, 99(3), 473-482.

Dungey, H. S., Low, C. B., Lee, J., Miller, M. A., Fleet, K., & Yanchuk, A. D. (2012). Developing breeding and deployment options for Douglas-fir in New Zealand: breeding for future forest conditions. *Silvae Genetica*, 61(1-6), 104-115.

Dunwell, J. M., Khuri, S., & Gane, P. J. (2000). Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 153-179.

Dunwell, J. M., Gibbings, J. G., Mahmood, T., & Saqlan Naqvi, S. M. (2008). Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. *Critical reviews in plant sciences*, 27(5), 342-375.

Dure, L., Greenway, S. C., & Galau, G. A. (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, 20(14), 4162-4168.

Durzan, D. J., & Gupta, P. K. (1987). Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension cultures. *Plant Science*, 52(3), 229-235.

E

Eastman, P. A. K., Webster, F. B., Pitel, J. A., & Roberts, D. R. (1991). Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii complex*) using culture morphology and isozyme analysis. *Plant Cell Reports*, 10(8), 425-430.

Elbl, P., Lira, B. S., Andrade, S. C. S., Jo, L., dos Santos, A. L. W., Coutinho, L. L., Floh E. L. R., & Rossi, M. (2015). Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 903-915.

Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6), 631-642.

Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. *Euphytica*, 57(3), 227-243.

Etienne, H., Berger, A., & Carron, M. P. (1991). Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 82(2), 213-218.

Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E., & Carron, M. P. (1993). Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *Plant Science*, 88(1), 91-96.

Eulgem, T., & Somssich, I. E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 366-371.

F

Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A. R., & Galili, G. (2006). *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, 142(3), 839-854.

Feher, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201-228.

Feirer, R. P. (1995). The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines, and storage proteins. *Dans: Jain, S. M., Gupta, P.K., & Newton, R. J. (eds), Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 317–336.

Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., & von Arnold, S. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, 51(343), 249-264.

Filonova, L. H., Von Arnold, S., Daniel, G., & Bozhkov, P. V. (2002). Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell death and differentiation*, 9(10), 1057.

Forward, B. S., Tranbarger, T. J., & Misra, S. (2001). Characterization of proteinase activity in stratified Douglas-fir seeds. *Tree physiology*, 21(9), 625-629.

Friml, J., & Palme, K. (2002). Polar auxin transport—old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*, 49(3), 273-284.

Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., & Weijers, D. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6963), 147.

G

Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., & Lemaux, P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222(6), 977-988.

Galland, R., Randoux, B., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (2001). A glutathione S-transferase cDNA identified by mRNA differential display is upregulated during somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1522(3), 212-216.

Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., & Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282(5397), 2226-2230.

Garcia-Mendiguren, O., Montalbán, I. A., Stewart, D., Moncalean, P., Klimaszewska, K., & Rutledge, R. G. (2015). Gene expression profiling of shoot-derived calli from adult radiata pine and zygotic embryo-derived embryonal masses. *PloS One*, 10(6), e0128679.

Gautier, F., Eliášová, K., Reeves, C., Sanchez, L., Teyssier, C., Trontin, J-F, Le Metté, C., Vágner, M., Costa, G., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M-A. (2017). What is the best way to maintain embryogenic capacity of embryogenic lines initiated from Douglas-fir immature embryos? *Dans* : Bonga JM, Park Y-S, Trontin J-F (éds). Proceedings 4ème Conférence Internationale IUFRO Unit 2.09.02 sur “Somatic embryogenesis and other vegetative propagation technologies. Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a changing climate and environment”. Septembre 19-23, 2016, La Plata Argentine pp. 283-286.

Gao, F., Zhou, Y., Zhu, W., Li, X., Fan, L., & Zhang, G. (2009). Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella* rosette leaves. *Planta*, 230(5), 1033-1046.

Ge, Z. Y., Wan, P. J., Li, G. Q., Xia, Y. G., & Han, Z. J. (2014). Characterization of cysteine protease-like genes in the striped rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Genome*, 57(2), 79-88.

Gliwicka, M., Nowak, K., Cieśla, E., & Gaj, M. D. (2012). Expression of seed storage product genes (CRA1 and OLEO4) in embryogenic cultures of somatic tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 235-245.

de la Goublaye, D., & Franclet, A. (1978). Bouturage du Douglas: rétablissement de l'orthotropie. *Annales AFOCEL* 1978, 277-295.

van der Graaff, E., Laux, T., & Rensing, S. A. (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome biology*, 10(12), 248.

Green, M. J., McLeod, J. K., & Misra, S. (1991). Characterization of Douglas fir protein body composition by SDS-PAGE and electron microscopy. *Plant physiology and biochemistry*, 29(1), 49-55.

- Gugger, P. F., González-Rodríguez, A., Rodríguez-Correa, H., Sugita, S., & Cavender-Bares, J. (2011).** Southward Pleistocene migration of Douglas-fir into Mexico: phylogeography, ecological niche modeling, and conservation of ‘rear edge’ populations. *New Phytologist*, 189(4), 1185-1199.
- Guo, F., Liu, C., Xia, H., Bi, Y., Zhao, C., Zhao, S., Hou, L., Li, F., & Wang, X. (2013).** Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS One*, 8(8), e71714.
- Guo, J., Jia, J., & Jia, R. (2015).** PTBP1 and PTBP2 impaired autoregulation of SRSF3 in cancer cells. *Scientific reports*, 5, srep14548.
- Gupta, P. K. (1996).** Method for reproducing conifers by somatic embryogenesis using a maltose enriched maintenance medium: US Patent No. 5,563,061. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1986).** Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Nature Biotechnology*, 4(7), 643-645.
- Gupta, P. K., & Pullman, G. S. (1991).** Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and osmotic potential variation. U.S. Brevet No 5,036,007, 30 juill. 1991.
- Gupta, P. K., & Pullman, G. S. (1995).** Method for reproducing Douglas-fir by somatic embryogenesis. U.S. Brevet No WO 95/22887, 31 août 1995.
- Gupta, P. K., & Pullman, G. S. (1996).** Method for reproducing Douglas-fir by somatic embryogenesis. U.S. Brevet No 5,482,857, 9 janv. 1996.
- Gupta, P. K., & Timmis, R. (2005).** Mass propagation of conifer trees in liquid cultures—progress towards commercialization. In *Liquid Culture Systems for in vitro plant propagation*, Springer Netherlands, 81, 339-346
- Gupta, P. K., Timmis, R., Timmis, K., Carlson, W., Grob, J., & Welty, E. (1994).** Plantlet regeneration via somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *TAPPI Proc. Bio. Science Symposium*, pp. 35-39.
- Gupta, P. K., Timmis, R., Timmis, K. A., Carlson, W. C., & Welty, E. D. (1995).** Somatic Embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). Dans : Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J. (éds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 3 -gymnosperms. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 303-313.
- Gusmaroli, G., Tonelli, C., & Mantovani, R. (2002).** Regulation of novel members of the Arabidopsis thaliana CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. *Gene*, 283(1), 41-48.
- Guzmán-García, E., Sánchez-Romero, C., Panis, B., & Carpentier, S. C. (2013).** The use of 2D-DIGE to understand the regeneration of somatic embryos in avocado. *Proteomics*, 13(23-24), 3498-3507.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., & Aebersold, R. (1999).** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 1720-1730.

H

- Habu, Y., Fukushima, H., Sakata, Y., Abe, H., & Funada, R.** (1996). A gene encoding a major Kunitz proteinase inhibitor of storage organs of winged bean is also expressed in the phloem of stems. *Plant molecular biology*, 32(6), 1209-1213.
- Hadfi, K., Speth, V., & Neuhaus, G.** (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development*, 125(5), 879-887.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., & Laux, T.** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131(3), 657-668.
- Hakman, I., & von Arnold, S.** (1985). Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). *Journal of Plant Physiology*, 121(2), 149-158.
- Hakman, I., Hallberg, H., & Palovaara, J.** (2009). The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree physiology*, 29(4), 483-496.
- Hall, A.** (1992). Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*, 3(5), 475-479.
- Harding, E. W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E., & Perry, S. E.** (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology*, 133(2), 653-663.
- Hargreaves, C. L., Reeves, C. B., Find, J. I., Gough, K., Josekutty, P., Skudder, D. B., van der Maas, S. A., Sigley, M. R., Menzies, M. I., Low, C. B., & Mullin, T. J.** (2009). Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(8), 1566-1574.
- Hargreaves, C. L., Reeves, C. B., Gough, K., Menzies, M. I., Low, C. B., & Mullin, T. J.** (2011). Overcoming the challenges of family and genotype representation and early cell line proliferation in somatic embryogenesis from control-pollinated seeds of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science (New Zealand Forest Research Institute Ltd (trading as Scion))*, 41.
- Harvengt, L., Trontin, J. F., Reymond, I., Canlet, F., & Paques, M.** (2001). Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta*, 213(5), 828-832.
- He, L., & Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5(8), 631.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U., & de Vries, S. C.** (2001). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3), 803-816.

Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D., Gruber, M., Sharpe, A., Parkin, I., Whitwill, S., & Lydiate, D. (2003). Molecular characterization of Brassicanapus NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress. *Plant molecular biology*, 53(3), 383-397.

Helal, N. A. S. (2011). The green revolution *via* synthetic (artificial) seeds: a review. *Res J Agric Biol Sci*, 7(6), 464-477.

Van Hengel, A. J., Van Kammen, A. B., & De Vries, S. C. (2002). A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 114(4), 637-644.

Hermann, R. K., & Lavender, D. P. (1999). Douglas-fir planted forests. *New Forests*, 17(1), 53-70.

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, 279(5350), 519-526.

Hong, L., Boulay, M., Gupta, P. K., & Durzan, D. J. (1991). Variations in somatic polyembryogenesis: induction of adventitious embryonal-suspensor masses on developing Douglas fir embryos. *Woody plant biotechnology*. New York: Plenum Publishing, 105-121.

Horstman, A. (2015). BABY BOOM-induced somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. Dissertation, Wageningen University.

Howe, G. T., Jayawickrama, K., Cherry, M., Johnson, G. R., & Wheeler, N. C. (2006). Breeding Douglas-fir. *Plant Breeding Reviews*, 27, 245.

Hu, R., Sun, Y., Wu, B., Duan, H., Zheng, H., Hu, D., Lin, H., Tong, Z., Xu, J., & Li, Y. (2017). Somatic Embryogenesis of Immature *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook Zygotic Embryos. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.

I

Imin, N., Nizamidin, M., Wu, T., & Rolfe, B. G. (2006). Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 439-451.

Iraqi, D., & Tremblay, F. M. (2001). Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2301-2311.

Isah, T. (2016). Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta physiologiae plantarum*, 38(5), 118.

J

Jang, H. N., Lee, M., Loh, T. J., Choi, S. W., Oh, H. K., Moon, H., Cho, S., Hong, S-E., Kim, D. H., Sheng, Z., Green, M. R., Park, D., & Zheng, X. (2014). Exon 9 skipping of apoptotic caspase-2 pre-mRNA is promoted by SRSF3 through interaction with exon 8. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(1), 25-32.

Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3), 91-110.

Jo, L., Dos Santos, A. L., Bueno, C. A., Barbosa, H. R., & Floh, E. I. (2013). Proteomic analysis and polyamines, ethylene and reactive oxygen species levels of *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine) embryogenic cultures with different embryogenic potential. *Tree physiology*, 34(1), 94-104.

Johnson, K. L., Jones, B. J., Bacic, A., & Schultz, C. J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, 133(4), 1911-1925.

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 19-53.

Joosen, R. V. L., Lammers, M., Balk, P., Brønnum, P., Konings, M. C. J. M., Perks, M., Stattin, E., Van Wordragen, M. F., & Geest, L. H. M. (2006). Correlating gene expression to physiological parameters and environmental conditions during cold acclimation of *Pinus sylvestris*, identification of molecular markers using cDNA microarrays. *Tree Physiology*, 26(10), 1297-1313.

Jordy, M. N., & Favre, J. M. (2003). Spatio-temporal variations in starch accumulation during germination and post-germinative growth of zygotic and somatic embryos of *Pinus pinaster*. *Biologia Plantarum*, 46(4), 507-512.

Jourdain, I., Lelu, M. A., & Label, P. (1997). Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35(9), 741-749.

Junker, A., Mönke, G., Rutten, T., Keilwagen, J., Seifert, M., Thi, T. M. N., Renou, J. P., Balzergue, S., Viehöver, P., Hähnel, U., Ludwig-Müller, J., Altschmied, L., Conrad, U., Weisshaar, B., & Ludwig-Müller, J. (2012). Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 71(3), 427-442.

K

Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S., & MacCoss, M. J. (2007). Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature methods*, 4(11), 923.

Kanayama, Y., Mori, H., Imaseki, H., & Yamaki, S. (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding NADP-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase from apple. *Plant physiology*, 100(3), 1607.

Kanter, U., Usadel, B., Guerineau, F., Li, Y., Pauly, M., & Tenhaken, R. (2005). The inositol oxygenase gene family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides. *Planta*, 221(2), 243-254.

Karami, O., & Saidi, A. (2010). The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, 37(5), 2493-2507.

- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J., & de Vries, S.** (2006). The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *The Plant Cell*, 18(3), 626-638.
- Kermode, A. R.** (1990). Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(2), 155-195.
- Kermode, A. R.** (1997). Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Science Research*, 7(2), 75-95.
- Kim, J., Park, R. Y., Chen, J. K., Kim, J., Jeong, S., & Ohn, T.** (2014). Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region. *Cell death and differentiation*, 21(3), 481.
- Kim, S. G., Kim, S. Y., & Park, C. M.** (2007). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta*, 226(3), 647-654.
- Kim, S. G., Kim, S. T., Wang, Y., Kim, S. K., Lee, C. H., Kim, K. K., Kim, K. J., Lee, S. Y., & Kang, K. Y.** (2010). Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiologia plantarum*, 138(1), 1-9.
- Klimaszewska, K., & Smith, D. R.** (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 949-957.
- Klimaszewska, K., Cyr, D. R., & Sutton, B. C. S.** (2000). Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(4), 279-286.
- Klimaszewska, K., Park, Y. S., Overton, C., Maceacheron, I., & Bonga, J. M.** (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(3), 392-399.
- Klimaszewska, K., Trontin, J. F., Becwar, M. R., Devillard, C., Park, Y. S., & Lelu-Walter, M. A.** (2007). Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree For Sci Biotechnol*, 1(1), 11-25.
- Klimaszewska, K., Noceda, C., Pelletier, G., Label, P., Rodriguez, R., & Lelu-Walter, M. A.** (2009). Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(1), 20.
- Klimaszewska, K., Overton, C., Stewart, D., & Rutledge, R. G.** (2011). Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta*, 233(3), 635-647.
- Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M. A., & Trontin, J. F.** (2016). Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *Dans* : Germanà, M. A., Lambardi, M. (éds.), *In vitro Embryogenesis in Higher Plants* Chap 7, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, pp. 131-166.

Klubicová, K., Uváčková, L., Danchenko, M., Nemecek, P., Skultéty, L., Salaj, J., & Salaj, T. (2017). Insights into the early stage of *Pinus nigra* Arn. somatic embryogenesis using discovery proteomics. *Journal of Proteomics*, accepted.

Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollmack, D., & Dietz, K. J. (2003). New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 35(4), 377-388.

Kong, L., & von Aderkas, P. (2011). A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106(1), 115-125.

Kong, L., Denchev, P., Radley, R., Lobatcheva, I. I., Attree, S. M. (2012). Method of culturing conifer somatic embryos using S (+)- abscisic acid. U.S. Patent No. US 8,124,412 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Kong, Z., Ioki, M., Braybrook, S., Li, S., Ye, Z. H., Lee, Y. R. J., Hotta, T., Chang, A., Tian, J., Wang, G., & Liu, B. (2015). Kinesin-4 functions in vesicular transport on cortical microtubules and regulates cell wall mechanics during cell elongation in plants. *Molecular plant*, 8(7), 1011-1023.

Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., & Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(2), 263-276.

Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 236-246.

Kundu, S., & Sharma, R. (2016). In silico identification and taxonomic distribution of plant class C GH9 endoglucanases. *Frontiers in plant science*, 7.

Kunieda, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Takeda, S., Aida, M., Tasaka, M., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2008). NAC family proteins NARS1/NAC2 and NARS2/NAM in the outer integument regulate embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(10), 2631-2642.

Kwong, R. W., Bui, A. Q., Lee, H., Kwong, L. W., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *The Plant Cell*, 15(1), 5-18.

L

Lafontaine, D. L., & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(7), 514.

Lane, B. G. (2000). Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins. *Biochem. J*, 349, 309-321.

- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U., & Flinn, B. S.** (2012). Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(3), 341-354.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., & Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(1), 87-96.
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S. B., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S. N., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J., Vale, R. D., Walczak, C. E., & Wordeman, L.** (2004). A standardized kinesin nomenclature. *The Journal of cell biology*, 167(1), 19-22.
- Ledwoń, A., & Gaj, M. D.** (2009). LEAFY COTYLEDON2 gene expression and auxin treatment in relation to embryogenic capacity of *Arabidopsis* somatic cells. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1677.
- Ledwoń, A., & Gaj, M. D.** (2011). LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 65(1), 157-167.
- Lee, G. J., & Vierling, E.** (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology*, 122(1), 189-198.
- Lee, H., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J.** (2003). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 2152-2156.
- Lelu, M. A., Klimaszewska, K., & Charest, P. J.** (1994). Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Canadian Journal of Forest Research*, 24(1), 100-106.
- Lelu, M. A., Bastien, C., Drugeault, A., Gouez, M. L., & Klimaszewska, K.** (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum*, 105(4), 719-728.
- Lelu-Walter, M. A., Pâques, L. E.** (2009). Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix × eurolepis* and *Larix × marschlinsii*). Perspectives for breeding. *Annales of Forest Science*, 66(1), 104p1–104p10.
- Lelu-Walter, M. A., Bernier-Cardou, M., & Klimaszewska, K.** (2006). Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Reports*, 25(8), 767-776.
- Lelu-Walter, M. A., Bernier-Cardou, M., & Klimaszewska, K.** (2008). Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1), 31-45.
- Lelu-Walter, M. A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M., & Pâques, L. E.** (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes*, 9(4), 883-899.

- Lelu-Walter, M. A., Klimaszewska, K., Miguel, C., Aronen, T., Hargreaves, C., Teyssier, C., & Trontin, J. F.** (2016). Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus spp.*: bottlenecks and recent advances. *Dans : Loyola-Vargas, V. M., Ochoa-Alejo, N. (éds.), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* Springer International Publishing Switzerland, Chap. 19, pp. 319-365.
- Lelu-Walter, M. A., Gautier, F., Sanchez, L., Teyssier, C., Eliášová, K., Lomenech, A., Le Metté, C., Hargreaves, C., Trontin, J. F., Reeves, C.** (in press). High gelling agent concentration and secondary somatic embryogenesis: key factors to improve somatic embryo maturation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco). *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*, accepté 27 09 17.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
- Li, Q., Zhang, S., & Wang, J.** (2014). Transcriptome analysis of callus from *Picea balfouriana*. *BMC genomics*, 15(1), 553.
- Li, W. F., Zhang, S. G., Han, S. Y., Wu, T., Zhang, J. H., & Qi, L. W.** (2013). Regulation of LaMYB33 by miR159 during maintenance of embryogenic potential and somatic embryo maturation in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113(1), 131-136.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., & Leubner-Metzger, G.** (2010). The evolution of seeds. *New Phytologist*, 186(4), 817-831.
- Lipavská, H., & Konrádová, H.** (2004). Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1(40), 23-30.
- Litvay, J. D., Verma, D. C., & Johnson, M. A.** (1985). Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports*, 4(6), 325-328.
- Liu, C. M., Xu, Z. H., & Chua, N. H.** (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5(6), 621-630.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C.** (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 297(5589), 2053-2056.
- Long, J. A., Woody, S., Poethig, S., Meyerowitz, E. M., & Barton, M. K.** (2002). Transformation of shoots into roots in *Arabidopsis* embryos mutant at the TOPLESS locus. *Development*, 129(12), 2797-2806.
- López-Fernández, M. P., & Maldonado, S.** (2013). Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Annals of botany*, 112(7), 1253-1262.

Lotan, T., Ohto, M. A., Yee, K. M., West, M. A., Lo, R., Kwong, R. W., Tamagishi, K., Fisher, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93(7), 1195-1205.

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550.

Luo, P., Shen, Y., Jin, S., Huang, S., Cheng, X., Wang, Z., Li, P., Zhao, J., Bao, M., & Ning, G. (2016). Overexpression of *Rosa rugosa* anthocyanidin reductase enhances tobacco tolerance to abiotic stress through increased ROS scavenging and modulation of ABA signaling. *Plant science*, 245, 35-49.

Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, J. F., Iversen, T. H., & Hvoslef-Eide, A. K. (2008). Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(4), 353.

M

MacKay, J. J., Becwar, M. R., Park, Y. S., Corderro, J. P., & Pullman, G. S. (2006). Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 2(1), 1-9.

Mahdavi-Darvari, F., Noor, N. M., & Ismanizan, I. (2015). Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 407-422.

Manfre, A. J., LaHatte, G. A., Climer, C. R., & Marcotte, W. R. (2009). Seed dehydration and the establishment of desiccation tolerance during seed maturation is altered in the *Arabidopsis thaliana* mutant *atem6-1*. *Plant and Cell Physiology*, 50(2), 243-253.

Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Chen, S. K., & Rose, R. J. (2008). The transcription factor MtSERF1 may function as a nexus between stress and development in somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling & Behavior*, 3(7), 498-500.

Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 127-158.

Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A. S., & Vannini, C. (2008). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Reports*, 27(2), 347-356.

Mathieu, M., Neutelings, G., Hawkins, S., Grenier, E., & David, H. (2003). Cloning of a pine germin-like protein (GLP) gene promoter and analysis of its activity in transgenic tobacco Bright Yellow 2 cells. *Physiologia plantarum*, 117(3), 425-434.

Mathieu, M., Lelu-Walter, M. A., Blervacq, A. S., David, H., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2006). Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Molecular Biology*, 61(4-5), 615-627.

- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., & Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.
- McCabe, P. F., Valentine, T. A., Forsberg, L. S., & Pennell, R. I.** (1997). Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *The Plant Cell*, 9(12), 2225-2241.
- McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S. M. C., Koeppe, M. K., & O'Keefe, D. P.** (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology*, 124(3), 1105-1120.
- Meier, I., & Brkljacic, J.** (2009). The nuclear pore and plant development. *Current opinion in plant biology*, 12(1), 87-95.
- Merino, I., Abrahamsson, M., Sterck, L., Craven-Bartle, B., Canovas, F., & von Arnold, S.** (2016). Transcript profiling for early stages during embryo development in Scots pine. *BMC plant biology*, 16(1), 255.
- Merkle, S., & Cunningham, M.** (2011). Southern hardwood varietal forestry: a new approach to short-rotation woody crops for biomass energy. *Journal of Forestry*, 109(1), 7-14.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., & Thomas, P. D.** (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature protocols*, 8(8), 1551.
- Michalczyk, L., Cooke, T. J., & Cohen, J. D.** (1992). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry*, 31(4), 1097-1103.
- Miemyk, J.** (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends in plant science*, 2(5), 180-187.
- Miguel, C. M., Rupps, A., Raschke, J., Rodrigues, A. S., Trontin, J. F.** (2016). Impact of molecular studies on somatic embryogenesis development for implementation in conifer multi-varietal forestry. *Dans : Park, Y-S., Bonga, J. M., Moon, H-K. (eds) Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, pp. 373–421.
- Miller, J. T., & Knowles, F. B.** (1994). Introduced forest trees in New Zealand: recognition, role, and seed source. 14. Douglas-fir: *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco. *FRI bulletin*, (124, pt. 14).
- Missihoun, T. D., Kirch, H. H., & Bartels, D.** (2012). T-DNA insertion mutants reveal complex expression patterns of the aldehyde dehydrogenase 3H1 locus in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3887-3898.
- Mithran, M., Paparelli, E., Novi, G., Perata, P., & Loreti, E.** (2014). Analysis of the role of the pyruvate decarboxylase gene family in *Arabidopsis thaliana* under low-oxygen conditions. *Plant Biology*, 16(1), 28-34.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.

Morel, A., Teyssier, C., Trontin, J. F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M., Morabito, D., Boizot, N., Le Metté, C., Belal-Bessai, L., Reymond, I., Harvengt, L., Cadene, M., Corbineau, F., Vágner, M., Label, P., Lelu-Walter, M. A. (2014a). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152(1), 184-201.

Morel, A., Trontin, J. F., Corbineau, F., Lomenech, A. M., Beaufour, M., Reymond, I., Le Metté, C., Ader, K., Harvengt, L., Cadene, M., Label, P., Teyssier, C., Lelu-Walter, M. A. (2014b). Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta*, 240(5), 1075-1095.

Mu, J., Tan, H., Zheng, Q., Fu, F., Liang, Y., Zhang, J., Yang, X., Wang, T., Chong, K., Wang, X-J., & Zuo, J. (2008). LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 148(2), 1042-1054.

Mu, J., Tan, H., Hong, S., Liang, Y., & Zuo, J. (2013). *Arabidopsis* transcription factor genes NF-YA1, 5, 6, and 9 play redundant roles in male gametogenesis, embryogenesis, and seed development. *Molecular Plant*, 6(1), 188-201.

Muñoz, F., Sanchez, L. (2015). breedR: Statistical Methods for Forest Genetic Resources Analysts. R package version 0.11. <https://github.com/famuvie/breedR>.

Mur, L. A., Sturgess, F. J., Farrell, G. G., & Draper, J. (2004). The AoPR10 promoter and certain endogenous PR10 genes respond to oxidative signals in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 435-451.

N

Nagata, T., Ishida, S., Hasezawa, S., & Takahashi, Y. (2002). Genes involved in the dedifferentiation of plant cells. *International Journal of Developmental Biology*, 38(2), 321-327.

Nagmani, R., Johnson, M. A., & Dinus, R. J. (1991). Effect of explant and media on initiation, maintenance, and maturation of somatic embryos in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Douglas-fir). *Dans : Ahuja, M. R. (éd.), Woody Plant Biotechnology* Springer US. pp. 171-178

Nagmani, R., Diner, A. M., Garton, S., & Zipf, A. E. (1995). Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers. *Dans : Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (éds.), Somatic embryogenesis in woody plants* Vol. 1, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands: pp. 23-48).

Navarro, B. V., Elbl, P., De Souza, A. P., Jardim, V., de Oliveira, L. F., Macedo, A. F., dos Santos, A. L. D., Buckeridge, M. S., & Floh, E. I. (2017). Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PloS one*, 12(7), e0180051.

Ng, T. L. M., Karim, R., Tan, S. Y., Teh, H. F., Danial, A. D., Ho, L. S., Khalid, N., Appleton, D. R., Harikrishna, J. A. (2016). Amino acid and secondary metabolite production in embryogenic and non-embryogenic callus of fingerroot ginger (*Boesenbergia rotunda*). *PLoS One*, 11(6), e0156714.

Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Canut, H., & Höfte, H. (1998). A plasma membrane-bound putative endo-1, 4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *The EMBO journal*, 17(19), 5563-5576.

Niu, S. H., Li, Z. X., Yuan, H. W., Chen, X. Y., Li, Y., & Li, W. (2013). Transcriptome characterisation of *Pinus tabulaeformis* and evolution of genes in the *Pinus* phylogeny. *BMC genomics*, 14(1), 263.

Noah, A. M., Niemenak, N., Sunderhaus, S., Haase, C., Omokolo, D. N., Winkelmann, T., & Braun, H. P. (2013). Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of proteomics*, 78, 123-133.

Nolan, K. E., Kurdyukov, S., & Rose, R. J. (2009). Expression of the SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1759-1771.

Nowak, K., & Gaj, M. D. (2016). Transcription Factors in the Regulation of Somatic Embryogenesis. *Dans : Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (éds), Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 53-79). Springer International Publishing.

Nowak, K., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2015). ERF022 impacts the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis* through the ethylene-related pathway. *Planta*, 241(4), 967-985.

Q

Oh, T. J., Wartell, R. M., Cairney, J., & Pullman, G. S. (2008). Evidence for stage-specific modulation of specific microRNAs (miRNAs) and miRNA processing components in zygotic embryo and female gametophyte of loblolly pine (*Pinus taeda*). *New Phytologist*, 179(1), 67-80.

Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L., & Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends in plant science*, 10(2), 79-87.

P

Palovaara, J., & Hakman, I. (2008). Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 66(5), 533-549.

Palovaara, J., Hallberg, H., Stasolla, C., & Hakman, I. (2010). Comparative expression pattern analysis of WUSCHEL-related homeobox 2 (WOX2) and WOX8/9 in developing seeds and somatic embryos of the gymnosperm *Picea abies*. *New Phytologist*, 188(1), 122-135.

- Pan, S., Sehne, P. C., Ferl, R. J., & Gurley, W. B.** (1999). Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *The Plant Cell*, *11*(8), 1591-1602.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J. K., Singh, S., Stephan, H. M., Clarke, P. A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., & Cramer, R.** (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Molecular cell*, *10*(6), 1307-1318.
- Parchman, T. L., Geist, K. S., Grahnen, J. A., Benkman, C. W., & Buerkle, C. A.** (2010). Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. *BMC genomics*, *11*(1), 180.
- Park, Y. S.** (2002). Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science*, *59*(5-6), 651-656.
- Park, S., Klimaszewska, K., Park, J. Y., & Mansfield, S. D.** (2010). Lodgepole pine: the first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud cultures of adult trees. *Tree physiology*, *30*(11), 1469-1478.
- Pastore, D., Trono, D., Laus, M. N., Di Fonzo, N., & Flagella, Z.** (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: a case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany*, *58*(2), 195-210.
- Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J. J., Makam, S. N., Chen, R. J., Masson, P. H., & Murphy, A. S.** (2004). Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *16*(7), 1898-1911.
- Petrek, J., Zitka, O., Adam, V., Bartusek, K., Anjum, N. A., & Pereira, E.** (2015). Are Early Somatic Embryos of the Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) Organised ?. *PLoS One*, *10*(12), e0144093.
- Petroni, K., Falasca, G., Calvenzani, V., Allegra, D., Stolfi, C., Fabrizi, L., Maddalena, A., & Tonelli, C.** (2008). The AtMYB11 gene from *Arabidopsis* is expressed in meristematic cells and modulates growth in planta and organogenesis in vitro. *Journal of experimental botany*, *59*(6), 1201-1213.
- Pradet, A., & Raymond, P.** (1983). Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, *34*(1), 199-224.
- Pullman, G. S., Zhang, Y., & Phan, B. H.** (2003). Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant cell reports*, *22*(2), 96-104.

Pullman, G. S., Johnson, S., Tassel, S. V., & Zhang, Y. (2005a). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(1), 91-103.

Pullman, G. S., Mein, J., Johnson, S., & Zhang, Y. (2005b). Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports*, 23(9), 596-605.

Pullman, G. S., Johnson, S., & Bucalo, K. (2009). Douglas fir embryogenic tissue initiation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), 75.

Q

Quesnelle, P. E., & Emery, R. N. (2007). cis-Cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth *in vitro*. *Canadian Journal of Botany*, 85(1), 91-103.

R

R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K., & Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 179-190.

Randazzo, P. A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., Roller, P., Cooper, J. A. (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97,4011-4016.

Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Pas̃a-Tolic´, L., & Pikaard, C. S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Molecular cell*, 33(2), 192-203.

Reeves, C., Hargreaves, C., Trontin, J. F., & Lelu-Walter, M. A. (in press). Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryogenic tissue of Douglas-fir. *Trees*, accepté.

Richmond, T., & Somerville, S. (2000). Chasing the dream: plant EST microarrays. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 108-116.

Robinson, A. R., Dauwe, R., Ukrainetz, N. K., Cullis, I. F., White, R., & Mansfield, S. D. (2009). Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant biotechnology journal*, 7(9), 952-963.

Rout, M. P., & Aitchison, J. D. (2001). The nuclear pore complex as a transport machine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 16593-16596.

Royce, T. E., Rozowsky, J. S., & Gerstein, M. B. (2007). Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic acids research*, 35(15), e99.

Ruaud, J. N. (1993). Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7–56-day-old *Picea abies*. *Plant Science*, 92(2), 213-220.

Ruaud, J. N., Bercetche, J., & Pâques, M. (1992). First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. *Plant cell reports*, 11(11), 563-566.

Ruduś, I., Weiler, E. W., & Kępczyńska, E. (2009). Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? *Plant Growth Regulation*, 59(2), 159-169.

Rupps, A., Raschke, J., Rümmler, M., Linke, B., & Zoglauer, K. (2016). Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABYBOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related HOMEODOMAIN-BOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta*, 243(2), 473-488.

Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A. K., Langum, T. J., Smidt, L., Boomsma, D. D., Emme, N. J., Chen, X., Finer, J. J., Shen, Q. J., & Rushton, P. J. (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling. *Plant biotechnology journal*, 10(1), 2-11.

Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in plant science*, 15(5), 247-258.

Rutledge, R. G., Stewart, D., Overton, C., & Klimaszewska, K. (2017). Gene expression analysis of primordial shoot explants collected from mature white spruce (*Picea glauca*) trees that differ in their responsiveness to somatic embryogenesis induction. *PloS one*, 12(10), e0185015.

S

Saly, S., Joseph, C., Corbineau, F., Lelu, M. A., & Côme, D. (2002). Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant growth regulation*, 37(3), 287-294.

Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome biology*, 6(12), 242.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

- dos Santos, A. L. W., Elbl, P., Navarro, B. V., de Oliveira, L. F., Salvato, F., Balbuena, T. S., & Floh, E. I. S.** (2016). Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. *Journal of Proteomics*, *130*, 180-189.
- Sasikumar, A. N., Perez, W. B., & Kinzy, T. G.** (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *3*(4), 543-555.
- Schloss, J. A.** (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nature Biotechnology*, *26*(10), 1113-1115.
- Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., & De Vries, S. C.** (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, *124*(10), 2049-2062.
- Schwarzerová, K., Vondráková, Z., Fischer, L., Boríková, P., Bellinvia, E., Eliášová, K., Havelková, L., Fiserová, J., Vágner, M., & Opatrný, Z.** (2009). The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biology*, *10*, 89-89.
- Shao, J., Wang, L., Zhong, C., Qi, R., & Li, Y.** (2016). AHSA1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of osteosarcoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *77*, 45-51.
- Shelbourne, C. J. A., Low, C. B., Gea, L. D., & Knowles, R. L.** (2007). Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 5: Genetic improvement of Douglas-fir in New Zealand. *Australian forestry*, *70*(1), 28-32.
- Shih, M-D., Hoekstra, F. A., & Hsing, Y-I. C.** (2008). Late embryogenesis abundant proteins. *Advances in Botanical Research* *48*, 211-255.
- Silveira, V., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Floh, E. I., Guerra, M. P., & Handro, W.** (2004). Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant growth regulation*, *44*(2), 147-156.
- Singh, H.** (1978). Embryology of Gymnosperms. Dans: Zimmerman, W., Ozenda, P., Wulff, H. D. (éds.), *Handbuch der pflanzen- anatomie*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, pp 187– 241.
- Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L.** (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, *5*(5), 430-436.
- Skoog, F., & Miller, C.** (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology, *11*, 118-130.
- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., & Kaufmann, K.** (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, *139*(17), 3081-3098.

- Smith, A., Brownawell, A., & Macara, I. G.** (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Current biology*, 8(25), 1403-S1.
- Spíchal, L.** (2012). Cytokinins—recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, 39(4), 267-284.
- Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, E. D. J., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Agenet, G., Scorza, R., Custer, J., & Boutilier, K.** (2007). Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Planta*, 225(2), 341.
- Stasolla, C.** (2010). Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 319-327.
- Stasolla, C., & Yeung, E. C.** (2001). Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 196-205.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C., & Thorpe, T. A.** (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(2), 93-105.
- Stasolla, C., van Zyl, L., Egertsdotter, U., Craig, D., Liu, W., & Sederoff, R. R.** (2003). The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology*, 131(1), 49-60.
- Stasolla, C., Bozhkov, P. V., Chu, T. M., Van Zyl, L., Egertsdotter, U., Suarez, M. F., Craig, D., Russ, D., von Arnold, S., & Sederoff, R. R.** (2004). Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiology*, 24(10), 1073-1086.
- Stein, W. I., & Owston, P. W.** (2002). *Pseudotsuga Carr., Douglas-fir*. Dans : Bonner FT, Nisley, R. G. (éds.), *Woody Plant Seed Manual*. Washington DC: USDA Forest Service, pp. 1-32.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Glilweiler, L., Palme, K., & Jürgens, G.** (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, 286(5438), 316-318.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., Van Kammen, A., & De Vries, S. C.** (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, 3(9), 907-921.
- Sterk, P., & de Vries, S. C.** (1993). Molecular markers for plant embryos. *Synseeds: Applications of synthetic seeds to crop improvement*. CRC Press, Boca Raton, 115-132.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K.** (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705-708.

Stock, D., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286(5445), 1700-1705.

Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11806-11811.

Stone, S. L., Braybrook, S. A., Paula, S. L., Kwong, L. W., Meuser, J., Pelletier, J., Hsieh, T. F., Fischer, R. L., & Harada, J. J. (2008). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3151-3156.

Strickler, S. R., Bombarely, A., & Mueller, L. A. (2012). Designing a transcriptome next-generation sequencing project for a nonmodel plant species1. *American Journal of Botany*, 99(2), 257-266.

Strompen, G., Dettmer, J., Stierhof, Y. D., Schumacher, K., Jürgens, G., & Mayer, U. (2005). Arabidopsis vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *The Plant Journal*, 41(1), 125-132.

Su, N., Wu, Q., Liu, Y., Cai, J., Shen, W., Xia, K., & Cui, J. (2014). Hydrogen-rich water reestablishes ROS homeostasis but exerts differential effects on anthocyanin synthesis in two varieties of radish sprouts under UV-A irradiation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(27), 6454-6462.

Suarez, M. F., Filonova, L. H., Smertenko, A., Savenkov, E. I., Clapham, D. H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., & Bozhkov, P. V. (2004). Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14(9), R339-R340.

Sun, L., Wu, Y., Su, S., Liu, H., Yang, G., Li, S., Shan, X., & Yuan, Y. (2012). Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays L.*) inbred line H99. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(2), 271-286.

Sydorsky, Y., Dilworth, D. J., Halloran, B., MAKHNEVYCH, T., WOZNIAK, R. W., & AITCHISON, J. D. (2005). Nop53p is a novel nucleolar 60S ribosomal subunit biogenesis protein. *Biochemical Journal*, 388(3), 819-826.

Szyjanowicz, P. M., McKinnon, I., Taylor, N. G., Gardiner, J., Jarvis, M. C., & 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(5), 730-740.

T

Taber, R. P., Zhang, C., & Hu, W. S. (1998). Kinetics of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany*, 76(5), 863-871.

- Takeuchi, M., Staehelin, L. A., & Mineyuki, Y.** (2017). Actin-Microtubule Interaction in Plants. In *Cytoskeleton-Structure, Dynamics, Function and Disease*. InTech.
- Tang, W.** (2000). Peroxidase activity of desiccation-tolerant loblolly pine somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(6), 488-491.
- Tautorus, T. E., Fowke, L. C., & Dunstan, D. I.** (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Canadian Journal of Botany*, 69(9), 1873-1899.
- Terskikh, V. V., Feurtado, J. A., Borchardt, S., Giblin, M., Abrams, S. R., & Kermode, A. R.** (2005). *In vivo* ¹³C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. *Journal of experimental botany*, 56(418), 2253-2265.
- Teyssier, C., Grondin, C., Bonhomme, L., Lomenech, A. M., Vallance, M., Morabito, D., Label, P., & Lelu-Walter, M. A.** (2011). Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix* × *eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia plantarum*, 141(2), 152-165.
- Teyssier, C., Maury, S., Beaufour, M., Grondin, C., Delaunay, A., Le Metté, C., Ader, K., Cadene, M., Label, P., & Lelu-Walter, M. A.** (2014). In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix* × *eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 150(2), 271-291.
- Timmis, R., Grob, J. A., Gupta, P. K., Rayfield, S. D.** (2011). Methods for increasing germination vigor by early singulation of conifer somatic embryos. U.S. Patent No. 7,964,404. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Thakare, D., Tang, W., Hill, K., & Perry, S. E.** (2008). The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology*, 146(4), 1663-1672.
- Thibaud-Nissen, F., Shealy, R. T., Khanna, A., & Vodkin, L.O.** (2003). Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*, 132(1), 118-136.
- Torii, K. U.** (2000). Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Current opinion in plant biology*, 3(5), 361-367.
- Tremblay, L., & Tremblay, F. M.** (1991). Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) BSP (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Science*, 77(2), 233-242.
- Treutter, D.** (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant biology*, 7(06), 581-591.

Trivedi, D. K., Ansari, M. W., & Tuteja, N. (2013). Multiple abiotic stress responsive rice cyclophilin:(OsCYP-25) mediates a wide range of cellular responses. *Communicative & integrative biology*, 6(5), e25260.

Trontin, J. F., Canlet, F., Reymond, I., Debille, S., Durandeu, K., Harvengt, L., Rousseau, J. P., de Boisseson, J. M., Fraysse, J. Y., Alazard, P., Bailly, A., Teyssier, C., Le Metté, C., Morel, A., Label, P., & Lelu-Walter, M. A. (2013). L'embryogenèse somatique: une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain? *FCBA INFO*, 1-9.

Trontin, J. F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C., & Lelu-Walter, M. A. (2016a). Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. *Dans* : Germanà, M. A., Lambardi, M. (eds), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*, vol. 1359, Chapter 8, Springer Science+Business Media New York, pp. 167-207.

Trontin, J. F., Aronen, T., Hargreaves, C., Montalbán, I. A., Moncaleán, P., Reeves, C., Quiniou, S., Lelu-Walter, M. A., & Klimaszewska, K. (2016b). International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. *Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea*, 211-260.

U

Uesono, Y., & Toh-e, A. (2002). Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13848-13855.

Uddenberg, D., Valladares, S., Abrahamsson, M., Sundström, J. F., Sundås-Larsson, A., & von Arnold, S. (2011). Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta*, 234, 527-539.

V

Vágner, M., Vondráková, Z., Strnadová, Z., Eder, J., & Macháčková, I. (1998). Endogenous levels of plant growth hormones during early stages of somatic embryogenesis of *Picea abies*. *Advances in Horticultural Science*, 1, 11-18.

Vágner, M., Vondráková, Z., Špačková, J., Cvikrová, M., Eder, J., Lipavská, H., Albrechtová, J., Svobodová, H., & Macháčková, I. (1999). Norway spruce somatic embryogenesis: Endogenous levels of phytohormones during somatic embryo development. *Dans* : Altman A, Ziv M, Izhar S (éds), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century* Springer Netherlands, pp. 93-96.

Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P., Hoyerová, K., Pešek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zažímalová, E., Benková, E., & Van Der Straeten, D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development*, 137(4), 597-606.

Vanstraelen, M., Van Damme, D., De Rycke, R., Mylle, E., Inzé, D., & Geelen, D. (2006). Cell cycle-dependent targeting of a kinesin at the plasma membrane demarcates the division site in plant cells. *Current Biology*, 16(3), 308-314.

Varhaníková, M., Uvackova, L., Skultety, L., Pretova, A., Obert, B., & Hajdich, M. (2014). Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *Journal of proteomics*, 104, 57-65.

de Vega-Bartol, J. J., Simões, M., Lorenz, W. W., Rodrigues, A. S., Alba, R., Dean, J. F., & Miguel, C. M. (2013). Transcriptomic analysis highlights epigenetic and transcriptional regulation during zygotic embryo development of *Pinus pinaster*. *BMC Plant Biology*, 13(1), 123.

Vestman, D., Larsson, E., Uddenberg, D., Cairney, J., Clapham, D., Sundberg, E., & von Arnold, S. (2011). Important processes during differentiation and early development of somatic embryos of Norway spruce as revealed by changes in global gene expression. *Tree Genet Genomes*, 7, 347-362.

de Vieira, L. N., Santa-Catarina, C., de Freitas, F. H., Dos Santos, A. L., Steinmacher, D. A., Schlogl, P. S., Silveira, V., Steiner, N., Floh, E.-I. S., & Guerra, M.-P. (2012). Glutathione improves early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze by alteration in nitric oxide emission. *Plant Science*, 195, 80-87.

Vondráková, Z., Cvikrová, M., Eliášová, K., Martinčová, O., & Vágner, M. (2010). Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree physiology*, 30(10), 1335-1348.

Vondráková, Z., Eliášová, K., Fischerová, L., & Vágner, M. (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Open Life Sciences*, 6(4), 587-596.

Vondráková, Z., Eliášová, K., Vágner, M., Martinčová, O., & Cvikrová, M. (2015). Exogenous putrescine affects endogenous polyamine levels and the development of *Picea abies* somatic embryos. *Plant growth regulation*, 75(2), 405-414.

Vondráková, Z., Krajňáková, J., Fischerová, L., Vágner, M., & Eliášová, K. (2016). Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. *Dans : Park YS, Bonga, J. M., Moon, H. K. (éds.), Vegetative Propagation of Forest Trees* National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul. pp.123-169.

Vooková, B., & Kormuťák, A. (2006). Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. *Biologia plantarum*, 50(4), 785-788.

W

- Wan, L. C., Zhang, H., Lu, S., Zhang, L., Qiu, Z., Zhao, Y., Zeng, Q. Y., & Lin, J.** (2012). Transcriptome-wide identification and characterization of miRNAs from *Pinus densata*. *BMC Genomics*, *13*(1), 132.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A.** (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, *9*(5), 244-252.
- Watt, K. E. N., Achilleos, A., Neben, C. L., Merrill, A. E., & Trainor, P. A.** (2016). The roles of RNA polymerase I and III subunits Polr1c and Polr1d in craniofacial development and in zebrafish models of Treacher Collins Syndrome. *PLoS genetics*, *12*(7), e1006187.
- Weis, K.** (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, *112*(4), 441-451.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., & Davies, B.** (2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development*, *131*(4), 915-922.
- West, A. G., Shore, P., & Sharrocks, A. D.** (1997). DNA binding by MADS-box transcription factors: a molecular mechanism for differential DNA bending. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(5), 2876-2887.
- Wickramasuriya, A. M., & Dunwell, J. M.** (2015). Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*. *BMC genomics*, *16*(1), 301.
- Wilkinson, B., & Gilbert, H. F.** (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1699*(1), 35-44.
- Wise, M. J., & Tunnacliffe, A.** (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, *9*(1), 13-17.
- Wójcikowska, B., Jaskóla, K., Gąsiorek, P., Meus, M., Nowak, K., & Gaj, M. D.** (2013). LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, *238*(3), 425-440.
- Woodford, M. R., Dunn, D. M., Blanden, A. R., Capriotti, D., Loiselle, D., Prodromou, C., Panaretou, B., Hughes, P. F., Smith, A., Ackerman, W., Haystead, T. A., Loh, S. N., Bourboulia, D., Schmidt, L. S., Linehan, W. M., Bratslavsky, G., & Mollapour, M.** (2016). The FNIP co-chaperones decelerate the Hsp90 chaperone cycle and enhance drug binding. *Nature communications*, *7*, 1-15.
- Wu, Q., Sun, C., Luo, H., Li, Y., Niu, Y., Sun, Y., Lu, Y., & Chen, S.** (2011). Transcriptome analysis of *Taxus cuspidata* needles based on 454 pyrosequencing. *Planta medica*, *77*(04), 394-400.

Wu, X., Chory, J., & Weigel, D. (2007). Combinations of WOX activities regulate tissue proliferation during *Arabidopsis* embryonic development. *Developmental Biology*, 309(2), 306-316.

X

Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., García, J. A., & Gutiérrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant molecular biology*, 39(4), 647-656.

Xu, Z. Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., Kim, D. H., Kim, S. Y., Seo, M., Bressan, R. A., Yun, D. J., & Yun, D. J. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(5), 2184-2199.

Y

Yakovlev, I. A., Fossdal, C. G., & Johnsen, Ø. (2010). MicroRNAs, the epigenetic memory and climatic adaptation in Norway spruce. *New Phytologist*, 187(4), 1154-1169.

Yan, G., MenLi, X., GuiFeng, W., LiWei, Y., & JiSen, S. (2010). Molecular characteristics and expression analysis of PmSERK1 during somatic embryogenesis in Masson pine. *Molecular Plant Breeding*, 8(1), 53-58.

Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.

Yang, X., Wang, L., Yuan, D., Lindsey, K., & Zhang, X. (2013). Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *Journal of experimental botany*, 64(6), 1521-1536.

Yang, L., Lou, Y., Peng, Z., Zhao, H., Sun, H., & Gao, Z. (2015). Molecular characterization and primary functional analysis of PeMPEC, a magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase gene of bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant cell reports*, 34(11), 2001-2011.

Yanhui, C., Xiaoyuan, Y., Kun, H., Meihua, L., Jigang, L., Zhaofeng, G., Zhiqiang, L., Yunfei, Z., Xiaoxiao, W., Xiaoming, Q., Yunping, S., Li, Z., Xiaohui, D., Jingchu, L., & Xing-Wang, D. (2006). The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant molecular biology*, 60(1), 107-124.

Yazawa, K., Takahata, K., & Kamada, H. (2004). Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(3), 215-223.

Yeung, E. C., & Meinke, D. W. (1993). Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. *The Plant Cell*, 5(10), 1371.

Young, J. C., Moarefi, I., & Hartl, F. U. (2001). Hsp90. *J Cell Biol*, 154(2), 267-274.

Yu, L., Chen, H., Sun, J., & Li, L. (2013). PtrKOR1 is required for secondary cell wall cellulose biosynthesis in *Populus*. *Tree Physiology*, *34*(11), 1289-1300.

Z

Zeng, F., Zhang, X., Zhu, L., Tu, L., Guo, X., & Nie, Y. (2006). Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and microarray. *Plant molecular biology*, *60*(2), 167-183.

Zhang, C., Timmis, R., & Hu, W. S. (1999). A neural network based pattern recognition system for somatic embryos of Douglas fir. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *56*(1), 25-35.

Zhang, J., Ma, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L., & Chen, S. (2009a). Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon—a proteomic approach. *Plant Science*, *177*(2), 103-113.

Zhang, S., Zhou, J., Han, S., Yang, W., Li, W., Wei, H., Li, X., & Qi, L. (2010). Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochemical and Biophysical Research communications*, *398*(3), 355-360.

Zhang, Y., Cao, G., Qu, L. J., & Gu, H. (2009b). Involvement of an R2R3-MYB transcription factor gene AtMYB118 in embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, *28*(3), 337-346.

Zhang, Y., Zhang, S., Han, S., Li, X., & Qi, L. (2012). Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Reports*, *31*(9), 1637-1657.

Zhang, Y., Clemens, A., Maximova, S. N., & Gultinan, M. J. (2014). The *Theobroma cacao* B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a dual role in control of embryo development and maturation. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 106.

Zhao, J., Wang, B., Wang, X., Zhang, Y., Dong, M., & Zhang, J. (2015a). iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *120*(2), 655-669.

Zhao, J., Li, H., Fu, S., Chen, B., Sun, W., Zhang, J., & Zhang, J. (2015b). An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PloS one*, *10*(3), e0119987.

Zhen, Y., Zhao, Z. Z., Zheng, R. H., & Shi, J. (2012). Proteomic analysis of early seed development in *Pinus massoniana* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *54*, 97-104.

Zhen, Y., Li, C., Chen, J., Chen, Q., & Shi, J. (2015). Proteomics of embryogenic and non-embryogenic calli of a *Liriodendron hybrid*. *Acta physiologiae plantarum*, *37*(10), 211.

- Zheng, Q., Zheng, Y., & Perry, S. E.** (2013). AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in *Arabidopsis* and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiology*, *161*(4), 2113-2127.
- Zhou, J., Qiu, J., & Ye, Z. H.** (2007). Alteration in Secondary Wall Deposition by Overexpression of the Fragile Fiber1 Kinesin-Like Protein in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(8), 1235-1243.
- Zhu, S. P., Wang, J., Ye, J. L., Zhu, A. D., Guo, W. W., & Deng, X. X.** (2014). Isolation and characterization of LEAFY COTYLEDON 1-LIKE gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *119*(1), 1-13.
- Zimmerman, J. L.** (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, *5*(10), 1411.
- Zivy, M., & de Vienne, D.** (2000). Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology*, *44*(5), 575-580.
- Zuo, J., Niu, Q. W., Ikeda, Y., & Chua, N. H.** (2002). Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(2), 173-180.

Annexe 1. Composition des milieux de culture (mg L⁻¹).

Composants	Milieu de base Glitz (Reeves <i>et al.</i> , in press)	Milieu de Prolifération (Lelu-Walter <i>et al.</i> , in press)	Milieu de Maturation (Lelu-Walter <i>et al.</i> , in press)
KNO ₃	950	950	950
MgSO ₄ .7H ₂ O	925	925	925
CaCl ₂ .2H ₂ O	11	11	11
KH ₂ PO ₄	170	170	170
NH ₄ NO ₃	825	825	825
FeSO ₄ .7H ₂ O	30	30	30
Na ₂ EDTA	40	40	40
MnSO ₄ .4H ₂ O	21	21	21
H ₃ BO ₃	31	31	31
ZnSO ₄ .7H ₂ O	43	43	43
KI	4.15	4.15	4.15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.5	0.5	0.5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.25	1.25	1.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.125	0.125	0.125
Thiamine HCl	5.0	5.0	5.0
Acide Nicotinique	5.0	5.0	5.0
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5
Myo-inositol	100	100	100
L-Glutamine	500	500	500
Hydrolysate caséine	1000	1000	1000
Maltose		30000	
Saccharose			68400 (0,2M)
2,4-D		1.0 (4.5µM)	
BA		0.5 (2.2 µM)	
ABA			15.84 (60µM)
Phytigel		4000	10000

Annexe 2. Fixation des échantillons dans les blocs de Paraffine et coloration

Annexe 2.1. Composition des milieux de déshydratation utilisés

Solution % Butanol	25%	40%	55%	70%	85%
Butanol	25	40	55	70	85
Ethanol	30	30	25	20	15
H ₂ O	45	30	20	10	—
Temps d'incubation	5h	12h	4h	4h	12h

Annexe 2.2. Température et temps d'incubation des milieux afin de retirer le butanol en solution

Conditions d'études \ Etapes	Dilution de la paraffine	Dilution de la paraffine (après ajout)	Fonte de la paraffine	Echange pour de la paraffine en solution pure liquide(x3)
Température	40°C	40°C	60°C	60°C
Temps d'incubation	24h	48h	24h	24h

Annexe 2.3. Composition des milieux de réhydratation utilisés. Les pourcentages sont exprimés en volumes du composé dans l'eau

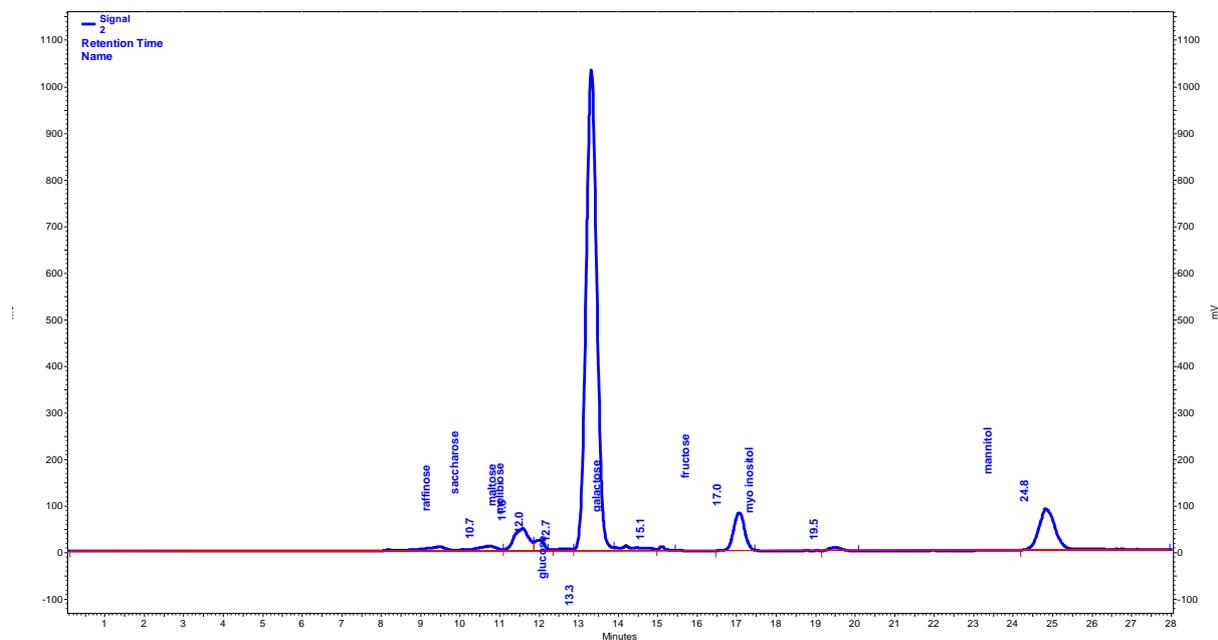
Solution \ % éthanol	100%	96%	70%	50%	30%
Ethanol 100%	100	96	70	50	30
H ₂ O	0	4	30	50	70
Temps d'incubation	3 min				

Annexe 2.4. Protocole pour la double coloration bleu alcian/« nuclear fast red »

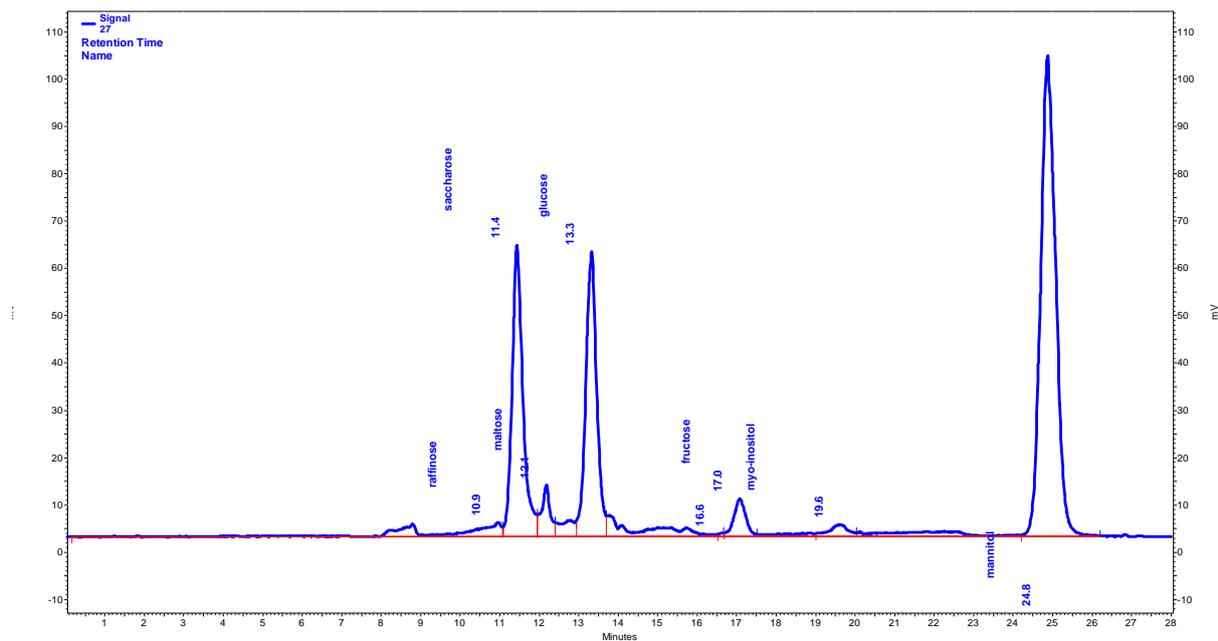
Type de coloration \ Conditions	Acide acétique	Bleu alcian (0,1% dans 3% acide acétique)	H ₂ O	Nuclear fast red (0,1% dans 3% sulfate d'ammonium)	H ₂ O
Coloration bleu alcian	10 s	15 min	5 min		
Coloration « nuclear fast red »				10 min	5 min

Annexe 3. Dosage des sucres solubles grâce à leurs profils chromatographiques des temps de rétention après HPLC

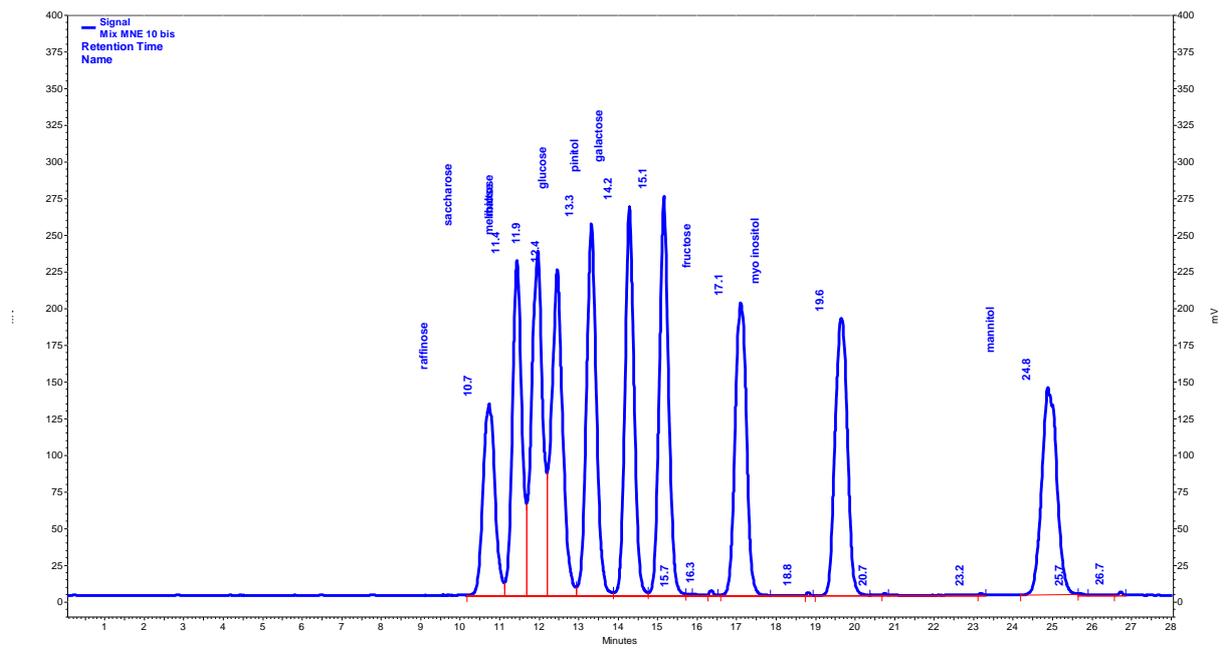
Annexe 3.1. Profil chromatographique d'un échantillon ME



Annexe 3.2. Profil chromatographique d'un échantillon NE



Annexe 3.3. Profil chromatographique du mix utilisé à partir des sucres standards.



Annexe 4. Identification des protéines et des transcrits communs entre les géotypes TD15-1, SD4-8 et TD17-1, différenciellement exprimés dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accension, ainsi que la description des gènes / protéines peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme_allgenes.transcripts.fasta). FC ME/NE Transcriptomique : ratio calculé entre les moyennes d'expression des ME et NE dans les analyses de transcriptomique ; FC ME/NE Protéomique : ratio calculé entre les moyennes d'expression des ME et NE dans les analyses de protéomique ; Nombre de GO : décompte des GO associés à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologiques, fonctions moléculaires, et composants cellulaires) ; GO Biological Process : groupe GO appartenant à la catégorie des processus biologiques à un niveau 2 ou plus.

Accession	Protéine/gène description	Espèce	Tissu	FC ME/NE Transcriptomique	FC ME/NE Protéomique	Nb GO	GO Biological Process
<i>Surexprimée dans ME</i>							
PSME_00038002-RA	UF642 I-GalL-responsive protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ME > NE	1291,44	4,17	5	root morphogenesis;response to karrikin
PSME_00000323-RA	Os09g0400100	<i>Oryza sativa</i>	ME > NE	225,06	11,56	24	regulation of transcription, DNA-templated;transport;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;tRNA threonylcarbamoyladenine modification;Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process;DNA repair;DNA recombination;small GTPase mediated signal transduction;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00013997-RA	L-ascorbate oxidase homolog	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	129,84	3,00	3	protein folding;metabolic process
PSME_00001755-RA	Protein RSI-1-like	<i>Glycine max</i>	ME > NE	109,45	5,74	4	transport;transmembrane transport
PSME_00031997-RA	Serine carboxypeptidase-like enzyme	<i>Selaginella moellendorffii</i>	ME > NE	35,11	5,28	1	
PSME_00034436-RA	Inositol-3-phosphate synthase isoform X1	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	32,89	4,85	4	protein phosphorylation
PSME_00028506-RA	Xyloglucan glycosyltransferase 5	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	15,86	2,35	3	ribosome biogenesis

PSME_00031292-RA	Vacuolar amino acid transporter 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	14,81	28,18	4	
PSME_00044624-RA	Glutelin type-A 1-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	13,96	8,33	11	regulation of transcription, DNA-templated;tRNA threonylcarbamoyladenine modification;DNA repair;DNA recombination
PSME_00052836-RA	Aspartic proteinase nepenthesin-1-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	11,96	9,04	4	microtubule-based movement
PSME_00051817-RA	Expansin-A11-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	9,92	7,18	7	tRNA aminoacylation for protein translation;tRNA aminoacylation
PSME_00046521-RA	Ribonuclease 1-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	8,99	3,45	11	potassium ion transport;oxidation-reduction process;folic acid-containing compound biosynthetic process;one-carbon metabolic process;porphyrin-containing compound biosynthetic process;siroheme biosynthetic process
PSME_00024031-RA	UF642 l-GalL-responsive protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ME > NE	8,70	5,57	15	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;DNA repair;DNA recombination;small GTPase mediated signal transduction;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00001915-RA	Thiol protease aleurain-like	<i>Populus euphratica</i>	ME > NE	8,34	7,04	6	immune response;proteolysis involved in cellular protein catabolic process
PSME_00049835-RA	Uninformative	<i>Physcomitrella patens</i>	ME > NE	8,09	5,34	1	
PSME_00002021-RA	Serine carboxypeptidase-like 45	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	7,03	8,45	7	ferrous iron transport
PSME_00002972-RA	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	6,83	11,55	3	regulation of translation
PSME_00029162-RA	12-oxophytodienoate reductase 2-like isoform X1	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	6,09	3,18	4	cobalamin biosynthetic process;glutamine metabolic process
PSME_00024734-RA	UDP-arabinopyranose mutase 1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	5,56	5,34	7	plant-type cell wall biogenesis;cellulose biosynthetic process;UDP-L-arabinose metabolic process
PSME_00034041-RA	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	5,17	2,81	5	tRNA threonylcarbamoyladenine modification;DNA repair;DNA recombination
PSME_00015316-RA	Coatomer subunit beta-1	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ME > NE	5,04	3,66	5	transmembrane transport

PSME_00011991-RA	Actin-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	4,56	6,02	1	
PSME_00040188-RA	Mitochondrial phosphate carrier protein 3, mitochondrial	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	4,43	3,56	4	transmembrane transport;smoothened signaling pathway
PSME_00003897-RA	Protein argonaute 10, partial	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	4,36	3,08	4	translation
PSME_00007485-RA	Actin	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	4,23	5,41	9	intracellular protein transport;vesicle-mediated transport;transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;mRNA catabolic process;negative regulation of bacterial-type flagellum assembly;pathogenesis
PSME_00009971-RA	Maternal effect embryo arrest 18	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	4,04	2,61	4	microtubule-based movement
PSME_00016277-RA	Ubiquinol oxidase 1a, mitochondrial-like	<i>Camelina sativa</i>	ME > NE	4,03	4,60	5	proteolysis
PSME_00001780-RA	High mobility group B protein 1-like	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	3,92	1,84	3	protein dephosphorylation
PSME_00010934-RA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP40	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	3,72	2,49	22	regulation of transcription, DNA-templated;transport;viral genome replication;nucleobase-containing compound metabolic process;tRNA threonylcarbamoyladenosine modification;DNA repair;DNA recombination;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00019416-RA	Cyprosin	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	3,71	7,85	16	oxidation-reduction process;tRNA processing;metabolic process;glutamate biosynthetic process;nitrogen compound metabolic process;porphyrin-containing compound biosynthetic process;siroheme biosynthetic process
PSME_00045450-RA	Ferredoxin-related	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	3,49	3,98	1	
PSME_00025101-RA	S-adenosylmethionine synthase 1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	3,42	2,48	6	oxidation-reduction process;fatty acid metabolic process
PSME_00021289-RA	Phosphoenolpyruvate carboxylase 4	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	3,33	9,46	1	

PSME_00029357-RA	RNA-binding protein 24-B	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	3,31	6,26	1	response to stress
PSME_00028204-RA	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	3,10	3,13	1	
PSME_00040230-RA	Delta(24)-sterol reductase	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	3,09	2,02	10	carbohydrate metabolic process;signal peptide processing;cellular glucan metabolic process
PSME_00026338-RA	Uncharacterized protein TCM_006340	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	2,99	2,34	1	
PSME_00020216-RA	ATPase 1, plasma membrane-type	<i>Camelina sativa</i>	ME > NE	2,99	2,92	1	
PSME_00018936-RA	Rhamnose biosynthetic enzyme 1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,88	3,37	10	UDP-rhamnose biosynthetic process;dTDP-rhamnose biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00005303-RA	Heat shock protein 90-1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,65	1,85	7	protein folding;response to stress
PSME_00028107-RA	UDP-glucose 6-dehydrogenase 4	<i>Musa acuminata</i>	ME > NE	2,63	2,22	3	metabolic process;tricarboxylic acid cycle
PSME_00020981-RA	Fumarate hydratase 1, mitochondrial	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,58	1,39	4	translation
PSME_00016703-RA	Ran-binding protein 1 homolog b	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,57	1,65	1	
PSME_00011989-RA	Histone deacetylase HDT2-like	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,55	2,06	3	protein phosphorylation
PSME_00002566-RA	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 4 of pyruvate dehydrogenase complex, chloroplastic	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	2,54	2,02	4	phosphorelay signal transduction system
PSME_00015395-RA	Coatomer subunit beta-1	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ME > NE	2,51	2,97	7	DNA repair;DNA recombination
PSME_00054694-RA	Inactive receptor kinase At1g48480	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,45	3,22	2	
PSME_00000781-RA	DNA gyrase subunit A	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	2,43	1,63	4	cation transport;transmembrane transport
PSME_00005435-RA	Single-stranded DNA-binding protein WHY1, chloroplastic-like isoform X2	<i>Cicer arietinum</i>	ME > NE	2,40	3,01	4	proteolysis;lipid catabolic process
PSME_00031420-RA	Protein BONZAI 1-like	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,37	1,96	0	

PSME_00055611-RA	Delta(24)-sterol reductase	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,37	1,70	2	
PSME_00007776-RA	Protein disulfide isomerase-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	2,34	1,58	1	
PSME_00016527-RA	Villin-3	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,24	1,94	3	regulation of translation
PSME_00044523-RA	Protein COBRA-like isoform X1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,23	2,79	2	metabolic process
PSME_00017712-RA	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein AIM1	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	ME > NE	2,22	2,67	4	fatty acid metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00017046-RA	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,21	2,42	2	protein deubiquitination
PSME_00021849-RA	Glycine-rich protein DOT1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,17	2,81	1	
PSME_00008228-RA	Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL6	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,12	1,81	2	chromatin assembly or disassembly
PSME_00021323-RA	Fructokinase-1	<i>Brassica napus</i>	ME > NE	2,12	3,26	7	regulation of apoptotic process;intracellular protein transport;vesicle-mediated transport;regulation of translation
PSME_00001372-RA	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	ME > NE	2,10	2,61	4	tRNA aminoacylation for protein translation
PSME_00019197-RA	Acid phosphatase 1-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	2,09	2,34	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00001927-RA	Alanine aminotransferase 2	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	2,08	13,83	5	DNA replication
PSME_00036273-RA	Putative methyltransferase 11, chloroplastic	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	2,08	2,77	0	
PSME_00037947-RA	Two-on-two hemoglobin-3	<i>Sesamum indicum</i>	ME > NE	2,08	3,49	3	oxygen transport
PSME_00022060-RA	UDP-glucuronic acid decarboxylase 6-like	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	2,05	2,50	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00009870-RA	Aspartate aminotransferase, chloroplastic	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,03	1,34	4	oxidation-reduction process
PSME_00004950-RA	Adenosine kinase 2	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	2,03	1,82	4	purine ribonucleoside salvage;AMP biosynthetic process;phosphorylation
PSME_00015545-RA	Elongation factor Tu, mitochondrial-like isoform X1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,02	1,23	1	
PSME_00005464-RA	Peroxiredoxin-2B-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	2,00	1,92	2	proteolysis

PSME_00035817-RA	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,99	3,22	4	transport;transmembrane transport
PSME_00048529-RA	Tubulin alpha chain	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,98	2,22	6	microtubule-based process
PSME_00019501-RA	Mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,97	1,51	3	protein peptidyl-prolyl isomerization;protein folding
PSME_00000157-RA	UDP-glucuronate 4-epimerase 3	<i>Brassica oleracea</i>	ME > NE	1,94	1,81	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00051470-RA	Hydroxyphenylpyruvate reductase-like, partial	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	1,94	1,55	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00037764-RA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	1,93	2,13	3	
PSME_00003087-RA	Os12g0623900	<i>Oryza sativa</i>	ME > NE	1,93	1,69	1	
PSME_00041420-RA	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 homolog 1	<i>Sesamum indicum</i>	ME > NE	1,90	1,56	2	protein folding
PSME_00017755-RA	DAG protein, chloroplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,89	1,80	1	
PSME_00010506-RA	Cathepsin B-like	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,87	2,46	2	cell communication
PSME_00056021-RA	Eukaryotic translation elongation factor, putative	<i>Ricinus communis</i>	ME > NE	1,86	1,56	23	regulation of transcription, DNA-templated;transport;viral genome replication;nucleobase-containing compound metabolic process;tRNA threonylcarbamoyladenine modification;DNA repair;DNA recombination;telomere maintenance;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00003145-RA	60S ribosomal protein L4	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,85	1,20	1	
PSME_00031028-RA	UDP-glucuronic acid decarboxylase 2-like	<i>Erythranthe guttatus</i>	ME > NE	1,85	1,77	1	
PSME_00006747-RA	60S ribosomal protein L15-1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,83	1,53	3	carbohydrate metabolic process
PSME_00015864-RA	YTH domain-containing family protein 1 isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,79	2,32	0	
PSME_00049017-RA	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase 1	<i>Beta vulgaris</i>	ME > NE	1,78	1,74	3	pteridine-containing compound metabolic process;folic acid-containing compound biosynthetic process

PSME_00034626-RA	Methyltransferase PMT17 isoform X1	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	1,78	2,51	6	oxidation-reduction process
PSME_00048393-RA	TRNA pseudouridine synthase A, mitochondrial-like	<i>Sesamum indicum</i>	ME > NE	1,77	3,49	2	metal ion transport
PSME_00039428-RA	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 53	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,76	1,74	1	
PSME_00029161-RA	DNA repair protein recA homolog 3, mitochondrial isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,76	1,98	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00022639-RA	Tubulin beta-1 chain	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ME > NE	1,75	2,01	6	microtubule-based process
PSME_00000575-RA	Anthranilate synthase alpha subunit 2, chloroplastic isoform X2	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,74	1,34	2	
PSME_00048815-RA	DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 3	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,72	1,51	2	metabolic process
PSME_00031559-RA	Methyltransferase PMT21	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,71	3,30	7	photosynthesis;drug transmembrane transport;transmembrane transport
PSME_00013554-RA	4-alpha-glucanotransferase DPE2 isoform X2	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	1,70	2,61	4	metabolic process;carbohydrate metabolic process;lipid glycosylation
PSME_00015642-RA	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,70	1,43	4	translation
PSME_00000620-RA	Aldehyde dehydrogenase	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,70	1,53	4	regulation of transcription, DNA-templated;autophagy
PSME_00032936-RA	DDT domain-containing protein DDB_G0282237-like	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,68	2,01	0	
PSME_00026301-RA	Leucine-rich repeat extensin-like protein 4	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	1,68	2,03	5	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00010571-RA	Tubulin alpha chain	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,68	1,45	2	
PSME_00033903-RA	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,67	2,10	3	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00033216-RA	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	<i>Arabidopsis lyrata</i>	ME > NE	1,66	2,50	1	
PSME_00032374-RA	UDP-D-apiiose/UDP-D-xylose synthase 2	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,66	1,55	13	transport;viral genome replication;DNA repair;DNA recombination
PSME_00040415-RA	ATP-dependent RNA helicase-like protein DB10	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,65	2,54	4	oxidation-reduction process;potassium ion transport
PSME_00005856-RA	60S ribosomal protein L8	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,62	1,99	4	cytoplasmic translation

PSME_00035171-RA	UMP/CMP kinase 3 isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,61	1,55	7	transport;transmembrane transport;protein import into mitochondrial matrix;amino acid transmembrane transport
PSME_00030199-RA	Os06g0602600	<i>Oryza sativa</i>	ME > NE	1,61	1,80	1	
PSME_00019786-RA	Elongation factor 1-gamma	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,60	1,48	1	
PSME_00007345-RA	Transmembrane 9 superfamily member 7	<i>Sesamum indicum</i>	ME > NE	1,59	4,33	3	DNA catabolic process
PSME_00007502-RA	Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha isoform X1	<i>Fragaria vesca</i>	ME > NE	1,59	2,43	1	
PSME_00009333-RA	UBP1-associated protein 2B-like	<i>Jatropha curcas</i>	ME > NE	1,58	1,95	1	
PSME_00041149-RA	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	ME > NE	1,57	2,66	2	
PSME_00011513-RA	Polyadenylate-binding protein 2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,57	1,73	7	metabolic process;regulation of transcription, DNA-templated;carbohydrate metabolic process;lipid glycosylation
PSME_00012153-RA	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,57	1,51	5	fatty acid beta-oxidation
PSME_00006308-RA	Nuclear cap-binding protein subunit 1	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	1,56	1,72	5	coenzyme A metabolic process;oxidation-reduction process;positive regulation of stomatal complex development
PSME_00033735-RA	Serine carboxypeptidase-like 27	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,54	2,98	4	translation
PSME_00018601-RA	40S ribosomal protein S25-2-like	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	1,53	1,58	2	
PSME_00032134-RA	Prolyl 4-hydroxylase 6	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,53	2,22	5	
PSME_00006929-RA	Ras-related protein RABD1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,53	1,41	8	ER to Golgi vesicle-mediated transport;small GTPase mediated signal transduction
PSME_00045612-RA	ABC transporter F family member 4-like	<i>Gossypium raimondii</i>	ME > NE	1,51	1,86	5	oxidation-reduction process
PSME_00046007-RA	Alpha-1,4-glucan-protein synthase	<i>UDP-forming</i>	ME > NE	1,50	1,44	8	plant-type cell wall biogenesis;cellulose biosynthetic process;UDP-L-arabinose metabolic process
PSME_00015064-RA	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	1,49	2,76	2	
PSME_00022884-RA	Binding isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	1,49	2,23	4	translation
PSME_00002235-RA	RNA-binding protein Nova-1 isoform X2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,49	1,38	2	mature ribosome assembly

PSME_00003124-RA	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,48	1,42	8	intracellular protein transport;vesicle-mediated transport;tryptophan catabolic process to kynurenine
PSME_00032525-RA	Histone-arginine methyltransferase 1.3	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,48	1,86	2	protein methylation
PSME_00011787-RA	YTH domain-containing family protein 2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,48	1,92	0	
PSME_00000641-RA	Uncharacterized protein L484_007981	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	1,47	1,51	1	metabolic process
PSME_00015181-RA	Glutamate synthase 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,47	2,54	1	
PSME_00021353-RA	Apyrase 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,46	2,33	4	
PSME_00053040-RA	60S ribosomal L12-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	1,46	1,35	5	ribosomal large subunit assembly;translation
PSME_00022879-RA	Myosin heavy chain, skeletal muscle	<i>Solanum lycopersicum</i>	ME > NE	1,45	2,42	5	proteasome localization;ubiquitin-dependent catabolism of misfolded proteins by nucleus-associated proteasome
PSME_00013135-RA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A-like	<i>Setaria italica</i>	ME > NE	1,43	1,48	7	amine metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00026346-RA	Os02g0831900	<i>Oryza sativa</i>	ME > NE	1,42	2,61	3	signal transduction
PSME_00018456-RA	T-complex protein 1 subunit beta	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,41	1,29	2	cellulose biosynthetic process
PSME_00012693-RA	Putative proline--tRNA ligase C19C7.06	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,41	1,75	1	
PSME_00002579-RA	Protein transport protein sec24	<i>Beta vulgaris</i>	ME > NE	1,41	2,69	8	cellular aromatic compound metabolic process;selenocysteine incorporation
PSME_00004177-RA	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	1,41	1,42	16	Golgi organization;pollen development;ATP hydrolysis coupled proton transport;ATP metabolic process
PSME_00013038-RA	66 kDa stress protein isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,41	2,53	2	
PSME_00000080-RA	Pre-mRNA-processing protein 40A	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,40	1,57	0	
PSME_00020105-RA	Dynamamin-related protein 5A	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,39	1,62	2	metabolic process
PSME_00012694-RA	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase-like isoform X2	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	1,39	1,42	5	prolyl-tRNA aminoacylation

PSME_00009588-RA	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 4-like isoform X2	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,37	1,91	1	
PSME_00006153-RA	Transmembrane 9 superfamily member 4-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,37	2,03	1	
PSME_00033520-RA	Calcium-transporting ATPase 1, plasma membrane-type	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,36	1,44	7	transmembrane transport;phospholipid biosynthetic process;transport
PSME_00019330-RA	Reticulon-like protein B1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,36	1,46	2	
PSME_00028857-RA	Soluble inorganic pyrophosphatase	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	1,36	2,01	4	phosphate-containing compound metabolic process
PSME_00022970-RA	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,34	1,71	3	cellulose biosynthetic process
PSME_00033280-RA	Importin alpha, putative	<i>Ricinus communis</i>	ME > NE	1,34	2,09	6	NLS-bearing protein import into nucleus
PSME_00006219-RA	4-coumarate--CoA ligase-like 7	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,34	3,79	4	regulation of transcription, DNA-templated;response to hormone
PSME_00000585-RA	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	<i>Fragaria vesca</i>	ME > NE	1,34	2,42	7	proline biosynthetic process;phosphorylation;oxidation-reduction process
PSME_00055366-RA	Glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible protein isoform X1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,33	1,55	4	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00000131-RA	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,33	1,69	3	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00005757-RA	3-ketoacyl-CoA reductase 1 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	1,32	1,69	3	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00002297-RA	Enolase 1-like	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,30	1,75	3	
PSME_00025010-RA	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>Musa acuminata</i>	ME > NE	1,30	1,52	5	regulation of transcription, DNA-templated;cell cycle
PSME_00006922-RA	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit-like isoform X2	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,29	1,82	2	
PSME_00011005-RA	Importin beta-like SAD2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,27	1,57	1	
PSME_00023023-RA	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,27	1,26	2	transport
PSME_00009309-RA	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 7	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,26	3,04	4	oxidation-reduction process

PSME_00033866-RA	Transmembrane nine 7 isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	1,25	1,74	1	lipid metabolic process
PSME_00003206-RA	Pre-mRNA-processing factor 39	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,21	1,21	1	RNA processing
PSME_00018930-RA	Mitochondrial Rho GTPase 1-like isoform X1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,19	1,51	2	exocytosis
PSME_00003708-RA	Far upstream element-binding protein 1-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,11	4,77	1	
<i>Sousexprimée dans ME</i>							
PSME_00010789-RA	Signal recognition particle receptor subunit alpha	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,85	0,51	15	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;rRNA processing;intracellular protein transport;response to copper ion
PSME_00048866-RA	Aminoacylase-1 isoform X2	<i>Vitis vinifera</i>	NE > ME	0,82	0,62	2	metabolic process
PSME_00007962-RA	Glycerate dehydrogenase isoform X2	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,81	0,65	8	oxidation-reduction process;metabolic process;fatty acid metabolic process
PSME_00036537-RA	Probable ribose-5-phosphate isomerase 3, chloroplastic	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,80	0,62	3	pentose-phosphate shunt, non-oxidative branch
PSME_00039185-RA	Calcium-dependent protein kinase 3	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,74	0,68	9	protein phosphorylation;signal transduction
PSME_00047891-RA	Isopentenyl diphosphate isomerase	<i>Solanum lycopersicum</i>	NE > ME	0,72	0,74	6	DNA-templated transcription, initiation;regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00022324-RA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1, chloroplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,72	0,50	6	metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00045033-RA	Tubulin alpha-3 chain-like	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,71	0,49	1	
PSME_00017679-RA	Protein SGT1 homolog	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,71	0,65	1	
PSME_00011992-RA	Transmembrane protein, putative	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,68	0,46	2	
PSME_00000513-RA	Protein DJ-1 homolog D-like isoform X2	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,67	0,55	9	proteolysis;vitamin B6 biosynthetic process;pyridoxal phosphate biosynthetic process;cobalamin biosynthetic process;glutamine metabolic process
PSME_00005541-RA	14-3-3-like protein D	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,66	0,80	3	bacterial-type flagellum organization
PSME_00033948-RA	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,64	0,53	2	trehalose biosynthetic process

PSME_00017291-RA	Formate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,64	0,36	5	metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00004229-RA	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1, chloroplastic/mitochondrial-like	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,64	0,47	3	metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00029904-RA	Bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase-like	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,64	0,50	2	biosynthetic process
PSME_00013947-RA	Hsp70-Hsp90 organizing protein 3	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,62	0,64	8	protein targeting;intracellular protein transport;protein import into mitochondrial outer membrane;meiotic cell cycle
PSME_00006584-RA	Dihydropyrimidine dehydrogenase	<i>NADP(+)</i>	NE > ME	0,62	0,66	6	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00008845-RA	Elongation factor 1-gamma 2-like	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,62	0,54	3	translational elongation
PSME_00017173-RA	Probable aldo-keto reductase 1	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,61	0,59	2	oxidation-reduction process
PSME_00031819-RA	Glutathione S-transferase omega-like 2	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,58	0,60	1	
PSME_00048700-RA	Os12g0468600	<i>Oryza sativa</i>	NE > ME	0,58	0,21	1	
PSME_00005257-RA	Heme oxygenase 1, chloroplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,58	0,33	3	heme oxidation;oxidation-reduction process
PSME_00031175-RA	Dihydropyrimidinase	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	NE > ME	0,57	0,42	2	
PSME_00000168-RA	Villin-3	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,57	0,54	2	actin filament bundle assembly
PSME_00023357-RA	2-hydroxyacyl-CoA lyase	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,54	0,50	4	methanogenesis, from acetate
PSME_00029325-RA	Strictosidine synthase 1-like	<i>Tarenaya hassleriana</i>	NE > ME	0,53	0,60	4	biosynthetic process
PSME_00021883-RA	Probable aldo-keto reductase 4	<i>Vitis vinifera</i>	NE > ME	0,51	0,62	12	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;response to sucrose;response to cadmium ion;oxidation-reduction process;sucrose induced translational repression
PSME_00028884-RA	Heat shock 70 kDa protein 8	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,50	0,31	2	

PSME_00004775-RA	Peptide methionine sulfoxide reductase A1-like	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,50	0,53	8	translation;oxidation-reduction process;mismatch repair
PSME_00031787-RA	Bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase, chloroplastic isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,50	0,57	5	oxidation-reduction process
PSME_00006791-RA	Non-symbiotic hemoglobin, putative	<i>Ricinus communis</i>	NE > ME	0,50	0,52	2	
PSME_00053512-RA	3-oxo-Delta(4,5)-steroid 5-beta-reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,50	0,44	2	
PSME_00026577-RA	S-adenosylmethionine synthase 2	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,49	0,31	12	S-adenosylmethionine biosynthetic process;cell adhesion;transposition, DNA-mediated;galactitol metabolic process;nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay
PSME_00041230-RA	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 2	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,48	0,27	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00009571-RA	Alpha-L-arabinofuranosidase 1	<i>Fragaria vesca</i>	NE > ME	0,48	0,28	3	L-arabinose metabolic process
PSME_00003232-RA	Isoflavone reductase-like protein	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,48	0,48	10	oxidation-reduction process;steroid biosynthetic process
PSME_00047906-RA	Ferredoxin--NADP reductase, putative	<i>Ricinus communis</i>	NE > ME	0,47	0,38	2	oxidation-reduction process
PSME_00017765-RA	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase, peroxisomal isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,47	0,35	6	metabolic process;proteolysis
PSME_00056370-RA	Esterase/lipase/thioesterase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	NE > ME	0,46	0,55	3	proteolysis
PSME_00004400-RA	Expansin-like A1	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,45	0,51	4	
PSME_00049348-RA	TolB protein-related isoform 2, partial	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,44	0,28	2	proteolysis
PSME_00050927-RA	Pathogenesis-related protein bet V I family protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,42	0,18	2	defense response;response to biotic stimulus
PSME_00013240-RA	NADP-dependent malic enzyme	<i>Cucumis sativus</i>	NE > ME	0,42	0,45	3	oxidation-reduction process
PSME_00009881-RA	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,41	0,44	4	glucose metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00033307-RA	Serine carboxypeptidase-like 35	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,41	0,31	2	proteolysis

PSME_00007495-RA	Bifunctional epoxide hydrolase 2	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,41	0,46	6	proteolysis;cation transport
PSME_00053283-RA	Os06g0726100	<i>Oryza sativa</i>	NE > ME	0,41	0,33	4	chitin catabolic process;cell wall macromolecule catabolic process
PSME_00020743-RA	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase 2	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,40	0,27	1	
PSME_00038357-RA	Peroxidase 55-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,39	0,26	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00032826-RA	Nitrilase/nitrile hydratase NIT4A-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,39	0,09	2	nitrogen compound metabolic process
PSME_00045047-RA	Protein YLS2-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,39	0,51	3	biosynthetic process
PSME_00008314-RA	Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 51	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,38	0,25	4	cell wall modification
PSME_00009882-RA	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,38	0,27	4	glucose metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00055205-RA	Probable glutathione S-transferase GSTU6-like	<i>Oryza brachyantha</i>	NE > ME	0,37	0,36	1	
PSME_00046317-RA	Uncharacterized protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,36	0,11	0	
PSME_00037425-RA	Transaldolase-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,35	0,24	1	carbohydrate metabolic process
PSME_00012089-RA	Phospholipase D alpha 1-like	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,35	0,30	2	
PSME_00031401-RA	Probable quinone oxidoreductase	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	NE > ME	0,35	0,39	1	oxidation-reduction process
PSME_00038261-RA	Peroxidase 12	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,35	0,26	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00026496-RA	Uncharacterized protein isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,34	0,15	3	gluconeogenesis
PSME_00001217-RA	Putative formamidase C869.04 isoform X4	<i>Elaeis guineensis</i>	NE > ME	0,33	0,17	1	
PSME_00046623-RA	12-oxophytodienoate reductase 7	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,33	0,26	3	oxidation-reduction process
PSME_00032965-RA	Protease Do-like 7 isoform X2	<i>Fragaria vesca</i>	NE > ME	0,33	0,20	10	proteolysis;viral process;viral protein processing
PSME_00023819-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII-like	<i>Setaria italica</i>	NE > ME	0,33	0,19	3	carbohydrate metabolic process;response to stress

PSME_00000477-RA	Chaperone protein ClpB1	<i>Elaeis guineensis</i>	NE > ME	0,32	0,22	26	regulation of transcription, DNA-templated;transport;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;tRNA threonylcarbamoyladenine modification;protein metabolic process;autophagy;DNA repair;DNA recombination;cell adhesion;attachment of spindle microtubules to kinetochore;small GTPase mediated signal transduction;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00012777-RA	Ferredoxin--nitrite reductase	<i>Morus notabilis</i>	NE > ME	0,32	0,20	4	oxidation-reduction process
PSME_00002336-RA	L-ascorbate peroxidase 2	<i>Morus notabilis</i>	NE > ME	0,31	0,37	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00002089-RA	Heat shock protein 83-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,31	0,34	4	protein folding;response to stress
PSME_00034975-RA	Enhanced disease susceptibility protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,29	0,44	3	lipid metabolic process;metabolic process
PSME_00043872-RA	LOW QUALITY PROTEIN: phospholipase A1-IIdelta	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,29	0,13	2	lipid metabolic process
PSME_00000594-RA	Putative 4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 2	<i>Tarenaya hassleriana</i>	NE > ME	0,29	0,26	8	methylation;negative regulation of catalytic activity;regulation of RNA metabolic process
PSME_00003878-RA	Sucrose synthase 3-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,29	0,28	2	sucrose metabolic process
PSME_00000476-RA	ATP-dependent chaperone ClpB	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,29	0,16	22	regulation of transcription, DNA-templated;transport;SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane;tRNA threonylcarbamoyladenine modification;protein metabolic process;autophagy;DNA repair;DNA recombination;cell adhesion;small GTPase mediated signal transduction
PSME_00030113-RA	Peroxidase 12	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,28	0,15	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00026375-RA	Protein disulfide oxidoreductase, putative	<i>Ricinus communis</i>	NE > ME	0,26	0,16	1	
PSME_00025197-RA	Protein notum homolog	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,26	0,17	1	

PSME_00021218-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,26	0,13	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00016087-RA	Thaumatococcus-like protein	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,26	0,17	3	proteolysis;viral process
PSME_00003877-RA	Sucrose synthase 2	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,25	0,37	2	sucrose metabolic process
PSME_00003908-RA	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,25	0,30	4	regulation of transcription, DNA-templated;oxidation-reduction process
PSME_00048674-RA	Cysteine-rich repeat secretory protein 15	<i>Vitis vinifera</i>	NE > ME	0,24	0,20	1	
PSME_00013623-RA	Peroxidase 56-like, partial	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,24	0,19	13	response to oxidative stress;oxidation-reduction process;NAD biosynthetic process;photosynthesis;tachykinin receptor signaling pathway;protein splicing
PSME_00016643-RA	8-hydroxygeraniol dehydrogenase-like	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,24	0,56	13	oxidation-reduction process;regulation of cell growth;fatty acid metabolic process;porphyrin-containing compound biosynthetic process;siroheme biosynthetic process
PSME_00032578-RA	Cinnamoyl-CoA reductase 1-like	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,24	0,24	8	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process;electron transport chain
PSME_00021228-RA	Anthocyanidin reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,24	0,19	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00026579-RA	S-adenosylmethionine synthase 5	<i>Fragaria vesca</i>	NE > ME	0,21	0,15	5	S-adenosylmethionine biosynthetic process;transposition, DNA-mediated
PSME_00054279-RA	Pathogenesis-related protein PR-4-like	<i>Prunus mume</i>	NE > ME	0,21	0,14	3	defense response to bacterium;defense response to fungus
PSME_00042587-RA	2-alkenal reductase (NADP(+)-dependent)-like	<i>Eucalyptus grandis</i>	NE > ME	0,20	0,09	1	oxidation-reduction process
PSME_00039380-RA	Protein HOTHEAD-like isoform X1	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,20	0,06	4	oxidation-reduction process
PSME_00031225-RA	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	NE > ME	0,19	0,16	3	metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00001199-RA	Anamorsin homolog	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,18	0,09	5	iron-sulfur cluster assembly;metabolic process
PSME_00019983-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform-like	<i>Setaria italica</i>	NE > ME	0,18	0,07	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00046128-RA	Anthocyanidin reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,18	0,16	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process

PSME_00016232-RA	Endoglucanase 23-like	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,17	0,06	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00039937-RA	Cytochrome P450 76C1	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,17	0,09	4	oxidation-reduction process
PSME_00047109-RA	Cytokinin dehydrogenase 6-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,17	0,32	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00055512-RA	Fibrous sheath CABYR-binding protein-like isoform X2	<i>Lingula anatina</i>	NE > ME	0,17	0,03	2	
PSME_00036731-RA	Purple acid phosphatase 4-like	<i>Oryza brachyantha</i>	NE > ME	0,16	0,16	1	
PSME_00031912-RA	Bifunctional L-3-cyanoalanine synthase/cysteine synthase 2, mitochondrial isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,16	0,32	12	cysteine biosynthetic process from serine;immune response;cellular amino acid biosynthetic process;cyanide catabolic process;root hair cell development
PSME_00047559-RA	Cationic peroxidase 1-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,16	0,17	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00001072-RA	Alcohol dehydrogenase-like	<i>Glycine max</i>	NE > ME	0,15	0,26	5	oxidation-reduction process;potassium ion transport
PSME_00043968-RA	Pectinesterase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,15	0,06	4	cell wall modification
PSME_00032232-RA	Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase	<i>Arabidopsis lyrata</i>	NE > ME	0,14	0,18	6	oxidation-reduction process;regulation of cell growth;potassium ion transport
PSME_00055424-RA	Fruit protein pKIWI501-like	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,14	0,24	0	
PSME_00035677-RA	Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4 isoform X2	<i>Cucumis melo</i>	NE > ME	0,14	0,15	3	metabolic process;oxidation-reduction process
PSME_00010853-RA	CO(2)-response secreted protease	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,14	0,13	2	proteolysis
PSME_00048140-RA	Peroxidase 12-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,14	0,61	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00010711-RA	Glutathione S-transferase F10-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,13	0,15	1	
PSME_00013602-RA	Probable chalcone--flavonone isomerase 3	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,13	0,20	1	
PSME_00007384-RA	Dihydroflavonol-4-reductase-like	<i>Elaeis guineensis</i>	NE > ME	0,13	0,34	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00043969-RA	Pectinesterase-like	<i>Malus domestica</i>	NE > ME	0,13	0,05	4	cell wall modification

PSME_00047423-RA	Auxin-repressed 12.5 kDa protein-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,13	0,18	0	
PSME_00013360-RA	Endoglucanase 3-like isoform X1	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,13	0,19	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00038196-RA	Fibrous sheath CABYR-binding protein-like isoform X2	<i>Lingula anatina</i>	NE > ME	0,13	0,07	4	phosphorelay signal transduction system;movement of cell or subcellular component
PSME_00016462-RA	Peroxidase 72-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,13	0,13	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00055640-RA	Protein TORNADO 2	<i>Vitis vinifera</i>	NE > ME	0,13	0,06	4	lipid metabolic process;ion transport
PSME_00033245-RA	Dihydroflavonol-4-reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,12	0,09	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00042511-RA	Thioredoxin	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,12	0,10	1	cell redox homeostasis
PSME_00044462-RA	CO(2)-response secreted protease	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,12	0,28	2	proteolysis
PSME_00005252-RA	Subtilisin-like protease	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,12	0,13	2	proteolysis
PSME_00008870-RA	Allene oxide synthase, chloroplastic-like	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,11	0,07	4	oxidation-reduction process
PSME_00020299-RA	Glutathione S-transferase, amino-terminal domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,11	0,25	1	
PSME_00024224-RA	2-methylene-furan-3-one reductase-like	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,11	0,18	14	oxidation-reduction process;RNA-protein covalent cross-linking
PSME_00008869-RA	Linoleate 9S-lipoxygenase 5, chloroplastic-like	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,10	0,08	4	oxidation-reduction process
PSME_00016025-RA	Peroxidase 12	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,10	0,08	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00023147-RA	Beta-D-xylosidase 1-like	<i>Cucumis sativus</i>	NE > ME	0,09	0,20	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00037344-RA	17.6 kDa class I heat shock protein-like	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,09	0,11	0	
PSME_00046703-RA	Probable protein Pop3-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,08	0,05	5	microtubule cytoskeleton organization;microtubule nucleation
PSME_00005056-RA	CO(2)-response secreted protease	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,08	0,18	2	proteolysis

Annexe 5. Identification des transcrits différentiellement exprimés dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accèsion, ainsi que la description des gènes/protéines peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq : (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme.allgenes.transcripts.fasta).

L'ensemble de la liste peut être retrouvé sur cette base de données (<https://>) regroupant les 9691 transcrits différentiellement exprimés entre ME (4472 transcrits) et NE (5219) au sein des 3 génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Le FC (fold change) représente le ratio calculé entre les moyennes d'expression des ME et NE dans les analyses de transcriptomique ; le nombre de GO est le décompte des GO associé à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologiques, fonctions moléculaires, et composants cellulaires) ; la colonne GO Biological Process représente les groupes GO appartenant à la catégorie des processus biologiques à un niveau 2 ou plus.

Annexe 6. Identification des protéines et des transcrits discutés dans le Chapitre 2, différemment exprimés dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accension, ainsi que la description des gènes/protéines peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme.allgenes.transcripts.fasta). FC ME/NE Transcriptomique : ratio calculé entre les moyennes d'expression des ME et NE dans les analyses de transcriptomique ; FC ME/NE Protéomique : ratio calculé entre les moyennes d'expression des ME et NE dans les analyses de protéomique ; Nombre de GO : décompte des GO associés à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologiques, fonctions moléculaires, et composants cellulaires) ; GO Biological Process : groupe GO appartenant à la catégorie des processus biologiques à un niveau 2 ou plus.

Accession	Protéine/gène description	Espèce	Tissu	FC ME/NE Transcriptomique	FC ME/NE Protéomique	Nombre GO	GO Biological Process
<i>Surexprimée dans ME</i>							
PSME_00019221-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like isoform X1	<i>Fragaria vesca</i>	ME > NE	3597,12	--	2	
PSME_00027748-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2155,77	--	6	secondary metabolite biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00027747-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	2111,28	--	4	oxidation-reduction process
PSME_00001422-RA	B3 domain-containing transcription factor ABI3	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1823,71	--	5	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;response to hormone
PSME_00027745-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1256,47	--	5	histone deacetylation
PSME_00021865-RA	Late embryogenesis abundant protein B19.1A	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	668,21	--	1	
PSME_00053977-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	625,08	--	2	cytoskeleton organization
PSME_00026945-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like isoform X2	<i>Fragaria vesca</i>	ME > NE	607,60	--	3	transmembrane transport
PSME_00043254-RA	Late embryogenesis abundant (LEA)-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	287,69	--	2	DNA-templated transcription, initiation
PSME_00052079-RA	Late embryogenesis abundant protein 2	<i>Cicer arietinum</i>	ME > NE	249,91	--	3	protein peptidyl-prolyl isomerization;protein folding
PSME_00019263-RA	Late embryogenesis abundant protein Dc3	<i>Sesamum indicum</i>	ME > NE	235,82	--		
PSME_00046132-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	119,60	--	7	intracellular protein transport;ER to Golgi vesicle-mediated transport;positive regulation

PSME_00005955-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	116,49	--	6	of transcription, DNA-templated;regulation of bacterial-type flagellum assembly
PSME_00027081-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like	<i>Glycine max</i>	ME > NE	111,39	--	4	secondary metabolite biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00051496-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	91,18	--	1	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00026963-RA	Late embryogenesis abundant (LEA) protein-related	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	58,80	--	2	bacteriocin immunity
PSME_00008685-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like	<i>Populus euphratica</i>	ME > NE	45,52	--	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00024538-RA	Cytochrome P450 78A7-like	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	45,37	--	2	
PSME_00014182-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like isoform X2	<i>Gossypium raimondii</i>	ME > NE	30,06	--		
PSME_00052395-RA	Nuclear transcription factor Y subunit A-10-like isoform X1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	25,61	--		
PSME_00017961-RA	WUSCHEL related homeobox 2, putative	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	23,80	--	8	positive regulation of cell proliferation;longitudinal axis specification;apical cell fate commitment;cotyledon development;response to karrikin;cotyledon boundary formation
PSME_00007097-RA	Nuclear transcription factor Y subunit C-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ME > NE	22,79	--	7	transcription, DNA-templated;positive regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00014180-RA	WUSCHEL-related homeobox 9-like isoform X1	<i>Gossypium raimondii</i>	ME > NE	17,17	--	1	
PSME_00017726-RA	WUSCHEL-related homeobox 2-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	17,11	--	9	positive regulation of cell proliferation;longitudinal axis specification;apical cell fate commitment;cotyledon development;response to karrikin;cotyledon boundary formation
PSME_00003008-RA	Nuclear transcription factor Y subunit B-3	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	17,01	--	4	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00037188-RA	AP2-like ethylene-responsive transcription factor BBM1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	16,95	--	6	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;multicellular organism development

PSME_00000045-RA	WUSCHEL-related homeobox 8	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	15,17	--	3	cell wall modification
PSME_00037187-RA	AP2-like ethylene-responsive transcription factor BBM1	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	13,40	--	6	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;multicellular organism development
PSME_00028368-RA	Nuclear transcription factor Y subunit A-7 isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	10,09	--	4	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00051817-RA	Expansin-A11-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	9,92	7,18	7	tRNA aminoacylation for protein translation;tRNA aminoacylation
PSME_00001246-RA	Nuclear transcription factor Y subunit A-3 isoform X1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	8,35	--	4	protein phosphorylation
PSME_00043053-RA	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At1g16060	<i>Pyrus x</i>	ME > NE	7,77	--	2	biosynthetic process
PSME_00027076-RA	Nuclear transcription factor Y subunit A-1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	7,48	--	6	microtubule-based movement;autophagy;Golgi organization
PSME_00052725-RA	Late embryogenesis abundant D-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	7,38	--	4	photosynthesis
PSME_00054207-RA	Late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related, putative	<i>Theobroma cacao</i>	ME > NE	7,29	--	3	tricarboxylic acid cycle;carbon fixation
PSME_00054299-RA	Late embryogenesis abundant protein Lea5-D	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	7,14	--	1	
PSME_00027077-RA	Nuclear transcription factor Y subunit A-1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	5,83	--	4	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00038561-RA	Phosphoglycerate kinase	<i>Micromonas sp.</i>	ME > NE	5,18	--	4	translation
PSME_00013055-RA	Late embryogenesis abundant D-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	4,85	--		
PSME_00011991-RA	Actin-like	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	4,56	6,02	1	
PSME_00007485-RA	Actin	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	4,23	5,41	9	intracellular protein transport;vesicle-mediated transport;transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;mRNA catabolic process;negative regulation of bacterial-type flagellum assembly;pathogenesis
PSME_00021289-RA	Phosphoenolpyruvate carboxylase 4	<i>Phoenix dactylifera</i>	ME > NE	3,33	9,46	1	

PSME_00027655-RA	AP2-like ethylene-responsive transcription factor BBM2	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	3,27	--	1	
PSME_00005303-RA	Heat shock protein 90-1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,65	1,85	7	protein folding;response to stress
PSME_00047705-RA	Somatic embryogenesis receptor kinase 1	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,61	--	3	cell redox homeostasis
PSME_00020981-RA	Fumarate hydratase 1, mitochondrial	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,58	1,39	4	translation
PSME_00054032-RA	Nuclear transcription factor Y subunit C-3	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	2,53	--	8	oxidation-reduction process;tRNA processing;fatty acid metabolic process
PSME_00044036-RA	Late embryogenesis abundant protein Lea5	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	2,33	--	1	
PSME_00017046-RA	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,21	2,42	2	protein deubiquitination
PSME_00056758-RA	Nuclear transcription factor Y subunit C-2-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	2,16	--	3	intracellular protein transport;vesicle-mediated transport
PSME_00004950-RA	Adenosine kinase 2	<i>Morus notabilis</i>	ME > NE	2,03	1,82	4	purine ribonucleoside salvage;AMP biosynthetic process;phosphorylation
PSME_00015545-RA	Elongation factor Tu, mitochondrial-like isoform X1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	2,02	1,23	1	
PSME_00048529-RA	Tubulin alpha chain	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,98	2,22	6	microtubule-based process
PSME_00019437-RA	Pyruvate kinase, cytosolic isozyme-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,97	--	3	methionine biosynthetic process
PSME_00056021-RA	Eukaryotic translation elongation factor, putative	<i>Ricinus communis</i>	ME > NE	1,86	1,56	23	regulation of transcription, DNA-templated;transport;viral genome replication;nucleobase-containing compound metabolic process;tRNA threonylcarbamoyladenosine modification;DNA repair;DNA recombination;telomere maintenance;cellular biogenic amine metabolic process
PSME_00003145-RA	60S ribosomal protein L4	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,85	1,20	1	
PSME_00006747-RA	60S ribosomal protein L15-1	<i>Elaeis guineensis</i>	ME > NE	1,83	1,53	3	carbohydrate metabolic process

PSME_00019344-RA	Nuclear transcription factor Y subunit C-2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,82	--	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00022639-RA	Tubulin beta-1 chain	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	ME > NE	1,75	2,01	6	microtubule-based process
PSME_00048815-RA	DNA-directed RNA polymerases II, IV and V subunit 3	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,72	1,51	2	metabolic process
PSME_00010571-RA	Tubulin alpha chain	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,68	1,45	2	
PSME_00033903-RA	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,67	2,10	3	regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00005856-RA	60S ribosomal protein L8	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,62	1,99	4	cytoplasmic translation
PSME_00019786-RA	Elongation factor 1-gamma	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,60	1,48	1	
PSME_00018601-RA	40S ribosomal protein S25-2-like	<i>Cucumis melo</i>	ME > NE	1,53	1,58	2	
PSME_00046007-RA	Alpha-1,4-glucan-protein synthase	<i>UDP-forming</i>	ME > NE	1,50	1,44	8	plant-type cell wall biogenesis;cellulose biosynthetic process;UDP-L-arabinose metabolic process
PSME_00027672-RA	Late embryogenesis abundant (LEA)-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	1,47	--	3	receptor-mediated endocytosis
PSME_00053040-RA	60S ribosomal L12-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	ME > NE	1,46	1,35	5	ribosomal large subunit assembly;translation
PSME_00012693-RA	Putative proline--tRNA ligase C19C7.06	<i>Nelumbo nucifera</i>	ME > NE	1,41	1,75	1	
PSME_00012694-RA	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase-like isoform X2	<i>Citrus sinensis</i>	ME > NE	1,39	1,42	5	prolyl-tRNA aminoacylation
PSME_00033280-RA	Importin alpha, putative	<i>Ricinus communis</i>	ME > NE	1,34	2,09	6	NLS-bearing protein import into nucleus
PSME_00002297-RA	Enolase 1-like	<i>Eucalyptus grandis</i>	ME > NE	1,30	1,75	3	
PSME_00025010-RA	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>Musa acuminata</i>	ME > NE	1,30	1,52	5	regulation of transcription, DNA-templated;cell cycle
PSME_00011005-RA	Importin beta-like SAD2	<i>Amborella trichopoda</i>	ME > NE	1,27	1,57	1	
PSME_00000063-RA	Late embryogenesis abundant protein Le14-A, putative	<i>Ricinus communis</i>	ME > NE	1,26	--	2	regulation of DNA-templated transcription, elongation

PSME_00010963-RA	Transport inhibitor response 1-like protein	<i>Vitis vinifera</i>	ME > NE	1,26	--	9	regulation of transcription, DNA-templated;cell cycle;mitotic spindle assembly checkpoint
PSME_00020463-RA	Phosphoglycerate kinase	<i>Micromonas sp.</i>	ME > NE	--	2,28	2	glycolytic process
<i>Sousexprimée dans ME</i>							
PSME_00016742-RA	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L isozyme, chloroplastic/amyloplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	--	0,45	2	signal transduction
PSME_00019283-RA	Phosphoglucomutase, chloroplastic-like isoform X1	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	--	0,39	3	metabolic process
PSME_00035611-RA	Phosphoglucomutase, putative	<i>Ricinus communis</i>	NE > ME	--	0,65	2	oxidation-reduction process;lysine biosynthetic process via diaminopimelate
PSME_00020464-RA	Phosphoglycerate kinase	<i>Micromonas sp.</i>	NE > ME	--	0,56	2	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00042401-RA	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	--	0,49	6	cytoskeleton organization
PSME_00008212-RA	Histone H2A.1	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,73	--	1	
PSME_00045033-RA	Tubulin alpha-3 chain-like	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,71	0,49	1	
PSME_00025825-RA	Histone H2B-like	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	NE > ME	0,67	--	3	DNA-templated transcription, initiation
PSME_00013947-RA	Hsp70-Hsp90 organizing protein 3	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,62	0,64	8	protein targeting;intracellular protein transport;protein import into mitochondrial outer membrane;meiotic cell cycle
PSME_00018264-RA	Histone H1-like	<i>Brachypodium distachyon</i>	NE > ME	0,61	--	4	nucleosome assembly
PSME_00007041-RA	Plastidial pyruvate kinase 2	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,60	--	7	glycolytic process;protein folding
PSME_00041528-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic isoform X3	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,60	--	1	
PSME_00031819-RA	Glutathione S-transferase omega-like 2	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,58	0,60	1	
PSME_00011444-RA	Scarecrow-like protein 9	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,56	--	3	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00008207-RA	Histone H2A.1	<i>Nicotiana glauca</i>	NE > ME	0,54	--	1	

PSME_00035515-RA	Scarecrow-like protein 21	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,52	--	9	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;signal transduction;photomorphogenesis
PSME_00011997-RA	Plastidial pyruvate kinase 2	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,51	--	8	carbohydrate metabolic process;glycolytic process;oxidation-reduction process
PSME_00028884-RA	Heat shock 70 kDa protein 8	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,50	0,31	2	
PSME_00011506-RA	Histone H4-like	<i>Nicotiana sylvestris</i>	NE > ME	0,50	--	4	DNA-templated transcription, initiation
PSME_00053828-RA	Histone H1-like	<i>Elaeis guineensis</i>	NE > ME	0,48	--	4	nucleosome assembly
PSME_00003232-RA	Isoflavone reductase-like protein	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,48	0,48	10	oxidation-reduction process;steroid biosynthetic process
PSME_00004400-RA	Expansin-like A1	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,45	0,51	4	
PSME_00052240-RA	Zeatin O-glucosyltransferase-like	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,42	--	2	metabolic process
PSME_00050927-RA	Pathogenesis-related protein bet V I family protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,42	0,18	2	defense response;response to biotic stimulus
PSME_00025097-RA	Scarecrow-like protein 27	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,41	--		
PSME_00038357-RA	Peroxidase 55-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,39	0,26	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00055205-RA	Probable glutathione S-transferase GSTU6-like	<i>Oryza brachyantha</i>	NE > ME	0,37	0,36	1	
PSME_00037124-RA	Scarecrow-like protein 21	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,37	--	9	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated;signal transduction;photomorphogenesis
PSME_00028581-RA	Scarecrow-like protein 1	<i>Prunus mume</i>	NE > ME	0,35	--		
PSME_00037425-RA	Transaldolase-like protein	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,35	0,24	1	carbohydrate metabolic process
PSME_00038261-RA	Peroxidase 12	<i>Erythranthe guttatus</i>	NE > ME	0,35	0,26	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00023819-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII-like	<i>Setaria italica</i>	NE > ME	0,33	0,19	3	carbohydrate metabolic process;response to stress
PSME_00002336-RA	L-ascorbate peroxidase 2	<i>Morus notabilis</i>	NE > ME	0,31	0,37	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00002089-RA	Heat shock protein 83-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,31	0,34	4	protein folding;response to stress

PSME_00046144-RA	Cytokinin dehydrogenase 7	<i>Beta vulgaris</i>	NE > ME	0,29	--	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00038438-RA	Zeatin O-glucosyltransferase-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,28	--	2	metabolic process
PSME_00047635-RA	Cytokinin dehydrogenase 7	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,28	--	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00030113-RA	Peroxidase 12	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,28	0,15	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00036684-RA	Cytokinin dehydrogenase 7	<i>Vitis vinifera</i>	NE > ME	0,28	--	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00021218-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12	<i>Jatropha curcas</i>	NE > ME	0,26	0,13	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00028832-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like isoform X1	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,25	--	7	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00013623-RA	Peroxidase 56-like, partial	<i>Solanum tuberosum</i>	NE > ME	0,24	0,19	13	response to oxidative stress;oxidation-reduction process;NAD biosynthetic process;photosynthesis;tachykinin receptor signaling pathway;protein splicing
PSME_00021228-RA	Anthocyanidin reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,24	0,19	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00017618-RA	Histone H2A 12	<i>Theobroma cacao</i>	NE > ME	0,22	--	1	
PSME_00054279-RA	Pathogenesis-related protein PR-4-like	<i>Prunus mume</i>	NE > ME	0,21	0,14	3	defense response to bacterium;defense response to fungus
PSME_00014516-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,20	--	5	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00043269-RA	Cytokinin dehydrogenase 9-like	<i>Phoenix dactylifera</i>	NE > ME	0,19	--	6	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00034360-RA	Histone H2A	<i>Gossypium raimondii</i>	NE > ME	0,18	--	1	
PSME_00019983-RA	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform-like	<i>Setaria italica</i>	NE > ME	0,18	0,07	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00046128-RA	Anthocyanidin reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,18	0,16	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00016232-RA	Endoglucanase 23-like	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,17	0,06	2	carbohydrate metabolic process

PSME_00038581-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	NE > ME	0,17	--	5	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00047109-RA	Cytokinin dehydrogenase 6-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,17	0,32	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00042161-RA	Zeatin O-glucosyltransferase-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,15	--	2	metabolic process
PSME_00043968-RA	Pectinesterase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,15	0,06	4	cell wall modification
PSME_00048140-RA	Peroxidase 12-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,14	0,61	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00010711-RA	Glutathione S-transferase F10-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	NE > ME	0,13	0,15	1	
PSME_00007384-RA	DihydroflavonoI-4-reductase-like	<i>Elaeis guineensis</i>	NE > ME	0,13	0,34	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00043969-RA	Pectinesterase-like	<i>Malus domestica</i>	NE > ME	0,13	0,05	4	cell wall modification
PSME_00013360-RA	Endoglucanase 3-like isoform X1	<i>Musa acuminata</i>	NE > ME	0,13	0,19	2	carbohydrate metabolic process
PSME_00016462-RA	Peroxidase 72-like	<i>Citrus sinensis</i>	NE > ME	0,13	0,13	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00033245-RA	DihydroflavonoI-4-reductase	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,12	0,09	6	steroid biosynthetic process;oxidation-reduction process
PSME_00049760-RA	Cytokinin dehydrogenase 1 isoform X1	<i>Cucumis melo</i>	NE > ME	0,11	--	5	oxidation-reduction process;cytokinin metabolic process
PSME_00056279-RA	Zeatin O-glucosyltransferase-like	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,11	--	2	metabolic process
PSME_00020299-RA	Glutathione S-transferase, amino-terminal domain protein	<i>Medicago truncatula</i>	NE > ME	0,11	0,25	1	
PSME_00053495-RA	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NE > ME	0,10	--	2	oxidation-reduction process
PSME_00016025-RA	Peroxidase 12	<i>Amborella trichopoda</i>	NE > ME	0,10	0,08	4	response to oxidative stress;oxidation-reduction process
PSME_00037344-RA	17.6 kDa class I heat shock protein-like	<i>Sesamum indicum</i>	NE > ME	0,09	0,11		
PSME_00006475-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like	<i>Pyrus x</i>	NE > ME	0,05	--	7	oxidation-reduction process;tRNA processing
PSME_00006473-RA	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic-like	<i>Beta vulgaris</i>	NE > ME	0,03	--	3	oxidation-reduction process

Annexe 7. Identification des transcrits différentiellement exprimés dans les lignées II par rapport aux lignées I de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accession, ainsi que la description des gènes peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme_allgenes.transcripts.fasta). FC: ratio calculé entre les moyennes d'expression des II vs I dans les analyses de transcriptomique ; Nombre de GO : décompte des GO associés à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologiques, fonctions moléculaires, et composants cellulaires) ; GO Biological Process : groupe GO appartenant à la catégorie des processus biologiques à un niveau 2 ou plus.

Accession	Gène description	Espèce	Génération	FC	Nb GO	GO annotation Processus Biologique
PSME_00000066-RA	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic 1 60S ribosomal protein	<i>Morus notabilis</i>	II>I	28,64	5	carbohydrate metabolic process;generation of precursor metabolites and energy;catabolic process;biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00016621-RA	L17-2-like isoform X1	<i>Jatropha curcas</i>	II>I	25,78	3	translation
PSME_00023262-RA	V-type proton ATPase subunit E	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	25,56	4	
PSME_00030767-RA	Ras-related protein RABE1a	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	24,63	3	signal transduction
PSME_00039826-RA	Probable fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	22,95	2	carbohydrate metabolic process;generation of precursor metabolites and energy;catabolic process
PSME_00007776-RA	Protein disulfide isomerase-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	II>I	21,50	6	cellular homeostasis;metabolic process;transport
PSME_00005810-RA	Elongation factor 1-delta-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	20,85	5	
PSME_00009413-RA	Ran-binding protein 1 homolog b	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	20,36	1	transport
PSME_00033903-RA	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	<i>Eucalyptus grandis</i>	II>I	20,15	4	metabolic process;response to stress
PSME_00010533-RA	60S ribosomal protein L18-2-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	20,02	10	translation



PSME_00051487-RA	ARF family GTPase	<i>Selaginella moellendorffii</i>	II>I	19,87	9	carbohydrate metabolic process
PSME_00002671-RA	60S ribosomal protein L23a-like	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	18,79	3	translation
PSME_00021323-RA	Probable fructokinase-1	<i>Brassica napus</i>	II>I	18,15	13	nucleobase-containing compound metabolic process;starch biosynthetic process
PSME_00049628-RA	60S ribosomal protein L18a	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	17,82	3	translation
PSME_00040085-RA	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	<i>Jatropha curcas</i>	II>I	17,15	11	response to cold;response to water deprivation;response to salt stress;response to cadmium ion;oxidation-reduction process
PSME_00032043-RA	Mitochondrial ATP synthase subunit G protein	<i>Theobroma cacao</i>	II>I	16,81	3	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00046751-RA	Histone-lysine N-methyltransferase setd3	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	16,34	1	
PSME_00017034-RA	40S ribosomal protein S12-like	<i>Sesamum indicum</i>	II>I	16,21	6	translation;response to salt stress;response to cadmium ion
PSME_00047882-RA	14-3-3-like protein	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	16,09	23	transcription, DNA-templated;regulation of transcription, DNA-templated
PSME_00047031-RA	Ras-related protein Rab11A	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	15,79	3	signal transduction
PSME_00020754-RA	NAC domain-containing protein 68-like isoform X2	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	15,75	2	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00000777-RA	40S ribosomal protein S7-like	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	15,58	6	translation
PSME_00012845-RA	60S ribosomal protein L7a	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	15,47	1	
PSME_00043453-RA	Nuclear transport factor 2	<i>Brassica oleracea</i>	II>I	15,45	2	transport
PSME_00020825-RA	60S ribosomal protein L35-like isoform 1	<i>Glycine max</i>	II>I	15,17	7	nucleobase-containing compound metabolic process;translation



PSME_00009560-RA	Probable fructokinase-6, chloroplastic Activator of 90 kDa	<i>Cicer arietinum</i>	II>I	14,99	2	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00044995-RA	heat shock protein ATPase homolog	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,98	3	response to stress
PSME_00015897-RA	60S ribosomal protein L23	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	14,85	3	translation
PSME_00015897-RA	60S ribosomal protein L23	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	14,85	3	translation
PSME_00053040-RA	60S ribosomal L12-like protein	<i>Medicago truncatula</i>	II>I	14,79	3	translation
PSME_00044770-RA	40S ribosomal protein S11 isoform X2	<i>Cicer arietinum</i>	II>I	14,69	4	translation
PSME_00042573-RA	Ras-related protein RABC1	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,59	7	
PSME_00042573-RA	Ras-related protein RABC1	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,59	7	signal transduction
PSME_00024979-RA	60S ribosomal protein L7a	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	14,20	1	
PSME_00042741-RA	RAB GTPase B1C isoform 1	<i>Theobroma cacao</i>	II>I	14,19	2	signal transduction
PSME_00002720-RA	40S ribosomal protein S14	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	13,87	5	translation
PSME_00002449-RA	60S ribosomal protein L7-2	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	13,45	11	translation
PSME_00001260-RA	40S ribosomal protein S15a-like isoform X2	<i>Populus euphratica</i>	II>I	13,34	3	translation
PSME_00048805-RA	40S ribosomal protein S13-like	<i>Gossypium raimondii</i>	II>I	13,22	4	translation
PSME_00045023-RA	40S ribosomal protein S19-3	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	13,12	3	translation
PSME_00051718-RA	Oxidoreductase family protein	<i>Populus trichocarpa</i>	II>I	12,54	1	



PSME_00037054-RA	40S ribosomal protein S11 isoform X2 TATA-box binding	<i>Cicer arietinum</i>	II>I	12,24	4	translation
PSME_00010902-RA	protein, component of TFIID and TFIIB Aldehyde	<i>Physcomitrella patens</i>	II>I	12,22	2	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00006614-RA	dehydrogenase family 3 member H1 Aldehyde	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	12,09	5	metabolic process;cellular process
PSME_00006614-RA	dehydrogenase family 3 member H1	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	12,09	5	metabolic process;cellular process
PSME_00016744-RA	60S ribosomal protein L32-1 Mediator of RNA polymerase II	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	11,72	4	translation
PSME_00044675-RA	transcription subunit 7a Arginine/serine-rich-splicing factor	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	11,72	3	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00001274-RA	RSP41-like isoform X1	<i>Prunus mume</i>	II>I	11,41	7	catabolic process
PSME_00021988-RA	60S ribosomal protein L23-like isoform X1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	II>I	11,25	3	translation
PSME_00012846-RA	60S ribosomal protein L7a	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	10,89	1	
PSME_00000617-RA	NADH dehydrogenase	<i>ubiquinone</i>	II>I	10,63	1	
PSME_00002670-RA	60S ribosomal protein L23a-like	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	10,49	3	translation
PSME_00036730-RA	Glutamate dehydrogenase 1	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	10,46	5	metabolic process;cellular process
PSME_00045635-RA	40S ribosomal protein S18	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	10,37	5	translation
PSME_00021950-RA	40S ribosomal protein S13-like	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	II>I	10,29	4	translation



PSME_00045082-RA	60S ribosomal protein L37-3 Aldehyde	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	10,08	4	translation
PSME_00030348-RA	dehydrogenase family 3 member H1-like	<i>Setaria italica</i>	II>I	10,07	3	metabolic process
PSME_00010506-RA	Cathepsin B-like	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	9,65	4	protein metabolic process
PSME_00020559-RA	40S ribosomal protein S27-2 ATP synthase subunit epsilon,	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	9,06	4	translation
PSME_00001808-RA	mitochondrial-like	<i>Phoenix dactylifera</i>	II>I	8,87	4	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00035421-RA	60S ribosomal protein L38	<i>Tarenaya hassleriana</i>	II>I	8,86	4	translation
PSME_00019277-RA	NADH dehydrogenase	<i>ubiquinone</i>	II>I	8,73	3	oxidation-reduction process
PSME_00032528-RA	60S ribosomal protein L36-2-like	<i>Prunus mume</i>	II>I	8,40	4	translation
PSME_00016280-RA	40S ribosomal protein S13-like	<i>Gossypium raimondii</i>	II>I	8,19	4	translation
PSME_00012317-RA	NAC domain-containing protein 68-like isoform X2 Mediator of RNA polymerase II	<i>Phoenix dactylifera</i>	II>I	5,71	2	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00052042-RA	transcription subunit 18, putative	<i>Theobroma cacao</i>	II>I	5,07	2	defense response to fungus
PSME_00031962-RA	Myb-related protein 340 isoform X1	<i>Gossypium raimondii</i>	II>I	4,86	5	cellular component organization
PSME_00052797-RA	Myb-related protein 308	<i>Elaeis guineensis</i>	II>I	4,18	5	cellular component organization
PSME_00045690-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	3,36	8	biosynthetic process;DNA metabolic process;response to stress
PSME_00034660-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	3,14	20	signal transduction;response to stress;cellular component organization



PSME_00047207-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	3,06	10	cell cycle
PSME_00036210-RA	Probable WRKY transcription factor 42	<i>Eucalyptus grandis</i>	II>I	2,97	4	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process;cell cycle
PSME_00038063-RA	Ethylene-responsive transcription factor ERF017	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	2,95	2	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00052548-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	2,95	4	cellular process
PSME_00009976-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	2,88	23	biosynthetic process;DNA metabolic process;transport;cell cycle;response to stress
PSME_00012847-RA	Kinesin KP1	<i>Cucumis sativus</i>	II>I	2,59	12	cellular component organization;cell cycle
PSME_00049809-RA	Kinesin-4	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	2,55	14	cellular component organization;DNA metabolic process;transport;response to stress
PSME_00036209-RA	WRKY family transcription factor	<i>Theobroma cacao</i>	II>I	2,51	3	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00052547-RA	Kinesin-4-like	<i>Brassica napus</i>	II>I	2,45	25	biosynthetic process;DNA metabolic process;response to stress;cellular component organization
PSME_00039951-RA	Kinesin KP1-like	<i>Gossypium raimondii</i>	II>I	2,37	7	cellular process
PSME_00049053-RA	Kinesin-4 isoform X2	<i>Gossypium raimondii</i>	II>I	2,33	24	response to stress;cell cycle;response to biotic stimulus;cellular component organization
PSME_00056742-RA	Kinesin-4	<i>Fragaria vesca</i>	II>I	2,31	9	cellular component organization;transport
PSME_00019473-RA	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit rpac1	<i>Amborella trichopoda</i>	II>I	2,30	3	biosynthetic process;nucleobase-containing compound metabolic process
PSME_00045870-RA	Kinesin-4 isoform X3	<i>Nelumbo nucifera</i>	II>I	2,25	6	cellular component organization;transport
PSME_00012331-RA	Kinesin-4	<i>Vitis vinifera</i>	II>I	2,13	8	response to biotic stimulus;response to external stimulus;transport;cellular process;response to stress
PSME_00045869-RA	Kinesin-4-like isoform X2	<i>Cucumis melo</i>	II>I	1,93	4	cellular process



Annexe 8. How to maintain embryogenic capacity of embryogenic lines initiated from Douglas-fir immature embryos? Poster présenté durant le colloque: IUFRO Working Party 2.09.02 conference “Somatic Embryogenesis And Other Vegetative Propagation Technologies” Septembre 19-23, 2016, La Plata Argentine.

HOW TO MAINTAIN EMBRYOGENIC CAPACITY OF EMBRYOGENIC LINES INITIATED FROM DOUGLAS-FIR IMMATURE EMBRYOS ?





Gautier F^{1,2*}, Eliášová K³, Reeves C⁴, Sanchez L¹, Teyssier C¹, Trontin J-F⁵, Le Metté C¹, Vágner M³, Costa G², Hargreaves C⁴, Lelu-Walter M-A¹.

¹ INRA, UR 0588 Unité Amélioration. Génétique et Physiologie Forestières. (2163 Avenue de la Pomme de Pin. CS 4001. Ardon. F-45075 Orléans Cedex 2 (France)) florian.gautier@orleans.inra.fr.

² Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles. (123 avenue Albert Thomas. 87000 Limoges (France)).

³ Institute of Experimental Botany CAS. (Rozvojová 263. Praha 6-Lysolaje 165 02 (Czech Republic)).

⁴ Scion. (Private Bag 3020. Rotorua (New Zealand)).

⁵ FCBA, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée. Equipe Génétique et Biotechnologie. (Campus Forêt-Bois de Pierroton. 71 route d'Arcachon. F-33610 Cestas (France)).



INTRODUCTION: Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) is a major species for reforestation in Europe with increasing demand for wood (high productivity, good wood properties and strong tolerance to diseases and insects). Selection and vegetative propagation of improved varieties are key issues to maintain productivity in plantation forestry (Lelu-Walter *et al.* 2013). Somatic embryogenesis from immature seeds coupled with cryopreservation is a promising retroactive clonal propagation system of selected trees, especially in conifers (Klimaszewska *et al.* 2016). A recurrent problem in Douglas-fir is the sustainable multiplication of initiated embryonal masses (EMs) subcultured every two weeks on proliferation medium, with the development of non-embryogenic callus (NEC) often occurring. In this work, we describe EMs morphology and cytology (light and confocal microscopy) of three unrelated embryogenic lines (D1, D2 and D3). We show great variations among genotypes, and suggest a proliferation method to reduce the formation of NEC.

Plant material:



		B		
Controlled cross	♂ 44	♂ 47		
	♀ 74	D1		
♀ 56			D2	
♀ 55				D3

Somatic embryogenesis is initiated from immature zygotic embryos of Douglas-fir obtained from controlled crosses. Initiated EMs are subcultured every two weeks on maintenance medium. In some lines, NEC (brown) appears among EMs during the culture process (A) and reduces EM proliferation. In this work we studied three lines (D1, D2, D3), genetically unrelated (B).

Morphological comparisons:

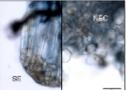
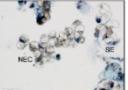




D1 : « pure line » D2 : « pure line » D3 : mixed line

According to their macro-morphology EMs were classified under two types : “pure lines” (D1, D2) , i.e. EMs white-translucent with immature somatic embryo (SE) ; or mixed line (D3), i.e. EMs with immature SE and NEC (brown parts). Cluster of NEC cells did not produce any cotyledonary SE after maturation treatment.

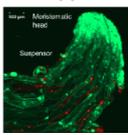
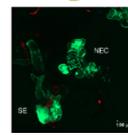
Transmission light microscopy:

Fresh EMs were collected (only white part), stained with trypan blue and observed under light microscope.

Transmission light microscope has shown D1 is made up of only embryogenic cells. D3 was confirmed as a mixture of SE and round cells (NEC). Interestingly, line D2 initially classified as a “pure line” also appeared to be a mixture of SE and NEC. NEC is interspersed with SE, and it is difficult to dissociate them. Morphology is not sufficient to describe EMs.

Confocal microscopy:

Fresh EMs were collected (only white part), and the viability was determined by double staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). Green fluorescein fluorescence reveals viable cells, whereas red fluorescence of PI-DNA complexes accumulates in dead cells. (A) SE with meristematic head and suspensor. (B) SE and NEC.

In all lines, using confocal microscopy, dead cells in SE (A) were observed in suspensor cells, suggesting autophagic programmed cell death (PCD) that is required for normal embryo development. For mixed lines such as D2 and D3, NEC (B) presented only viable cells.

Discussion:

- In some lines, the white parts of proliferating EMs were shown to contain both immature SE and NEC. Viable non-embryogenic cells are of unknown origin : degeneration of embryogenic cells, NEC isolated at the same time as EMs.
- Different methods are possible to reduce the production of non-embryogenic cells : frequent subculture of EMs (no aging), vigorous dissociation in liquid medium (Reeves *et al.* 2016, submitted), and transfer on filter paper (homogenization).

Proliferation method: A: clumps B: filter paper

For the mixed line (D3), the transfer of EMs onto a filter paper greatly reduced the formation of NEC.




D3 EMs were subcultured for two weeks either as clumps (A) or dispersed over filter paper (B).

References:

- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F (2016). Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: *In vitro embryogenesis in Higher plants*, Chap. 7, Garmaná M-A, Lambardi M (Eds), Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, pp 131-168.

- Lelu-Walter M-A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Torbio M, Pâques L-E (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet Genomes*, 9: 883-899.

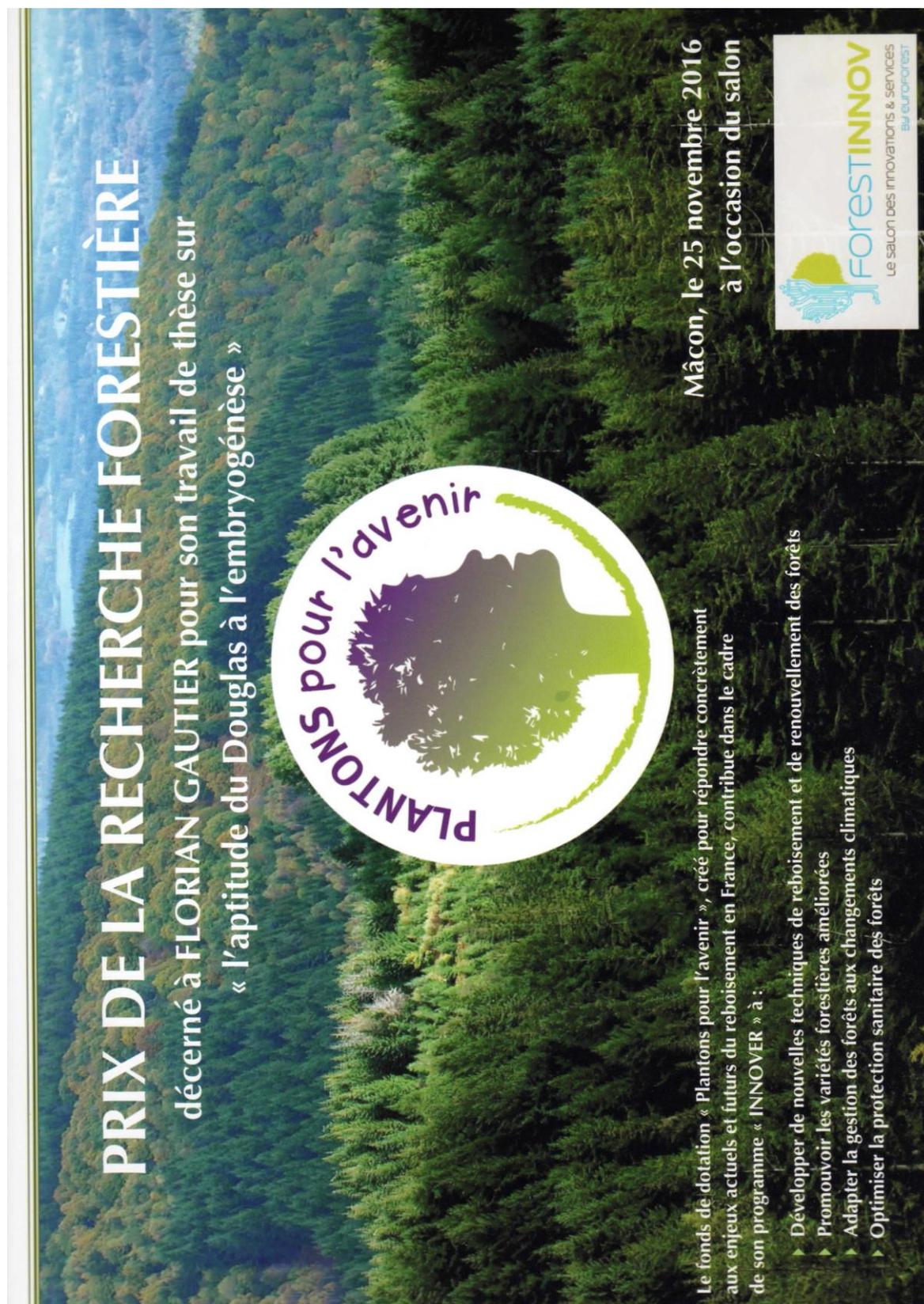
- Reeves C, Hargreaves C, Trontin J-F, Lelu-Walter M-A (2016). Simple and efficient protocols for the initiation and proliferation of embryonic tissue of Douglas-fir. Submitted.



2163, avenue de la Pomme de Pin – BP 20619 – Ardon
45166 Olivet Cedex
www.orleans.inra.fr




Annexe 9. Prix de la Recherche Forestière du fond de dotation « Plantons pour l'avenir » décerné lors du salon « ForestInnov ». Mâcon, 25.11.2016.



PRIX DE LA RECHERCHE FORESTIÈRE
décerné à **FLORIAN GAUTIER** pour son travail de thèse sur
« l'aptitude du Douglas à l'embryogénèse »

PLANTONS pour l'avenir

Le fonds de dotation « Plantons pour l'avenir », créé pour répondre concrètement aux enjeux actuels et futurs du reboisement en France, contribue dans le cadre de son programme « INNOVER » à :

- ▶ Développer de nouvelles techniques de reboisement et de renouvellement des forêts
- ▶ Promouvoir les variétés forestières améliorées
- ▶ Adapter la gestion des forêts aux changements climatiques
- ▶ Optimiser la protection sanitaire des forêts

Mâcon, le 25 novembre 2016
à l'occasion du salon

FORESTINNOV
Le salon des innovations & services
du forçage





Table des illustrations

Figure I.1 Aire de répartition naturelle du Douglas vert (vert), du Douglas bleu (bleu) et de l'hybride (gris) sur la côte ouest des Etats Unis. Le Douglas vert est celui qui est utilisé en Europe. Source Bastien <i>et al.</i> , (2013).....	20
Figure I.2 Aire de répartition du Douglas en France d'après « Le Douglas, un choix pour la construction » (France Douglas, 2012).....	21
Figure I.3 Comparaison du module d'élasticité des principales essences résineuses commerciales françaises (pin maritime, Douglas, pin sylvestre et épicéa).	21
Figure I.4 Caractéristiques botaniques du Douglas. A : arbre entier ; B : aiguilles ; C : bourgeons végétatifs ; D : cône femelle ; E : écorce ; F : couleur du bois. Photos: Florian Gautier.	22
Figure I.5 Cycle de reproduction du Douglas. Mars-avril mise à fleur, pollinisation, pour finir en automne avec la dissémination des graines matures. Photos : Florian Gautier.	24
Figure I.6 Représentation schématique du développement de l'embryon zygotique (EZ) chez la famille des Pinaceae: 4 stades : proembryogenèse, l'embryogenèse précoce, l'embryogenèse tardive et la maturation. pU : partie supérieure primaire, pE : partie embryonnaire primaire, E : partie embryonnaire, S : suspenseur, U : partie supérieure, EM : tête embryonnaire, sS : suspenseur secondaire (von Arnold <i>et al.</i> , 2002)	24
Figure I.7 Structure des graines de gymnospermes: (A) multiples fécondations, (B) megagamétophyte tissu haploïde, nutritif de l'embryon zygotique (Linkies <i>et al.</i> , 2010)	25
Figure I.8 Schéma explicatif de la proembryogenèse des conifères, depuis la fécondation à la formation du proembryon secondaire. pU : partie supérieure primaire, pE : partie embryonnaire primaire, U : partie supérieure secondaire, S : suspenseur, E ₁ : segment embryonnaire, E : cellules embryonnaires. (Dogra, 1967).	25
Figure I.9 Schéma explicatif de l'embryogenèse précoce à l'embryogenèse tardive, montrant une polyembryogenèse de clivage (Pinus, 15-19), ou non (Picea, 20-23). U : partie supérieure secondaire, S : suspenseur, E : segments embryonnaires, e : tête embryonnaire. (Dogra, 1967).	26
Figure I.10 Principales caractéristiques physiologiques des différentes étapes de l'embryogenèse et de la déshydratation. LEA : Protéines abondantes lors de l'embryogenèse tardive ; HSP : protéines de réponse au choc thermique ; ABA : Acide abscissique (von Arnold <i>et al.</i> , 2002; Bewley <i>et al.</i> , 2013).	27
Figure I.11 Deux régions de provenances (PME901 : basse altitude ; et PME902 : >800m) délimitées du Douglas en France, représentant les résultats des tests de descendance sur 500 arbres de provenance de Washington (Bastien <i>et al.</i> , 2013). La partie grise sont les régions ne faisant pas partie des régions de provenances.....	29
Figure I.12 Schéma du programme d'amélioration du Douglas en France. Différents tests (descendance et provenance) ont permis de former les différents vergers à graines français ; sélection et multiplication des individus intéressants après identification et évaluation. Bastien (communication personnelle).	30
Figure I.13 : Comparaison des différents stades de l'embryogenèse zygotique avec ceux de l'embryogenèse somatique chez les conifères (von Aderkas <i>et al.</i> , 1991; von Arnold <i>et al.</i> , 2002).	33
Figure I.14 Différentes étapes de l'embryogenèse somatique du Douglas : initiation, multiplication des masses embryogènes (cryoconservation possible), maturation des embryons somatiques (ES). Les ES	

cotylédonaire mis en germination, se développent en plantes qui sont acclimatées (Photos : Marie-Anne Lelu-Walter ; Florian Gautier).....	34
Figure I.15 Aspect macromorphologique sous loupe des masses embryogènes (EC, a,b) et des cals non-embryogènes (NE, a, c) de <i>Larix principis-rupprechtii</i> provenant du même embryon zygote (a) (échelle de 1 mm). Cytologie sous microscope optique avec une coloration à l'acétocarmin de EC (d) et de NE (e) (échelle de 100µm). D'après Zhao <i>et al.</i> , 2015a.	35
Figure I.16 Schéma explicatif de l'intérêt de la cryoconservation afin de créer une banque de matériel végétal juvénile. Photos : Marie-Anne Lelu-Walter et Florian Gautier.	37
Figure I.17 Schéma explicatif de l'embryogenèse somatique primaire et secondaire du Douglas. Obtention des lignées embryogènes primaires à partir d'un embryon zygote; obtention de lignées embryogènes secondaires à partir d'un embryon somatique (ES) issu d'une lignée embryogène primaire de Douglas.	39
Figure I.18 Schéma des teneurs en oses présents au cours des différentes étapes de l'embryogenèse somatique de <i>Picea abies</i> . La couleur blanche représente des niveaux très faibles, le gris représente des valeurs plus hautes, et le noir des valeurs élevées. RFO = Raffinose Family Oligo, Sucrose = Saccharose, Starch = Amidon. (Lipavská et Konrádová 2004).	41
Figure I.19 : Schéma de la biosynthèse des cytokinines, leurs conversions et leur dégradation dans les plantes. Les enzymes impliquées sont indiquées par les numéros rouges.	45
Figure I.20 Interactions entre les différents facteurs de transcription connus pour avoir un impact pendant l'embryogenèse. Les flèches indiquent l'activation de l'expression des gènes. Les lignes sans flèches indiquent une inhibition de l'expression d'un gène. Les lignes en pointillées sont des interactions suggérées entre deux gènes. Les cadres composés de lignes complètes sont des gènes liés au stress, alors que les cadres en pointillées sont des gènes liés aux hormones (Nowak et Gaj, 2016).	50
Figure I.21 Relation entre l'étude du transcriptome et du protéome dans une cellule (Bidart et Lacroix, 2006).	60
Figure I.22 Principe de la spectrométrie de masse classique (MS), B : principe de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).	62
Figure I.23 Schéma de différents montages principalement utilisés pour la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	64
Figure I.24 Aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique : positionnement des questions de recherche (Q). Embryon somatique (ES), embryon zygote (EZ), Masse embryogène (ME), cal non-embryogène (NE).	68
Figure II.1 Caractérisation de l'aptitude du Douglas à l'embryogenèse somatique (question de recherche Q1): analyses et matériel végétal utilisés. Embryon somatique (ES), embryon zygote (EZ), Masses embryogènes (ME), cal non-embryogène (NE).....	73
Figure II.2 Observation of three Douglas-fir embryogenic lines (D1, D2, D3)	76
Figure II.3 Morphologie du matériel végétal de Douglas étudié: 1 masses embryogènes (ME), 2 cal non-embryogènes (NE) de trois lignées de Douglas TD15-1 (A), SD4-8 (B) et TD17-1 (C), après 8 semaines sur un milieu de maturation. La formation d'embryons somatiques (ES) est visible pour les ME, alors que le tissu s'est nécrosé pour les NE. ES = embryon somatique, Pr = prolifération.	91
Figure II.4 Morphologie des masses embryogènes (ME) de trois lignées de Douglas : A1 : TD15-1, B1 : SD4-8, C1 : TD17-1 et des cal non-embryogènes (NE) : A2 : TD15-1, B2 : SD4-8, C2 : TD17-1, de	

Douglas, après 2 semaines de multiplication. Échelle = 1mm, ES=embryons somatiques, ME = masse embryogène, NE= cal non-embryogène.....91

Figure II.5 Aspects cytologiques des masses embryogènes (ME) de trois lignées de Douglas après deux semaines de multiplication : A. TD15-1 ; B. SD4-8 ; C. TD17-1. La microscopie optique montre la structure des ME (A1, B1, et C1) après une coloration au bleu trypan, les grains d'amidon (en noir) par coloration au lugol (A2, B2 et C2), et la structure de ces embryons après fixation dans de la paraffine suivi d'une double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red (A3, B3 et C3). Échelle = 100µm (A1, A3, B1, B3, C1, C2 et C3) et 50µm (A2 et B2), TM = tête méristématique, S = suspenseur, ES=embryon somatique, NE= cellules non-embryogènes, GA = grain d'amidon.92

Figure II.6 Aspects cytologiques des cals non-embryogènes (NE) de trois lignées de Douglas après deux semaines de multiplication : A. TD15-1 ; B. SD4-8 ; C. TD17-1. La microscopie optique montre la structure des NE après une coloration au bleu trypan, les grains d'amidon (en noir) par coloration au lugol (A2, B2 et C2), et la structure de ces cals après fixation dans de la paraffine suivi d'une double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red (A3, B3 et C3). Échelle = 100µm (A3, B1) et 50µm (A1, A2, B2, B3, C1, C2 et C3), ES=embryon somatique, NE= cellules non-embryogènes, GA = grain d'amidon.93

Figure II.7 Structure et viabilité des masses embryogènes (ME : A) et cals non-embryogènes (NE : B) de Douglas après deux semaines de multiplication. Les images sous microscope optique montrent la structure générale des ME (A1) après double coloration au bleu alcian et Nuclear Fast Red montrant des cellules en division (flèches) et la composition en phénol (PH) des NE par coloration azur II (B1). Les images confocales des ME (A2) et NE (B2) affichent une fluorescence verte dans les noyaux des cellules vivantes (coloration FDA), et une fluorescence rouge dans les noyaux des cellules mortes (coloration IP). Les images confocales permettent de voir que dans les ME, seules quelques cellules du suspenseur sont mortes, et que les cellules des NE sont vivantes. Échelle = 50µm (A1 et B1) et 100µm (A2 et B2), TM = tête méristématique, S = suspenseur, ES=embryon somatique, NE= cellules non-embryogènes, PH = composés phénoliques, MIT = mitose.....94

Figure II.8 Proportion des teneurs en cytokinines endogènes isoprénoïdes (actives : « free-base » et riboside, précurseurs (ph), O-glucosylées : OG et ROG, et N-glucosylées : 7/9G) dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de trois lignées Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) après 2 semaines de multiplication. La proportion est exprimée en pourcentage, et les chiffres sur les barres correspondent à la teneur (pmol.g⁻¹MS) de chaque groupe d'isoforme.....99

Figure II.9 Proportion des teneurs en cytokinines endogènes aromatiques (actives : BAP et BAR, précurseurs (ph), et N-glucosylées : 3/7/9G) dans des masses embryogènes (ME) et des cals non-embryogènes (NE) de trois lignées Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) après 2 semaines de multiplication. La proportion est exprimée en pourcentage, et les chiffres sur les barres correspondent à la somme de la teneur (pmol.g⁻¹MS) de chaque groupe d'isoforme.100

Figure II.10 Diagramme de Venn des protéines différentiellement abondantes entre ME et NE dans les lignées TD15-1, SD4-8 et TD17-1 de Douglas. Le rouge représente le nombre de protéines surexprimées (up) dans les ME, et le bleu les protéines sous-exprimées (down) dans les ME et donc surexprimées dans les NE.101

Figure II.11 Analyses des 413 protéines communes aux trois lignées (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) différentiellement exprimées entre les ME et les NE. L'identification et la quantification des protéines a été faite en spectrométrie de masse. (A) Analyse en composantes principales en fonction des lignées (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), et du type de matériel (ME ou NE) ; (B) HeatMap représentant les

changements dans les abondances des différentes protéines en fonction des génotypes et du type de matériel. 102

Figure II.12 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus qui sont associées aux protéines retrouvées enrichies significativement dans les masses embryogènes (ME) ou dans les calcs non-embryogènes (NE) des trois lignées de Douglas. Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini and Hochberg 1995). Le fold change correspond au ratio du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre. Seuls les groupes et sous-groupes de GO avec un ratio (FC) supérieur à 1,6 sont inclus dans la figure. 105

Figure II.13 Analyse en composante principale répartissant les 31 671 transcrits exprimés entre toutes les lignées des masses embryogènes (ME) et des calcs non-embryogènes (NE) (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). En vert les transcrits surexprimés dans les ME (4472), en rose les transcrits surexprimés dans les NE (5219), et en gris les transcrits sans différence d'expression (21980). 106

Figure II.14 Analyses des 9691 transcrits différemment exprimés entre les ME et les NE. (A) Analyse en composantes principales en fonction du génotype (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), et du type de matériel (ME ou NE) ; (B) HeatMap représentant les changements dans les abondances des différents transcrits en fonction des génotypes et du type de matériel. 107

Figure II.15 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus qui sont associées aux transcrits retrouvées enrichies significativement dans les trois lignées (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) ME ou les trois lignées NE correspondantes de Douglas Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini and Hochberg 1995). Le fold change correspond au ratio du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre. Seuls les groupes et sous-groupes de GO avec un ratio (FC) supérieur à 1,3 sont inclus dans la figure. 111

Figure II.16 Analyses fonctionnelle des GO identifiés (à un niveau 2) appartenant aux identifiants communs (protéines et transcrits) différemment exprimés dans les masses embryogènes (ME) et calcs non-embryogènes (NE) correspondant aux 3 lignées de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Les différentes catégories fonctionnelles de GO sont classés dans 3 catégories : processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires. Le pourcentage de hits est calculé en fonction du nombre de hits (occurrence) dans chaque catégorie GO par rapport au nombre de hits totaux dans chaque catégorie, et pour chaque type de matériel. 113

Figure II.17 Termes GO (Gene Ontology, de niveau 2 et plus) pour les trois catégories : processus biologiques (A), fonctions moléculaires (B) et composants cellulaires (C), qui sont associés aux identifiants communs des protéines et transcrits retrouvés enrichis significativement dans les masses embryogènes (ME) ou les calcs non-embryogènes (NE) correspondants aux 3 lignées de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Les GO ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini and Hochberg 1995). Le fold change correspond à la différence du nombre de hit présents d'un type de matériel à l'autre. 114

Figure II.18 Schéma de la voie de biosynthèse des différentes cytokinines isoprénoïdes retrouvées dans nos masses embryogènes (ME) et calcs non-embryogènes (NE) de Douglas (iP : isopentenyladenine, Z (cis et trans) : zéatine, DHZ : dihydrozéatine), les formes actives, désactivées réversibles, désactivées irréversible, jusqu'à leur dégradation. Les enzymes impliquées dans la conversion des différentes formes sont indiquées par des numéros. 1: 5'-ribonucléotide phosphohydrolase ; 2: adenosine nucléosidase ; 3: purine nucléoside phosphorylase ; 4: adenosine kinase ; 5: CK phosphoribohydrolase ; 6: adenine phosphoribosyltransférase ; 7 : N-glucosyltransférase ; 8: zéatine-O-glucosyltransférase ; 9 :beta-

glucosidase ; 10: Cytokinine dehydrogenase ; iP-ph : N ⁶ -isopentenyladenosine-5'-monophosphate ; iPR : N ⁶ -isopentenyladenosine ; iP7/9G : N ⁶ -isopentenyladenosine-7/9-glucoside ; et les équivalents pour tZ, DHZ et cZ ; tZOG : trans-zéatine-O-glucoside ; tZROG : trans-zéatine-O-glucoside riboside et les équivalents pour DHZ et cZ. Le sens des flèches représente une teneur régulée différemment entre les ME (blanc) ou NE (noir) dans nos analyses. Les enzymes (8 et 10) en rouge sont retrouvées surexprimées les NE. Schéma inspiré de Spíchal (2012).....	120
Figure II.19 Clustering hiérarchique des transcrits sélectionnés surexprimés dans les masses embryogènes (ME) par rapport aux cals non-embryogènes (NE). Le rouge indique un FC très haut et le vert un FC proche de 2.	132
Figure II.20 Schéma récapitulatif des marqueurs moléculaire du protéome et du transcriptome caractérisant les masses embryogènes (ME) et les cals non-embryogènes (NE) de Douglas. Les rectangles avec un dégradé de couleur indiquent le niveau de surexpression entre les deux types de matériel. Dans les ME, cela va de jaune clair (faible surexpression) à rouge (forte surexpression), alors que dans les NE la faible surexpression est représentée en vert clair allant jusqu'à bleu foncé (forte surexpression).	135
Figure III.1 Réitérer un cycle d'embryogenèse somatique augmente le potentiel des lignées peu ou moyennement embryogènes de Douglas (question de recherche Q2) : analyses et matériel végétal utilisés. Embryon somatique (ES), embryon zygotique (EZ), masses embryogènes (ME).	141
Figure III.2 Analyses des 470 transcrits différemment exprimés entre les lignées I (SD4, TD17) et les lignées II (SD4-2, SD4-6, SD4-8, TD17-1). (A) Analyse en composantes principales en fonction du génotype, et des lignées (P) ou (S) ; (B) HeatMap représentant les changements dans les abondances des différents transcrits en fonction des génotypes et de I et II.	216
Figure III.3 Termes GO (Gene Ontology) pour les catégories de processus biologiques de niveau 2 ou plus associées aux protéines retrouvées enrichis significativement dans les 4 lignées secondaires (TD17-1, SD4-, SD4-6 et SD4-8) de Douglas. Les Gss ont été comparés à un groupe de référence, en utilisant une correction de Bonferroni, pour un FDR < 0,05 (taux de faux positif, Benjamini and Hochberg 1995). Le fold change correspond à la différence du nombre de hits présents d'un type de matériel à l'autre.	219



Table des tableaux

Tableau I.1 Classement des 10 espèces forestières les plus vendues en nombre de plants. Extrait des résultats de l'enquête statistique annuelle MAAPRAT/IRSTEA sur les ventes de plants forestiers pour la campagne de plantation 2015-2016. TCR = taillis à courte rotation.	20
Tableau I.2 Caractéristiques des différents vergers à graines français testés (supériorité de certains caractères testés) ou qualifiés (sélection phénotypique individuelle) pour la production de plants (Source : France-Douglas, http://www.france-Douglas.com).	29
Tableau I.3 Historique des travaux réalisés en embryogenèse somatique du Douglas : étude des différentes étapes (initiation, multiplication, cryoconservation, maturation, essais en champs). Les références en bleues correspondent à des brevets.	34
Tableau I.4 Marqueurs moléculaires pouvant être caractéristiques de la capacité embryogène (ME) ou non-embryogène (NE) des conifères	47
Tableau II.1 Origine génétique des lignées embryogènes primaires de Douglas (<i>Pseudotsuga menziesii</i>) : TD15, TD17 et SD4.	81
Tableau II.2 Mesure du potentiel embryogène (Nb ES g ⁻¹ MF) de masses embryogènes (ME) et de calcs non-embryogènes (NE) pour trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8, TD17-1) après 8 semaines de maturation.	90
Tableau II.3 Mesure du potentiel embryogène (Nb ES g ⁻¹ MF) de masses embryogènes (ME) et de calcs non-embryogènes (NE) pour trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8, TD17-1) après 8 semaines de maturation.	95
Tableau II.4 Teneur en sucres solubles, en amidon et en protéines totales dans des masses embryogènes (ME) et des calcs non-embryogènes (NE) dans nos trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) de Douglas après deux semaines de multiplication. Les valeurs correspondent à 4 (glucides et amidon) et 5 (protéines totales) mesures ± IC à un niveau d'erreur de 5 %. Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes (P < 0,05), comparant ME et NE, sont représentés par des lettres. Les valeurs en gras sont les teneurs les plus remarquables significativement.	96
Tableau II.5 Teneur en hormones endogènes dans des masses embryogènes (ME) et des calcs non-embryogènes (NE) de nos trois génotypes (TD15-1, SD4-8 et TD17-1) de Douglas après 2 semaines de multiplication (moyenne ± IC à 5 %). AIA : acide indole 3-acétique, ABA : acide abscissique, ABA-GE : ABA glucose ester ; CKs isoprénoïdes : cytokinines actives de forme isoprénoïdes, c-Z (cis-Zéatine), t-Z (trans-Zéatine), DHZ (DehydroZéatine), iP (isopentenyladenine); CKs aromatiques : famille de la benzyl adénine (BAP). R (riboside) : forme active riboside ; R-ph : forme précurseur riboside phosphate ; OG et ROG : forme de désactivation (stockage) réversible O-glucosylée ; 3G, 7G et 9G : forme de désactivation irréversible N-glucosylée. Les valeurs correspondent à 3 ou 4 mesures ± IC à un niveau d'erreur de 5 %. Les groupes de significativité définis par comparaison multiple de moyennes (P < 0,05), comparant ME et NE, sont représentés par des lettres.	98
Tableau II.6 Répartition fonctionnelle (code GO de niveau 2 ou plus, catégorie fonctionnelle « Processus Biologiques ») des protéines différentiellement exprimées entre ME et NE des 3 génotypes de Douglas étudiés (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Le tableau donne le nombre de hits impliqués dans chaque catégorie fonctionnelle. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de hits (occurrence) par groupe fonctionnel rapporté au nombre total de GO dans cette catégorie.	104

Tableau II.7 Répartition fonctionnelle (code GO de niveau 2 ou plus, catégorie fonctionnelle « Processus Biologiques ») des transcrits différentiellement exprimés entre ME et NE des 3 génotypes de Douglas étudiés (TD15-1, SD4-8 et TD17-1). Le tableau donne le nombre de hits (occurrence) impliqués dans chaque catégorie fonctionnelle. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de hits par groupe fonctionnel rapporté au nombre total de GO dans cette catégorie. 108

Tableau II.8 Récapitulatif des groupes fonctionnels marqueurs communs aux trois génotypes de Douglas (TD15-1, SD4-8 et TD17-1), obtenus après analyses différentielles en protéomique et en transcriptomique des masses embryogènes (ME) et des calcs non-embryogènes (NE)..... 122

Tableau III.1 Répartition fonctionnelle selon les lignées primaires (I : SD4 et TD17) et secondaires (II : SD4-2, SD4-6, SD4-8 et TD17-1) des 475 transcrits différentiellement exprimés en fonction de leur code GO (Gene Ontology) dans la catégorie fonctionnelle « processus biologique » chez le Douglas. Le nombre de protéines est le nombre de celles-ci impliquées dans chaque groupe (une protéine pouvant en avoir plusieurs). Le pourcentage correspond au nombre de protéines par groupe sur le nombre total retrouvées dans tous les groupes principaux. 217

Tableau III.2 Identification des 12 transcrits communs avec le protéome, surexprimés dans lignées secondaires (TD17-1, SD4-2, SD4-6 et SD4-8) de Douglas après deux semaines de multiplication. L'accession, ainsi que la description des gènes/protéines peuvent être retrouvées sur la base de données PineRefSeq (http://dendrome.ucdavis.edu/ftp/Genome_Data/genome/pinerefseq/Psme/v1.0/gene_models/Psme.allgenes.transcripts.fasta). FC : ratio calculé entre les moyennes d'expression des lignées I et II dans les analyses de transcriptomique ; Nombre de GO : décompte des GO associés à chaque accession (pouvant appartenir aux catégories processus biologique, fonction moléculaire, et composant cellulaire) ; GO Biological process : Groupe GO à un niveau 2 ou plus..... 220





Résumé de thèse : Aptitude du Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) à l'embryogenèse somatique : approches de physiologie cellulaire et moléculaire via l'analyse du protéome et du transcriptome

Au cours des prochaines décennies, les besoins en bois vont entraîner une pression considérable sur la production forestière. Pour le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), deuxième essence utilisée pour le reboisement des forêts françaises, le développement et la diffusion de variétés améliorées par sélection classique est lente. Chez les conifères l'embryogenèse somatique, méthode de multiplication végétative la plus performante, a été développée avec succès. Cependant elle n'est obtenue à ce jour qu'à partir de matériel juvénile (graines) malgré les nombreux travaux engagés. Les objectifs de ce travail de thèse ont été de **1)** caractériser à différentes échelles l'aptitude à l'embryogenèse somatique en comparant des masses embryogènes (**ME**) et des cals non-embryogènes (**NE**) isogéniques, **2)** caractériser les marqueurs responsables de la variation du potentiel embryogène en comparant aux niveaux cellulaire et moléculaire, les **ME** primaires à des **ME** secondaires et tertiaires obtenues lors de la ré initiation de l'embryogenèse somatique à partir d'ES cotylédonaire.

1) Pour le premier objectif, nous avons rapproché des données de protéomique et de transcriptomique, que nous avons complétées par des observations biologiques (potentiel embryogène), histologiques, et biochimiques (teneur en eau, glucides, régulateurs de croissance). Nous avons observé chez les **ME** une surexpression des marqueurs impliqués dans la différenciation (hormones, facteurs de transcription) et la division cellulaire (événements de mitose, teneur en glucides, information génétique). Nous avons retrouvé certains facteurs de transcription marqueurs de l'embryogenèse somatique : *WOX*, *LEC1*, *SERK1*, *BBM*. En comparaison, les **NE** sont caractérisés par la réponse aux stimuli (ABA, phénols, protection contre les ROS), mais aussi par le stockage de réserves carbonées (amidon).

2) Le potentiel embryogène des **ME** secondaires et tertiaires augmente significativement. Au niveau cellulaire, cela se traduit par une amélioration de la structuration des ES (diminution de centres polyembryogènes au profit d'ES isolés). Le rapprochement des données de protéomique et de transcriptomique ont mis en évidence que lors de cette reprogrammation cellulaire il y a surexpression du métabolisme des protéines, oxydatif, et hormonal. La présence de facteurs de transcription associés à la maturation de l'ES (*WRKY*, *NAC*, *ARF*, *ERF* et *MYB*) surexprimés précocement pourrait aussi être une caractéristique ciblant un plus fort potentiel embryogène chez le Douglas.

Nos résultats contribuent à une meilleure compréhension de l'aptitude à l'embryogenèse somatique du Douglas. Ils pourraient permettre *in fine* d'initier l'embryogenèse somatique à partir de matériel âgé.

Mots clefs : *Embryogenèse somatique, histologie, multiplication, potentiel embryogène, protéomique, transcriptomique, Douglas, masse embryogène, cal non-embryogène.*

