

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF ET D'UN GÈNE COR DE
FONCTION INCONNUE LORS DE L'ACCLIMATION AU FROID
CHEZ LE BLÉ D'HIVER

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR
KARL MICHAEL TAMOUYA TATIENTSE

DÉCEMBRE 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Jean Danyluk pour m'avoir donné l'opportunité d'étudier dans son laboratoire. Son support durant toute ma maîtrise et ce malgré les nombreux obstacles que j'ai rencontré m'a permis de rester serein et assez confiant. Sa bonne humeur, sa patience, sa confiance m'ont poussé à continuer à chercher, penser, comprendre et à me réjouir des avancées effectuées durant ma maîtrise.

Je n'oublierai pas la participation des membres de mon laboratoire qui ont toujours été de très bons conseils, Mohamed Badawi, Zahra Agharbaoui, Mohamed Zayed, ainsi que tous les professeurs qui ont permis, tout au long de ma maîtrise de forger la personne que je suis aujourd'hui.

Je n'oublie pas toutes les personnes formidables du pavillon SB que j'ai eu le privilège de côtoyer durant ces dernières années, que ce soit d'autres étudiants, techniciens, enseignants et chercheurs.

Je crois que je ne pourrais jamais assez remercier ma famille qui est ma source d'inspiration. Je ne me serais sûrement pas rendu ici sans eux. Merci de toujours croire en moi et en mes projets professionnels et personnels. Merci pour votre présence, soutien, encouragement et amour. Vous êtes formidables.

Et merci à DIEU par qui et avec qui j'ai pu entreprendre tout ce que j'avais à entreprendre. À jamais je remets ma vie entre tes mains.

DÉDICACES

À ma très chère mère Monique Madam Epse Tamouya, forte et brave: Tu représentes pour moi le symbole de la bonté et de la détermination par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

À la mémoire de mon père Pierre Tamouya aucun mot ne saurait exprimer l'amour, le respect et la gratitude que j'ai et aurai toujours pour toi. Et je ferai toujours honneur à ton nom.

À ma très chère femme, ton entrée dans ma vie m'a complété et dès lors j'ai entrepris ce qui me paraissait inaccessible. Tu es mon moteur et je vois mon avenir dans tes yeux.

A mes très chers frères et leurs compagnes. Yan, tu es le corps de cette famille, tu es mon modèle, mon exemple de courage, détermination et humilité, merci de m'avoir mis sur ce chemin. Henri, tu es le cœur de cette famille. Tu es mon exemple de gentillesse, force et intégrité, merci pour ta présence dans tous les moments de ma vie.

À mon fils et mes chers neveux et nièces. Vous êtes la représentation de l'amour, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder en son sein et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers car vous êtes notre avenir.

À la mémoire de mes oncles Tonton Samuel et Tonton Mamadou. Je vous remercie car vous avez contribué à l'édification de l'homme que je suis.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
RÉSUMÉ	XIII
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.1 Introduction.....	1
1.2 Impact du froid.....	2
1.2.1 Stress par le froid.....	3
1.2.2 Perception du stress par les plantes	4
1.2.3 Les gènes régulés par le froid (COR)	10
1.2.4 Les superhélices.....	14
1.2.5 Régulation de l'expression des gènes	17
1.3 L'épissage alternatif.....	22
1.3.1 Définition.....	22
1.3.2 Rôles	25
1.3.3 Mécanismes de l'épissage alternatif.....	28
1.4 Problématique	33

CHAPITRE II	
MATERIELS ET METHODES.....	36
2.1 Matériel végétal et conditions de croissance.....	36
2.2 Analyse des Profils d'expression des Gènes	37
2.2.1 Isolement d'ARN	37
2.2.2 Analyse par RT-PCR.....	37
2.2.3 Analyse par qRT-PCR.....	39
2.3 Purification et analyse des protéines.....	40
2.3.1 Expression des protéines de fusion de NC2-His (4A) et des mutants 5A et 6A avec His-tag	40
2.3.2 Production des protéines recombinantes	41
2.3.3 Purification protéique des protéines de fusion sur colonne (Ni-NTA)...	41
2.4 Analyses bio-informatiques	42
2.4.1 Analyse des gènes sujets à EA	42
2.4.2 Analyse de NC2.....	43
CHAPITRE III	
RESULTATS	44
3.1 Identification des gènes candidats.....	44
3.2 Analyse des Profils d'expression des gènes cibles	47
3.3 Identification de gènes présentant un Épissage alternatif induit par le froid	52
3.4 Caractérisation des isoformes de SRp30 par bio-informatique.....	58
3.5 Caractérisation d'un gène régulé par le froid et codant pour une protéine de fonction inconnue	60
3.6 Données sur NC2	61

3.7 Séquences et données structurales	67
3.8 Prédiction de la structure primaire des protéines	68
3.9 Analyse de caractéristiques in vitro	74
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	77
4.1 Analyse sur l'EA induit par le froid	77
4.1.1 Gènes induits lors de l'acclimatation au froid	77
4.1.2 Épissage alternatif induit par le froid.....	79
4.2 Analyse de NC2	83
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	87
BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation d'une superhélice	16
1.2 Schéma général des différentes étapes de l'épissage du pré-ARNm par le splicéosome majeur.....	24
1.3 Modèle résumé d'épissage alternatif d'un transcrit contenant un exon alternatif	25
1.4 Les différents types d'épissage alternatif.....	30
1.5 Organisation structurale des sous-familles de protéines Sérine/Arginine	32
1.6 Rôles des protéines Sérine/Arginine dans la sélection du site d'épissage.....	33
3.1 L'induction des gènes COR par le froid	49
3.2 L'induction des gènes Sérine/Arginine par le froid	51
3.3 Analyse par RT-PCR des gènes COR sélectionnés chez deux variétés de blé afin d'évaluer l'induction de l'épissage alternatif par le froid.....	56
3.4 Analyse par RT-PCR des gènes Sérine/Arginine sélectionnés chez deux variétés de blé afin d'évaluer l'induction de l'épissage alternatif par le froid.....	57
3.5 Diagrammes schématiques des transcrits du gène SRp30 alternativement épissé lors de l'acclimatation à froid du blé d'hiver Norstar	60
3.6 Profil d'expression tissulaire chez le blé du gène NC2 provenant des données de puces à ADN	64
3.7 Profil d'expression du gène NC2 induit par des stimuli abiotiques chez <i>Triticum aestivum</i> provenant des données de puces à ADN	65

3.8 Profil de l'expression du gène NC2 induit par différents stress abiotiques autre que le froid chez <i>Triticum aestivum</i> provenant des données de puces à ADN	66
3.9 Alignement des séquences protéines homologues à la protéine codée par NC2	71
3.10 Vue circulaire de la région en superhélice de NC2.....	74
3.11 Analyse de l'expression protéique	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Liste des gènes cibles et des amorces utilisées	38
3.1 Identification des gènes par bio-informatique.....	46
3.2 Liste et caractéristiques des différents homologues de NC2	68
3.3 Analyse des régions en superhélice de la protéine de NC2	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	«Antifreeze protein»
AG	Acide gibbérellique
AMT	Arginine N-méthyltransférase 1
AP1	Apetala1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine-triphosphate
Aux/Iaa	«Auxine/indole-3-acetic acid»
AXR1	«Auxin resistant 1»
BHLH18	«Transcription factor bHLH18-like»
BRC1	«Branched1»
CAL	«Cauliflower»
CBF	«C-repeat binding factor»
CDPL	«Cell-delineating protein-like»
CK	Cytokinine
COR	«Cold regulated»

DMT1	«DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1-like»
DREB	Facteur de liaison aux éléments sensible à la déshydratation
EA	Épissage alternatif
EMSA	«Electrophoretic mobility shift assay ou analyse de retard de migration sur gel»
ESE	«Exonic splicing enhancer»
ESS	«Exonic splicing silencer»
HLMT2D	«Histone-lysine N-methyltransferase 2D-like»
HMG	«High mobility group box: HMG1/2-like»
HnRNP	«Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein»
HSP	«Heat shock proteins»
ICE	«Inducer of CBF expression»
FUL	«Fruitful»
LEA	«Late embryogenesis abundant»
LT65	«Low-temperature-induced 65 kDa protein-like»
MADS	MCM1, AGAMOUS, deficiens et serum response factor
MAX	«More axillary branching»
MBP2	«Myrosinase-binding protein 2-like»
NC	Non caractérisé»
NMD	«Nonsense-mediated mRNA decay»
NSP	«Nitrile-specifier protein 5»
NTFY	«Nuclear transcription factor Y subunit A-5-like»

ODL14	«Obtusifolios 14- α demethylase-like»
OF2	«2-oxoglutarate-Fe(II) type oxidoreductase-like»
P22	«Protein 22-like»
PCP	«Pyrrolidone-carboxylate peptidase»
PIN	«Pin-formed auxin efflux carriers»
PLACE	«Plant cis acting regulatory elements»
PRL3	«Protein RADIALIS-like 3»
PRR37	«Pseudo reponse regulator 37»
PSII	Photosystème II
RBD	Domaine de liaison à l'ARN
RISC	«RNA-induced silencing complex»
RITS	«RNA-induced transcriptional silencing»
RRM	Motif de reconnaissance d'ARN
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
RS	Arginine/Sérine
SL	Strigolactone
SMC	Structural maintenance of chromosomes
SR	Sérine/Arginine
TB1	«Teosinte branched1»
VMT	Virus de la mosaïque du tabac
VRN1	«Vernalization1»

RÉSUMÉ

Parmi les différents facteurs abiotiques, la température et l'eau sont les éléments qui ont régi la distribution géographique des plantes. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact du froid sur le blé d'hiver. Ainsi, les plantes survivent aux basses températures à l'aide d'un phénomène connu sous le nom d'acclimatation au froid. Bien qu'il fût caractérisé chez de nombreuses espèces de plantes, il reste encore beaucoup de choses à découvrir et à exploiter. Des études ont révélé qu'à la suite d'une exposition au froid, les plantes subissent un stress qui agit au niveau cellulaire avec comme conséquence majeure, une modification de l'expression des gènes qui aboutira à des plantes tolérantes ou sensibles. Cette modification de l'expression des gènes se fait au niveau, transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Pour notre étude, nous nous sommes intéressés d'une part sur une modification post-transcriptionnelle, l'épissage alternatif car il est impliqué dans l'adaptation des plantes aux stress environnementaux. Pour cela, nous avons examiné l'expression et l'épissage alternatif de plusieurs gènes (COR=régulés par le froid et SR=facteurs d'épissage) contenant au moins un intron durant l'acclimatation au froid chez le blé (*Triticum aestivum*) durant l'acclimatation au froid. Nous avons appris que le froid n'agit pas sur tous les gènes de la même façon. Sur les 18 gènes COR analysés, un seul a présenté des signes d'épissage alternatif (EA) induit par le froid, et cinq ont présenté une variation d'expression significative (au moins 20 fois) induite par le froid. Chez les gènes SR, les candidats présentant l'EA furent plus nombreux car au moins 5 ont été détectés. Nous avons décidé de prédire l'impact de l'EA sur les gènes SR, ceci par l'analyse bio-informatique d'un gène SR (SRp30). C'est ainsi que nous avons observé des modifications de la séquence nucléique chez différents isoformes de SRp30 par l'EA, tel que l'apparition d'un codon d'arrêt précoce. Ce dernier causerait une modification de la protéine sérine/arginine (SR), soit par la perte d'une grande partie de la séquence protéique, soit par la perte d'une partie de la région riche en sérine et arginine. Lors de cette analyse, nous avons appris que de ces cinq gènes COR analysés, certains n'avaient pas été caractérisés. Raison pour laquelle comme second objectif, nous avons commencé la caractérisation de l'un d'entre eux (NC2 qui coderait pour une protéine de 156 acides aminés) afin d'étudier sa contribution dans l'acclimatation au froid. Les analyses bioinformatiques indiquent que NC2 coderait pour une protéine possédant un domaine transmembranaire, une région hydrophobe en hélices α et un domaine ayant la propriété de former une superhélice. À l'issue de cette étude, nous avons appris que certains gènes SR et COR présentent un EA induit par le froid et ceci peut influencer les variantes protéiques présentes durant l'acclimatation au froid. De plus, notre étude bio-informatique sur NC2 montre

qu'il est possible d'identifier/suggérer que des propriétés spécifiques joueraient des rôles fonctionnels qui contribueraient à l'acclimatation au froid.

Mots clés: *Triticum aestivum*, acclimatation au froid, modifications de l'expression, épissage alternatif, gène Sérine/Arginine, gène COR

CHAPITRE I

REVUE DE LITTERATURE

1.1 Introduction

Le blé est une plante monocotylédone de la famille des graminées du genre *Triticum* avec de nombreuses espèces parmi lesquelles *aestivum*, *durum*. Sur le plan économique, il existe deux principales variétés de blé, le blé dur dit *Triticum durum* et le blé tendre dit *Triticum aestivum*. Le blé dur se différencie du blé tendre principalement par sa teneur en gluten qui y est plus élevée et il est aussi plus sensible au froid ce qui fait qu'il est plus cultivé dans les régions arides, ce blé est principalement utilisé pour la production de pâtes alimentaires et de couscous. Concernant le blé tendre, sur le plan de la répartition géographique, il est la variété la plus cultivée dans le monde car il tolère beaucoup plus le froid, les hautes altitudes, et également la sécheresse. La consommation mondiale de blé et sa culture sont en constante augmentation, ce qui fait qu'il est même cultivé dans les régions du monde avec un climat très difficile tel que le Canada et la Russie.

Le blé a de nombreux produits dérivés utilisés en agroalimentaire, dans l'élevage, dans l'industrie brassicole et des spiritueux. Selon le *CONSEIL INTERNATIONAL DES CÉRÉALES*, la production mondiale a été estimée à 740 millions de tonnes pour 2017, et c'est la deuxième céréale la plus produite au monde (Conseil International Des Céréales (IGC), 2018). Le Canada qui est l'un des 10 principaux producteurs de blé avec une production d'environ 20 millions de tonnes entre 2016 et 2017 (Conseil

International Des Céréales (IGC), 2018) a favorisé la culture du blé de printemps par rapport au blé d'hiver, à cause des niveaux de tolérance au gel insuffisante chez les cultivars hiver commerciaux. Bien que l'on ne puisse agir sur le climat une bonne connaissance de l'impact des paramètres climatiques tels que la température, l'humidité et la luminosité sur les mécanismes d'acclimatation au froid permettront d'apporter des ajustements nécessaires à la culture du blé de printemps en période de froid et même d'améliorer les génotypes d'hiver afin de permettre leur culture au Canada.

1.2 Impact du froid

Les plantes subissent constamment l'action des facteurs environnementaux qui agissent sur le développement et leur distribution géographique comme des sources de stress. Les plantes ont développé des mécanismes pour s'adapter à ces facteurs grâce à différents ajustements. Les stress environnementaux sont de deux ordres, soit biotique c'est-à-dire lié à un organisme vivant, soit abiotique lié aux facteurs physico-chimique. Le froid appartient à cette dernière classe de stress.

Le stress par le froid a deux paliers, les températures dites de refroidissement comprises entre 0°C et 15°C, et les températures de congélation qui sont inférieures à 0°C. L'action du froid sur les plantes de manière générale se fait à différents niveaux de développement et de croissance ceci à travers différentes modifications physiologiques. Il agit sur la germination, sur les systèmes racinaires et foliaires, sur l'hydratation et l'osmolarité, et sur la photosynthèse (Ameziane El Hassani et Persoons, 1994). Tout ceci aboutissant soit à la mort de la plante qui sera alors qualifiée de sensible au froid, soit à la survie de la plante qui dans ce cas sera qualifiée de tolérante au froid. La tolérance au froid se fait via l'acclimatation au froid qui est un phénomène induit et réversible (Thomashow, 1999). Il commence avec la

perception des signaux de stress au niveau de la membrane cellulaire et par la suite s'enchaîne un ensemble de réactions en cascade appelé signal de transduction qui causera des altérations du niveau d'expression des gènes (près de 10% à 25% des gènes), et c'est de l'efficacité de cette variation d'expression génique que dépendra l'établissement de l'acclimatation au froid (Ouellet et Charron, 2001).

1.2.1 Stress par le froid

Il est clair que le froid est nocif pour les plantes sensibles et leur cause des dommages, il est qualifié de stress. Pour survivre, les plantes doivent procéder à des ajustements métaboliques (des sucres, des acides aminés et des acides gras), ainsi que des régulations physiologiques afin de répondre à ce stress (Ouellet et Charron, 2001). Concernant les dommages causés par le froid, ils sont liés aux types de températures présents. Les températures de congélation chez certaines plantes causent la formation de glace dans les tissus en plus d'autres événements liés aux basses températures, tandis que les températures de refroidissement peuvent endommager la plante sans formation de glace dans les tissus. De manière générale, les basses températures causent une chlorose et un ralentissement du développement des plantes, ces limitations contribuent à la distribution géographique de la culture des plantes dans le monde (Sanghera et al., 2011), l'on peut citer par exemple les céréales (riz, soja, etc.), les fruits tropicaux (mangues, bananes, etc.) et subtropicaux (raisins, oranges, etc.). Cependant l'étude des plantes des régions tempérées, nous a appris qu'elles présentaient différents degrés de tolérance au froid, et que ces niveaux de tolérance sont liés aux variétés, à la durée d'exposition et aux températures (Thomashow, 1999). Cette acclimatation au froid provient des ajustements aussi bien génétiques que physiologiques.

1.2.2 Perception du stress par les plantes

1.2.2.1 Effet du stress par le froid

Il est intéressant de voir comment le froid agit sur les plantes. Il est ressorti que les principales conséquences chez les plantes sensibles au froid sont l'inhibition de l'absorption d'eau causée par un stress oxydatif ce qui modifiera la structure des membranes qui deviendront plus rigides, associée au réarrangement du cytosquelette à l'entrée massif de calcium (Ouellet et Charron, 2001), et à la fuite des électrolytes associée à une désactivation des protéines membranaires (Seo et al., 2010). En cas de gel, on aura une déshydratation cellulaire provoquée par la formation de cristaux de glace (nucléation) dans l'espace extracellulaire qui causera une déshydratation cytoplasmique par mouvement de l'eau vers les cristaux (Ouellet et Charron, 2001). Cette nucléation aboutira à des lésions au niveau des membranes dues au grossissement des cristaux de glace (Thomashow, 1999). Ainsi, chez les plantes sensibles tous ces dommages ont généralement des conséquences irréversibles.

1.2.2.2 Mécanisme de l'acclimatation au froid

La membrane fut confirmée comme étant le site de perception du froid et le premier site de dommages causés par ce dernier, ceci par la rigidification membranaire causée par le froid. Dans le cas des températures inférieures à 0°C, il y a une augmentation de la désaturation des lipides membranaires chez les plantes tolérantes afin de maintenir la fluidité membranaire (Ouellet et Charron, 2001), et ainsi prévenir des dommages structuraux causés par la nucléation tel que la lyse de la membrane par expansion de cristaux qui est facilitée chez des membranes rigides. Par la suite, de nombreux mécanismes biochimiques sont mis en œuvre afin de maintenir la fluidité membranaire.

Les plantes vont changer leur composition en lipides membranaires, en induisant la synthèse et de l'activation des enzymes nécessaires pour la désaturation et l'hydrolyse des acides gras (Ouellet et Charron, 2001). C'est ainsi que l'on observe une augmentation de la synthèse des phospholipides qui passeront de 46,8% à 57,1%, et des di-insaturés et des phosphatidyléthanoline qui passeront respectivement de 36,9 à 42,8% et de 28,6 à 34,9% de la quantité des lipides totaux. Une diminution des acides gras mono-insaturés et des phosphatidylcholines membranaires qui passeront respectivement de 60,8 à 54,8% et de 67,6 à 61,4% de la quantité des lipides totaux (Côme et Corbinau, 1992; Uemura et al., 1995). Il faut noter que ce phénomène d'ajustement du degré de saturation des lipides membranaires survient chez toutes les membranes cellulaires. C'est le cas des acides gras triénoïques au niveau de la membrane des thylakoïdes chez les chloroplastes (Roughan, 1985).

1.2.2.3 Mécanisme de perception et de signalisation lors du stress par le froid

Changements de la membrane cellulaire et Ca^{2+} dans l'acclimatation au froid

Il a été indiqué que les signaux de stress au froid sont perçus au niveau membranaire par des modifications structurales. Toutefois, bien que l'existence d'éventuels récepteurs primaires situés dans la membrane cellulaire ainsi que leur lien dans la voie de signalisation du froid ait été reconnu, leur nature exacte n'a pas encore été établie. Ces hypothèses s'appuient sur des études menées chez les bactéries, les histidines kinases transmembranaires telles que le HIK33 (cyanobactérie) et le DesK (*Bacillus subtilis*) ont été suggérées comme thermosenseurs (Aguilar et al., 2001; Suzuki et al., 2000). Ces travaux ont permis de confirmer que c'est la membrane plasmique qui est le principal capteur du froid et que c'est elle qui active les systèmes relais des réponses secondaires aux signaux du froid. Cependant, certains chercheurs suggèrent que les kinases seraient des capteurs de signaux. L'on peut citer l'histidine

kinase ATHK1 connue comme étant un osmo-capteur chez *Arabidopsis thaliana*; des travaux chez les levures ont révélé que son expression confère une forte tolérance au stress osmotique (Urao et al., 1999), ce qui est assez intéressant sachant le lien entre le stress osmotique et le stress au froid (Gilmour et al., 2000). Ou encore la protéine réceptrice membranaire NtC7 dont l'expression chez du tabac transgénique contribue activement dans la tolérance au stress osmotique (Tamura et al., 2003). Ainsi, bien qu'aucun de ces récepteurs membranaires du froid ne furent caractérisés, ces chercheurs ont suggéré que c'était le changement conformationnel induit par la température dans le domaine extracellulaire de ces protéines réceptrices qui induirait l'activité kinase sur le côté cytoplasmique. Malgré toutes ces informations, la question de savoir comment ces kinases sont impliquées dans la signalisation lors du stress au froid reste en suspens.

Par la suite, des études ont montré que les signaux de Ca^{2+} interviennent dans différents stress abiotiques parmi lesquels le froid. Ces signaux agissent comme des transducteurs et régulateurs dans de nombreux processus d'adaptation et de développement des plantes, ceci en induisant un afflux soudain de Ca^{2+} provenant d'espaces intracellulaires dans le cytoplasme (Ouellet et Charron, 2001). Par la suite, ces signaux Ca^{2+} furent identifiés comme étant le signal secondaire pendant la signalisation lors d'un stress abiotique (Knight, 1999). Chez *Arabidopsis*, le capteur de Ca^{2+} , CAS, a été localisé dans la membrane plasmique et son rôle dans la signalisation du Ca^{2+} , l'ouverture et la fermeture stomatique a été confirmé (Han et al., 2003). De ce fait, la signalisation au froid dans les plantes peut être la conséquence de l'afflux de Ca^{2+} ce qui causera la rigidification de la membrane par la réorganisation des microfilaments d'actine. De plus, les principales voies de transduction de la signalisation du Ca^{2+} ont été étudiées, et il a été révélé que ces voies impliquent des kinases régulées par le Ca^{2+} (Monroy and Dhindsa 1995). Les plantes possèdent différents types de capteurs de Ca^{2+} . Nous avons les CDPK et les

calmodulines (CaM) qui fonctionnent respectivement comme régulateurs positifs et négatifs de l'expression des gènes et de la tolérance au froid (Saijo et al., 2000; Townley et Knight, 2002). Il y a aussi les CAMTA qui régulent les facteurs CBF, tel que CAMTA3 qui fut identifié comme un activateur de CBF2 / DREB1C (Doherty et al., 2009). De plus, il a été démontré que les événements en aval de la signalisation associés à la détection de ROS impliquent le Ca^{2+} tels que la calmoduline, et l'activation de la signalisation des phospholipides conduisant à l'accumulation d'acide phosphatidique (Mittler et al., 2004).

Signalisation chimique

Les hormones végétales jouent un rôle central dans la capacité des plantes à s'adapter aux changements de l'environnement. Dans l'établissement d'une réponse au stress par le froid on observe l'intervention de différentes phytohormones, entre autre on peut citer l'acide abscissique (ABA), l'auxine, l'acide gibbéréllique (AG), cytokinines (CK) et l'éthylène (Lee et al., 2005).

L'ABA est bien connu comme un signal pour plusieurs contraintes abiotiques, en particulier le déficit hydrique. Durant l'acclimatation au froid, il sert de signal secondaire et intervient dans la transduction des signaux via les messagers secondaires tel que les peroxydes et le calcium (Ouellet et Charron, 2001). Suite à une exposition au froid, les variations de la quantité d'ABA dans la cellule conduit à des modifications physiologiques et à l'activation de certains gènes. C'est le cas des gènes COR (par exemple, CBF1, CBF2, CBF3 (Knight et al., 2004) et CBF4 (Chinnusamy et al., 2004).

L'auxine ou acide indole 3-acétique est une phytohormone bien connue pour ses rôles essentiels dans différents aspects de la croissance, du développement et des

modifications adaptatives des plantes dans un environnement précis, ceci au travers son implication dans les processus tels le modelage des embryons, l'organogenèse, le modelage du méristème et les tropismes (Vieten, 2007). Des études ont montré que chez les plantes, le froid agit sur la concentration et la distribution de l'auxine, et une corégulation de certains gènes par l'auxine et le froid (Shibasaki et al., 2009), pouvant causer par exemple une inhibition du développement de la racine.

Tout comme l'auxine, l'AG agit sur l'architecture de certaines plantes et subit les effets de la température. Il est connu pour jouer un rôle majeur chez la plante au travers sa voie de signalisation via l'intermédiaire des protéines DELLA. Il intervient dans la germination des graines, l'expansion des feuilles, l'allongement de la tige et de la racine, le temps de floraison et le développement des fruits (Willige et al., 2007). Ainsi les protéines DELLA restreignent la croissance des plantes, tandis que l'AG favorise la croissance en ciblant les protéines DELLA pour les détruire, aboutissant à une modulation de la croissance et de la réponse de la plante face à une variation environnementale.

Concernant l'éthylène, l'on sait qu'il régule les multiples aspects de la croissance et du développement des plantes, et des réponses au stress environnemental comme sa contribution dans la synthèse des protéines antigels (Yu et al., 2001). La surexpression du gène *ETO1* intervenant dans la synthèse de l'éthylène, ou de ses précurseurs tel que l'AACPC augmente la sensibilité au froid, cependant l'addition d'inhibiteur de la synthèse de l'éthylène tel que l'aminooéthoxyvinyl-glycine corrige cette sensibilité induite (Shi et al., 2012). Ceci sous-entend que l'éthylène est un régulateur négatif de la tolérance au froid.

Les CK ont été identifiés comme des régulateurs de nombreux processus biologiques, ils protègent contre le stress osmotique en favorisant une augmentation de la

résistance à la déshydratation cellulaire (Argueso et al., 2009). Bien qu'il n'y ait pas de preuve directe de l'implication des CK dans le stress au froid, il y a l'existence d'interactions entre la voie de signalisation CK et celle d'ABA dans la régulation de la croissance et du développement des plantes. Ceci suggère un lien indirect avec la tolérance au froid. Par exemple, chez des plantes présentant une déficience en CK, on observe une sensibilisation accrue à l'ABA durant un stress oxydatif et l'activation des CK induit l'inhibition de la signalisation de l'ABA (Nishiyama et al., 2011). Il y a encore beaucoup à faire afin d'éclaircir l'action de CK lors de ce stress.

La compréhension actuelle de l'action hormonale repose sur l'hypothèse que les systèmes de signalisation hormonaux constituent un réseau interconnecté avec plusieurs entrées et sorties, ce qui permet d'envisager des liens directs ou indirects entre l'acclimatation au froid et les différentes phytohormones.

Variation hydraulique, du pH et autres molécules de la signalisation lors du stress par le froid

Des études ont démontré que l'établissement de l'acclimatation au froid présente des caractéristiques liées aux stress hydriques tel que la similarité entre la déshydratation cellulaire induite par la congélation et celle induite par la sécheresse (Pearce, 2001). Aussi la conversion des signaux hydrauliques en la signalisation de l'ABA cause des changements de tension d'eau ou du potentiel osmotique. Sur cette base, il est normal de suggérer une implication d'évènements hydrauliques dans l'établissement de l'acclimatation au froid.

L'on sait que le pH intervient comme signal dominant dans le processus de signalisation sous différents stress, comme c'est le cas du stress hydrique ou du stress salin (Kader et Lindberg, 2010). Ainsi sur la base d'études menées sur les variations

du pH cellulaire liées aux stress abiotiques, l'on peut citer le fait que des changements du pH apoplastique peuvent affecter la façon dont l'ABA régleme le comportement et la croissance stomatique (Davies et al., 2005). Par exemple, la diminution du pH cytosolique des cellules de graines d'*Arabidopsis thaliana* due à l'inhibition des pompes H^+ par l'ajout d'ABA, cause un arrêt ou un ralentissement de la germination (Planes et al., 2014). Il existe un lien entre le pH et la signalisation calcique (Kader et Lindberg, 2010). Compte tenu des différentes interconnexions entre le stress au froid et le signal osmotique, hydraulique et calcique, l'on peut suggérer que les variations du pH peuvent affecter l'ensemble des événements causés par le froid.

1.2.3 Les gènes régulés par le froid (COR)

La dénomination de COR (aussi appelé LTI, KIN, RAD ou ERD) sont ces gènes dont l'expression est régulée par le froid, et ceci juste quelques heures après exposition. Ils ont été classés en deux différents groupes. Dans le premier groupe, on retrouve les gènes codant pour des agents de protection de la plante contre un stress environnemental (LEA, AFP), et dans le deuxième, les gènes agissant dans la régulation de l'expression des gènes et la transduction du signal du stress. Ainsi des études leur ont reconnu de nombreuses fonctions et impacts dans la plantes. Par exemple, le gène *cas30* est induit par la rigidification de la membrane plasmique, et l'accumulation de la protéine cas30 favoriserait la fluidité membranaire (Örvar et al., 2000). De plus, il a été prouvé que les facteurs de transcription appelé CBFs sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes *COR* et de l'acclimatation au froid (Gilmour et al., 2000).

1.2.3.1 Antifreeze proteins (AFP)

Les protéines AFP ont été identifiées dans plusieurs organismes vivants pendant l'hiver comme les poissons tolérants, les plantes vasculaires et non vasculaires et les bactéries. Des chercheurs ont révélé que dans le cas des plantes, elles s'accumuleraient durant l'acclimatation au froid dans l'apoplasme des feuilles et du collet (Griffith et Yaish, 2004). Elles sont dites protéines d'hystérésis thermiques de par leur capacité à se lier à la surface des cristaux de glace et ainsi elles inhibent la liaison de molécules d'eau supplémentaires aux cristaux ceci en diminuant la température de congélation sans affecter le point de fusion de la solution. Ceci entraîne la formation de facettes sur la surface cristalline et dans certains cas une inhibition de la recristallisation de la glace (Knight et Duman, 1986). Ceci permet de contribuer aussi bien à la protection des tissus contre les dégâts causés par le gel qu'à la stabilisation des membranes cellulaires. Ainsi leur action crée une différence entre le point de fusion et le point de congélation de l'eau, chez les végétaux, elle varie entre 0,2 et 1,6°C. De plus, les AFP de par la variabilité de leur structure et composition ont des sous-classes. Par exemple, on trouve six types d'AFP dans l'apoplasme des feuilles du seigle d'hiver. Leurs masses varient de 16 à 35 kDa et ces AFP codent pour des β -1,3-endoglucanases, des endochitinases, des protéines de type thaumatine et d'autres polypeptides (Griffith et Yaish, 2004).

1.2.3.2 Protéines LEA

Les protéines LEA sont des protéines abondantes à la fin de l'embryogenèse et jouent un rôle dans la tolérance à la dessiccation. Elles ont d'abord été trouvées chez le coton et le blé et sont produites en abondance au cours du développement des graines, composant près de 4% des protéines cellulaires (Hong-Bo et al., 2005). On les retrouve aussi dans les graines et organes végétatifs de nombreuses plantes, en

particulier en conditions de stress telles que le froid, la sécheresse ou la salinité élevée, mais leur fonction exacte n'est pas encore connue. Les gènes LEA ont été clonés dans plusieurs espèces de plantes, et basé sur la correspondance des motifs de leurs protéines, elles ont été classifiées en au moins six différents groupes, dont les groupes 1, 2 et 3 sont majoritaires.

Les protéines LEA ont pour caractéristique commune une composition d'acides aminés biaisée marquée par la faible représentation, voire l'absence, des résidus cystéine et tryptophane qui conduit à une hydrophilicité élevée (Hong-Bo et al., 2005) et à une stabilité thermique en solution. Les protéines du groupe 1 sont impliquées dans la fixation ou le remplacement de l'eau et ne sont présentes que chez les plantes. Chez le blé, la protéine *Em* est la séquence type. Ces protéines sont non structurées en solution (Swire-Clark et Marcotte, 1999), mais contiennent un motif d'acides aminés conservé de 20 résidus, le plus souvent en une copie (Battaglia et al., 2008). Les protéines du groupe 2 (aussi appelé déhydrines) et du groupe 4 peuvent contribuer au maintien de la structure protéique et membranaire (Battaglia et al., 2008), et se trouvent principalement dans les plantes, y compris les algues. Les protéines des groupes 3 et 5 ont été proposées pour la séquestration ionique (Battaglia et al., 2008). Concernant les protéines du groupe 6, elles sont structurellement déficiente de cystéine et de tryptophane (Battaglia et al., 2008). On leur a associé différentes fonctions, de molécules chaperonnes, de protéine nucléaire associée à la chromatine ou de facteur de transcription (Wise et Tunnacliffe, 2004). Structurellement, les prédictions suggèrent que les protéines LEA de la classe 3 forment de nombreuses hélices α alors que les protéines de la classe 1 et 2 seraient moins structurées (Wise et Tunnacliffe, 2004). De plus, elles peuvent changer de structure tridimensionnelle dans certaines conditions de stress, comme c'est le cas chez le soja de la protéine rGmD-19 qui passe d'un état non structurée à 10°C à un état structuré en hélices α à 80°C (Soulages et al., 2002). Concernant les protéines LEA des groupes 4, 5 et 6, ces

dernières ont une grande hydrophobicité due à leur faible quantité de résidus polaires et elles sont en général plutôt structurées, même en solution. De nombreuses études ont montré que les protéines LEA s'accumuleraient dans la plupart des compartiments cellulaires (cytosol, noyau, mitochondrie, plaste, réticulum endoplasmique, vacuole, membrane plasmique, etc.) et majoritairement dans le cytosol.

1.2.3.3 Autres gènes COR

Il est connu que l'acclimatation au froid chez les plantes est associée aussi à l'expression de nouveaux gènes, c'est le cas de *COR15a* et de *MsaciA* (Steponkus et al., 1998; Laberge et al., 1993), dont chacun code pour une protéine de fonction inconnue avec peu ou pas d'homologie de séquence avec les protéines induites déjà catégorisées. Cependant bien qu'étant de fonction inconnue, il fut clair que ces gènes avaient un rôle dans l'établissement de la tolérance au froid et au gel des plantes étudiées. Ils seraient également régulés par la chaleur (Artus et al., 1996; Laberge et al., 1993). Ainsi, afin d'évaluer la contribution de *COR15am* dans l'établissement de la tolérance au froid, une analyse comparative de son expression entre des plantes transgéniques et sauvages, chez des protoplastes, révèle qu'ils expriment constitutivement la protéine mature *COR15am* de 9,4 kDa dans le chloroplaste. Les protoplastes présentant une expression constitutive de *COR15am* se sont révélés plus tolérants à des températures de congélation comprises entre -4°C et -8°C que ceux isolés à partir de plantes NA de type sauvage (Steponkus et al., 1998). De plus, il a été suggéré que *COR15a* agirait avec d'autres gènes COR dans l'établissement de la tolérance au froid (Thomashow, 2001). Dans le cas de *MsaciA*, des études ont confirmé sa contribution à la tolérance au froid, c'est pour cela que bien que sa fonction dans ce phénomène ne soit pas claire, on lui privilégierait une action structurale (Nelke et al., 1999). Il lui est attribué une diversité protéique. Nous avons

appris que chez les plantes tolérantes au froid, il coderait pour différentes protéines dont la structure serait spécifique au tissu. Ils ont ainsi identifié chez la luzerne cultivée trois types dans les feuilles, et une dans le collet (Ferullo et al., 1997). NDong et al (2002) ont identifié des gènes *COR* qui codent pour des protéines contenant dans leur région C-terminal un motif qui est prédit à former une superhélice (NDong et al., 2002). Ils suggèrent que ces protéines pourraient interagir avec d'autres protéines afin d'accomplir leurs fonction dans le développement de la tolérance au froid.

Ainsi, l'acclimatation favoriserait l'expression de certains gènes qui auraient comme rôles la stabilisation des membranes cellulaire durant un stress au gel. Cependant compte tenu du manque d'information concernant le lien entre les changements survenus chez les protéines membranaires pendant l'acclimatation au froid, l'action de certains gènes *COR*, et à l'acquisition de tolérance au froid, il est important de caractériser de nouveaux gènes apparus durant l'acclimatation.

1.2.4 Les superhélices

1.2.4.1 Définition

Une superhélice est un motif structurel présent dans de nombreuses protéines naturelles. Elle est constituée généralement de faisceaux de deux à cinq hélices α qui sont enroulées ensemble les unes autour des autres formant ainsi différents états d'oligomérisation s'assemblant sous forme de cordes (Lupas, 1996), dont les plus fréquents sont les dimères et les trimères (Figure 1.1). Le plus souvent, elle consiste en deux, trois ou quatre hélices orientées dans les mêmes directions (parallèles) ou opposées (antiparallèles), mais des structures avec cinq hélices et plus ont été déterminées et même des faisceaux de faisceaux. C'est le cas du COMP

(Malashkevich et al., 1996) et de la cobalamine adénosyltransférase (St Maurice et al., 2007) qui sont respectivement des pentamères et hexamères. Ce sont en général des oligomères de même chaîne (homo) ou de chaînes différentes (hétéro), mais parfois des hélices consécutives de la même chaîne polypeptidique. Dans ces structures, la composition d'une hélice α est caractérisée par la répétition régulière d'acides aminés hydrophobes et polaires, qui s'étendent habituellement sur 20 résidus ou plus voir s'étendre sur plusieurs centaines d'acides aminés. Ainsi, le modèle en heptade qui est le plus vulgarisé et représenté par $[abcdefg]_n$, dans laquelle n indique le nombre de répétition de la séquence, les positions a et d sont occupées principalement par acides aminés hydrophobes créant une face amphipathique avec un ratio de résidus proche de 3,6 par tour (Rackham et al., 2010). Tout ceci aboutissant à des regroupements sous un angle d'environ 20° d'hélices α de structures amphipathiques avec des faces hydrophobes et polaires distinctes, et présentant des interactions a à a' et d à d' le long du noyau de la structure, ce qui aboutirait à la répétition de ces interactions tous les 7 résidus au deux tours de l'hélice (Lupas, 1996). Les résidus aux positions e et g sont occupées par des résidus chargés sur les hélices adjacentes, ils sont souvent impliqués dans des liaisons de type ponts salins inter-hélices.

Des chercheurs ont remarqué que l'empilement des hélices α voisines favorisent des déformations qui s'éloigne de la configuration normal de départ pour une superhélice $7/2$ (7 résidus sur 2 tours) avec un nombre rationnel de résidus par tour, tels que $11/3$, $15/4$ et $18/5$ (Lupas, 1996; Gruber et Lupas, 2003).

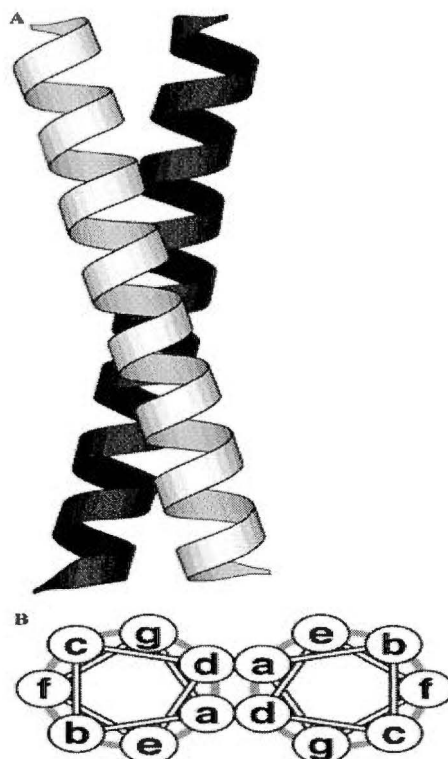


Figure 1.1 : Représentation d'une super hélice α . (A) Molscript (Kraulis, 1991) représentation du ruban pour la structure de GCN4-p1 (O'Shea et al., 1991). (B) Roue hélicoïdale montrant les positions relatives des sept résidus de la répétition de l'heptade dans une bobine enroulée en parallèle à deux brins. Le diagramme représente «l'espace de super-enroulement» dans lequel un heptade couvre exactement deux tours d'une hélice α super-enroulée.

1.2.4.2 Aspects fonctionnels

Les domaines en superhélice présentent une grande diversité de longueur et jouent divers rôles structuraux et dynamiques dans de nombreuses protéines. Ils assurent principalement la médiation des interactions protéine-protéine par l'enroulement d'hélices α appartenant à des chaînes polypeptidiques identiques ou différentes et à leurs propriétés structurales (Parry et al., 2008). Leurs rôles comprennent celui de médiateur d'oligomérisation qui permet de faciliter la manipulation d'autres protéines et polynucléotides dans des systèmes tels que les facteurs de transcription, les

moteurs moléculaires, les récepteurs et les molécules de signalisation. Contrairement aux animaux et aux levures, seul un petit nombre de longues protéines spiralées ont été étudiées chez les plantes. Par exemple, les protéines de type kinésine ont été caractérisées et la plupart semble jouer un rôle dans la cytokinèse (Lu et al., 2005). Chez *Arabidopsis*, des homologues des protéines impliquées dans la maintenance du chromosome de mammifères ont été identifiés, et on a confirmé leur implication dans la réparation de l'ADN et le développement des graines (Hirano, 2002; Lam et al., 2005). Cette fonction des superhélices pouvant être associée à la rigidité et leurs grandes surfaces hydrophiles exposées, leur permettant de jouer le rôle de bras de protéines impliquées dans la manipulation de polynucléotides (Seryl-ARNt synthétase, ADN polymérase I). Nous avons aussi appris que les superhélices étaient sujettes à une régulation influencée par l'environnement. Ainsi, les protéines LEA du groupe 3 contiennent des hélices α amphipathiques qui ont des propriétés de former des superhélices liées à la teneur en eau (Goyal et al., 2003; Hand et al., 2007). En plus, il fut démontré que la structure en superhélice de certaines protéines membranaires contribue à leur fonction et à leur localisation spatio-temporelle (Raiborg et al., 2001; Rose et Meier, 2004).

1.2.5 Régulation de l'expression des gènes

L'une des premières hypothèses émises sur l'acclimatation au froid des plantes est qu'elle serait le résultat d'une modification d'expression de gènes induite par le froid. Parmi ces gènes, on trouve ceux codant pour des facteurs de transcriptions et des protéines COR impliquées dans le processus métabolique ou physiologique (Ouellet et Charron, 2001). L'expression des gènes *COR* est régulée par les CBF qui sont des facteurs de transcription intervenant principalement dans l'établissement de l'acclimatation au froid (Ouellet et Charron, 2001). Par exemple chez le blé, le gène *COR14* est activé par les CBF (Valiollahi et Niazi, 2009). Les *CBF* (aussi appelé

DREB) ont une expression précoce et transitoire induite par le froid, dépendamment de chaque espèce au sein desquelles ils contribuent à l'établissement de la tolérance au froid par l'intermédiaire de l'activation de leurs gènes cibles (Ouellet et Charron, 2001). Ainsi l'étude des CBF chez le blé a permis de les classer en fonction de leur structure en 10 groupes dont 6 sont spécifiques aux graminées. Ces six groupes sont CBF3c, CBF3d, CBF4a, CBF4b, CBF4c et CBF4d (Badawi, 2007). Malgré ces informations sur les gènes régulés par le froid, on constate qu'il y a encore beaucoup à faire concernant leur identification et leur caractérisation.

1.2.5.1 Régulation transcriptionnelle

Il est connu que les facteurs de transcription contribuent à la modification génique induite par la perception des signaux de stress au froid (Wang et al, 2003). Chez *Arabidopsis*, 4% à 20% des gènes sont régulés par le froid (Matsui et al., 2008). Parmi ceux-ci, approximativement 1000 subissent une régulation transcriptionnelle (655 sont surexprimés et 284 sont réprimés) via des facteurs de transcription, d'éléments régulateurs agissant en cis, de la chromatine et des histones nucléosomales induits par le froid (Kim et al., 2010; Matsui et al., 2008).

Le stress au froid induit donc l'expression de facteurs de transcription tels que les CBF. Des analyses dans les plantes transgéniques notamment chez *Arabidopsis* ont montré que l'expression ectopique des CBF est suffisante pour activer l'expression des gènes *COR* et le développement de l'acclimatation au froid (Ouellet et Charron, 2001). Par exemple, chez *Arabidopsis* durant le stress au froid, on a appris que le retard de croissance semble être réglementé par les CBF à travers des protéines DELLA localisées dans le noyau et ces dernières répriment la croissance (Chinnusamy et al., 2010). Cet impact majeur des CBF dans l'acclimatation est donc liée à leur induction par le froid, et c'est ainsi qu'a été identifié les gènes *ICE* qui sont

également des facteurs de transcription dont le rôle est de réguler l'expression des *CBF*. Chez *Arabidopsis*, ICE1 fut identifié comme étant un facteur de transcription localisé dans le noyau et régulant l'expression de *CBF3/DREB1A* en se liant à un élément cis MYC dans son promoteur. De plus, des plantes transgéniques présentant la mutation *ice1* dominante ont une sensibilité accrue au froid et au gel avec une altération de près de 40% des gènes régulés par le froid, dont 46% étaient des facteurs de transcription régulés par le froid (Chinnusamy et al., 2007). Chez le blé l'expression d'homologues de l'ICE1 (*TaICE141* et *TaICE187*) a confirmé l'action d'ICE1 en tant qu'activateur de la tolérance au froid par son action inductrice sur les *CBF* et les gènes *COR* (Badawi et al., 2008; Chinnusamy et al., 2007). Par contre, l'expression des *CBF* est réprimée par d'autres facteurs de transcription, les MYB. C'est le cas de MYB15 qui se lie aux éléments cis de reconnaissance MYB dans la région promotrice de *CBF1* et empêche la fixation d'ICE1 (Agarwal et al., 2006). Une mutation *myb15* chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* présente une amélioration de l'expression des *CBF* et par conséquent une amélioration de la tolérance au froid et au gel, par contre la surexpression de *MYB15* présente l'effet contraire (Agarwal et al., 2006). D'autres facteurs induits par le froid modulent les *CBF*, c'est le cas des facteurs de transcription ZAT10, et CAMTA (Zhao et al., 2015). Concernant ZAT10, la surexpression de son inhibiteur LOS2 entraîne chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* une amélioration de la tolérance au froid, tandis la répression de LOS2 par mutation favorise la sensibilité (Chinnusamy et al., 2007). Les travaux sur la régulation transcriptionnelle sont toujours d'actualité et continuent de fournir des informations supplémentaires sur la compréhension et l'identification des différents acteurs intervenant à ce niveau.

1.2.5.2 Régulation post-transcriptionnelle

Cette régulation comprend différentes étapes. On peut citer le traitement du pré-mRNA, la stabilisation et l'exportation de l'ARNm hors du noyau. Ainsi, de par son action sur le transcriptome, elle affecte aussi le protéome.

Le pré-ARNm (brin d'ARNm immature obtenu lors de la transcription de l'ADN) subit différents processus nucléaires tels que l'addition d'une coiffe méthylé à son extrémité 5', d'une polyadénylation à son extrémité 3' et l'épissage des introns. L'épissage du pré-ARNm est un processus nucléaire crucial car il permet la synthèse d'ARNm fonctionnels à partir d'un gène, et ce processus est couplé à l'exportation nucléaire d'ARNm. Les transcrits primaires constitués d'introns et d'exons peuvent subir deux types d'épissage, l'un dit constitutif lorsque la même séquence exonique est systématiquement retrouvée chez le transcrit mature, et l'autre dit alternatif qui aboutit à la production de multiples isoformes d'ARNm matures à partir d'un seul pré-ARNm. L'on sait de l'épissage alternatif (EA) qu'il régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, qu'il est présent chez environ 60% des gènes dans le règne végétal et qu'il favorise la diversité protéomique causée par sa capacité d'avoir différentes formes liées au types cellulaires et au développement (Filichkin et al., 2015). C'est ainsi que la variabilité de l'EA a été associée à l'établissement de la tolérance à un stress abiotique (Reddy, 2007). De nombreux exemples peuvent être cités. Par exemple chez le blé, deux gènes *COR* codant pour une ribokinase (7H8) et une protéine C3H2C3 de type RING-finger ont présenté un EA induit par le froid (Mastrangelo et al., 2005). Parmi les facteurs d'épissage, il s'est avéré que les protéines riches en Sérine/Arginine (SR) seraient impliquées dans la régulation de l'épissage aussi bien constitutif qu'alternatif des pré-ARNm de différents gènes et de leurs propres pré-ARNm sous l'induction des facteurs de développement et environnementaux (Reddy, 2007). Il a été observé qu'après un EA, certains isoformes

d'ARNm contiennent un codon d'arrêt précoce les engageant dans une voie de désintégration et d'autres produiraient des variantes protéiques à cause des différentes combinaisons entre les exons et les introns susceptibles d'affecter leurs fonctions.

D'autres acteurs intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle ont été identifiés, il s'agit des petits ARN non codants, à savoir les miARN et les piARN. Ils agissent comme des répresseurs omniprésents de l'expression des gènes chez les animaux et les plantes de par leur association avec les complexes RISC (RNA-induced silencing complex) et RITS (RNA-induced transcriptional silencing) (Sunkar et al., 2007). Chez les végétaux, ils ont un grand rôle dans les réponses aux stress abiotiques, déjà de par leur induction par ces stress afin que ces derniers répriment l'expression de gènes favorisant la sensibilité au stress, et favorisent l'expression de gènes qui contribuent à la tolérance au stress (Sunkar et al., 2007). Par exemple, lors d'une étude chez *Arabidopsis*, la surexpression de miR393 lors d'un stress au froid fut accompagnée d'une réduction de ses gènes cibles tel que l'ubiquitine ligase E3, de ce fait miR393 pourrait cibler l'ARNm de l'ubiquitine ligase E3 et ainsi diminuer son action sur ses protéines cibles.

1.2.5.3 Régulation post-traductionnelle

La régulation post-traductionnelle permet de réguler le protéome, sachant l'impact physiologique des protéines en réponse aux besoins de croissance et de développement, il est indispensable pour la cellule d'effectuer des changements rapides au niveau protéique afin de répondre à d'éventuels changements environnementaux. Différentes modifications déterminent certaines caractéristiques protéiques, c'est le cas de la localisation sous-cellulaire, l'activité catalytique ou l'interaction avec d'autres protéines. Ainsi, chez *Arabidopsis*, trois événements post-traductionnels s'observaient chez près de 10% du génome transcrit, il s'agit de

l'ubiquitination, de la phosphorylation et de la glycosylation (Mazzucotelli et al., 2006; Ouellet et Charron, 2001).

Une autre modification protéique post-traductionnelle répertoriée est la sumoylation. Durant ce processus, les protéines SUMO sont conjuguées aux substrats protéiques via des ligases, tandis que la désumoylation est l'élimination des protéines SUMO de leurs protéines cibles par des protéases. L'action de la sumoylation serait antagoniste à l'ubiquitination, car cette dernière est bloquée par la sumoylation (Ulrich, 2005). Le processus de sumoylation a été identifié comme élément majeur dans les réponses des plantes aux stress abiotiques par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation (ABA et l'acide salicylique) (Miura et al., 2007).

1.3 L'épissage alternatif

1.3.1 Définition

Chez les eucaryotes, il est connu que le protéome est crucial pour la croissance et le développement des cellules et ceci à différents stades de leur vie. De ce fait, la synthèse des protéines est étroitement réglementée et elle se fait à différents niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel). La plupart des gènes nucléaires eucaryotes sont constitués de régions codantes (exons) associées à une fonction (protéine), ces exons sont dans certains cas interrompus par des parties non codantes (introns) (Wahl et al., 2009). De plus, il est connu que le génome hexaploïde du blé a une séquence d'environ 17 giga paires de bases. Environ 977 000 loci ont été identifiés avec près de 1,27 millions de variants d'épissage distincts (Marcussen et al., 2014).

La régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel est vue comme étant sa pierre angulaire (Reddy et al., 2013). C'est à ce niveau que nous avons la transcription de l'ADN en ARN, plus précisément en pré-ARNm. Durant l'étape suivante, le pré-ARNm composé d'introns et d'exons, subi entre autre dans le noyau une élimination de ses introns et une jonction de ses exons contribuant à la formation d'ARNm fonctionnels qui seront qualifiés de matures. Ce processus est appelé épissage. L'épissage est effectué par le spliceosome (Figure 1.2), ce dernier est un supra-complexe ribonucléoprotéique composée généralement de cinq particules ribonucléoprotéiques (U1, U2, U4/U6 et U5) appelées snRNP ainsi que des protéines facteurs d'épissage (Padgett, 2012). Il existe deux types de spliceosomes : le spliceosome majeur ou U2-dépendant qui épisse les introns de type U2 (99% des introns épissés chez l'homme), et le spliceosome mineur ou U12-dépendant qui épisse les introns rares de type U12 (1% des introns épissés chez l'homme) (Burge, Padgett, et Sharp, 1998; Padgett, 2012). Donc en résumé, l'on sait qu'un ARNm fonctionnel sera transporté vers le cytoplasme afin d'être traduit. Cependant, ce transport nécessite qu'en plus d'être épissé, l'ARN soit coiffé au niveau de son extrémité 5' et modifié au niveau de son extrémité 3' par un clivage et l'ajout d'une queue Poly(A).

Il existe deux types d'épissage. Dans le cas où nous avons la génération d'un seul type d'ARNm à partir d'un gène contenant au moins un intron en utilisant le même ensemble de sites d'épissage 5' et 3', il est dit constitutif. Dans le cas où l'épissage s'effectue par l'utilisation (ou la non utilisation) de divers sites d'épissage 5' et/ou 3' par le spliceosome, il est dit alternatif. Ceci permet d'obtenir deux ou plusieurs isoformes d'ARNm à partir d'un même gène (Figure 1.3) (Reddy, 2007). Ce dernier processus est un élément clé de la diversité du protéome et du différentiel entre le génome et le protéome par sa fonction régulatrice de l'expression des gènes (Chen et Manley, 2009).

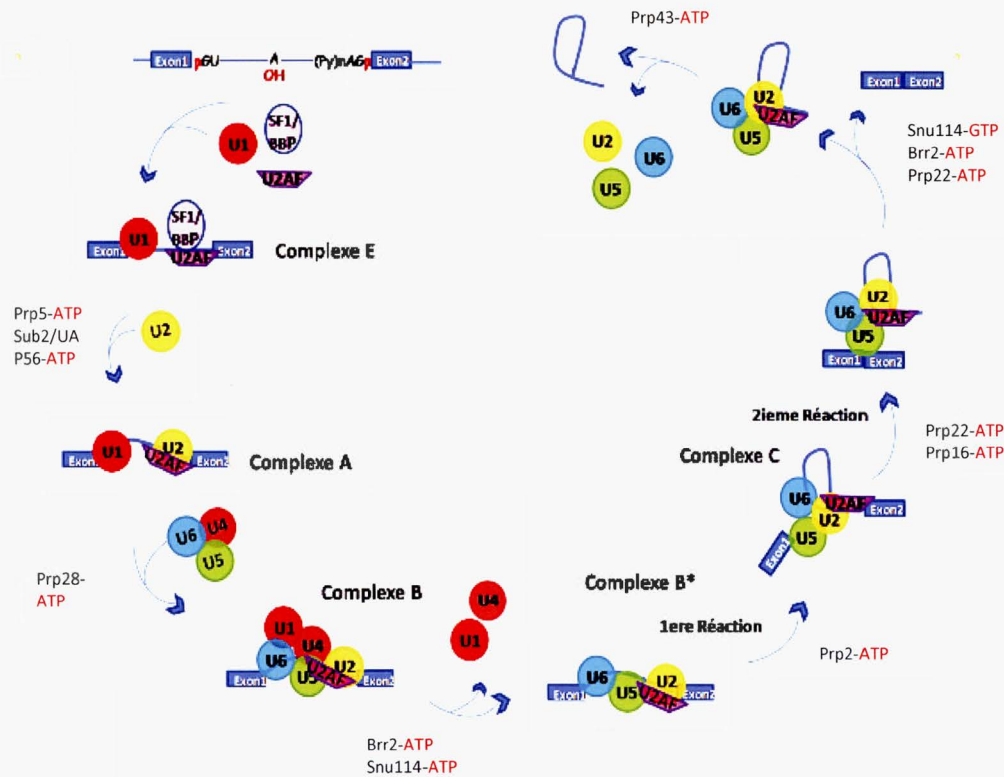


Figure 1.2 : Schéma général des différentes étapes de l'épissage du pré-ARNm par le spliceosome majeur. Les interactions des snRNP (cercles colorés) et des facteurs d'épissage (autres formes colorées) intervenant dans l'élimination d'un intron d'un pré-ARNm contenant deux exons (boîtes bleues) sont représentées. Neuf enzymes interviennent aux différentes étapes de l'épissage pour catalyser les réarrangements ARN-ARN et les événements de remodelage RNP. Ces enzymes comprennent Sub2 (UAP56 chez l'homme), Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 et Prp43, et la Snul14. SE (site d'épissage en 5' ou 3'), PB (point de branchement). D'après (Wahl, et al., 2009)

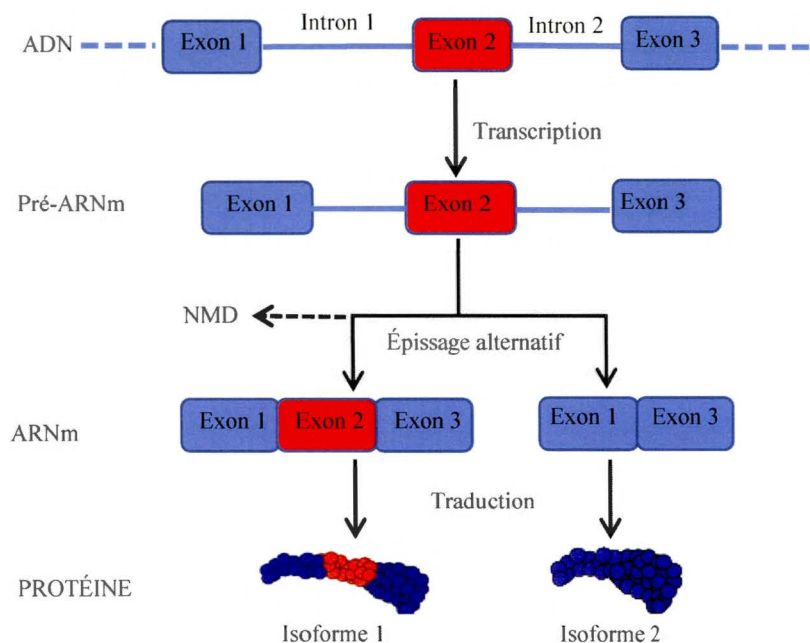


Figure 1.3 : Modèle résumé d'épissage alternatif d'un transcrit contenant un exon alternatif. Séquence génomique avec des exons (boîtes bleues et rouges) et des introns (traits bleus), la boîte rouge représente l'exon épissé alternativement. Les deux isoformes protéiques indiquent les deux éventuelles protéines obtenues après épissage alternatifs, avec la région en rouge indiquant les possibles modifications survenues au niveau de la structure des protéines. D'après (Ghanem, 2009)

1.3.2 Rôles

Suite à la découverte d'exons et d'introns dans des gènes d'adénovirus (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977), il a été proposé que différentes combinaisons d'exons puissent être regroupées pour produire plusieurs ARNm à partir d'un seul gène (Breathnach et Chambon, 1981). C'est ainsi qu'au fil du temps des chercheurs révélèrent l'implication de l'EA dans différents processus cellulaires aussi bien dans le règne végétal qu'animal (Lopez, 1998). Bien que l'EA ait été étudié avec certains gènes comme des événements isolés, l'ampleur de l'EA dans les eucaryotes multicellulaires n'a été connue que récemment. De nombreuses études récentes

suggèrent que l'EA joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Reddy, 2007). On lui identifie de nombreuses contributions à différents événements cellulaires :

- L'apoptose : L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène commun à de nombreux organismes multicellulaires. Elle permet la destruction et l'élimination réglementées des cellules endommagées ou indésirables. Un grand nombre de facteurs apoptotiques sont régulés par un EA, tels que Fas, Bcl-2, Bax et Ced-4 qui interagissent avec les caspases (Jiang et Wu, 1999)
- Le cycle cellulaire: Certaines études montrent une corrélation entre la progression du cycle cellulaire et le changement de l'EA, bien qu'un lien direct reste ici toujours à démontrer (Shin et Manley, 2004). D'autres études ont présenté le rôle de régulateur négatif de l'EA sur le cycle cellulaire à travers l'expression d'un nouvel isoforme de p27kip1 (HIRANO et al., 2001).
- La photosynthèse: Il est intéressant de noter que des analyses fonctionnelles qui ont été menées indiquent des rôles de l'EA dans la photosynthèse. C'est le cas de la rubisco activase qui est l'un des premiers gènes à montrer deux isoformes liées à l'EA chez les dicotylédones et les monocotylédones, ayant tous deux une activité sur Rubisco, cependant seule la grande isoforme est redox dépendante (Reddy, 2007).
- Les réponses aux stress : Les études indiquent que des gènes R provenant de diverses espèces végétales confèrent une résistance spécifique à différents pathogènes et herbivores (Hammond-Kosack et Jones, 1997). Par exemple, le gène N du tabac, un homologue du récepteur Toll-IL-1 (TIR) confère une résistance au pathogène VMT. Le gène N peut produire deux transcrits par EA, un transcrit court NS et un long NL qui respectivement, manque ou contient, un exon alternatif. Le transcrit NS est la forme la plus répandue avant l'infection et entre 0h et 3h post-infection par le VMT tandis qu'après 4h à 8h, c'est le transcrit NL qui devient plus répandu. Comme l'exon alternatif apporte un codon d'arrêt prématuré, le transcrit NL code pour une protéine N tronquée permettant une résistance complète au MVT. Ces observations

ont été confirmées par l'expression des deux variantes chez des plantes transgéniques et soutient l'importance de l'EA du gène N dans la résistance aux maladies (Dinesh-Kumar et Baker, 2000). De nombreux autres cas impliquant l'EA dans les stress ont été étudiés tels que, les facteurs d'épissage (SF) liant l'ARN et certains autres composants du spliceosome qui subissent eux-mêmes l'EA en réponse aux signaux environnementaux (Thomas et al., 2012).

- La floraison : Les effets différentiels de l'EA sur le temps de floraison et le développement floral ont été démontrés et confirmés avec les différentes interactions protéine-protéine. Les protéines de liaison à l'ARN, tel que FCA favorise la floraison en empêchant l'accumulation d'ARNm codant pour le répresseur floral FLC. L'étude de l'expression FCA a révélé qu'elle est régulée par EA de son pré-ARNm donnant quatre transcrits (α , β , γ et δ). Elle code pour une protéine contenant potentiellement deux domaines de liaison à l'ARN et un domaine d'interaction protéine-protéine WW (Macknight et al., 1997). Alors que le transcrit γ code pour la protéine FCA avec tous ses domaines, l'épissage qui produit le transcrit δ entraîne un décalage du cadre de lecture qui conduit à l'introduction d'un codon d'arrêt précoce aboutissant à la perte du domaine WW en entier. Les transcrit α (causé par la rétention de l'intron 3) et β (causé par la polyadénylation de l'intron 3 et un clivage) conduisent tous à la perte des domaines de liaison à l'ARN. Par conséquent, l'EA du pré-ARNm de FCA donne différents transcrits, avec un seul transcrit FCA- γ fonctionnel pour le contrôle du temps de floraison. Ainsi, l'EA limite la quantité de protéines FCA, qui à son tour contrôle la floraison. Ceci suggère une autorégulation empêchant une floraison précoce.

1.3.3 Mécanismes de l'épissage alternatif

L'EA est le mécanisme qui favorise la diversité protéique. Le processus d'épissage est effectué par le spliceosome qui se lie autour des sites d'épissages de chaque intron. Chaque site d'épissage se compose d'une séquence consensus reconnue par les composants du spliceosome. On distingue les sites «forts» qui sont plus efficacement reconnus et les sites d'épissages «faibles». C'est la concurrence des sites d'épissages forts et faibles le long d'un pré-ARNm naissant qui conduit à un EA (Graveley, 2001).

1.3.3.1 Le processus de l'épissage alternatif (EA)

De manière générale, l'EA peut se résumer en deux étapes caractérisées par deux réactions d'estérification. La première étape aboutissant à la formation d'une structure intronique intermédiaire en lasso et d'un exon libre tandis que la deuxième étape se termine avec la formation d'un ARNm et la structure intronique en lasso (Figure 1.2). Quatre éléments sont nécessaires à ces réactions : il y a les sites dits donneur et accepteur d'épissage situés respectivement en 5' et 3' d'un intron, le groupement hydroxyle de l'adénosine du site de branchement qui est localisé à près de 40 nucléotides en amont du site accepteur, et le dernier point est la séquence polypyrimidine située entre le point de branchement et le site accepteur (Chen et Manley, 2009). Ainsi, les événements associés à l'EA causent les modifications sur les éléments suivants: l'extrémité 5' de l'ARN qui cause une modification du site d'initiation de la traduction et l'extrémité 3' par une modification sur les sites de clivage et de polyadénylation. Pris ensemble, ces modifications altèrent la reconnaissance d'un ou des exons, ce qui engendre différentes combinaisons d'assemblage des régions codantes (Chen et Manley, 2009).

1.3.3.2 Les différents types d'EA

L'EA implique l'utilisation différentielle des sites d'épissage pour créer une diversité de protéines. Ce dernier s'appuie sur l'utilisation de sites 5' donneurs et 3' accepteurs. De ce fait l'utilisation de ces sites donne lieu à plusieurs types d'EA:

- Exon cassette: C'est le cas où un exon est bordé par des sites 5' et 3' alternatifs qui peuvent être inclus ou exclus de l'ARN messenger (Figure 1.4-A).
- EA sur le site 5' d'épissage: Il s'agit de l'utilisation de différents sites d'épissage en 5' (Figure 1.4-B).
- EA sur le site 3' d'épissage: Il s'agit de l'utilisation de différents sites d'épissage en 3' (Figure 1.4-C).
- Rétention d'introns: C'est lorsqu'un intron peut être retenu dans l'ARNm mature après épissage (Figure 1.4-D).
- Exons mutuellement exclusifs: C'est lorsque pour deux exons adjacents ou plus, ils ne sont épissés ensemble de sorte qu'un seul exon du groupe est inclus à la fois. (Figure 1.4-E).

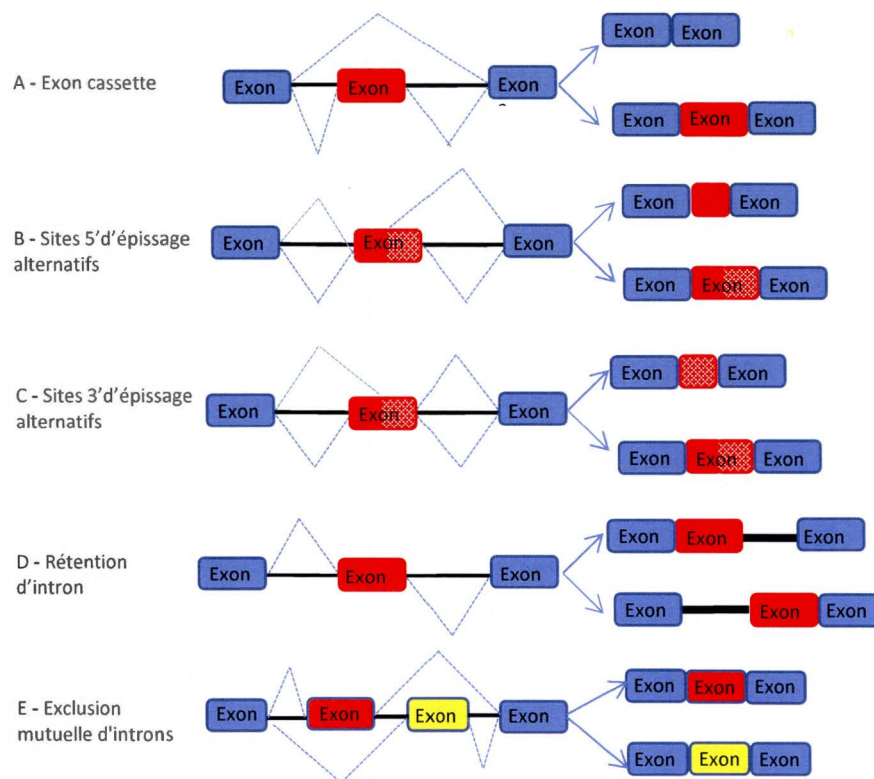


Figure 1.4 : Les différents types d'épissage alternatif. Différents ARNm peuvent être produits par différents événements, les exons sont les boîtes colorées avec ceux en rouges ou jaunes représentant les alternativement épissés, tandis que les introns sont en traits pleins noirs. (A) dans le cas d'exon cassette les deux sites d'épissage de l'exon sont alternatifs. L'épissage alternatif peut faire appel à deux sites 5' (B) ou 3' (C) alternatifs pour un même exon. (D) Il est aussi possible que la région intronique soit insérée dans le transcrit mature. (E) il existe des cas où un exon ne peut être inclus avec un autre.

1.3.3.3 Régulation par les facteurs trans-régulateurs

Les protéines riches en Sérine/Arginine : Les protéines riches en Sérine/Arginine (SR) constituent une famille de protéines de liaison à l'ARN à prédominance nucléaire que l'on retrouve aussi bien dans le règne animal que végétal. C'est dans le règne animal, plus particulièrement chez l'humain, que leur rôle en tant que facteur d'épissage a été démontré pour la première fois (Krainer et al., 1991). Des études phylogénétiques de protéines SR ont révélé un grand nombre de protéines SR dont la diversité varie en fonction des espèces. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana* on a 18 gènes SR et chez *Oryza sativa* on trouve 20 protéines SR (Isshiki et al., 2006). Les principaux membres de cette famille sont SRp20, SRp30c, 9G8, SRp40, SRp55, SRp75, ASF/SF2 et SCL33, SR45, RS (Long et Caceres, 2009). De plus, on leur reconnaît un rôle dans l'étape d'élongation durant la transcription (Fededa et Kornblihtt, 2008; Kornblihtt et al., 2004), dans la traduction (Long et Caceres, 2009; Zhou et Fu, 2013), dans la stabilité du génome et la progression du cycle cellulaire et le transport et la dégradation des ARN (Long et Caceres, 2009).

Les protéines SR sont classées en sous famille suivant leurs caractéristiques structurales principales (Figure 1.5). Elles possèdent un ou deux domaines qui sont des motifs de reconnaissance de l'ARN (RRM : RNA recognition motif) (RRM1, RRM2) de type RBD qui permettent la liaison de la protéine avec le pré-ARNm par l'intermédiaire de séquences agissant en cis dans le pré-ARNm tel que les amplificateurs d'épissage exoniques (Chen et Manley, 2009; Reddy, 2007). Ils sont suivis par une région riche en sérine et arginine dans l'extrémité C terminale fonctionnant comme un modulateur d'interaction protéine-protéine pour recruter les protéines du spliceosome et lier ce dernier au point de branchement du pré-ARNm (Manley et Krainer, 2010).

Ces deux principaux domaines sont responsables de la fonction d'activateur d'épissage des protéines SR (Matlin et al., 2005; Reddy, 2007) de différentes manières (Figure 1.6). Il y a des interactions avec les protéines du spliceosome au niveau des sites donneurs/accepteurs d'épissage (Figure 1.6A), leurs actions contre des répresseurs d'épissage (les protéines hnRNP) (Figure 1.6B), ou encore leurs actions entre les sites d'épissage grâce à des interactions protéine/protéine sans liaison directe à l'ARN (Figure 1.6C). Il faut savoir que les protéines hnRNP constituent une famille de protéines structurellement diversifiées. Elles possèdent des domaines de liaison à l'ARN de type RRM, ainsi que des domaines auxiliaires riches en certains acides aminés particuliers (qui jouent un rôle dans la modulation de l'affinité pour l'ARN ainsi que dans des interactions protéine/protéine) (Martinez-Contreras et al., 2007). Ces protéines sont des antagonistes des protéines SR (Figure 1.6).

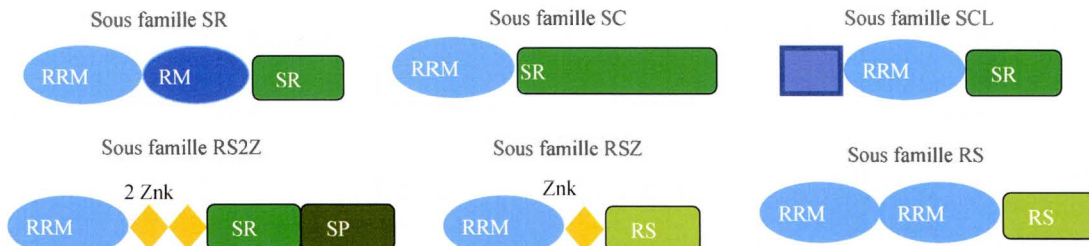


Figure 1.5 : Organisation structurale des sous-familles de protéines SR. Chaque figure colorée représente une région spécifique ou domaine de la séquence aminée des protéines SR. Les protéines de la sous-famille SR (orthologues de mammifère SRSF1/SF2/ASF) possèdent un motif SWQDLKD conservé par évolution dans leur domaine γ RRM suivi d'un domaine SR avec des dipeptides SR caractéristiques. La sous-famille RSZ (orthologues de mammifère SRSF7/9G8) se compose de protéines SR avec un nœud Zn. La sous-famille SC (orthologues de SRSF2/SC35) contient des protéines avec un seul RRM suivi d'un domaine RS. La sous-famille SCL spécifique à une installation (type SC35) est similaire à SRSF2 (domaine RRM) mais possède une extension chargée N-terminal boîte bleue foncée. Les protéines de la sous-famille RS2Z spécifique à la plante possèdent deux nœuds Zn et ont une région additionnelle SP-riche suivant le domaine RS. Les protéines de sous-famille RS spécifiques à la plante contiennent deux RRM (sans motif SWQDLKD) suivies par le domaine RS riche en dipeptides RS. (Barta et al., 2010)

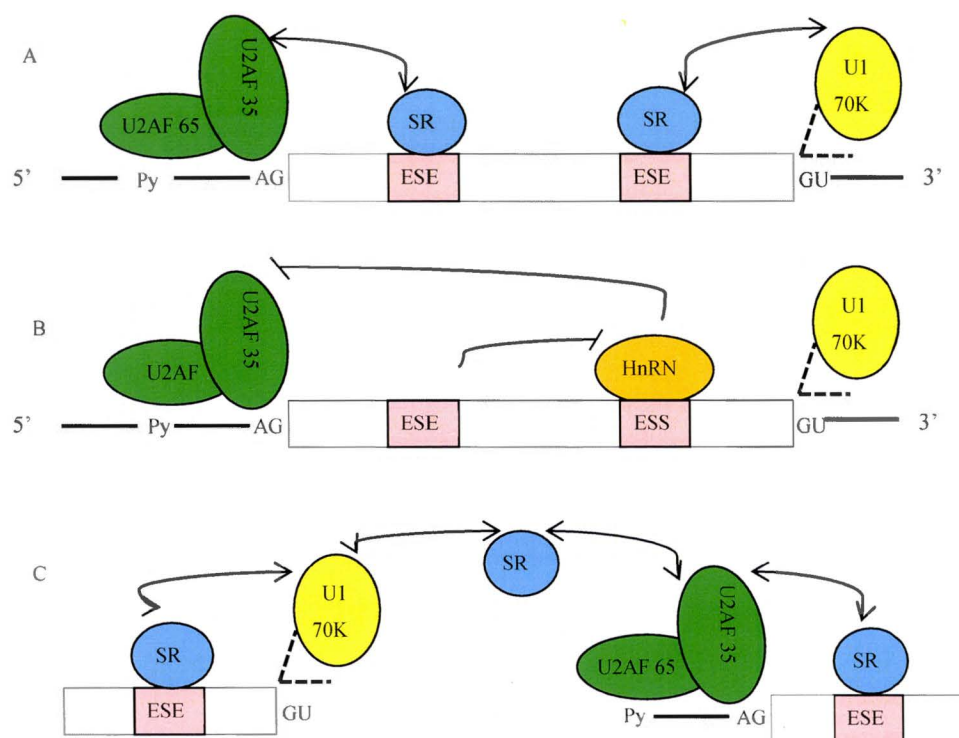


Figure 1.6 : Rôles des protéines SR dans la sélection du site d'épissage. (A) Les protéines SR liées aux éléments activateurs de l'épissage exonique (ESE : Exonic splicing enhancer) recrutent les facteurs d'épissage U2AF35 et U1-70K respectivement en amont du site d'épissage en 3' et en aval site d'épissage en 5'. (B) Les répresseurs de l'épissage exonique (ESS : Exonic splicing silencer) recrutent des protéines hnRNP qui bloquent la fixation de l'U2AF35 au site d'épissage en 3'. Les protéines SR liées aux ESE peuvent s'opposer à l'action de ces répresseurs d'épissage, favorisant ainsi la sélection du site d'épissage. (C) Les protéines SR peuvent faciliter les interactions entre le domaine SR, à U1-70K et U2AF35, ce qui permet de juxtaposer les sites d'épissage en 5' et 3'. D'après (Long & Caceres, 2009).

1.4 Problématique

Beaucoup de plantes tolérantes peuvent augmenter leur résistance au froid au travers d'un processus connu sous le nom d'acclimatation au froid. La tolérance au froid est une propriété importante pour la survie des plantes dans les régions nordiques. Cette tolérance est variable chez plusieurs plantes d'importance agronomique. Par exemple, le riz et la tomate sont sensibles au froid et peuvent être sérieusement endommagés à des températures en dessous de 15 °C, tandis que le blé et l'orge sont plus résistants.

C'est ainsi que les plantes tolérantes au froid telles que l'épinard et la patate peuvent survivre à des températures avoisinant 0 °C, tandis que des céréales tempérées comprenant l'orge, le blé et le seigle peuvent survivre à des températures de -3 °C à -30 °C (Sharma et al., 2005) .

Pendant l'acclimatation au froid, les plantes subissent de nombreux processus biochimiques induits par l'expression de plusieurs gènes qui codent pour diverses protéines dont les fonctions connues et inconnues varient et ensemble contribuent à l'établissement de la tolérance. Les études effectuées à l'aide de biopuces d'ADN suggèrent que l'expression d'une bonne proportion du génome est modifiée durant la réponse au froid. Ces gènes peuvent être classés en deux catégories. La première catégorie de gènes sont appelé gènes COR dont l'induction par le froid est de l'ordre de quelques heures après la perception du signal de stress, codent pour des protéines qui vont protéger la plante contre les dommages du froid tel que les protéines LEA. La deuxième catégorie rassemble les gènes qui codent pour les facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes, l'on peut citer comme exemple les protéines CBF (Thomashow, 1999). De plus, il a été démontré que cette régulation induite par le froid se fait à trois niveaux. Il y a une régulation transcriptionnelle avec des facteurs de transcription comme ICE1-CBF, une régulation post-transcriptionnelle qui se fait à différentes étapes durant le traitement du pré-ARNm, durant la stabilisation de l'ARNm, ou durant l'exportation hors du noyau de l'ARNm, et finalement il y a une régulation post-traductionnelle qui se fait au travers des gènes tels que HOS1 (Chinnusamy et al., 2010).

Bien que la fonction de certains gènes *COR* soit connue chez les plantes, il est reconnu cependant que pour un bon nombre d'entre eux contribuant à la tolérance des plantes au froid, leur action spécifique n'a pas été identifié pour le moment (Mastrangelo et al., 2005). Ainsi, il est clair que leur caractérisation est importante

afin de révéler leurs différentes fonctions dans l'acclimatation au froid. De plus concernant les mécanismes de régulation génique, les régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles ont été longuement étudiées. Ce n'est que plus récemment que les mécanismes régulateurs post-transcriptionnels, tels que l'épissage de pré-ARNm, l'exportation d'ARNm et la dégradation d'ARNm dirigée par de petits ARN, se sont révélés être importants pour l'installation de la tolérance au gel (Chinnusamy et al., 2007). Du fait que l'EA soit un mécanisme clé permettant d'une part de diversifier le protéome et par conséquent les différentes fonctions associées au protéome, et puis de réguler l'expression génique par l'action des facteurs d'épissage tels que les protéines SR et les hnRNP. Il est clair maintenant que l'EA est associé à de nombreux processus biologiques y compris la tolérance aux stress abiotiques. C'est ainsi que nous avons décidé de voir si chez le blé, les facteurs d'épissage auraient un rôle dans l'établissement de l'acclimatation au froid de par leur action sur des ajustements du protéome.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Des plants de blé d'hiver Norstar (*Triticum aestivum*, 2n x 6 = 42) de 14 jours ont été soumis dans des chambres de croissance à des conditions simulant la croissance en automne. La température et la photopériode (à 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) furent successivement abaissées au long de l'expérience passant des jours : 0j (21°C-15h), 3j (19°C-14h45), 35j (4°C-13h45), 49j (3°C-12h45), 63j (3°C-11h45) à 70j (3°C-10h45). A chaque jour de culture indiqué, les collets ont été récoltés et congelés à -80°C.

Pour l'expérience mesurant l'expression des gènes dans les différents tissus du blé pendant une courte exposition au froid, les graines ont germé pendant 7 jours à 20°C suivant les conditions de jours longs (16 h à 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Pour le traitement par le froid, les plantes ont été transférées à 4°C (16 h à 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 1 et 8 jours. Les plantes non acclimatées ont été obtenues en poursuivant la croissance à 20°C (16 h à 250 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pour 1 et 3 jours. Des explants d'environ 1 cm ont été prélevés. Sept types d'explants ont été utilisés : racine (R), collet (C), partie proximale (T1) et distale (T2) de la tige, et les tiers proximaux, moyens et distaux (F1, F2 et F3) de la première feuille. Les zones de jonction ont été évitées entre les

différents explants. Les tissus ont été aussitôt congelés à -80°C pour l'extraction d'ARN.

2.2 Analyse des profils d'expression des gènes

2.2.1 Isolement d'ARN

L'ARN des explants de tissus (R, C, T1, T2, F1, F2 et F3) ou des collets provenant de l'expérience simulant la croissance en automne a été isolé selon les directives des protocoles du kit *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion) et de la solution *Plant RNA Isolation Aid* (Ambion). Brièvement, les tissus pré-broyés avec de la glace sèche ont été mélangés avec 10 volumes de tampon d'extraction du kit et 1 volume de la solution « Plant Aid ». Une fois l'extrait décongelé et revenu à la température de la pièce, il est centrifugé 15 000 x g dans une micro centrifugeuse pendant 5 min à température ambiante. Le surnageant est soit congelé à -80°C pour utilisation ultérieure ou extrait directement selon la procédure décrite dans le kit pour obtenir l'ARN total. Pour la suite de notre expérience, l'ARN de seulement un des trois répliques biologiques a été utilisé. La concentration et la pureté (ratio 260/230 et 260/280) des ARN totaux furent mesurés par Nanodrop.

2.2.2 Analyse par RT-PCR

La transcription inverse des ARN totaux (0,9 µg) en vue de leur analyse par PCR a été réalisée selon les directives de la trousse pour RT Omniscript (QIAGEN) en utilisant l'oligo dT comme amorce pour le premier brin. L'ADNc a été amplifié avec des amorces spécifiques à chaque gène (Tableau 2.1), en utilisant la trousse *HotStar Taq DNA Polymerase* (QIAGEN) selon leur recommandation. Les fragments obtenus après PCR ont été analysés sur gel d'agarose puis clonés en utilisant la trousse TOPO

TA Cloning Kit (Invitrogen), et les plasmides séquencés au Centre d'innovation Génomique Québec et Université McGill.

Tableau 2.1 : Liste des gènes cibles et des amorces utilisées

Gène cible	Amorces utilisées pour la RT-PCR
LT65	SENS: GACGTTCTGTCGACGATG ANTISENS: AGCCAGGCGACTTATTCCA
NC2	SENS: CCGTCCCGATCATTCTCT ANTISENS: GGAAAATTTGGCGCTTG
PCP	SENS: ACTGCCACGAAGAACCAATC ANTISENS: CGCCAATCACCACACAATC
PRR37	SENS: TCCTGCACAGGAAGACCA ANTISENS: CCAGTCTCTTCCGGCTCT
WHY1	SENS: AACCACGCCACAGGATAAAC ANTISENS: GTATCATTCTTCCTGCCATCTC
NTFY	SENS: CCATGCTTCTCCCCTCTTCT ANTISENS: ACGCCAGAAATAAAGCCAAG
PRL3	SENS: GCTAGGTAGATCGAGCAATGG ANTISENS: CCATCGATCTATGTGGTGTGTATC
DMT1	SENS: CAACCCAAGACTGACTTCCA ANTISENS: ACACCCACATAACACAACAGA
BHLH18	SENS: ACCGTGCAGGAACACGTC ANTISENS: CTTTGCGTCTTCATGTTTATTG
HMG	SENS: GCAAGCCCCAAGCAGAC ANTISENS: GGGGCTAAACTAACAGCGAAC
AMT	SENS: CTGGCTGATGATGGTGTGTGT ANTISENS: TGACAGCTGAGTGCTAAGTTCC
REMORINE	SENS: GATCAGATGGCGGAGGAAG ANTISENS: TTGAAGATGAAGCGAAGAGGA
pT	SENS: TCACCGTGTGTGTGTGAAAG ANTISENS: GTCAGATGCAGCTCGTTGG
MBP2	SENS: GCTTTAGCTCCTCACACATCC ANTISENS: TCGACCAGAGCCATGAAGA
ricinB	SENS: ACCACCGACAGGCTAGTCAA ANTISENS: CGCCGTCCTTTTATTCCA
NC3	SENS: GCTAGCAATGGCCACAACC ANTISENS: GCATAGACAAGGGGGACACA
NC4	SENS: CCCTGGCCATTGTGTATTG ANTISENS: CCTTTGGAAGGGAAAGACAAC
NC1	SENS: TCGTAGCACTGTTTCGAGTAGC ANTISENS: ACGGCCATTATCCACGTCT
RSZ22	SENS: GAGCTCCCGGCTCTCGTC ANTISENS: ACGGGCTTCAGGTCTAACTC
RSZ38	SENS: GTCCGACCTAGGGTTCTGC ANTISENS: TGGAGACACGCTTCTTCCTC

SRp30	SENS: CTTCTCCTGTTCCCCTTCGT ANTISENS: AGTACTATAACAGCGGATGCAGA
SCL33	SENS: GACTCCACGCGAACCTTG ANTISENS: CCACGAGCAAGTCCACTACA
SR34B	SENS: AATCTCTCGGCAGCTTTTCC ANTISENS: GCATATGCAACCACCTACGA
SR34A	SENS: CCTGCGGAGTCCTGAAGC ANTISENS: ACATATGCGACCACCTACGA
RS41	SENS: GCCCGTGGAACCTACCT ANTISENS: CGCAACCATCCATGGTACA
RS31	SENS: GGGACTGACATCAATCATCAC ANTISENS: CGCCTCGCTACCATAAACC

2.2.3 Analyse par qRT-PCR

Un aliquote de 0.9 µg d'ARN total a été traité pour enlever l'ADN génomique avec le tampon « gDNA wipeout » contenu dans la trousse QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN) et ensuite l'ADNc a été synthétisé à l'aide de la même trousse. Deux µL d'ADNc (équivalent à 90 ng d'ARN total) a été utilisé pour la qPCR avec 0.2 µM d'amorce spécifique et le mélange provenant de la trousse LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). La RT-PCR a été réalisée sur le système FX96 Real-time Detection System (Bio-Rad, USA). Les conditions PCR étaient: 95°C pour 15 min; 40 cycles de 95°C pour 15 s, 55°C pour 30 s; et 72°C pour 30 s. L'ARN 18S du blé (n ° d'accession J01896) a été utilisé comme contrôle interne avec les amorces F1 : 5'-GACTACGTCCCTGCCCTTTG-3' et R1 : 5'-AACACTTCACCGGACCATTTC-3'. Les niveaux d'expression relatifs ont été déterminés et analysés suivant cette source (Yuan et al., 2006).

2.3 Purification et analyse des protéines

2.3.1 Expression des protéines de fusion de NC2-His (4A) et des mutants 5A et 6A avec His-tag

Le gène complet de NC2 a été amplifié en utilisant les amorces suivantes: 5'-CCGTCCCGATCATTTCTCT-3' (sens); 5'- CATAAAGTGGAGGGATGCAG -3' (antisens) et de l'ADNc de Norstar suivant les directives dans la trousse *HotStarTaq DNA Polymerase* (QIAGEN). Le fragment PCR a été cloné en utilisant la trousse TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), et les plasmides séquencés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. Le sous clonage du gène complet (4A), du mutant ne possédant pas le domaine transmembranaire (5A) et du mutant ne possédant pas les domaines transmembranaire et première hélice amphiphilique (6A) ont été réalisés par PCR en utilisant les amorces ci-dessous et en incorporant dans le vecteur pENTR4 :

4A dans pENTR04 sens (NcoI) :

5'-GAAACCATGGGAATGTGCGGAAAGGGCCGGAACAAC-3'

5A dans pENTR04 sens (NcoI) :

5'-GAAACCATGGGAATGTCGCCCGCCGGCGC-3'

6A dans pENTR04 sens (NcoI) :

5'-GAAACCATGGGAATGTCGCCCGCTCGAGCCAAG-3'

4A, 5A, 6A dans pENTR04 antisens incluant le codon stop (EcoRI) :

5'-GTTTGAATTCTTTCACAGGTCTCCATCGGCGAGT-3'

Les clones appropriés (4A, 5A ou 6A) clonés dans pENTR4 ont été utilisés pour faire la réaction LR Gateway (Invitrogen) afin de transférer les régions codantes de NC2 en aval du promoteur T7 et de l'étiquette 6xHis dans le vecteur pDEST17. Les plasmides issus de cette recombinaison ont été transformés dans la souche *E.coli*

DH10B et sélectionnés sur milieu ampicilline. Pour l'expression protéique, les plasmides isolés ont été de nouveau transformés dans la souche BL21AI qui est dépendante de l'arabinose pour l'induction de la T7 ARN polymérase.

2.3.2 Production des protéines recombinantes

Une préculture des plasmides transformés dans BL21AI est initiée dans le milieu LB contenant l'ampicilline et 0.1% glucose et agitée à 37°C pendant la nuit. Ensuite, 1/100 de cette préculture estensemencé dans le milieu de culture, puis incubé à 37°C jusqu'à une densité bactérienne de DO_{600} égale à 0,6. À ce stade, les bactéries sont séparées en 3 tubes, on ajoute séparément du L-Arabinose à 0,2%, 0,02% et 0% et on laissera agiter pour des temps de 0 à 2 heures. Suite à l'induction, les bactéries ont été centrifugées, puis suspendues dans un tampon de lyse contenant 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,5% Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8 1 mg/ml de lysozyme et 3 unité/ml de benzonase permettant de fragiliser la paroi. Après 3 cycles de gel/dégel (15 min à -80°C/5 min à 42°C), on centrifuge puis le culot et le surnageant ont été analysés séparément en les mélangeant avec du tampon Laemmli 1X et 2X respectivement. Les culots des échantillons (protéines totales) ont été mélangés à un tampon de charge 1X. Ces échantillons ont été chauffés à 95°C puis séparés sur gel SDS-PAGE 13% (p/v) par une migration à 100 V pendant 100 min. Les protéines d'intérêt ont ensuite été visualisées par Bleu de Coomassie.

2.3.3 Purification protéique des protéines de fusion sur colonne (Ni-NTA)

La méthode de purification a été élaborée en condition native à partir de lysats d'*E. coli* sur colonne Ni-NTA, selon le protocole de purification de QIAGEN (Ni-NTA Spin Kit Handbook). Suite à l'induction, 10 ml de la solution bactérienne a été centrifugé, puis resuspendu dans 1,8 ml du tampon de lyse à pH 8.0 contenant 50 mM

NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1mg/ml lysozyme et benzonase (3 unités/ml). Comme dans la section précédente, l'extrait a subi 3 cycles de gel/dégel et le lysat a été centrifugé pendant 15 minutes à 12000xg. Les surnageants contenant les différentes protéines de fusions ont été chargées séparément sur la colonne de résine Ni-NTA puis centrifugés à 270xg pendant 5 minutes. La colonne a ensuite été lavée et éluée tel qu'indiqué dans la légende. Toutes les fractions ont été analysées par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide 13% (p/v) et colorées avec du bleu de Coomassie.

2.4 Analyse bio-informatiques

2.4.1 Analyse des gènes sujets à EA

Les gènes sélectionnés pour l'étude proviennent de différentes études traitant de l'EA ou de l'impact de stress abiotiques sur l'expression de certains gènes dans différentes plantes (Laudencia-Chingcuanco et al., 2011; Palusa et al., 2007; Simpson et al., 2008; Thomas et al., 2012). Nous avons utilisé la base de données du centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI). Pour trouver un homologue chez le blé (*Triticum*, nous avons utilisé Standard Nucleotide BLAST <Database : Nucleotide collection> afin d'obtenir des séquences ADNc. Pour déterminer le nombre d'introns de la séquence génomique, nous avons utilisé Standard Nucleotide BLAST <Database : Whole-genome shotgun contigs> (McGinnis et Madden, 2004). Afin de prédire la séquence protéine de nos clones séquencés, nous avons utilisé Translated BLAST <Database : Non-redundant protein séquences> (McGinnis et Madden, 2004) et comparé par alignement ces différentes séquences pour voir si elles présentaient des similitudes à l'aide de l'algorithme COBALT (Papadopoulos et Agarwala, 2007) et CLUSTALW (Thompson et al., 1994). Une fois les éventuelles séquences protéiques obtenues, nous avons recherché les domaines caractéristiques des familles protéiques avec NCBI-Conserved Domain search (Marchler-Bauer et al., 2011).

2.4.2 Analyse de NC2

À partir de la séquence nucléotidique de NC2, nous avons obtenu sa sonde Affymetrix via NetAffx (<http://www.affymetrix.com/analysis>) (Liu et al., 2003). Nous avons utilisé cette sonde dans le programme GENEVESTIGATOR (Zimmermann et al. 2005) afin d'obtenir des informations sur d'éventuelles études menées sur l'expression de NC2. Pour trouver un homologue de NC2 chez d'autres espèces de plantes, nous avons utilisé NCBI (Standard Nucleotide BLAST) et UNIPROT (Bairoch et al. 2005) afin d'obtenir des séquences nucléotidiques et protéiques. Les séquences nucléotidiques d'intérêt furent prédites en séquence protéine par Translated BLAST (McGinnis et Madden, 2004). Par la suite, la prédiction des propriétés liées aux différentes séquences obtenues fut faite avec les programmes suivants : PREDOTAR, PLANT-MPLOC, PEPTIDEMASS, HELIQUEST, LOGICOIL, MUSITE, O-GlcNAcPRED-II, GPP, MARCOILS, PSIPRED, SPOCTOPUS. Une fois toutes les informations obtenues des différentes séquences protéiques, ces dernières furent alignées à l'aide de l'algorithme du programme CLUSTALW (Thompson et al., 1994) pour voir si elles présentaient des similitudes.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Comme nous l'avons indiqué, une partie de notre étude vise à identifier chez le blé d'hiver les gènes potentiellement sujets à l'EA induit par le froid. C'est la raison pour laquelle il nous fallait un ensemble de gènes qui nous servirait de base de départ pour notre étude. Donc partant de résultats d'un ensemble d'études identifiés au travers de notre revue de littérature, nous avons trouvé des études qui avaient étudié l'épissage induit par des stress osmotiques par la technique de RNAseq, ils ont trouvé de nombreux gènes qui présentaient potentiellement l'EA. Cependant aux questions de savoir comment cette induction affectait les pré-ARNm et comment le froid contribuait à ce phénomène chez le blé d'hiver, rien n'avait été fait. Ainsi sur cette base, nous savions qu'il y avait beaucoup de gènes qui seraient des candidats potentiels, cependant compte tenu du temps qui nous était imparti nous ne pouvions pas tous les traiter.

3.1 Identification des gènes candidats

En commençant le projet, j'ai travaillé avec des stagiaires sur l'expression spécifique de gènes au niveau de différents cultivars (ceux étudiés furent Norstar et Manitou), de différents tissus (racines, collets, tiges et feuilles) et de différents temps d'exposition au froid. Pour ces travaux, le choix de candidats s'est basé sur des données de RNAseq ou micropuces obtenues par des études antérieures des gènes présentant une

induction à un stress abiotique chez le blé (Holappa et al., 1995; Chinnusamy et al., 2010). Parmi cette liste de gènes, nous avons sélectionné 17 gènes qui avaient au moins un intron, sachant qu'un intron représente l'élément clé de l'EA. De plus, nous avons ciblé les gènes SR car ils avaient été déjà établi qu'ils pouvaient être sujet à l'EA (Duque, 2011; Filichkin et al., 2015) suite à la présence des facteurs hormonaux ou environnementaux. À ce niveau, il était question pour nous de voir comment le froid agirait d'une part sur l'expression des gènes SR et si le froid pourrait comme facteur environnemental induire un EA de ces derniers. Compte tenu du fait que les séquences SR que nous avons provenaient du riz, nous avons cherché des homologues de nos gènes chez le blé par analyse bio-informatique à l'aide de l'algorithme BLASTN. Nous avons donc sélectionné 9 gènes SR du blé pour une analyse plus approfondie.

Dans le Tableau 3.1, nous présentons la liste des gènes *COR* et *SR* analysés lors de notre étude. Nous avons évalué le nombre d'intron par l'analyse comparative entre des séquences annotées ARNm, ADNc ou transcrits versus la séquence génomique du blé dans la base de données du NCBI. Les résultats montrent qu'un bon nombre de gènes *COR* présentaient plus de deux introns comme c'est le cas du gène *DMT1* avec 19 introns ou des gènes *AMT* et *PRR37* avec 7 introns chacun. Les gènes *COR* sélectionnés codent pour des protéines avec des fonctions variées telles que des agents de méthylation des histones et de l'ADN, des facteurs de transcription, des enzymes liées au stress oxydatif, des protéines de fonctions inconnues et bien d'autres. Sur cette base, notre étude représente une possibilité de déterminer si l'EA ajoute un autre niveau de régulation durant l'acclimatation au froid du blé. Concernant les gènes *SR*, nous avons appris deux choses. D'abord à quel classe chacun de nos gènes *SR* appartient et que certains d'entre eux étaient spécifiques au règne végétal tandis que d'autres étaient commun au règne végétal et animal. Ainsi *SRp30*, *SR34A* et *SR34B* appartiennent à la classe ASF/SF2 et sont commun au règne animal et végétal, tout comme le gène *RSZ22* appartenant à la classe RSZ (Graveley,

2000). Par contre, le reste des gènes *SR* sont spécifiques aux plantes et appartiennent à différentes classes, nous avons *RS31* et *RS41* qui sont de la classe RS, *RSZ38* qui est de la classe RS2Z (Lopato et al., 2006) et *SCL33* qui est de la classe SCL (Graveley, 2000).

À partir de notre liste de candidats obtenus, nous avons construit des amorces spécifiques à chaque gène. Nous avons ensuite déterminé si ces gènes sont régulés au niveau transcriptionnel lors d'une courte exposition au froid dans divers tissus du blé Norstar et une longue exposition au froid dans le collet.

Tableau 3.1 : Identification des gènes par bio-informatique. Ce tableau présente les gènes sélectionnés chez le blé ainsi que leur nombre d'introns après analyses comparatives entre des séquences annotées ARNm, ADNc, transcrits versus la séquence génomique du blé dans la base de données du NCBI.

LISTE DES GÈNES COR ANALYSÉS			
Numéro d'accension NCBI	Longueur en pb	Nombre d'introns	Appellation
GAKM01057312.1	1809	4	<i>LT65</i>
GAKL01033068.1	465 pb	2	<i>NC2</i>
JW026786.1	660 pb	5	<i>PCP</i>
AB646973.1	2007 pb	7	<i>PRR37</i>
GAKL01010776.1	807 pb	5	<i>WHY1</i>
GAJL01254528.1	765 pb	4	<i>NTFY</i>
GAKL01046910.1	303 pb	2	<i>PRL3</i>
JV864297.1	2693 pb	19	<i>DMT1</i>
GAKM01041797.1	978 pb	3	<i>BHLH18</i>
GAKM01125668.1	375 pb	6	<i>HMG</i>
XM_020300343.1	1032 pb	7	<i>AMT</i>
AK454483.1	534 pb	4	<i>REMORINE</i>
XM_020307045.1	408 pb	2	<i>pT</i>
XM_020305102.1	1128 pb	3	<i>MBP2</i>
AK456044.1	1008 pb	3	<i>ricinB</i>
AK334093.1	1400 pb	4	<i>NC3</i>
KF307326.1	660 pb	3	<i>NC4</i>
AK357253.1	219 pb	1	<i>NC1</i>
LISTE DES GÈNES SR			
DQ019626.1	585 pb	5	<i>RSZ22</i>
DQ019628.1	1002 pb	6	<i>RSZ38</i>
DQ019630.1	765 pb	8	<i>SRp30</i>
XM_020314970.1	807 pb	7	<i>SCL33</i>
AK333522.1	878 pb	5	<i>SR34B</i>
JP883187.1	903 pb	5	<i>SR34A</i>
HP629250.1	945 pb	5	<i>RS41</i>
JV872194.1	910 pb	4	<i>RS31</i>

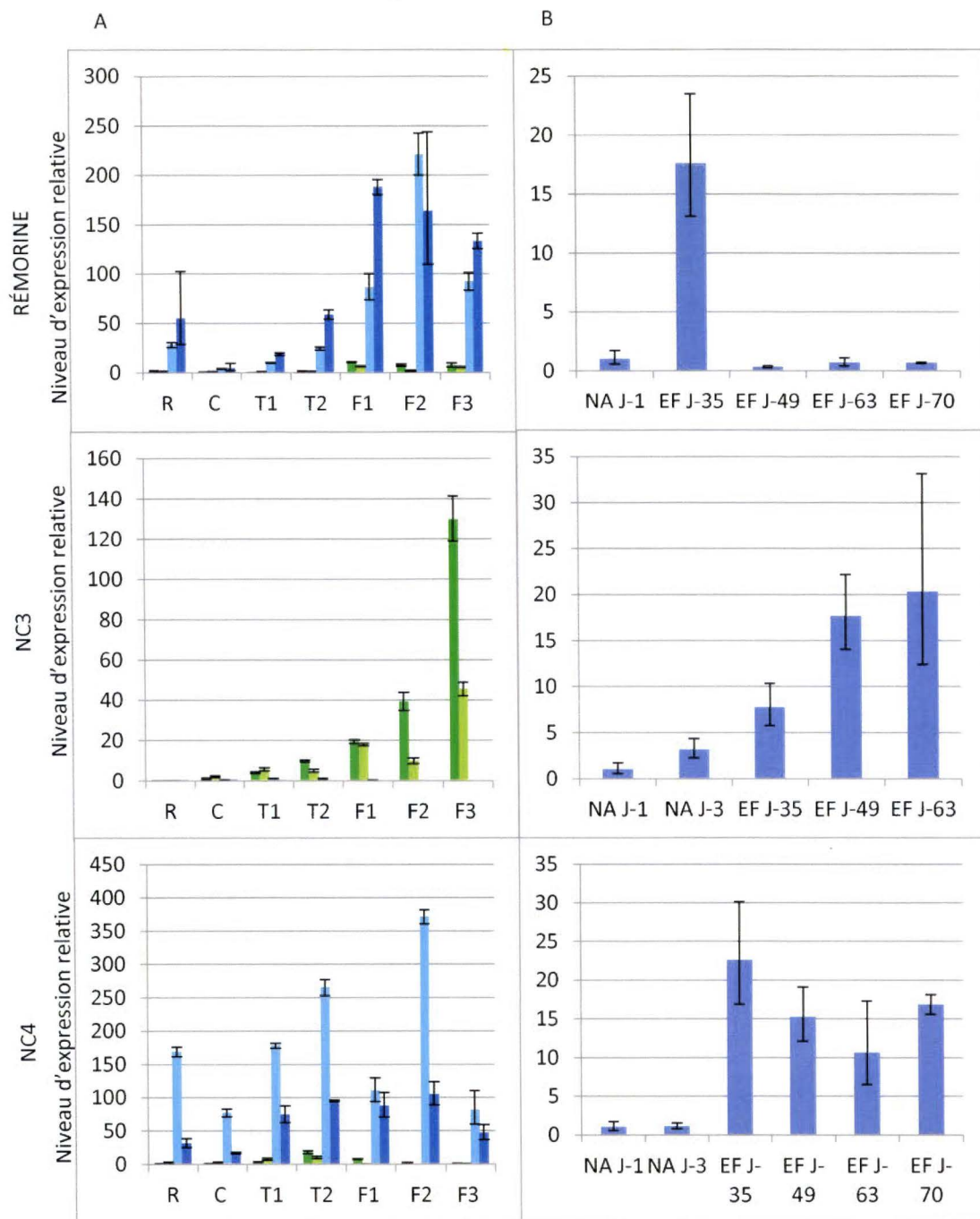
3.2 Analyse de l'expression des gènes cibles

Nous avons analysé les profils d'expression génique des gènes sélectionnés suivant deux axes, d'une part suivant les différents tissus après un court traitement au froid et puis dans un même tissu à différents moments après une exposition plus longue au froid. Les résultats obtenus ont montré que le niveau de transcription de 13 des 18 gènes *COR* était modifié suite à une exposition au froid (résultats non présentés). Nous avons présenté que les gènes qui possédaient en condition acclimatée une variation minimale de vingt fois et plus par rapport à l'échantillon de normalisation qui est en condition non acclimatée. Il s'agit de 5 gènes sur les 13 gènes d'intérêt. La Figure 3.1A montre la variation d'expression induite par le froid dans divers tissus. Pour cela nous avons normalisé nos valeurs de qRT-PCR avec celle de l'échantillon du collet NA J-1. Les gènes *LT65*, *NC2* et *NC4* présentent une induction par le froid dans tous les tissus. Par contre, l'expression de *LT65* et *NC4* semblent être plus intense au début de l'exposition et diminuer progressivement tandis que, le niveau de *NC2* semble être stable. *REMORINE* et *NC3* montrent une préférence marquée pour les feuilles avec la plus faible expression chez le collet pour *REMORINE* et la racine pour *NC3*. De plus, *REMORINE* démontre une induction par le froid tandis que *NC3* est réprimé par le froid. L'analyse de l'expérience des collets de blé exposés à différentes durées d'exposition au froid (Figure 3.1B) montre que les gènes *LT65*, *NC2*, *NC3* et *NC4* sont exprimés à des niveaux plus élevés au froid (EF J-35 à EF J-70) tandis que *REMORINE* présente une induction transitoire à EF J-35.

Concernant les gènes *SR*, nous savions que leur expression est souvent régulée durant le développement, ce qui fait que nous avons supposé que le froid ne serait pas un facteur inductif indispensable. Toutefois nous avons mesuré l'expression de 4 gènes *SR* par qRT-PCR à ce jour. Dans la figure 3.2A, nous observons les quatre gènes *SR* et aucun de ces gènes ne nous a donné de résultat significatif d'induction par le froid spécifique à un tissu. Plutôt, le gène *SRp30* montre une légère diminution dans tous

les tissus au froid. D'autre part, quand on regarde la figure 3.2A, on observe de façon générale que le niveau de ces gènes décroît plus on s'éloigne de la racine. Par contre quand on regarde l'impact de la durée d'exposition au froid sur les gènes dans le collet (Figure 3.2B), les résultats sont très variables. Le gène *RSZ38* présente une augmentation de son niveau d'expression en condition NA, par contre ce niveau chute après 35 jours pour finalement être nul au-delà de 35 jours d'exposition au froid. Le gène *RSZ22* présente un profil assez similaire, la principale différence se voit en condition NA où on observe une diminution totale du niveau du gène après 3 jours d'exposition. Le gène *SCL33b* quant à lui présente un niveau élevé après 35 jours d'exposition au froid pour baisser après à un niveau sensiblement similaire à celui observé en condition NA. Le gène *SRp30* présente en condition NA une diminution importante et ensuite reste plus ou moins stable le reste du traitement.

Ainsi, nous avons pu identifier les gènes dont l'induction seraient liée au froid et spécifique à un tissu. Nous allons maintenant chercher à voir si parmi les gènes, il y en a qui présenteraient un EA induit par le froid.



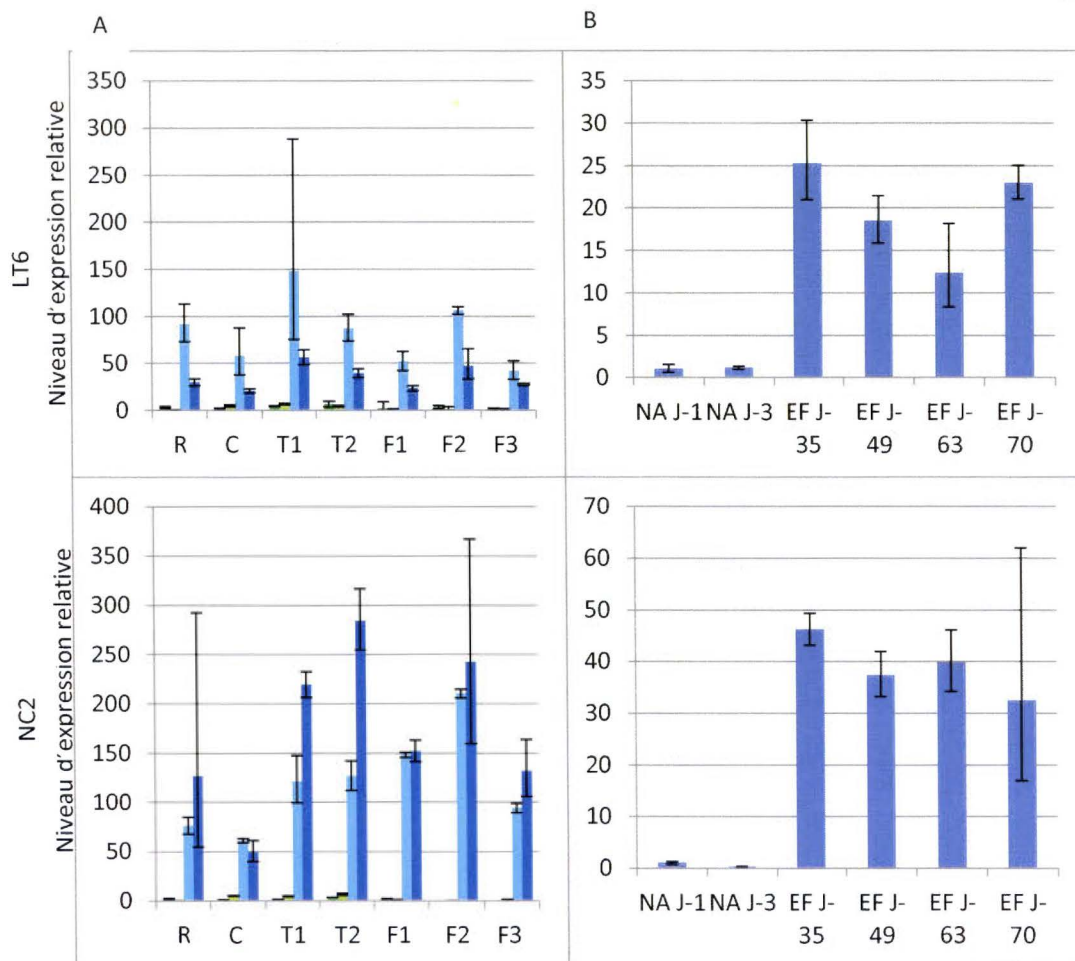
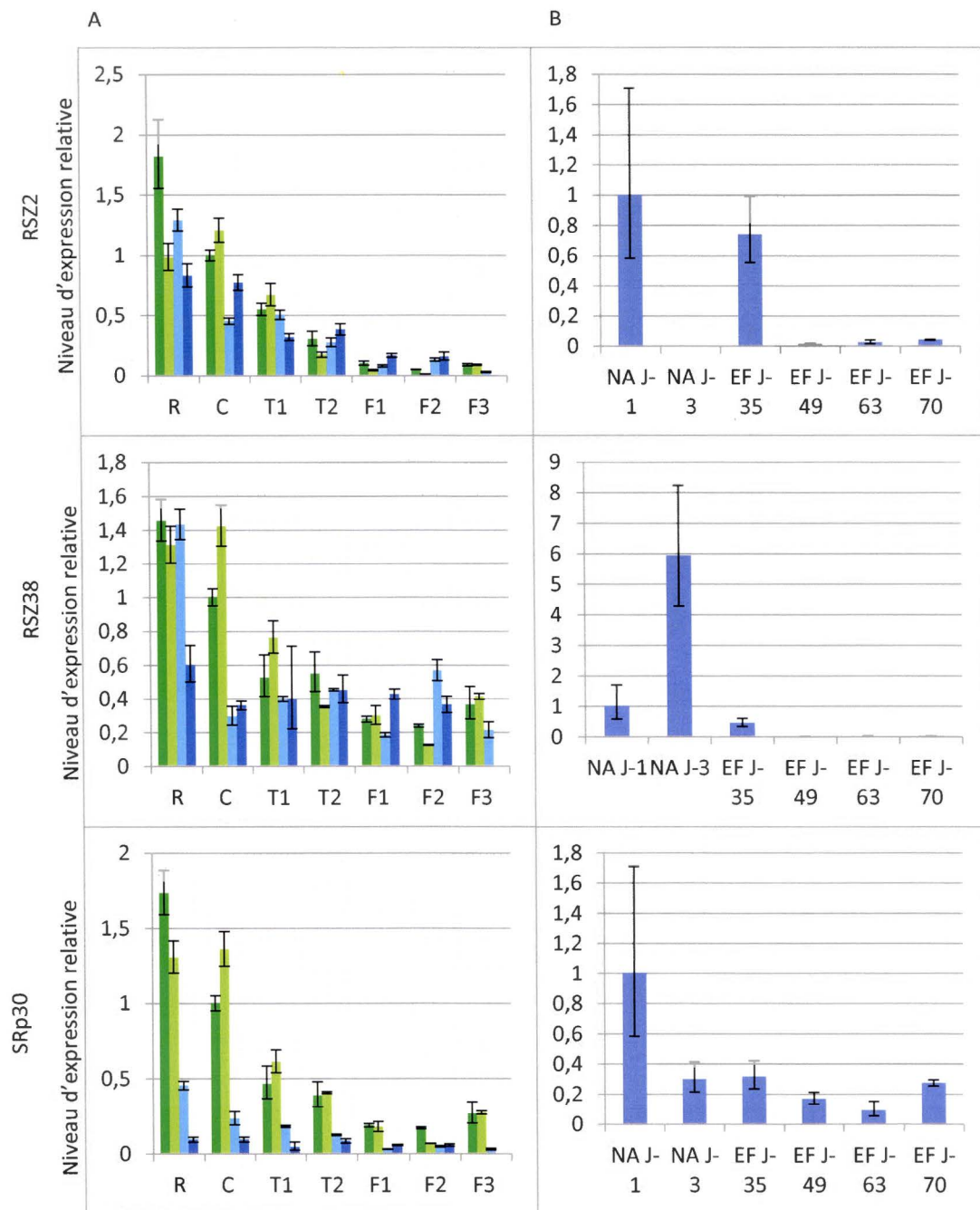


Figure 3.1 : L'induction des gènes *COR* par le froid de manière spécifique au tissu (A) ou liée à l'expérience de simulation de croissance à l'automne avec des explants de collets (B). La spécificité tissulaire a été déterminée avec des explants de racine (R), collet (C), partie proximale (T1) et distale (T2) de la tige, et les tiers proximal, moyen et distale (F1, F2 et F3) de la première feuille. Cette analyse a été mesurée par qRT-PCR en duplicata avec l'ARN 18S de blé comme contrôle interne. Des plants de blé d'hiver ont été soumis à des conditions d'exposition au froid (EF) et de non acclimatation au froid (NA). (A) une exposition soit à 20°C pendant 1 et 3 jours ou à 4°C pendant 1 et 8 jours. (B) une exposition soit entre 21°C et 19°C (NA) ou entre 4°C et 3°C (EF). Les détails supplémentaires sont dans la méthodologie. Dans (A) les conditions d'exposition sont : la couleur verte foncée (NA jour 1), verte claire (NA jour 3), bleue claire (EF jour 1) et bleue foncée (EF jour 8). Le niveau d'expression relatif ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$), les barres d'erreurs se calculent à partir des déviations standards (SD) avec $-SD = RQ - (2^{-(\Delta\Delta Ct + \Delta Cq SD)})$ et $+SD = -RQ + (2^{-(\Delta\Delta Ct + \Delta Cq SD)})$, où Cq est le numéro du cycle à laquelle la courbe PCR de l'échantillon croise le seuil.



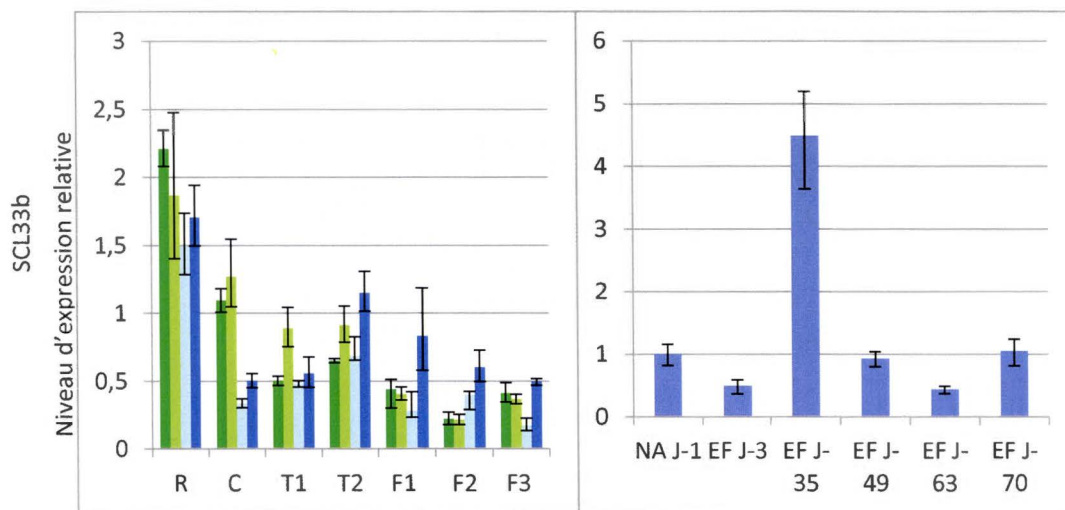


Figure 3.2 : L'induction des gènes *SR* par le froid de manière spécifique au tissu (A) ou liée à l'expérience de simulation de croissance à l'automne avec des explants de collets (B). La spécificité tissulaire a été déterminée avec des explants de racine (R), collet (C), partie proximale (T1) et distale (T2) de la tige, et les tiers proximal, moyen et distale (F1, F2 et F3) de la première feuille. Cette analyse a été mesurée par qRT-PCR en duplicata avec l'ARN 18S de blé comme contrôle interne. Des plants de blé d'hiver ont été soumis à des conditions d'exposition au froid (EF) et de non acclimatation au froid (NA). (A) une exposition soit à 20°C pendant 1 et 3 jours ou à 4°C pendant 1 et 8 jours. (B) une exposition soit entre 21°C et 19°C (NA) ou entre 4°C et 3°C (EF). Les détails supplémentaires sont dans la méthodologie. Dans (A) les conditions d'exposition sont : la couleur verte foncée (NA jour 1), verte claire (NA jour 3), bleue claire (EF jour 1) et bleue foncée (EF jour 8). Le niveau d'expression relatif ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$), les barres d'erreurs se calculent à partir des déviations standards (SD) avec $-SD = RQ - (2^{-(\Delta\Delta Ct + \Delta CqSD)})$ et $+SD = -RQ + (2^{-(\Delta\Delta Ct + \Delta CqSD)})$, où Cq est le numéro du cycle à laquelle la courbe PCR de l'échantillon croise le seuil.

3.3 Identification de gènes présentant un épissage alternatif induit par le froid

Les expressions des ARNm de différents gènes ont été estimées par RT-PCR de manière qualitative réalisée sur deux expériences. La première consistait à mesurer l'EA induit par un traitement court au froid dans plusieurs tissus (racine, collet, tige et feuilles) chez la variété de blé Norstar (variété d'hiver plus tolérante au froid). La deuxième consistait à mesurer l'EA durant une longue période d'acclimatation dans les variétés de blé Norstar et Manitou (variété de printemps moins tolérante au froid) au niveau du collet. Afin de détecter des nouveaux variants (ou des proportions de variants différents) des gènes analysés entre deux conditions de croissance (normale

et exposé au froid), des amorces spécifiques ont été conçues pour chaque gène. Après électrophorèse, une analyse comparative du profil de migration de chaque gène fut effectuée entre les extraits de plantes se développant en condition de stress et ceux des plantes en condition normale. En outre, les gènes en condition normale ou dite non acclimatée servent de contrôle afin de vérifier qualitativement l'induction de l'expression du gène par le froid ou l'apparition de l'EA induit par le froid. Tout d'abord, le premier fait que nous avons constaté dans la Figure 3.3 est que les gènes potentiellement induits par le froid présentent des résultats variables. Nous avons des gènes qui n'ont rien présenté après la PCR, il s'agit de *DMT1*, *NC2* et *LT65*. Ce type de résultat soulève la possibilité que les paramètres de la PCR ne permettent pas de détecter le transcrit complet de 2kb (pour *DMT1* et *LT65*). Ensuite, nous avons les gènes comme *BHLH*, *NTFY*, *REMORINE*, *MBP2*, *HMG* et *NC4* qui en général présentent une meilleure amplification dans les conditions acclimatées reflétant leur induction par le froid présenté à la Figure 3.1. Par contre, cette absence d'amplification ne permet pas de bien caractériser l'apparition de variants issus de l'EA. Maintenant à la question de savoir si ces gènes *COR* présentaient l'EA induit par le froid, la réponse est non pour la majorité des gènes analysés car là où nous avons une amplification, on n'observait pas de profil de migration différent entre les conditions NA et EF au sein de chaque tissu ou variété de blé analysé. Ceci est marqué par la présence au sein d'un échantillon tissulaire d'une ou plusieurs bandes identiques caractérisant les transcrits. Cependant le gène *HMG* est assez intéressant, et il est la raison pour laquelle nous pouvons affirmer qu'il y aurait des gènes *COR* qui présenteront l'EA. On observe que dans la condition EF, *HMG* présente une bande de plus (astérisque rouge dans la Figure 3.3) que dans la condition NA au niveau des racines, collet et tiges. Ses bandes sont de faible intensité et se trouvent à plus de 400 pb. Malheureusement, comme l'amplification pour les tissus NA est moindre, ceci ne permet pas de conclure sans équivoque que ceci représente l'EA. Toutefois, les résultats de la comparaison des cultivars soumis à une longue période d'acclimatation sont beaucoup plus convaincants. On observe le même phénomène

dans les deux variétés entre les conditions NA et CA, l'apparition d'une bande de plus de 400b dans les pistes CA et l'absence de cette bande dans les pistes NA même si le signal après amplification est beaucoup plus fort. Ceci implique l'apparition d'un nouveau transcrit, d'où la possibilité d'un EA induit par le froid. Ce résultat obtenu avec *HMG* nous fait comprendre qu'il y a certains gènes *COR* qui présenteraient un EA induit par le froid.

L'analyse des résultats (Figure 3.4) montre qu'aucune amplification n'a été obtenue pour *RSZ38* tandis que pour les gènes *RSZ22* et *RS41*, aucune différence qualitative n'a été détectée entre les conditions NA et CA au niveau des tissus ou des cultivars. Concernant les six autres gènes des protéines SR, ils ont tous présenté un phénomène d'EA induit par l'acclimatation au froid (Figure 3.4). Si l'on prend le cas des gènes *SRp30* et *SC35* comme exemple, on constate qu'il y a épissage alternatif induit par CA, ceci se voit dans les quatre tissus et les deux cultivars. On constate l'expression majoritaire d'un transcrit de taille supérieure en condition EF au détriment d'un autre qui était majoritairement exprimé en condition NA. Pour les gènes *RS31* et *SCL33*, l'EA est plus observable dans le cas des racines et du collet entre les deux conditions NA et EF. On constate que le profil d'expression est le même pour ces tissus entre les deux conditions, le transcrit majoritairement exprimé n'est pas le même. Dans l'expérience avec les deux variétés de blé, seul *SCL33* présente cette même différence quantitative dans l'expression des deux transcrits majeurs entre la condition NA et la condition EF. Concernant les gènes *SR34A* et *SR34B*, ils présentent un EA. Déjà chez la variété Norstar, les échantillons de racine ayant obtenu une meilleure amplification présentent un profil différent entre les conditions NA et EF, où dans le cas de *SR34A* en condition NA présente un variant, dans la condition EF présente trois variants. Ce résultat est retrouvé chez *SR34B*. À cela, on constate également un même profil de variation lié au froid entre les variétés Norstar et Manitou, avec l'apparition de nouveaux variants en condition EF. De ce fait la différence de profil des transcrits pour ces différents gènes dans la condition EF suggère l'idée de l'induction de l'EA

induit par le froid. Ceci afin d'obtenir soit le bon transcrit parmi les différents isoformes du gène épissé qui contribuera à l'établissement de l'acclimatation, soit la sous-expression d'un gène (favorisant la sensibilité au froid) par la formation d'isoformes du gène épissé non viables. Raison pour laquelle les produits RT-PCR du gène *SRp30* ont été séquencés pour confirmer l'identité des fragments amplifiés, afin de pouvoir identifier les événements survenus lors de l'EA.

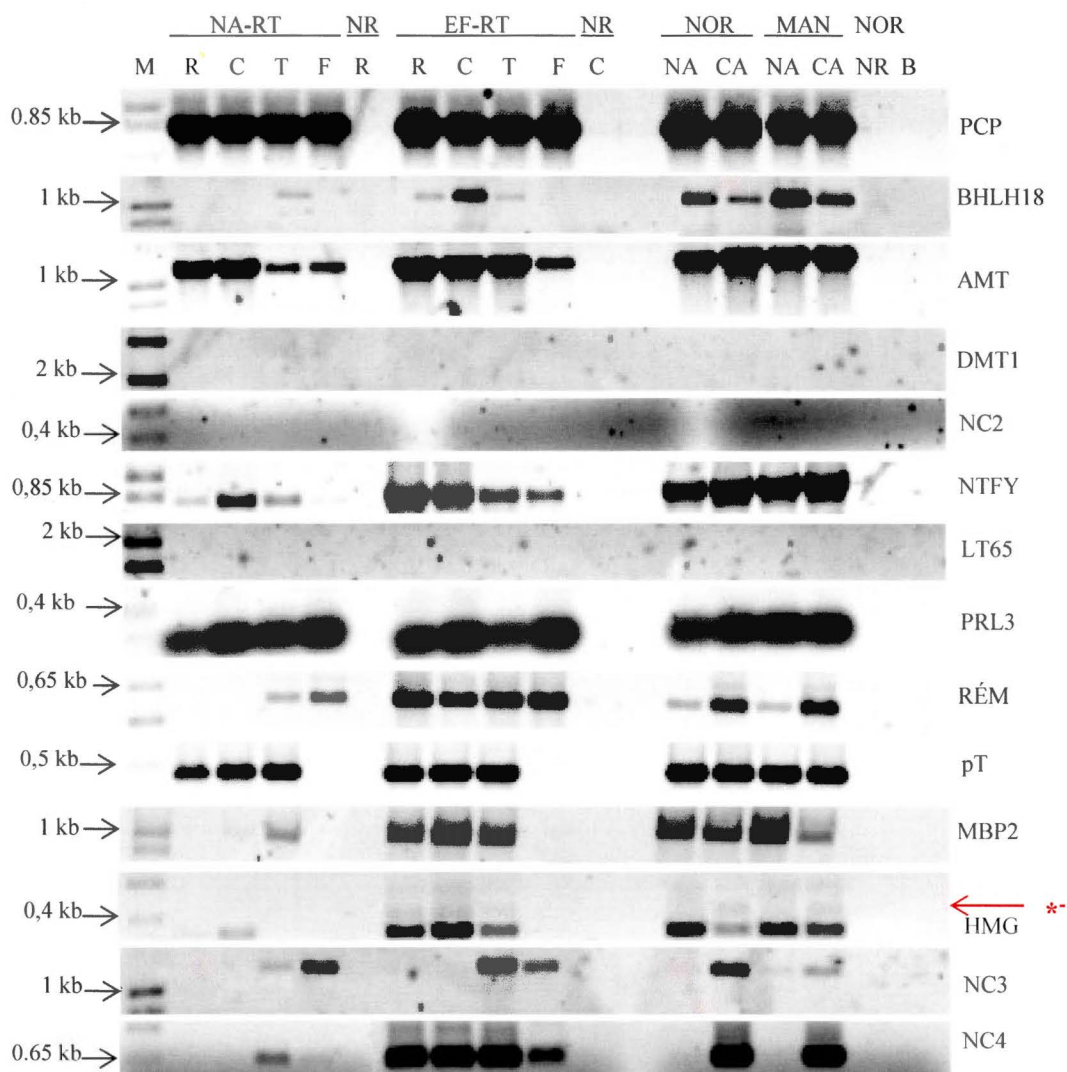


Figure 3.3 : Analyse par RT-PCR des gènes *COR* sélectionnés chez deux variétés de blé afin d'évaluer l'induction de l'EA par le froid. En utilisant des amorces spécifiques à chaque gène *COR*, des analyses par RT-PCR ont été effectuées en utilisant des ARN totaux provenant de l'expérience analysant différents tissus traités au froid et de l'expérience analysant l'effet de deux génotypes sur l'EA au niveau du collet. Les amplicons obtenus sont visualisés par Molecular Imager FX (Bio-Rad) après une électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium et un marqueur de poids moléculaire (M). L'analyse comparative entre Norstar (Nor) et Manitou (Man) s'est fait avec un mélange d'ARN provenant de collet non acclimaté (NA) et acclimaté 14 à 49 jours (CA). Le traitement au froid s'est fait par exposition des plants de blé Norstar pendant 8 jours à 4°C. Les ARN totaux proviennent de différents tissus des plantes, la racine (R), le collet (C), la tige (T) et la première feuille (F). Les indications suivantes sont non rétrotranscrit (NR), exposé au froid (EF), blanc (B) ou milieu réactionnel de la PCR sans ARN, RÉMORINE (RÉM), astérisque en rouge indique la présence de nouvelles bandes. Chaque gène a été analysé deux fois.

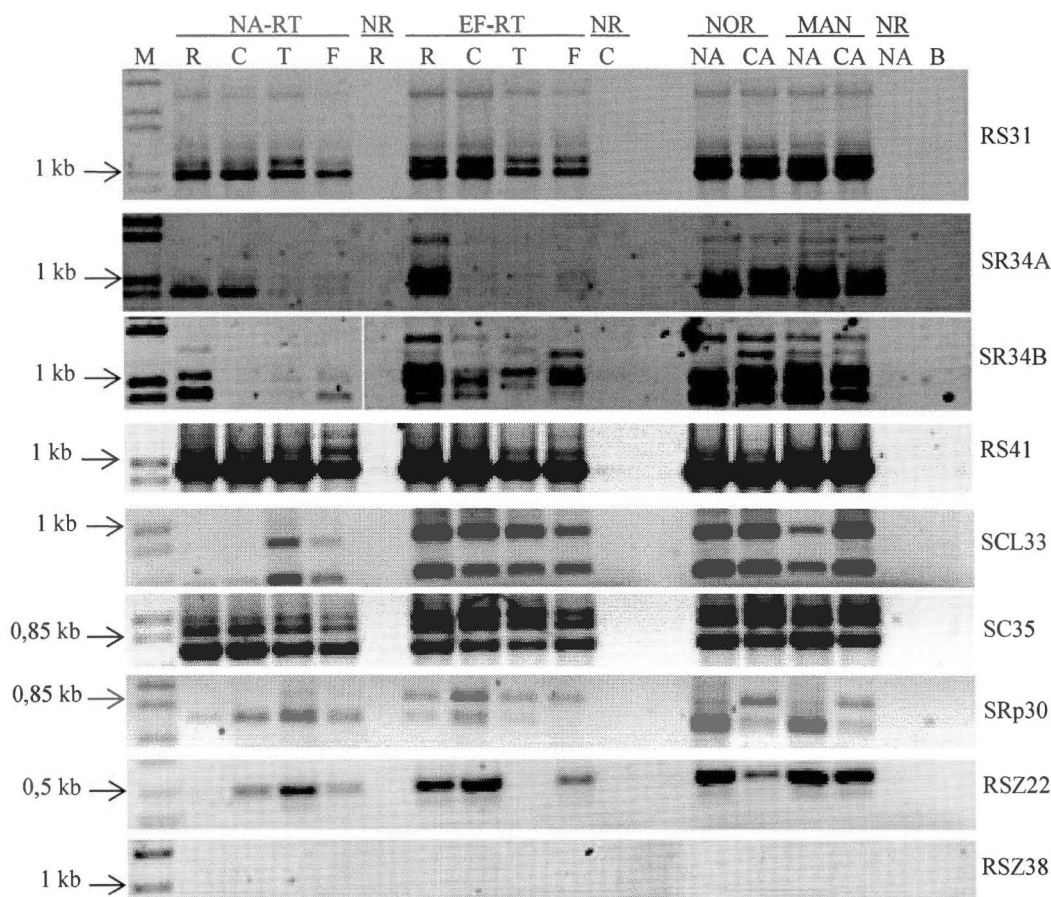


Figure 3.4 : Analyse par RT-PCR des gènes SR sélectionnés chez deux variétés de blé afin d'évaluer l'induction de l'EA par le froid. En utilisant des amorces spécifiques à chaque gène *SR*, des analyses par RT-PCR ont été effectuées en utilisant des ARN totaux provenant de l'expérience analysant différents tissus traités au froid et de l'expérience analysant l'effet de deux génotypes sur l'EA au niveau du collet. Les amplicons obtenus sont visualisés par Molecular Imager FX (Bio-Rad) après une électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium et un marqueur de poids moléculaire (M). L'analyse comparative entre Norstar (Nor) et Manitou (Man) s'est fait avec un mélange d'ARN provenant de collet non acclimaté (NA) et acclimaté 14 à 49 jours (CA). Le traitement au froid s'est fait par exposition des plants de blé Norstar pendant 8 jours à 4°C. Les ARN totaux proviennent de différents tissus des plantes, la racine (R), le collet (C), la tige (T) et la première feuille (F). Les indications suivantes sont non rétrotranscrit (NR), exposé au froid (EF), blanc (B) ou milieu réactionnel de la PCR sans ARN. Chaque gène a été analysé deux fois.

3.4 Caractérisation des isoformes de SRp30 par bio-informatique

Parmi les gènes précédemment identifiés présentant le phénomène d'EA induit par le froid, nous avons choisi *SRp30* afin de poursuivre son analyse. Ce dernier présentait une bonne différence de profil entre les conditions NA et EF dans les différents tissus et dans les cultivars.

Ainsi, nous avons prédit les structures protéiques de SRp30 afin de comparer la forme induite par l'acclimatation et celle en condition NA. Bien que pour cette analyse nous avons effectué une approche bio-informatique afin de prédire toutes les éventuelles modifications structurales associées à l'EA, elle s'est faite après différentes étapes. Nous avons cloné dans *E. coli* les produits amplifiés à partir d'ADNc de collet provenant des conditions NA et EF, ceci afin d'isoler et d'identifier les variants de notre gène d'intérêt.

C'est ainsi que nous avons sélectionné des plasmides à séquencer, sur la base de la taille de nos inserts. Nous avons séquencé neuf échantillons NA (provenant des échantillons à la condition NA), ayant tous la même taille des fragments après digestion et dix-neuf échantillons CA (pour acclimaté au froid provenant des échantillons à la condition EF) possédant des variations au niveau des fragments après digestion. Ainsi à l'aide des programmes de NCBI d'identification de domaine et d'alignement, l'on a pu d'une part regrouper les séquences en fonction des événements séquentiels survenu sur les échantillons acclimatés (Figure 3.5.). C'est ainsi que nous avons regroupé nos séquences variantes de SRp30 en quatre groupes dont la nomination fut liée à des isoformes. Ainsi, l'isoforme CA10 est la variante la plus abondante dans Norstar acclimatée (12/19). L'isoforme CA16 est la deuxième variante la plus abondante dans Norstar acclimatée (5/19). Les isoformes CA02 et CA12 ont été retrouvés 1 fois sur 19. Chez les échantillons NA, nous avons constaté que l'isoforme CA10 est la seule variante détectée (9/9).

Par la suite, nous avons prédit les impacts que ces modifications auraient sur les éventuelles protéines synthétisées. Par analyse des séquences nucléiques suivant le cadre de lecture, nous avons pu évaluer les impacts que l'EA aurait sur chaque isoforme de SRp30 (Figure 3.5-A). L'isoforme CA10 serait le transcrit qui coderait pour la protéine normale. L'isoforme CA16, quant à elle présenterait un nouvel exon retenu (boîte rouge) et ceci introduit un codon d'arrêt (flèche rouge) qui termine la traduction du domaine riche SR prématurément. L'isoforme CA02 montre le saut d'un exon qui code pour la dernière partie du domaine RRM2. Finalement, l'isoforme CA12 montre une rétention d'intron qui modifie le cadre de lecture et par conséquent, termine la traduction prématurément (flèche rouge). Par prédiction de séquences protéiques, nous avons pu comparer les différences de motifs et domaines sur les structures protéiques (Figure 3.5-B). Il est envisageable que chez l'isoforme CA10 qui est pressenti pour être la forme normale du gène, il n'y aurait pas de modification sur l'ensemble de la protéine SRp30. Concernant l'isoforme CA16, l'on observe que l'introduction de ce codon d'arrêt précoce aurait comme conséquence la réduction du domaine riche en sérine/arginine et de ce fait, une réduction de la taille par rapport à la protéine normale. De même pour l'isoforme CA02, le saut d'exon survenu causerait la perte d'une partie du deuxième domaine RRM qui peut être due à la perte de 19 acides aminés présents dans la protéine normale. Finalement pour l'isoforme CA12, l'apparition de ce codon d'arrêt précoce si tôt dans la séquence de l'ARN prédit causerait une perte de la majeure partie de la séquence protéique qui se limiterait juste à une partie du domaine RRM1 et serait la plus petite protéine éventuellement synthétisée à partir du gène *SRp30*.

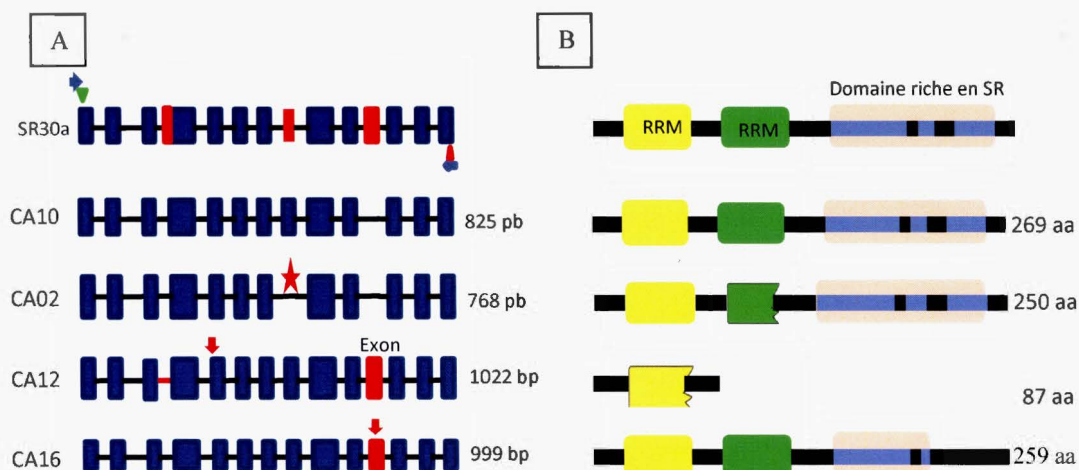


Figure 3.5 : Diagrammes schématiques des transcrits du gène *SRp30* alternativement épissés lors de l'acclimatation au froid du blé d'hiver Norstar. (A) : Le modèle de gène (*SRp30*) et les isoformes identifiées (CA10 - CA16) sont affichés à gauche avec la taille des transcrits correspondants. Les différents événements survenus sur les différents transcrits clonés sont analysés par bioinformatique. Dans *SRp30*, les boîtes bleues représentent des exons conservés dans toutes les isoformes, les lignes noires et rouges représentent des introns. Les flèches bleues dans le premier et dernier exon représentent les positions des amorces de PCR, et les pointes de flèche vertes et rouges représentent des codons de départ et d'arrêt. (B) : Les isoformes protéiques ont été prédites et analysés par bioinformatique. L'impact des événements liés à l'EA a été prédit par alignement des séquences nucléotidiques et protéiques provenant des différents transcrits. Pour chaque alignement le transcript majoritaire après le clonage a servi de référence.

3.5 Caractérisation d'un gène régulé par le froid et codant pour une protéine de fonction inconnue

Pour la deuxième partie de notre étude, nous avons analysé plus en détails le gène *NC2*. Pour explorer si des annotations étaient disponibles pour ce gène, des recherches ont été effectuées en utilisant des algorithmes tels que BLASTxnr, Gene Ontology (GO), UniProtKB, KEGG et COG, etc. Toutefois, aucune information n'a été trouvée permettant de comprendre la fonction de ce gène.

3.6 Données sur NC2

Comme présenté dans la première partie de la section résultat, le gène *NC2* est hautement régulé par le froid et s'exprime fortement dans tous les tissus analysés (Figure 3.1). Maintenant bien que ce gène fut identifié comme gène *COR*, nous nous sommes interrogés sur le lien entre le froid et *NC2*, à savoir si ce lien était exclusif.

Pour cette analyse fonctionnelle, nous sommes allés à la collecte d'information sur *NC2* au travers de différentes études via la base de données Genevestigator (Grennan, 2006). Nous avons d'abord recherché le niveau d'expression de *NC2* lié à l'anatomie du blé au travers de différentes études en condition normale de croissance (Figure 3.6-A), ce qui nous a permis de faire une observation comparative dans les tissus entre les données obtenues en condition dite normale (en absence de stimuli) et celles obtenues après exposition à différents stimuli (stress osmotique, au froid, à la chaleur) (Figure 3.6-B), ceci afin de voir si l'expression de *NC2* serait spécifique à un tissu et si de manière générale la spécificité tissulaire était influencé par les stress. Cette analyse s'est faite sur la base de différentes études. L'on constate d'une part que l'expression relative de *NC2* dans des tissus bien spécifiques liés aux semis ne présente pas de variations significatives entre la condition normale dans la Figure 3.6-A et la condition dite stressée dans la Figure 3.6-B, tandis que dans l'inflorescence en général on observe une faible répression de l'expression à la suite d'une exposition aux différents stimuli, cependant l'embryon indique une augmentation d'expression de *NC2* de 12 dans la condition normale à 14 dans la condition stressée. Par contre dans les tissus liés aux jeunes pousses (shoot), on observe une augmentation significative du niveau d'expression de *NC2* d'approximativement 8,5 dans la condition normale à 11 dans la condition stressée. Pour les rhizomes, l'augmentation de l'expression passe d'approximativement 8,5 dans la condition normale à 10,5 dans la condition stressée. La Figure 3.6 nous a permis de voir que le gène *NC2* serait régulé par différents facteurs environnementaux, et que son expression ne serait pas

spécifique à un tissu que ce soit en condition normale ou de stress. Par contre, il semblerait que son induction dans les tissus liés au rhizome à la suite d'un stress y soit plus élevée. Nous avons voulu savoir sur la base de ce qui a déjà été fait, comment l'exposition au froid agit sur l'expression de *NC2* chez différentes variétés de blé. Les variétés étudiées furent celles d'hiver (Harnesk, Norstar et Solstice), et celle de printemps (Paragon). Les informations obtenues par les deux études furent compilées dans la figure 3.7. La première étude analyse la variation de l'expression *NC2* induite par le froid et la lumière après 12 semaines d'exposition au cours desquelles la température fut progressivement abaissée. Ainsi les trois premières semaines de 16°C jour/14°C nuit représente la condition de non stimuli par le froid et la lumière pour tous les cultivars (Figure 3.7). Chez la variété Solstice, un échantillon a été exposé à la lumière uniquement pendant 5 et 9 semaines. Il représente l'induction spécifique par la lumière. Ceci dans les mêmes tissus, à savoir les feuilles ou le collet. Ainsi après 5 semaines et 9 semaines, on observe chez les échantillons de feuilles de Solstice que l'expression de *NC2* induite par la lumière est similaire à celle des contrôles. Lors de l'exposition au froid, on voit que globalement les échantillons de feuilles des variétés Harnesk et Solstice présentent une augmentation du niveau d'expression de *NC2* comparativement à celle des différents contrôles. Cette augmentation indique une surexpression de *NC2* après 9 semaines d'exposition au froid. Dans le cas des variétés d'hiver, cette variation du niveau d'expression normalisée passe de près de 10 après 2 semaines d'exposition au froid à près de 15 après 6 semaines d'exposition au froid. Ceci montre une induction par le froid car pour la même durée d'exposition, les échantillons exposés uniquement à la lumière ne présentent pas de variations d'expression significative comparativement aux contrôles, leurs niveaux d'expression se situe dans la région médiane. Par contre, chez la variété Paragon, les données présentées ne permettent pas de conclure à une régulation par le froid. Maintenant dans le collet, le niveau d'expression de *NC2* semble ne pas changer pour les variétés d'hivers après deux semaines d'exposition au froid. Par contre chez la variété Paragon, on observe une répression de l'expression

par le froid. Ce qui est assez étrange quand on constate qu'après 6 semaines d'exposition au froid, les échantillons provenant de Paragon présentent une forte augmentation d'expression comparativement à leur contrôle. Cette augmentation est aussi observée chez les variétés d'hiver. Toutefois, comme le contrôle de 9 semaines (sans exposition au froid) aussi démontre cette induction, il est possible que dans le collet l'augmentation observée serait en partie associée à d'autres facteurs comme ceux liés au développement. La deuxième étude fut menée chez la variété Norstar (blé d'hiver) et examine l'impact du CO₂ et du froid sur les gènes *COR*. L'échantillonnage s'est fait sur la troisième feuille après 20-25 jours pour la condition NA (20°C jour/16°C nuit) et entre 70-80 jours pour la condition EF (5°C jour/5°C nuit). Afin de déterminer l'induction de l'expression de *NC2* par le froid, ils ont effectué une analyse comparative des échantillons avec des teneurs variables en CO₂ aussi bien condition normale qu'exposée au froid. Il en ressort très clairement que dans les feuilles, il y a une forte induction par le froid dans des conditions de CO₂ normale et élevée. Ce résultat va dans le sens de l'étude précédente et nous permet de renforcer nos hypothèses chez les variétés d'hiver. Cependant comme il avait été révélé dans la Figure 3.6, l'expression de *NC2* serait régulée par différents facteurs abiotiques.

Nous avons sélectionné les études disponibles pour chaque facteur abiotique et les résultats obtenus furent compilés dans la Figure 3.8. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de présenter différentes études liées à chaleur et à la déshydrations, afin de confirmer l'absence de régulation marquée par ces facteurs. De manière simpliste, on peut déjà constater qu'à l'exception du froid, seules la salinité et la phytohormone ABA (par conséquent le stress osmotique) présentent une régulation à la hausse marquée de l'expression de *NC2* (voir les valeurs fold change pour ces traitements). Ce résultat suggère une intervention de *NC2* chez le blé d'hiver en réponse à un stress osmotique.

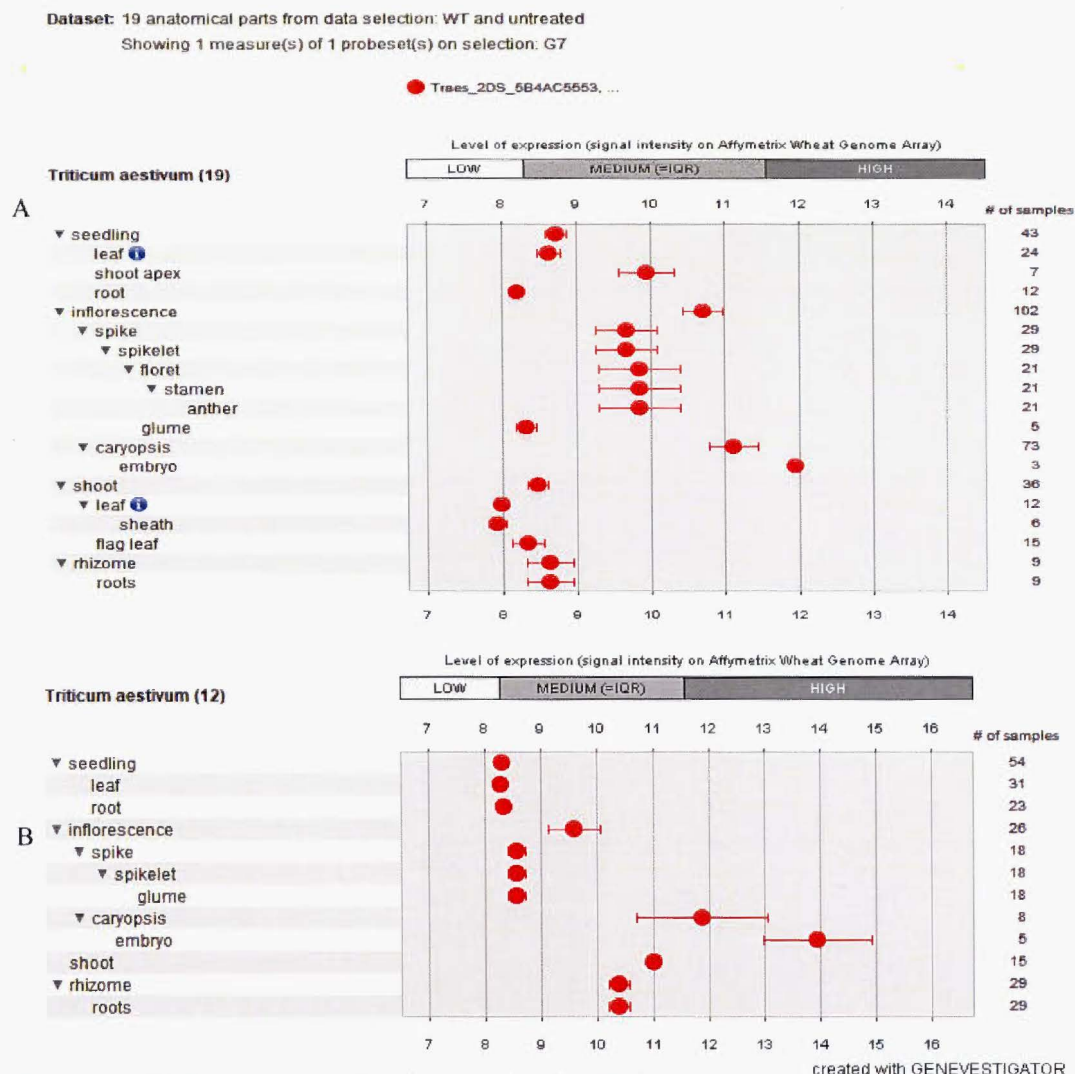


Figure 3.6 : Profil d'expression tissulaire chez le blé (*Triticum aestivum*) du gène *NC2*. Analyse effectuée avec les données de puces à ADN issues de Genevestigator (sonde Affymetrix Ta.19303.1.S1 at) à différentes conditions, (A) sans stimuli et (B) en présence de stimuli abiotiques (ABA, H₂O₂, chaleur, froid, déshydratation). Les niveaux d'expression de *NC2* sont affichés par rapport aux nombres échantillons (à droite) sélectionnés via les données des sondes Affymetrix publiées (représentant 19 et 12 prélèvements d'organes et de tissus en A et en B). Ces niveaux dans Genevestigator (entre 7 et 16) sont les niveaux d'expression suivant une échelle logarithmique de base 2 des micropuces correspondantes (MC) par rapports à celles ne correspondant pas (NC) à *NC2* dans le réseau Affymetrix du génome du blé ($\log_2(MC/NC)$). Ces valeurs sont par la suite normalisées sous la forme de quantile ceci donnant la force de l'expression. Ces niveaux sont basées sur le calcul des centiles après normalisation en quantiles des intensités du signal de la sonde au sein de chaque expérience sélectionnée dans la base de donnée, ainsi "LOW" correspond au premier quartile, "MEDIUM" à la gamme interquartile et "HIGH" au quatrième quartile. Les organes à gauche sont regroupés en catégorie organique contenant toutes les puces hybridées avec de l'ADN des différents tissus. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Le "i" sur fond bleu est pour les tissus sortant dans plusieurs catégories.

Dataset: 51 samples from data selection: TA_AFFY_WHEAT_01
Showing 1 measure(s) of 1 probeset(s) on selection: G7

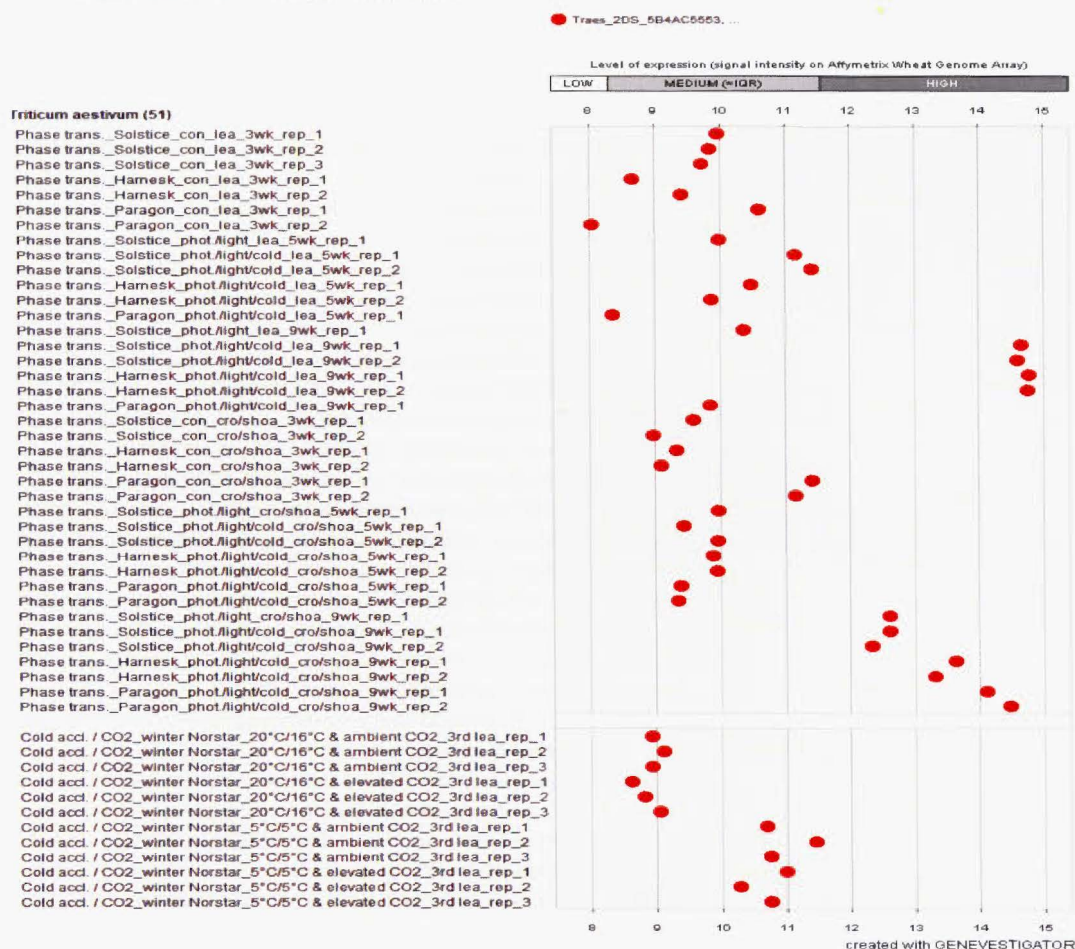


Figure 3.7 : Profil d'expression du gène *NC2* induit par des stimuli abiotiques chez *Triticum aestivum*. Analyse effectuée avec les données de puces à ADN issues de Genevestigator (sonde Affymetrix Ta.19303.1.S1_at). Les niveaux d'expression de *NC2* sont obtenus via les données des résultats provenant des travaux de (Winfield et al., 2009) sur les changements du transcriptome induit par le froid et la lumière, et de (Kane et al., 2013) sur l'impact du CO₂ sur la photosynthèse et l'acclimatation au froid. Les niveaux d'expression de *NC2* sont affichés par rapport aux nombres échantillons (à droite) sélectionnés via les données des puces à ADN Affymetrix publiées. Ces niveaux dans Genevestigator (entre 8 et 15) sont les niveaux d'expression suivant une échelle logarithmique de base 2 des micropuces correspondantes (MC) par rapports à celles ne correspondant pas (NC) à *NC2* dans le réseau Affymetrix du génome du blé ($\log_2(\text{MC}/\text{NC})$). Ces valeurs sont par la suite normalisées sous la forme de quantile ceci donnant la force de l'expression soit "HIGH" ou "LOW". Ces niveaux sont basés sur le calcul des centiles après normalisation en quantiles des intensités du signal de la sonde au sein de chaque expérience sélectionnée dans la base de donnée, ainsi "LOW" correspond au premier quartile, "MEDIUM" à la gamme interquartile et "HIGH" au quatrième quartile. Les éléments analysés sont regroupés en catégorie organiques contenant toutes les puces hybridées avec de l'ADN des différents tissus du système. Dans la première étude, ils ont un échantillon de Solstice qui n'est pas stimulé par le froid soumis aux mêmes durées d'exposition que les autres échantillons de plantes stimulées simultanément par la lumière et le froid. ce qui permet de voir l'impact du froid.

Dataset: 147 perturbations from data selection: Stress-TA_AFFY_WHEAT
Showing 1 measure(s) of 1 probe(s) on selection: G7

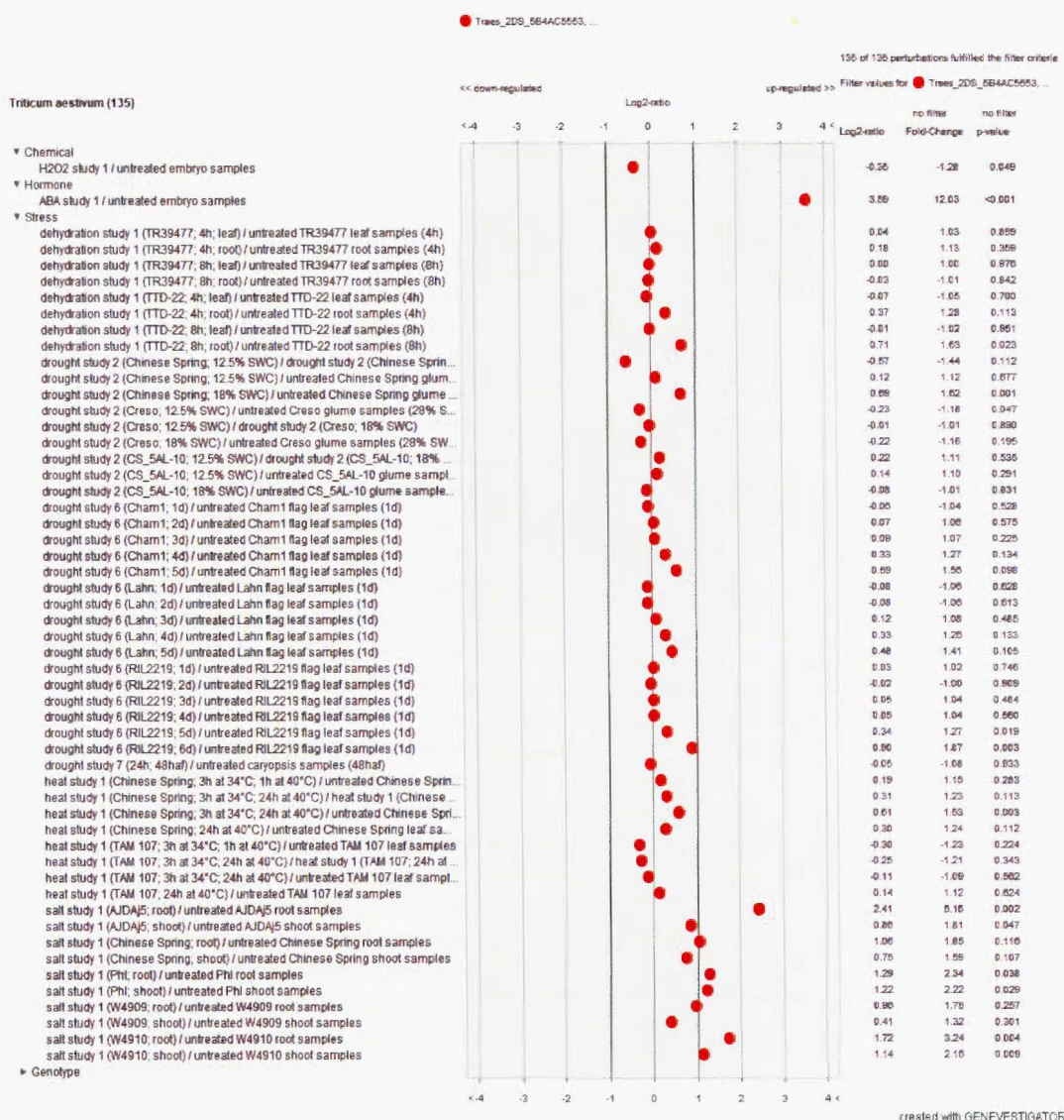


Figure 3.8 : Profil de l'expression du gène *NC2* induit par différents stress abiotiques autre que le froid chez *Triticum*. Analyse effectuée avec les données de puces à ADN issues de Genevestigator (sonde Affymetrix Ta.19303.1.S1_at). Les niveaux d'expression de *NC2* sont obtenus via les données des résultats provenant des travaux de (Yu et al., 2016) sur le stress oxydatif, de (Aprile, 2009; Ergen, 2009; Habash, 2014; Qin, 2008; Shih, 2008) sur la déshydratation liée à la sécheresse et la chaleur, et de (Mott et Wang, 2007) sur le stress salin, suivant différentes durées d'exposition. Ces variations représentent l'expression relative (qui représente les rapports entre les valeurs en condition stimulé et les valeurs témoins) exprimé sur la base $\log_2$ calculé après normalisation linéaire des intensités du signal de la sonde au sein de chaque expérience sélectionnée dans la base de données, ainsi la base $\log_2$ permet d'éviter les valeurs d'expression négatives et une sensibilité excessive aux petits changements dans les valeurs d'expression faibles. La section *Genotype* faisant référence aux différentes variétés utilisées, nous les avons énumérés dans la section Résultats.

3.7 Séquences et données structurales

Les informations recueillies sur le gène *NC2* contribuent à sa caractérisation. Cependant, ils ne nous permettent pas encore d'envisager une fonction pour ce gène dans la plante. Comme la séquence de *NC2* ne présente pas d'homologie avec une protéine de fonction connue, nous avons cherché des homologues de séquences dans d'autres espèces et pour ce faire nous nous sommes concentrés sur les monocotylédones. À l'aide de base de données telle que *Ensembl Plants* (Kersey et al., 2015), *NCBI BLAST* (Altschul et al., 1990; Johnson et al., 2008) et, *UNIPROT* (Bairoch et al., 2005), nous avons trouvé des homologues du gène *NC2* chez d'autres monocotylédones. Le Tableau 3.2 présente les homologues de *NC2* que nous avons trouvé ainsi que certaines propriétés liées à la séquence aminée, le point isoélectrique (pI) et l'unité de masse atomique en dalton (Da). Ces séquences protéiques furent alignées via *CLUSTALW* (Thompson et al., 1994) afin d'évaluer leur différence d'homologie par rapport à la séquence protéique de *NC2*. Cette première analyse, nous indique que notre gène est présent chez les trois copies génomiques de la variété de blé hexaploïde (*Triticum aestivum*) Chinese Spring. De plus, à l'exception de son homologue chez *Brachypodium distachyon*, on observe que les différents homologues protéiques de *NC2* ont un pI basique qui varie entre 8,08 et 10,10. Un fait intéressant est que la différence entre homologues n'a pas un fort impact sur la différence que ce soit des pI, ou sur la masse atomique qui de manière générale varie faiblement 14 kDa et 18 kDa, tout comme le nombre d'acides aminés qui est relativement proche. Par la suite, nous avons cherché à savoir si les protéines homologues à *NC2* sont sécrétées hors de la cellule ou pas, pour cela nous avons cherché la présence de peptide signal avec le programme *SPOCTOPUS* (Viklund et al., 2008). Ce programme combine efficacement la prédiction du signal peptide et du domaine transmembranaire, ceci dans le but d'éviter la confusion de prédiction entre signal peptide et domaine transmembranaire.

Tableau 3.2 : Liste et caractéristiques des différents homologues de NC2. NCBI BLAST a donné des homologues nucléotidiques de NC2, leurs numéros d'accèsions sont suivis de (NCBI). Certaines ont été traduites en protéines par <NCBI Translated BLAST> et les séquences obtenues furent soumises à <UNIPROT> qui a donné des homologues protéiques de NC2. Le point isoélectrique (pI), le nombre d'acides aminés (Nbre AA) et la masse est donnée par ExPASYP-PROTPARAM. Le pourcentage de similitude est donné par CLUSTALW. Parmi les homologues nucléotidiques obtenus, le codon ATG choisi pour le respect du cadre de lecture était celui qui possédait un codon stop en amont dans le même cadre de lecture. Parmi nos 16 candidats, deux (*Hordeum vulgare* et *Dichanthelium oligosanthos*) possèdent deux codons ATG après ce codon stop repère. Lors de la traduction bioformatique des séquences protéines pour ces deux, nous avons choisis les séquences à partir du premier ATG après ce codon stop repère.

Espèces ou identifiant	Numéro d'accèsion sur UNIPROT ou NCBI	pI/Mw en Dalton	Nbre AA	Similitude en %
<i>Triticum aestivum</i> (2AS)	A0A1D5TNI6	9,15/15725	154	100
<i>Triticum aestivum</i> (2BS)	W5BPV0	9,45/15840	155	89
<i>Triticum aestivum</i> (2DS)	A0A1D5UYD7	9,18/15813	154	90
<i>Aegilops tauschii</i>	XP_020160178 (NCBI)	9,18/15813	154	90
<i>Secale Cereale</i>	GCJW01026743 (NCBI)	9,15/15219	148	87
<i>Oryza.S.japonica</i>	Q8LI24	9,41/16742	164	56
<i>Leersia Perrieri</i>	A0A0D9X1Q4	9,52/17406	169	51
<i>Sorghum bicolor</i>	A0A1B6QFQ7	9,87/17659	169	57
<i>Zea mays</i>	A0A1D6IKF4	10,10/16940	160	54
<i>Serita Italica</i>	XP_012699363 (NCBI)	9,62/17921	171	55
<i>Hordeum vulgare</i>	GFJO01002305 (NCBI)	8,52/15624	151	78
<i>Musa acuminata</i>	XP_018675173 (NCBI)	8,52/15624	166	78
<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_010235216 (NCBI)	7,94/14368	142	48
<i>Dichanthelium oligosanthos</i>	A0A1E5UL28	9,72/14437	158	58
<i>Ananas comosus</i>	A0A199UTV5	8,08/17536	158	35
<i>Phoenix dactylifera</i>	A0A2H3ZC30	8,92/18294	168	33

3.8 Prédiction de la structure primaire des protéines

La Figure 3.9 résume sous forme d'alignement des différents homologues et présente les différents critères analysés autre que le signal peptide, tel que la prédiction des régions hydrophobes, amphipathiques et en superhélice.

De nombreuses études ont travaillé sur la conception des protéines afin d'examiner les éventuelles relations séquence-structure de la protéine et ainsi identifier de nouvelles structures et fonctions protéiques (Beasley et Hecht, 1997; Hill et DeGrado, 2000). Pour réussir, cependant, le processus de conception de protéines nécessite la

vérification de règles fiables qui lient la séquence protéique à la structure et à d'éventuelles fonctions. C'est ainsi que pour ces études, il y a deux concepts importants dans la caractérisation de nouvelles protéines. Il y a la conception structurale basée soit sur la structure secondaire (hélice α et feuillets β), soit sur les régions amphipathiques (superhélice). Ceci peut aider à établir un lien entre les caractéristiques structurelles et fonctionnelles, compte tenu du fait que les séquences protéiques ne présentent aucune homologie significative avec des protéines de fonctions connues. Sur cette base, nous avons analysé les homologues protéiques en commençant par la recherche de région hydrophobe à l'aide de l'algorithme *PSIPRED* (McGuffin et al., 2000) et par la recherche de région superhélice à l'aide des algorithmes tels que *MARCOILS*. Ainsi, l'alignement de ces séquences protéiques et la recherche de motifs et de caractéristiques séquentielles spécifiques nous ont permis d'obtenir certaines informations sur la protéine codée par le gène NC2 (Figure 3.9).

La Figure 3.9 nous apprend que certaines régions chez les différents homologues semblent assez conservées. Nous avons quatre régions hydrophobes et constantes chez les candidats. Le premier constat est qu'à l'exception de *Musa acuminata* et de *Ananas comosus*, la première région hydrophobe serait un domaine transmembranaire, de plus le programme utilisé nous indique que l'extrémité N-terminale qui est la région avant ce domaine serait extracellulaire et l'extrémité C-terminale serait intracellulaire, avec 10 candidats sur 14 présentant cette orientation. Dans l'alignement, deux autres régions sont hydrophobes en hélices α , à savoir VELAIGV et WLDALRAWAKLCLK car nous constatons que leur propriété liée à leur polarité est bien conservée dans les autres candidats. Finalement, concernant la dernière région hydrophobe, le programme Marcoil nous apprend qu'il s'agit d'un domaine en superhélice SMKKAQKQSLAMGKEAVEQTAVSAARAAEETIGRT TEKVR. Tout ceci est très intéressant connaissant le rôle des superhélices dans les interactions protéines-protéines, d'autant plus que cette partie de la protéine serait

intracellulaire. Enfin, un autre fait intéressant est à la fin des séquences des candidats qui présentent un motif bien conservé DXYL, où X est majoritairement un G/A dans l'alignement. Avec la présence d'une superhélice, nous avons décidé d'ouvrir une nouvelle porte de collecte d'informations sur le sujet lié à NC2. En parallèle, nous nous sommes intéressés aux modifications post-traductionnelles, en particulier la glycosylation favorisant la localisation cellulaire (membrane plasmique, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) et son dérivé l'acétylglucosaminylation de par son implication dans la localisation cellulaire (cytoplasme et noyau) et dans les réponses des plantes aux variations hormonales et environnementales (Olszewski et al., 2010). Nous avons répertorié les différents sites de glycosylation. Nous avons utilisé le programme GPP (Hamby et Hirst, 2008) pour la prédiction de sites de N- et O-glycosylation, car ce programme semble être de manière générale le mieux adapté pour cette analyse. Sur la base de l'analyse via GPP des différents homologues protéiques de NC2, nous avons établi des sites consensus sur la protéine de NC2. Ainsi, nous avons les sérines en position (12, 41, 139, 141, 143, 145) et on observe que certains sites sont bien conservés entre les 14 protéines analysées. On observe que la sérine en position 139 est présente chez les 14 protéines, celle en position 41 est présente chez 11 protéines et celles en position 141 et 143 sont présentes chez 9 protéines. La même logique fut suivie pour les sites d'acétylglucosaminylation entre les espèces et les programmes utilisées, *MUSITE* (Gao, et al., 2010) et *O-GlcNAcPred-II* (Jia, et al., 2018), ainsi nous obtenus des sérines en position (17, 93, 118, 139, 141, 143, 145) et des thréonines en position (16, 19, 21, 115, 131, 144). De même, certaines positions de thréonines sont assez bien conservées entre les 14 protéines, la position 131 (9/14) et la position 115 (7/14). Concernant les sites sérines, les trois programmes indiquent les positions 139, 141, 143 et 145. La forte présence de ces sites suggère une localisation membranaire de notre protéine mais ne nous indique pas si notre protéine est située sur l'appareil de Golgi ou sur le réticulum endoplasmique.

Triticum (AS)	MCGKGRNGLAS	PAG-----	TS	GTAT	AIVALASLLLAASVVVFL	SP----	PAPAADEK-----
Aegilops	MCGKGQNNGLAS	PAG-----	TS	STATA	IVVLASLLLAASVAAFFL	SPS----	PSPAADK-----
Secale	MCGKGQNNGLAS	PAG-----	TS	GTATA	IVVFASLLLVASVVVFL	SP----	PAPATDGK-----
Hordeum	MCVKGKNDGL	SPAG-----	TS	GTATA	IVVLASLLLVASAAVFFL	SP----	PAPAAAADE-----
Sorghum bicolor	MRGNRNGKKGGGAGADGDA	ARPVAT	CMAAI	IVSV	VVALLVVASVLLFLL	S-----	PPGVPGTPG-----
Zea mays	MSGNRNGR-GKGA	-----	ARPVAT	CMAAI	IVCVVLLVVAASALLFLL	SSS-----	PPPATGVPG-----
Serita	MRGKNRRAARDGAADD	ADDAARPA	-----	CMAAT	IVAVVLLVVASALLFLL	S-----	PPGAPGGGG-----
Dichanthelium	MGGKNRGAARDG	-----	ADAAARPA	-----	VVASALLFLL	S-----	PPAAPGGGG-----
Oryza japonica	MGGSRNNNGGKTAE	-----	AAAAAS	GTANT	VVALVLLVVAASAVVFL	SP----	PTPATRIGR-----
Leersia	MGGGSRNNNGAVATEAT	-----	AAAAAS	GTATT	VVALVLLVVAASVVVLL	SPPTPTPT	PAVTRIGD-----
Brachypodium	MCGVKSGKGGVA	PA-----	-----	AVIV	VSLLLVVAASVLAFL	SP----	LAPPAADGKAG-----
Musa	MAAGGCT	RTSS-----	-----	SLFL	LLLLL-LSSLT	SP-----	SYGCAHDG-GEAKGNEMRYERA
Phoenix	MANGVGGRRPPA	PSY-----	-----	LSS	LLLLLSLFLVLSPLIL	SPVRRGDHGDGDRG	SGSD-----
Ananas	MDNINATVRR	-----	-----	ITAV	LLFLVVSLLS	PLV-----	RCDEHGQRDRVER-----
Triticum (AS)	-----	PPEPVELAIGVAGHEG	WLD--	ALRAWAKLACLKLR	-----	PLEP---	RCDL-RSS-GSMKKAA
Aegilops	-----	PPEPVELAIGVAGHEG	WLD--	ALRAWAKLACLKLR	-----	PLEP---	RCDL-RSS-GSMKKAA
Secale	-----	PPEPVELAIGVAGHEG	WLD--	ALRAWAKLACLKLR	-----	PLEP---	RCDL-RSP-GSVKKAA
Hordeum	-----	KPPPEPVELAIGVAGHEG	WLD--	ALRAWAKLACLKLR	-----	PLEP---	RCDL-RSP-GSMKKAA
Sorghum bicolor	-----	NGPPREPVELAIGLAGHER	WLD--	ALRAWAKLACFNIR	-----	HAEP---	RYHLVRSP-ASVAKAA
Zea mays	-----	NGPPREPVELAIGLAGHER	WLD--	ALRAWAKLACFNLRPPAEP	-----	RYHLVRSP	PAASVTKAA
Serita	-----	GEGKGAPREPVELAIGIAGHER	WLD--	ALRAWAKLACFKLR	-----	PAEP---	RYDVLRS-ASVKMAA
Dichanthelium	-----	GEGPPREPVELAIGIAGHER	WLD--	ALRAWAKLACFKLR	-----	PAEP---	RYDVLRS-ASVKMAA
Oryza japonica	-----	HGDGPPREPVELAIGLAGHER	WLD--	AVRAWAKLACLKLR	-----	PPEP---	RYDL-RSPAA-VKAAA
Leersia	-----	GGEVSPR-EPVEHAIGLAGYES	WLD--	AVRAWAKLAFKLR	-----	PPEP---	RYHLRRPASVKVAAA
Brachypodium	-----	APPEPVELAMAGAGHEGGHGLD	LGALRAWAKLAFKLR	-----	PLEP---	RGLRSP	SGESVVTKAA
Musa	EQOQQQQQGPQVERAIGL	RSAS--	RWD--	TIRTWAKLACMNL	-----	PPS	STERYGRGESSAWEVVKEAA
Phoenix	DKELGEKQEPDPAERAIGM	ALTS--	RWD--	AIRTWAKLAWMNF	-----	PPES--	WYRRRDSAGEVVKEAA
Ananas	MEVVEAKQQPDPAERAIGITGMN	-----	RWD--	AVKAWAKLASMNF	-----	PPES--	WYRRRG-TSGEVVKDAA
Triticum (AS)	KQSLAMGKEAVEQTAV	SAARAAEETIGRTTEK	VRRKV	SPSPST	SAPLA-DGDL		
Aegilops	RQSLAMGKEAVEHTAV	SAARAAEETIGRTTEK	VRRKV	SASPS	APRA-DGDL		
Secale	KQSLAMGKEAVEHTAV	SAARAAEETIGRTTEK	VRRKV	SPSPS	-----	DGDL	
Hordeum	RQSLAMGKEAVEHTAESA	ARAADETIGRTTEK	VRRKV	SPSPS	-----	DGDL	
Sorghum bicolor	KKTLEMKGKETVEHTAESA	ARATEEALERTTEK	VRRKV	SGSR	PAARRPDGDGDL		
Zea mays	KSTLEMKGEMVEKLAESA	ARATEEALERTTEK	VRRKV	-----	PSARRP--	DGDL	
Serita	KESLEMKGKETVRHSAESA	ARATEEALERTTEK	VRRKV	SLSPS	PSARRR--	DGDL	
Dichanthelium	KESLEMKGKETVKQSAESA	ARATEEALERTAEK	VRRKV	SFSR	PSRRR--	DGDL	
Oryza japonica	KEALEMGKVAVEHAAESA	AAEAVGKT	TVKLKRL	SPPT	PAGGRL--	DEDL	
Leersia	KETLEMKGKETVEHAAESA	---ETLGKT	TVKLKRL	SPSS	PPAGRL--	DGDL	
Brachypodium	KKSLEMKGKETVEHTAESA	---DALRR	TSS	-----	HGDL		
Musa	SRSFETSKGAVEHAAESA	AKVAEKAHKTKEK	KARTV	SKPSG	-----	KPDAEL	
Phoenix	TRSFETSKETVAHTAESA	AKVAGEAMHKTKEK	KRTVSR	PEG	-----	DPDAEL	
Ananas	ARSFESGKETVEQAAASA	AHAAGETMHKTKEK	KRTVTS	SAGQ	-----	ELDAEL	

Figure 3.9 : Alignement des séquences protéiques homologues à la protéine codée par NC2. Les séquences représentées de protéines prédites pour les homologues de NC2 dans différentes espèces de plantes de la classe *Liliopsida* appartenant aux sous-classes *Zingiberidae*, *Commelinidae* et *Arecidae*. Ces séquences furent obtenues à partir des numéros d'accès du Tableau 3.2. Seule la copie la séquence de la copie AS de *Triticum aestivum* est utilisée ici, ceci dû à sa similitude avec NC2. À partir de l'alignement obtenu en utilisant CLUSTALW, différentes régions homologues sont identifiées. La surbrillance verte : région transmembranaire, rouge: signal peptide. Les régions soulignées représentent les régions en superhélice obtenues avec Marcoil, les régions en gras représentent les régions hydrophobes en hélice α . Les régions en vert représentent les feuillets β . Le bleu et la surbrillance jaune indiquent les sites de O-N-acétylglucosaminylation en sérine thréonine avec respectivement pour le programme MUSITE une sensibilité variant de 36 à 62% pour une spécificité à 95% et une sensibilité variant de 20 à 62% pour une spécificité à 99%. Pour le programme O-GlcNAcPred-II une sensibilité de 81,05% pour une spécificité de 95,91% et une précision de 91,43%. Le rouge indique via GPP (glycosylation prediction program) les sites de N- et O-glycosylation en sérine avec une précision de 90,8%, une sensibilité de 96,1% et une spécificité de 88,9%; en thréonine avec une précision de 92,0%, une sensibilité de 93,6% et une spécificité de 92,4%, en asparagine avec une précision de 92,8%, une sensibilité de 96,6% et une spécificité de 91,8%.

Pour en savoir plus sur ce domaine en superhélice, nous l'avons analysé avec différents programmes, HELIQUEST (Gautier et al., 2008) dans le but de définir sa périodicité, et LOGICOIL (Vincent et al., 2012) dans le but de définir son degré d'oligomérisation et son orientation. Ainsi, le Tableau 3.3 nous permet de supposer que la région en superhélice de notre protéine chez le blé serait de périodicité $11/3$ (3.67 acides aminés par tour) car le dénombrement des périodicités nous montre que chez les quatorze protéines, toutes se voient prédire une périodicité $11/3$ dans cette région. Il est clair qu'avec ses trois représentants parmi lesquels ne figurent pas le blé, la périodicité $7/2$ ne semble pas être liée à notre protéine. Son état d'oligomérisation serait tétramérique (avec 11 candidats sur 14 présentant cette configuration parmi lesquels le blé) ou dimérique antiparallèle (avec majoritairement 6 candidats sur 14 présentant cette configuration). Nous avons aussi constaté que chez le blé la superhélice présente une face hydrophobe MGAVLA qui semble assez bien conservée chez les autres candidats car des variations de certains acides aminés possèdent les mêmes propriétés. Par exemple, chez *Zea mays* nous avons VGAVLA ou chez *Ananas comosus* avec VGAVFA ou encore chez *Phoenix dactylifera* avec AVFA. Tous ces résultats nous suggèrent que nous avons bien une région qui serait principalement une superhélice avec une périodicité de $11/3$. Dans la figure 3.10, on voit clairement ressortir la face hydrophobe de la superhélice.

Tableau 3.3 : Analyse des régions en superhélice de la protéine de NC2. Les régions prédites pour être en superhélice sont caractérisées par le programme HELIQUEST. Ce dernier base son analyse dans six classes de domaines ou régions (les segments transmembranaires, les feuillets β , les hélices : ceux liant les lipides, ceux liant possiblement aux lipides, les spirales) (Gautier et al., 2008). La prédiction du degré d'oligomérisation est effectuée avec le programme LOGICOIL, ce programme est basé sur les superhélices connues, et il est associé à la périodicité 7/2 tout en tenant compte des anomalies tels que les «skips», les «stutters» et les «stammers» (Vincent et al., 2012).

Candidats	Périodicité 7/2	Périodicité 11/3	Périodicité 10/3	État d'oligomérisation Premier choix Deuxième choix
<i>Triticum aestivum</i> (2AS)	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère parallèle
<i>Aegilops tauschii</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère parallèle
<i>Secale cereale</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Oryza japonica</i>	Oui	Oui	Non	Dimère antiparallèle Tétramère
<i>Leersia Perrieri</i>	Non	Oui	Non	Dimère antiparallèle Tétramère
<i>Sorghum bicolor</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Zea mays</i>	Oui	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Serita italica</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Hordeum vulgare</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère parallèle
<i>Musa acuminata</i>	Non	Oui	Non	Dimère parallèle Tétramère
<i>Brachypodium distachyon</i>	Oui	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Dichanthelium oligosanthes</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère parallèle
<i>Ananas comosus</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère antiparallèle
<i>Phoenix dactylifera</i>	Non	Oui	Non	Tétramère Dimère parallèle

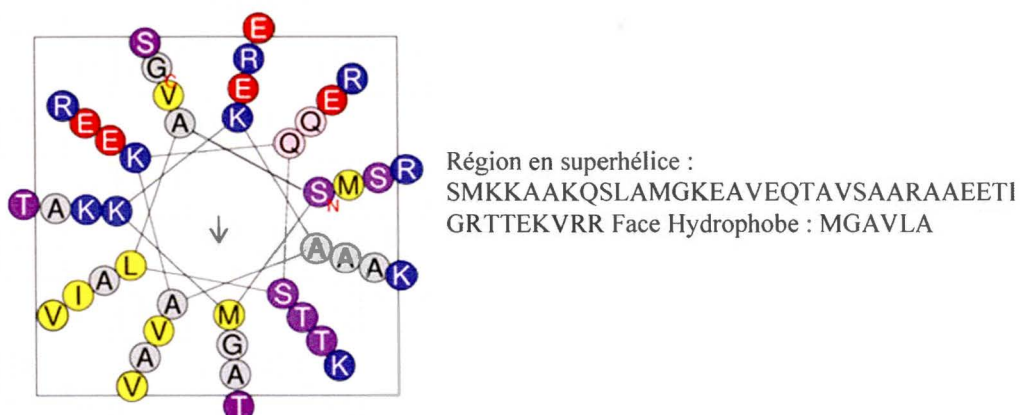


Figure 3.10 : Vue circulaire de la région en superhélice de NC2. La visualisation de la superhélice est faite avec le programme HELIQUEST suivant la périodicité 11/3. La coloration indique le type d'acides aminés, en bleu les acides aminés chargés positivement, en rouge les acides aminés chargés négativement, en gris et en jaune sont les acides aminés hydrophobes respectivement aliphatiques ou minuscules, en violet les acides aminés polaire non chargés et en rose la glutamine.

3.9 Analyse de caractéristiques *in vitro*

La protéine NC2 a un domaine transmembranaire, une hélice α amphiphile et une hélice α amphiphile ayant les propriétés d'une superhélice (Figure 3.9). Nous avons commencé par l'analyse de l'expression de la protéine normale prédite par NC2 du blé. Nous avons aussi créé différents mutants de cette dernière à savoir 5A et 6A qui sont respectivement le gène NC2 avec délétion du domaine transmembranaire, et le gène NC2 avec délétion du domaine transmembranaire + la première hélice α amphiphile. Nous avons constaté que la protéine normale n'apparaissait pas sur le gel ce qui laisse penser que son induction n'a pas fonctionné. Cependant, on observe bien la présence de protéines correspondant aux deux mutants et ce après 2 heures d'induction. Les résultats confirment d'une part le bon fonctionnement de l'induction et de plus nous permettent d'approfondir la caractérisation de la protéine (Figure 3.11-A)

Ainsi après avoir pu induire la synthèse des protéines mutantes, nous avons vérifié dans quelle fraction (soluble ou insoluble) elles se trouvent (Figure 3.11-B). Il en ressort que le mutant 5A apparaît très clairement après 2h d'induction à 0,2% et il se retrouve aussi bien dans la fraction insoluble (culot) que soluble (surnageant). Lors de la purification par affinité sur résine Ni-NTA, la protéine de fusion NC2 dans la fraction soluble est retenue sur la résine, la bande n'apparaît pas lors des fractions R et des trois premières fractions LAV (20 à 60 mM imidazole) et commence à éluer avec les deux prochains LAV (100 et 200 mM imidazole) et élue complètement dans les fractions EL (500 mM imidazole). Concernant le mutant 6A, il est présent dans la fraction soluble, par contre il est absent de la fraction insoluble (culot). La purification donne des résultats similaires au mutant 5A et permet d'obtenir une fraction purifié du mutant 6A. Bien qu'à ce niveau nous n'avons pas pu exprimer la protéine native, l'expression des mutants 5A et 6A nous indique que les protéines mutantes mesurent respectivement entre 16 et 11 kDa.

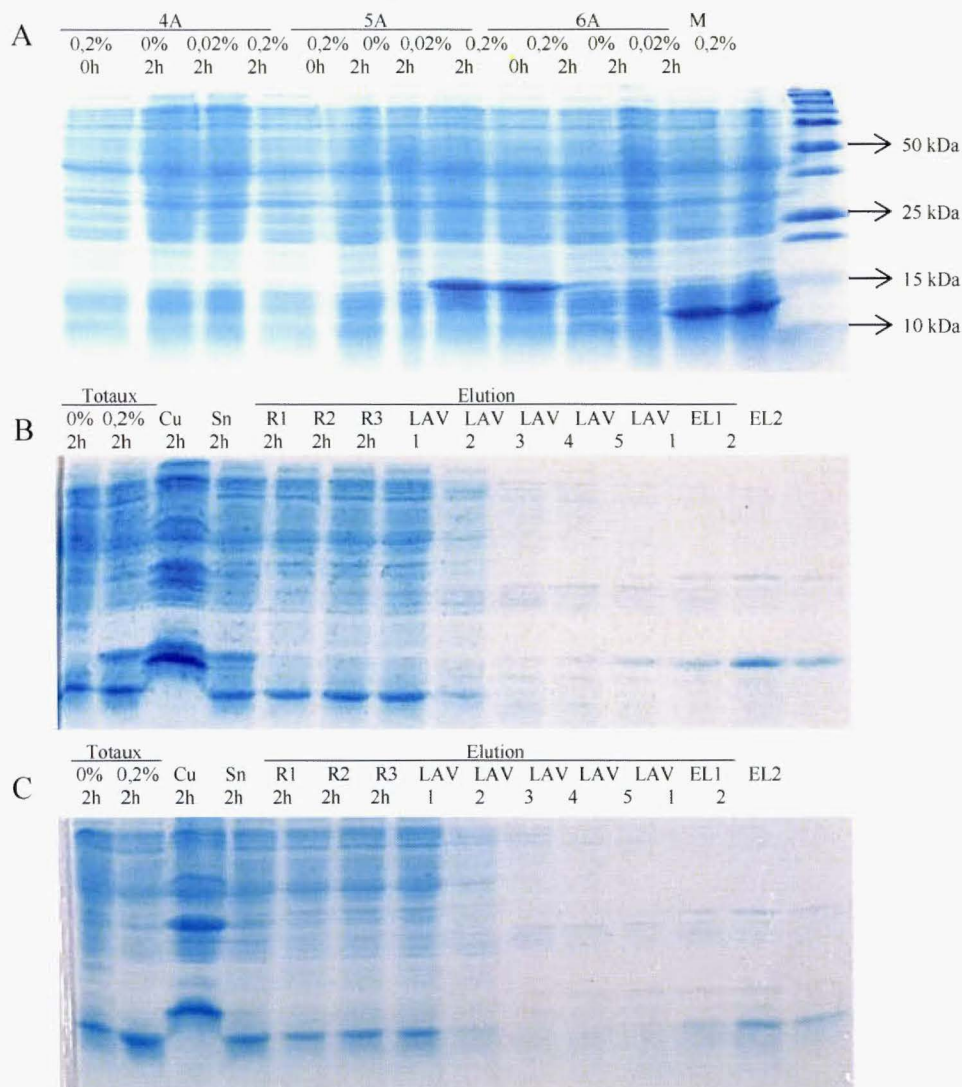


Figure 3.11 : Analyse de l'expression protéique. A : Visualisation de l'induction de NC2 et de ses mutants (5A et 6A). B : Purification de 5A. C : Purification de 6A. L'analyse sur gel d'acrylamide 13% d'extraits protéiques totaux en (A), après une expérience d'induction avec arabinose 0%, 0,02% et 0,2%, ceci en présence de 0,1% glucose et avec deux points d'échantillonnage (temps 0 et après 2h d'induction). Le Clone 4A code pour la protéine NC2 entière dans DEST17 en fusion avec un His-tag en N-terminal. Le clone 5A code pour une protéine fusion de NC2 avec d'une part une délétion d'un domaine hydrophobe et un His-tag en N-terminal. Le clone 6A code pour une protéine de fusion de NC2 avec d'une part une délétion d'un domaine hydrophobe + une première hélice amphiphile et un His-tag en N-terminal. Les fractions analysées soluble dans le surnageant (Sn), insoluble dans le culot (Cu). Les fractions de l'élué, celles non retenues par la colonne (R), celles retenues par la colonne et éluées avec 200 μ L de tampon d'élué (EL), celles obtenues après élué par lavage (LAV) avec du tampon suivant différentes concentrations d'imidazole (entre 20 et 250mM). Les différentes fractions de EL et de LAV sont numérotées de 1 à 5. (M) est le standard protéique de poids moléculaire en kilodalton de BIO-RAD (Prestained Protein Standards).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Analyse sur l'EA induit par le froid

4.1.1 Gènes induits lors de l'acclimatation au froid

Nous savions que la tolérance au froid dépend de facteurs géographiques tels que le climat (Xin et Browse, 2000), et que les facteurs environnementaux et hormonaux induisaient l'épissage de nombreux gènes y compris celui des facteurs d'épissage (Reddy, 2007). Pour cette étude, nous avons analysé 19 gènes *COR* et 8 gènes *SR* contenant des introns. L'expression de ces gènes a été caractérisée dans plusieurs tissus pendant un traitement court au froid et chez le collet durant une longue période d'acclimatation. Ces expériences ont aussi été utilisées pour déterminer si ces gènes présentaient un épissage alternatif dépendant du froid. À l'exception de *SRp30* qui a présenté une répression par le froid dans les différents tissus analysés, les 4 gènes *SR* testés par qPCR n'ont pas présenté de signe d'induction par le froid. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'ils peuvent être régulés par d'autres facteurs tels que les hormones ou être sous contrôle développemental (Reddy, 2007). Entre autres, l'ABA est reconnu comme signal secondaire et il contribue à l'établissement de l'acclimatation au froid (Peleg et Blumwald, 2011), il induit et régule des gènes comme ce fut le cas de certains gènes *SR* (exemple *SR1/SR34* et *SR45*) (Carvalho et

al., 2010; Palusa et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse que ABA régulerait également *SRp30*.

Sur les 19 gènes *COR* analysés, seulement 4 (*NC2*, *NC4*, *LT65* et *REMORINE*) ont présenté une induction marquée par le froid et un *NC3* présentait une répression, ce qui suggère une implication de ces gènes dans l'établissement de l'acclimatation au froid. Nous avons constaté que leur expression démontrait une préférence pour certains tissus. Les gènes *NC3* et *REMORINE* sont majoritairement retrouvés dans les feuilles tandis que les gènes *SR* était majoritairement associé aux racines et au collet. Le fait que les *SR* soient majoritairement régulés dans les racines et le collet peut ne pas être anodin, sachant que ces tissus sont les plus affectés par le stress hydrique, ce qui laisse penser que les gènes *SR* auraient une action spéciale dans ces tissus afin de leur permettre de répondre efficacement aux problèmes hydriques causés par le froid. Le même raisonnement peut expliquer la régulation référentielle des gènes *NC3* et *REMORINE* dans les feuilles. Concernant les Remorines, l'on sait qu'elles sont associées aux réponses aux stress en général. L'exposition au froid cause des problèmes photosynthétiques et nous pouvons supposer que la régulation de ces deux gènes à ce niveau permettrait à la plante de surmonter des anomalies de la photosynthèse. Certaines Remorines seraient impliquées dans la photoassimilation, comme le gène *GSD1* chez le riz (Gui et al., 2014), ou dans la régulation du développement de la plante exposée à un stress abiotique (exemple le gène *MIREM*) (Checker et Khurana, 2013). Concernant *NC3*, nous n'avons aucune information sur son implication dans la plante. Sa forte répression induite par le froid dans les feuilles est très intéressante mais avant toute chose il serait intéressant de le caractériser chez la plante normale. Par contre *NC2*, *NC4* et *LT65* ne semblent pas présenter de spécificité tissulaire d'induction. Excepté l'induction par le froid de *LT65*, nous ne savons rien des fonctions de ces trois gènes chez les plantes.

4.1.2 Épissage alternatif induit par le froid

Parmi les gènes analysés, nous avons appris que cinq *SR* et le gène *HMG* présentaient un EA. Les protéines *SR* représentent une famille de protéines contribuant au mécanisme de tolérance au stress abiotique chez les plantes. Ainsi une étude chez *Arabidopsis* révèle que l'expression des gènes *SR* est dépendante des stress abiotiques et des facteurs hormonaux et que ces gènes agissent sur la variabilité du transcriptome de la plante (Palusa et al., 2007). Cet étude nous apprend que *RS31* a 8 variants dont 3 sont induits par le froid. De plus, les gènes *SR* sont exprimés dans tous les organes à des niveaux différents cependant leur profil d'épissage est dépendant du tissu et du stade du développement. Ce résultat fut confirmé dans notre étude en ce qui concerne *RS31*, *SCL33*, *SRp30*, *SC35*, *SR34A* et *SR34B* qui ont présenté différents variants entre les conditions EF et NA (Figure 3.4). Par contre dans notre étude (chez le blé), *RS31* présente 5 variants identiques entre les conditions EF et NA que ce soit entre les différents tissus d'une variété (Norstar) ou que ce soit entre deux variétés (Norstar et Manitou). Nous avons aussi constaté qu'au sein d'un même tissu le profil des transcrits des gènes *SR* n'était pas pareil, exemple le gène *SR34A* qui présente dans la racine en condition EF deux bandes qui sont absente en condition NA, ce qui suppose l'induction de ces isoformes par le froid. Ceci peut être justifié par l'hypothèse que l'expression des gènes *SR* est temporellement et spatialement régulé (Palusa et al., 2007).

Pour plusieurs transcrits exprimés dans différents tissus des plantes de blé étudiées, les isoformes constants entre les conditions (dans le cas des gènes des protéines *SR*) sont ceux présents en condition NA, bien qu'ils soient réduits dans la condition d'acclimatation au froid. Cette observation fut confirmée lors de l'analyse de l'expression du gène de *SRp30* entre la condition EF et NA, où l'isoforme constant est majoritaire dans la condition EF. Ceci a soulevé des interrogations quant au mécanisme de régulation de l'EA des gènes induits par le froid. Nous savions déjà

que bien qu'étant des facteurs d'épissage, les gènes SR telle que *SRp30* subissent l'EA pendant un stress abiotique (Figure 3.5). Concernant le gène *RSZ38* que nous avons pu détecter par qRT-PCR, l'expérience de l'EA n'a donné aucun résultat. Ce résultat suppose que soit les paramètres utilisés pour cette expérience ne permettaient pas son analyse.

Ainsi après avoir identifié les gènes qui présentaient un épissage alternatif, nous avons décidé de les caractériser. Nous avons commencé par une analyse bio-informatique de *SRp30* comme modèle. Nous avons essayé de comprendre les mécanismes mis en jeu pour obtenir ces isoformes ainsi que l'impact de ces derniers. De nombreuses études furent menées sur l'EA (Ghanem, 2009; Reddy et al., 2013). Sur la base des informations obtenues lors de l'analyse bio-informatique, nous avons pu classer les événements de l'EA par rapport à leur effet prédit sur la traduction de l'ARNm. Ainsi l'isoforme CA10 fut identifié comme le transcrit codant pour la protéine SRp30 normale, car ce dernier isoforme est unique durant la condition NA et majoritaire durant la condition EF. Par prédiction traductionnelle, on obtient une séquence protéique contenant les deux domaines RRM et une région riche en sérine et arginine, ce qui confirme l'appartenance de SRp30 à la sous-famille SR. Ainsi l'étude des événements d'épissage fut effectuée sur les trois autres isoformes. L'isoforme CA16 est la plus abondante des isoformes induite par le froid. Cet isoforme est lié à l'inclusion d'un nouvel exon. Ceci est assez surprenant car ce résultat soulève la possibilité que la vitesse de la transcription au froid aurait un impact sur le choix du site d'épissage. À ce sujet, des études nous ont permis d'émettre deux hypothèses. La première hypothèse à vérifier expérimentalement serait de voir, s'il y a un lien entre la vitesse d'élongation durant la transcription et l'inclusion de l'exon faible (généralement épissé) sans affecter l'ordre d'élimination de l'intron, ce qui suggère que l'élongation lente favorise l'inclusion d'exon pendant l'assemblage du spliceosome (Luco et al., 2011), et cet effet se résume par le fait que la vitesse de synthèse de l'ARN affecte sa structure secondaire, qui à son tour affecte l'épissage.

Expérimentalement, dans le cas de la tropomyosine, il a été démontré qu'une séquence MAZ (Myc-associated zinc finger protein) insérée dans le gène de la tropomyosine conduit à une pause de l'ARN Pol II et favorise une inclusion plus élevée de l'exon 3 de la tropomyosine qui est normalement épissé (Roberts et al., 1998). Il y a également l'impact de la nature du promoteur qui affecte l'EA par son action sur l'élongation (Cramer et al., 1997). L'autre hypothèse est basée sur un mécanisme similaire par action d'éléments régulateurs d'épissage. Ces derniers agiraient sur le choix entre l'établissement d'un saut exonique ou d'une inclusion d'exon, car il a été établi que ce phénomène pouvait survenir sur un exon qui était normalement constitutivement épissé (Lev-Maor et al., 2007). Tout ceci pris ensemble nous permet d'envisager expérimenter l'impact de différents éléments liés à la transcription sur l'EA des gènes *SR* et si cela serait en lien avec l'induction par le froid.

Les deux autres isoformes sont équiprobables (1/19). Concernant l'isoforme CA02, il présente le phénomène de saut d'exon ou cassette exonique. Nous avons appris que ce type d'EA est rare chez les plantes et majoritaire dans le règne animal (Reddy, 2007). Cependant, certains cas ont été identifiés, exemple chez la patate où il s'est avéré que le stress au froid induirait un saut exonique de deux gènes codants pour des invertases (Bournay et al., 1996). Cette hypothèse permet de supposer que même chez le blé, le saut exonique est induit par le froid. Il serait important d'étudier l'impact de la protéine nouvellement formée dans la tolérance au froid puisque cette isoforme perdra son deuxième domaine RRM. Par rapport à l'isoforme CA12, on a observé deux événements sur la même séquence. Tout d'abord, nous avons vu une inclusion d'exon à la même position que l'isoforme CA16, pouvant être justifié par les mêmes hypothèses que pour l'isoforme CA16, et on a observé une rétention d'intron. Dans ce cas, l'issue est simple, il y a un fort risque de changement du cadre de lecture durant la traduction affectant la nature et la fonction de la nouvelle protéine.

Notre analyse bio-informatique a permis d'envisager l'impact sur la synthèse protéique. En se basant sur le fait que l'EA contribue non seulement à la diversité du protéome mais également à travers les événements liés à l'épissage peut introduire des codons de terminaison prématurée qui provoquent une NMD (Reddy, 2007). Ceci à son tour est connu pour jouer un rôle dans l'expression des gènes en régulant les taux de transcrits en dégradant les transcrits non-conformes. Par rapport à l'isoforme CA10, rien ne porte à croire que ce transcrit poserait problème. Cependant, concernant les isoformes 02 et 16 pour lesquels la prédiction a donné respectivement une perte dans RRM2 et une réduction du domaine riche en sérine/arginine, ces résultats laissent planer un doute sur l'aspect fonctionnel de ces protéines tronquées comparativement à la protéine normale. Concernant le RRM2 tronqué, nous n'avons pas trouvé d'études sur cet événement chez les protéines SR. Par contre, nous avons appris que chez les protéines hnRNP matures, un RRM2 tronqué causerait la perte de leur capacité à fixer l'ARN (Chen et al., 2008). Le domaine riche en Sérine/arginine a un rôle dans les liaisons entre les protéines SR et les composés protéiques du spliceosome. Sur cette base, il serait intéressant d'analyser la fonction de l'isoforme CA16 car cela permettrait d'acquérir des plus amples informations sur ces protéines SR dans le règne végétal en général et chez le blé en particulier. Finalement, le cas de l'isoforme CA12 est clair, sa prédiction nous donne une protéine tronquée, ce qui suggère qu'il y a de fortes chances que ce dernier soit dégradé par la voie NMD.

Ainsi, nous avons pu montrer que l'EA fait partie des phénomènes induits par le froid, et qu'il permet la régulation de certaines protéines SR. Il serait intéressant maintenant de savoir quel serait l'impact physiologique des différents produits de l'EA sur l'acclimatation au froid chez le blé. De plus, le fait de ne pas avoir poursuivi l'analyse de HMG pour le moment nous permet également d'envisager une étude plus poussée sur l'impact que son EA induit par le froid aurait sur la plante. Sachant que les protéines HMG sont des protéines liant l'ADN et jouant un important rôle dans la régulation des gènes et l'architecture de l'ADN (Štros et al., 2007).

4.2 Analyse de NC2

Dans cette étude, nous rapportons ici la caractérisation d'un gène *COR* codant potentiellement pour une protéine transmembranaire. Nous savions déjà depuis le début de cette étude que le gène *NC2* est un gène *COR* dont on ne connaissait pas la fonction et de ce fait sa contribution dans la tolérance au froid chez le blé. Sachant que nous n'étions pas les premiers à avoir mesuré l'expression de ce gène, c'est ainsi que par l'analyse bio-informatique les premières ébauches de l'expression de ce gène ont été établies. L'expression de *NC2* serait spécifique à certains tissus ainsi que son induction, c'est le cas des tissus liés à l'inflorescence où son expression est réprimée par des stress abiotiques, alors que le caryopse présente une surexpression induite par ces stress. Par contre, le fait que chez les semis l'expression de *NC2* ne semble pas être affectée à la suite d'une exposition à un stimuli, nous laisse penser que son expression dépend également du niveau de développement de la plante, ceci est intéressant quand on sait que des études ont montré que l'acclimatation au froid agissait même chez les semis de blé (*Triticum aestivum*), par exemple en altérant les enzymes antioxydants (Scebba, et al., 1998), d'où la possibilité que ce gène n'agisse pas à ce niveau dans l'établissement de la tolérance au froid mais pour le moment rien ne peut venir le confirmer ou infirmer. Par contre, ces premiers constats vont dans le sens que les effets induits par les faibles températures sont modulés par le stade physiologique de la plante, tels que chez les jeunes plantes, la germination et les influences hormonales qui en résultent. Ainsi l'expression de *NC2* serait induite par des facteurs de développement et de réponse à certains stress. Cette dernière hypothèse fut confirmée par différentes études présentées dans la section résultat, nous avons une surexpression de *NC2* lors de stress par le froid et salin tandis que pour les autres stress, l'induction était minime. Ceci renvoi aux différentes stratégies de tolérance aux stress chez les plantes (Raphaël, 2008), parmi lesquelles on trouve l'induction des protéines HSPs (important dans la tolérance aux stress abiotiques liés à la déshydratation, elles favorisent du repliement, de l'assemblage, de la

translocation et de la dégradation des protéines) (Wang et al., 2004), ou l'augmentation de la production d'espèces actives de l'oxygène. De plus certaines COR présentent des similitudes structurales avec les protéines HSP (Neven et al., 1994). Donc l'expression de *NC2* serait une réponse spécifique au froid et au stress oxydatif (que ce soit hormonal ou salin), plutôt qu'un effet non spécifique contrôlé par un mécanisme commun à la réponse aux stress abiotiques.

Pour obtenir des indices sur les propriétés de la protéine NC2 qui pourraient être impliquée dans l'acclimatation au froid, nous avons procédé à sa caractérisation bio-informatique en utilisant différents programmes et différentes séquences similaires à NC2 chez différentes espèces de plantes sélectionnées. Les différentes séquences protéiques s'accordent sur différents points ou propriétés liés à leur composition en acides aminés. Ainsi les prédictions *in silico* ont indiqué que NC2 coderait pour une protéine transmembranaire, possédant dans sa région intracellulaire une hélice α amphiphile et une superhélice. En plus d'avoir un domaine transmembranaire, nous pensons que la protéine NC2 est principalement localisée sur la membrane cellulaire. Les prédictions informatiques suggèrent que NC2 a une région extracellulaire du côté N-terminal. Connaissant les rôles des hélices α dans les interactions avec des macromolécules autres que protéiques par exemple chez les lipoprotéines où ces dernières interviennent dans des liaisons avec les lipides (Segrest et al., 1994), et les superhélices dans des interactions protéiques (Parry et al., 2008). Ces propriétés suggèrent que NC2 peut intervenir dans des interactions protéines-protéines. Malheureusement, les deux premières régions amphipathiques (PVELAIG et WLDALRAWAKLACLK) ne furent pas reconnues comme propre à un domaine répertorié, par contre il était très intéressant de constater que le domaine amphiphile C-terminal a été identifié comme étant un domaine en superhélice. L'analyse des sites d'acétylglucosaminylation suggère la localisation membranaire, car il a été reconnu que l'acétylglucosaminylation bien qu'étant un phénomène cellulaire intervenant dans la régulation des voies de signalisation, elle se retrouve chez des protéines

régulatrices de la membrane plasmique (Hanover, 2001). Ainsi, les différentes positions de ses sites Sérine/thréonine propre à l'acétylglucosaminylation aussi bien dans la région intracellulaire que extracellulaire semblent suivre l'idée de la localisation membranaire. Cette modification post-traductionnelle est de plus associée à différentes voies de signalisation telle que hormonale, et à la réponse aux stress osmotique et oxydatif (Zachara et al., 2004). Cette étude bien que ce soit chez les mammifères a démontré que ce phénomène est fortement induit par des stress et favoriserait la survie cellulaire. De même, il a été démontré chez le blé d'hiver que l'acétylglucosaminylation serait induite par une longue exposition au froid (Xing, et al., 2009), et qu'il favoriserait les échanges au travers du plasmodesme (Taoka, et al., 2007). Donc les sites identifiés par notre étude se trouvent aussi bien du côté intracellulaire qu'extracellulaire, ceci nous permet de supposer une interaction protéine-protéine.

Nous avons identifié un domaine en superhélice chez NC2. Les motifs structuraux en superhélice sont impliqués dans la multimérisation de sous-unités d'un grand nombre de protéines soutenant un large éventail de fonctions biologiques (Lupas et Gruber, 2005). Ceci en théorie pourrait impliquer une interaction au niveau du domaine directement, ou via des protéines accessoires intracellulaires. À partir de l'alignement des protéines présentant une forte homologie avec notre protéine d'intérêt, nous avons constaté que dans l'ensemble la région contenant la superhélice est assez bien conservée. L'analyse du degré d'oligomérisation semble indiquer une forte tendance pour que la région en superhélice soit un tétramère. De ce fait, nous avons appris que des irrégularités surviennent chez les superhélices en heptade, il s'agit des insertions d'un ou plusieurs résidus dans le motif heptade et que seules quelques superhélices sont entièrement sans discontinuité (Lupas et Gruber, 2005). Ceci aboutit à des superhélices avec d'autres périodicités tels que les hendécades comme le Tétrabrachion, décades comme les Myosines HC, etc (Gruber et Lupas, 2003). Donc l'analyse de nos protéines indiquait clairement que notre domaine serait de périodicité

11/3. Ce fait n'invalide pas les résultats obtenus pour le degré d'oligomérisation. Au contraire, ils sont liés. Il faut savoir que toutes les actuelles périodicités ont été établies ou confirmées sur la base de l'heptade, car certains chercheurs avaient constaté de nombreux cas de discontinuité chez certaines superhélices en utilisant le modèle en heptade (Cohen et Parry, 1990). Ces discontinuités étaient le «skip» (insertion d'un résidu ce qui diminue le degré de surenroulement sans affecter la conformation), le «stutter» (insertion de quatre résidus ce qui diminue le degré de surenroulement) et le «stammer» (insertion de trois résidus ce qui augmente le degré de surenroulement). Ainsi, il est apparu d'autres possibilités de périodicités. C'est le cas du 11/3 qui serait un heptade plus un «stutter». Ceci est très intéressant, cependant en pratique qu'en est-il? Il nous fallait maintenant confirmer la périodicité de notre protéine d'intérêt ainsi que son état d'oligomérisation. Pour cela, nous envisageons une caractérisation moléculaire avec des approches telles que le «cross-linking» (Sinz, 2006), l'analyse du contenu hélice α par dichroïsme circulaire (Eschli et al., 2006).

La caractérisation *in vitro* nous apporte aussi son lot d'information. Les études préliminaires effectuées par des stagiaires dans le laboratoire montrent que des fusions de NC2 avec GFP sont localisées à la membrane plasmique. L'un des points positifs fut l'expression des mutants confirmant déjà que les protéines sans le domaine transmembranaire sont solubles. Ceci a été démontré avec les mutants 5A et 6A qui respectivement possèdent une hélice α amphiphilique + superhélice ou seulement la superhélice. Cependant notre protéine (surtout le mutant 5A) reste assez hydrophobe tel que révélé par la présence de ce mutant dans la fraction insoluble. Nous envisageons également ultérieurement de trouver une solution pour l'expression de la protéine native, et d'effectuer une analyse par co-immunoprécipitation de la région contenant la superhélice afin d'avoir une idée précise sur la fonction de notre protéine par rapport à des protéines liées au froid tel que les calmodulines par exemple, ou des protéines cytosoliques ou extracellulaires.

CONCLUSION GENERALE

Le travail mené dans le cadre de ma maîtrise avait pour principal objectif d'analyser certains paramètres liés à l'acclimatation au froid d'un blé d'hiver (Norstar) afin de mieux comprendre les éléments contribuant à l'établissement de ce phénomène. Par conséquent, ce travail contribue à l'édification des connaissances de ce phénomène chez le blé. Notre travail a eu deux axes, l'épissage alternatif induit par le froid et la caractérisation partielle d'un gène *COR* de fonction inconnue. Nous avons utilisé une approche bio-informatique afin de collecter les informations qui nous serviraient de guide sur les approches (techniques) à utiliser en laboratoire.

La première partie de notre travail basée sur l'analyse de gènes *COR* et de la famille *SR* a permis d'identifier certains gènes induits fortement par le froid *REMORIN*, *LT65*, *NC2*, *NC4*, tandis que *NC3* a présenté une répression de son expression. Dans le même sens, les gènes présentant cette induction par le froid n'avaient pas en commun une localisation d'expression tissulaire préférentielle. Par contre un fait intéressant fut le gène *HMG*, il est le seul gène *COR* étudié présentant des signes d'EA. Ceci présente une bonne opportunité d'édification de la compréhension de l'établissement de l'acclimatation au froid chez le blé d'hiver via des analyses ultérieures, par exemple en associant les variants avec des effets phénotypiques ceci afin de mettre en mise évidence des liaisons entre les mécanismes associés à *HMG* et ceux liés à l'établissement de l'acclimatation au froid. Concernant les gènes de la famille des *SR*, nous avons pu identifier plusieurs qui démontraient un EA induit par le froid. À l'aide d'un candidat, le gène *SRp30*, nous avons pu recenser les événements liés à l'EA survenus et prédire les conséquences possibles. Tout comme dans le cas de *HMG*, *SRp30* servira éventuellement de base pour des analyses

ultérieures que ce soit phénotypique ou génomique. Il serait intéressant de voir comment les transcrits de *SRp30* obtenus par EA affecteront la plante au regard de l'établissement de l'acclimatation au froid. Mais avant tout il faudra d'abord vérifier si ces deux gènes (*HMG* et *SRp30*) ont un impact sur la plante. Une analyse comparative de la surexpression des gènes *HMG* et *SRp30* chez des plantes transgéniques tolérantes et sensibles au froid, nous permettra d'évaluer leur impact sur les plantes suite à une exposition au froid. Par la suite, connaissant la fonction de *SRp30* (facteur d'épissage) et de *HMG* (intervention dans l'organisation de l'ADN et la régulation de l'ADN), une analyse différentielle de l'expression des gènes suite à la surexpression de leurs différents variants permettra d'analyser l'impact fonctionnel de chaque variant sur l'établissement de l'acclimatation au froid.

La deuxième partie de mon travail de maîtrise a porté sur la caractérisation du gène *NC2*, ce dernier (gène *COR*) fut révélé dans ma première partie comme induit fortement par le froid et n'étant pas caractérisé. Ces deux points nous ont beaucoup intéressés. Cependant ne possédant aucune information sur la pertinence de *NC2* pour le blé, nous avons d'abord cherché le plus d'informations sur ce dernier via une approche bio-informatique. L'analyse *in silico* effectuée nous a permis d'identifier un domaine transmembranaire, des régions hydrophobes en hélice α et en superhélice qui furent bien conservées au travers différentes plantes de la classe des *Liliopsida*. Aussi, nous avons pu produire différents mutants (5A et 6A) de la protéine *NC2* où nous avons supprimé soit juste le domaine transmembranaire, soit le domaine transmembranaire et la première hélice amphiphile. Tout ceci n'est qu'un début car l'ensemble des données bio-informatiques collectées sur *NC2*, nous permet d'envisager différentes perspectives. D'abord, la vérification de sa localisation cellulaire au niveau de la membrane plasmique peut se faire par une analyse par SDS-PAGE et Western blot, après fractionnement d'extraits de plantes transgéniques exprimant, une protéine de fusion à étiquette FLAG (Takahashi et al., 2009). Par la suite, nous pourrions analyser son domaine en superhélice et ses sites

d'acétylglucosaminylation. Ces analyses futures nous permettront d'établir entre autres les différentes interactions dans lesquelles cette protéine interviendrait.

Quand l'on tient compte de toutes ces informations et hypothèses, nous constatons que bien que l'acclimatation au froid soit un phénomène connu, il y a encore beaucoup de travail à faire. Surtout dans le cas du blé d'hiver où l'une des problématiques serait d'améliorer la tolérance au froid de cette variété qui aurait beaucoup d'avantages surtout sur le plan économique.

BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C. H., Fujii, H., Zheng, X., et Zhu, J. K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem*, 281(49), 37636-37645.
- Aguilar, P. S., Hernandez - Arriaga, A. M., Cybulski, L. E., Erazo, A. C., et de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two -component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *The EMBO J*, 20(7), 1681-1691.
- Allo, M., Buggiano, V., Fededa, J. P., Petrillo, E., Schor, I., de la Mata, M., ... Kornblihtt, A. R. (2009). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*, 16(7), 717-724.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., et Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-410.
- Ameziane El Hassani, T., et Persoons, E. (1994). Agronomie moderne: *Bases physiologiques et agronomiques de la production végétale*. Edt AUPELF. UREF. P, 544.
- Aprile, A., Mastrangelo, A. M., De Leonardis, A. M., Galiba, G., Roncaglia, E., Ferrari, F., ... Cattivelli, L. (2009). Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. *BMC Genomics*, 10(1), 279.
- Argueso, C. T., Ferreira, F. J., et Kieber, J. J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell et Environment*, 32(9), 1147-1160.
- Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C., et Thomashow, M. F. (1996). Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13404-13409.

- Astbury, W. (1947). Croonian lecture: on the structure of biological fibres and the problem of muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 134(876) 303-328.
- Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M., et Sarhan, F. (2007). The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Mol Genet Genomics*, 277(5), 533-554.
- Badawi, M., Reddy, Y. V., Agharbaoui, Z., Tominaga, Y., Danyluk, J., Sarhan, F., et Houde, M. (2008). Structure and functional analysis of wheat ICE (inducer of CBF expression) genes. *Plant Cell Physiol*, 49(8), 1237-1249.
- Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., ... Magrane, M. (2005). The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, 33(suppl_1), D154-D159.
- Barlow, D. J., et Thornton, J. M. (1988). Helix geometry in proteins. *J Mol Biol*, 201(3), 601-619.
- Barta, A., Kalyna, M., et Reddy, A. S. (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for Sérine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *Plant Cell*, 22(9), 2926-2929.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., et Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148(1), 6-24.
- Beasley, J. R., et Hecht, M. H. (1997). Protein design: the choice of de novo sequences. *J BiolChem*, 272(4), 2031-2034.
- Berget, S. M., Moore, C., et Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(8), 3171-3175.
- Bolser, D., Staines, D. M., Pritchard, E., et Kersey, P. (2016). Ensembl plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data. In *Plant Bioinformatics* (pp. 115-140): Humana Press, New York, NY.
- Bournay, A.-S., Hedley, P. E., Maddison, A., Waugh, R., et Machray, G. C. (1996). Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Res*, 24(12), 2347-2351.
- Breathnach, R., et Chambon, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, 50(1), 349-383.

- Brini, F., Saibi, W., Amara, I., Gargouri, A., Masmoudi, K., et Hanin, M. (2010). Wheat dehydrin DHN-5 exerts a heat-protective effect on beta-glucosidase and glucose oxidase activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(5), 1050-1054.
- Burge, C. B., Padgett, R. A., et Sharp, P. A. (1998). Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell*, 2(6), 773-785.
- Carvalho, R. F., Carvalho, S. D., et Duque, P. (2010). The plant-specific SR45 protein negatively regulates glucose and ABA signaling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 154(2), 772-783.
- Checker, V. G., et Khurana, P. (2013). Molecular and functional characterization of mulberry EST encoding remorin (MiREM) involved in abiotic stress. *Plant Cell Rep*, 32(11), 1729-1741.
- Chen, H.-H., Chang, J.-G., Lu, R.-M., Peng, T.-Y., et Tarn, W.-Y. (2008). The RNA binding protein hnRNP Q modulates the utilization of exon 7 in the survival motor neuron 2 (SMN2) gene. *Mol Cell Biol*, 28(22), 6929-6938.
- Chen, M., et Manley, J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 10(11), 741.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., et Zhu, J. K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot*, 55(395), 225-236.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., et Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*, 12(10), 444-451.
- Chinnusamy, V., Zhu, J.-K., et Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. In *Plant Stress Tolerance* (39-55). Humana Press.
- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broke, T. R., et Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12(1), 1-8.
- Cohen, C., et Parry, D. A. (1986). α -Helical coiled coils—a widespread motif in proteins. *Trends Biochem Sci*, 11(6), 245-248.

- Cohen, C., et Parry, D. A. (1990). α - Helical coiled coils and bundles: how to design an α - helical protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 7(1), 1-15.
- Conseil international des céréales (2018). Rapport - Marché des céréales. Récupéré de <http://www.igc.int/fr/default.aspx>
- Côme, D., et Corbineau, F. (1992). *Les semences et le froid*. Paris : CÔME D.
- Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., et Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *P Natl A Sci USA*, 94(21), 11456-11460.
- Creighton, T. E. (1993). *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan.
- Crick, F. (1952). Is α -keratin a coiled coil? *Nature*, 170(4334), 882-883.
- Cuming, A. C. (1999). LEA proteins. In *Seed proteins* (pp. 753-780): Springer. Dordrecht.
- Dalal, M., Tayal, D., Chinnusamy, V., et Bansal, K. C. (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from Brassica napus plays a key role in salt and drought tolerance. *J Biotechnolo*, 139(2), 137-145.
- Davies, W. J., Kudoyarova, G., et Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J Plant Growth Regul*, 24(4), 285.
- Dinesh-Kumar, S., et Baker, B. J. (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *P Natl Acad Sci USA*, 97(4), 1908-1913.
- Doherty, C. J., Van Buskirk, H. A., Myers, S. J., et Thomashow, M. F. (2009). Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, 21(3), 972-984.
- Duque, P. (2011). A role for SR proteins in plant stress responses. *Plant Signal Behav*, 6(1), 49-54.
- Dure, L., 3rd. (1993). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J*, 3(3), 363-369.

- Dutta, K., Alexandrov, A., Huang, H., et Pascal, S. M. (2001). pH-induced folding of an apoptotic coiled coil. *Protein Sci*, 10(12), 2531-2540.
- Ergen, N. Z., Thimmapuram, J., Bohnert, H. J., et Budak, H. (2009). Transcriptome pathways unique to dehydration tolerant relatives of modern wheat. *Funct Integr Genomics*, 9(3), 377-396.
- Eschli, B., Quirin, K., Wepf, A., Weber, J., Zinkernagel, R., et Hengartner, H. (2006). Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J Virol*, 80(12), 5897-5907.
- Fang, J., Chai, C., Qian, Q., Li, C., Tang, J., Sun, L., et Liu, M. (2008). Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre - harvest sprouting and photo - oxidation in rice. *Plant J*, 54(2), 177-189.
- Fededa, J. P., et Kornblihtt, A. R. (2008). A splicing regulator promotes transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol*, 15(8), 779-781.
- Ferullo, J. M., Vezina, L. P., Rail, J., Laberge, S., Nadeau, P., et Castonguay, Y. (1997). Differential accumulation of two glycine-rich proteins during cold-acclimation alfalfa. *Plant Mol Biol*, 33(4), 625-633.
- Filichkin, S., Priest, H. D., Megraw, M., et Mockler, T. C. (2015). Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Curr Opin Plant Biol*, 24, 125-135.
- Gao, J., Thelen, J. J., Dunker, A. K., et Xu, D. (2010). Musite, a tool for global prediction of general and kinase-specific phosphorylation sites. *Mol Cell Proteomics*, 9(12), 2586-2600.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., et Drin, G. (2008). HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101-2102.
- Gebauer, F., Merendino, L., Hentze, M. W., et Valcarcel, J. (1998). The Drosophila splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA*, 4(2), 142-150.
- GENEVESTIGATOR-Shaping biological discovery. (2017). User manual. [Tutoriel]. Récupéré de <https://genevestigator.com/gv/doc/support.jsp>.

- Ghanem, D. (2009). Mécanismes moléculaires de la régulation et de la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau et cTNT dans la Dystrophie Myotonique de Type 1. Université du Droit et de la Santé-Lille II,
- Gilmour, S. J., Sebolt, A. M., Salazar, M. P., Everard, J. D., et Thomashow, M. F. (2000). Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant physiol*, 124(4), 1854-1865.
- Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J., et Tunnacliffe, A. (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *J Biol Chem*, 278(15), 12977-12984.
- Goyal, K., Walton, L. J., et Tunnacliffe, A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J*, 388(1), 151-157.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6(9), 1197-1211.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*, 17(2), 100-107.
- Grennan, A. K. (2006). Genevestigator. Facilitating web-based gene-expression analysis. *Plant Physiol*, 141(4), 1164-1166.
- Griffith, M., et Yaish, M. W. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci*, 9(8), 399-405.
- Gruber, M., et Lupas, A. N. (2003). Historical review: another 50th anniversary--new periodicities in coiled coils. *Trends Biochem Sci*, 28(12), 679-685.
- Gui, J., Liu, C., Shen, J., et Li, L. (2014). Grain setting defect1, encoding a remorin protein, affects the grain setting in rice through regulating plasmodesmatal conductance. *Plant physiol*, 166(3), 1463-1478.
- Guy, C. L., K. J. Niemi, et R. Brambl (1985). Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(11): 3673-3677.
- Gupta, A. K., et Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci*, 30(5), 761-776.

- Habash, D. Z., Baudo, M., Hindle, M., Powers, S. J., Defoin-Platel, M., Mitchell, R., et Nacht, M. M. (2014). Systems responses to progressive water stress in durum wheat. *PLoS One*, 9(9), e108431.
- Hamby, S. E., et Hirst, J. D. (2008). Prediction of glycosylation sites using random forests. *BMC bioinformatics*, 9(1), 500.
- Hammond-Kosack, K. E., et Jones, J. D. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48(1), 575-607.
- Han, S., Tang, R., Anderson, L. K., Woerner, T. E., et Pei, Z.-M. (2003). A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. *Nature*, 425(6954), 196-200.
- Hand, S. C., Jones, D., Menze, M. A., et Witt, T. L. (2007). Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 307(1), 62-66.
- Hannah, M. A., Heyer, A. G., et Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 1(2), e26.
- Hanover, J. A. (2001). Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J*, 15(11), 1865-1876.
- Hara, M., Terashima, S., Fukaya, T., et Kuboi, T. (2003). Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217(2), 290-298.
- Hellings, H. (1997). Rational protein design: combining theory and experiment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(19), 10015-10017.
- Hill, R. B., et DeGrado, W. F. (2000). A polar, solvent-exposed residue can be essential for native protein structure. *Structure*, 8(5), 471-479.
- Hinch, D. K., Hellwege, E. M., Heyer, A. G., et Crowe, J. H. (2000). Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze - drying. *FEBS J*, 267(2), 535-540.
- Hirano, K., Hirano, M., Ying, Z., Nishimura, J., Keiichi, H., Koichiro, M., et Kanaide, H. (2001). Cloning and functional expression of a degradation-resistant novel isoform of p27Kip1. *Biochemical J*, 353(1), 51-57.

- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev*, 16(4), 399-414.
- Holappa, L. D., et Walker-Simmons, M. K. (1995). The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiology*, 108(3), 1203-1210.
- Hon, W.-C., Griffith, M., Chong, P., et Yang, D. S. (1994). Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol*, 104(3), 971-980.
- Hong-Bo, S., Zong-Suo, L., et Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 45(3-4), 131-135.
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D., et Sarhan, F. (2004). Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol J*, 2(5), 381-387.
- Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., et Xiong, L. (2008). Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant molecular biology*, 67(1-2), 169-181.
- Isshiki, M., Tsumoto, A., et Shimamoto, K. (2006). The Sérine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell*, 18(1), 146-158.
- Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O., et Thomashow, M. F. (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280(5360), 104-106.
- Jia, C., Zuo, Y., Zou, Q., et Hancock, J. (2018). O-GlcNAcPRED-II: an integrated classification algorithm for identifying O-GlcNAcylation sites based on fuzzy undersampling and a K-means PCA oversampling technique. *Bioinformatics*, 34(12), 2029-2036.
- Jiang, Z. H., et Wu, J. Y. (1999). Alternative splicing and programmed cell death. *Proc Soc Exp Biol Med*, 220(2), 64-72.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., et Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res*, 36(suppl_2), W5-W9.

- Kader, M. A., et Lindberg, S. (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant signaling et behavior*, 5(3), 233-238.
- Kane, K., Dahal, K. P., Badawi, M. A., Houde, M., Hüner, N. P., et Sarhan, F. (2013). Long-term growth under elevated CO₂ suppresses biotic stress genes in non-acclimated, but not cold-acclimated winter wheat. *Plant Cell Physiol*, 54(11), 1751-1768.
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Armean, I., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., et Grabmueller, C. (2015). Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D574-D580.
- Kim, J. M., To, T. K., Nishioka, T., et Seki, M. (2010). Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant Cell Environ*, 33(4), 604-611.
- Knight, C. A., et Duman, J. G. (1986). Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, 23(3), 256-262.
- Knight, H. (1999). Calcium signaling during abiotic stress in plants. In *Int Rev Cytol* (Vol.195, pp. 269-324). Academic Press.
- Knight, H., Zarka, D. G., Okamoto, H., Thomashow, M. F., et Knight, M. R. (2004). Absciscic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiol*, 135(3), 1710-1717.
- Kornblihtt, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Munoz, M. J., et Nogues, G. (2004). Multiple links between transcription and splicing. *RNA*, 10(10), 1489-1498.
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., et Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(3), 153.
- Krainer, A. R., Mayeda, A., Kozak, D., et Binns, G. (1991). Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell*, 66(2), 383-394.
- Laberge, S., Castonguay, Y., et Vézina, L.-P. (1993). New cold-and drought-regulated gene from *Medicago sativa*. *Plant Physiol-Rockville Pike Bethesda*, 101, 1411-1411.

- Lam, W. S., Yang, X., et Makaroff, C. A. (2005). Characterization of *Arabidopsis thaliana* SMC1 and SMC3: evidence that AtSMC3 may function beyond chromosome cohesion. *J Cell Sci*, 118(14), 3037-3048.
- Laudencia-Chingcuanco, D., Ganeshan, S., You, F., Fowler, B., Chibbar, R., et Anderson, O. (2011). Genome-wide gene expression analysis supports a developmental model of low temperature tolerance gene regulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 12(1), 299.
- Lee, B. H., Henderson, D. A., et Zhu, J. K. (2005). The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *Plant Cell*, 17(11), 3155-3175.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., et Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39(4), 949-962.
- Lehti-Shiu, M. D., et Shiu, S. H. (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1602), 2619-2639.
- Lev-Maor, G., Goren, A., Sela, N., Kim, E., Keren, H., Doron-Faigenboim, A., et Ast, G. (2007). The "alternative" choice of constitutive exons throughout evolution. *PLoS Genet*, 3(11), e203.
- Li, C., Yang, Y., Junttila, O., et Palva, E. T. (2005). Sexual differences in cold acclimation and freezing tolerance development in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) ecotypes. *Plant Sci*, 168(5), 1365-1370.
- Liu, G., Loraine, A. E., Shigeta, R., Cline, M., Cheng, J., Valmeekam, V., et Siani-Rose, M. A. (2003). NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res*, 31(1), 82-86.
- Livingston, D. P., et Henson, C. A. (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiol*, 116(1), 403-408.
- Long, J. C., et Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J*, 417(1), 15-27.
- Lopato, S., Borisjuk, L., Milligan, A. S., Shirley, N., Bazanova, N., Parsley, K., et Langridge, P. (2006). Systematic identification of factors involved in post-transcriptional processes in wheat grain. *Plant Mol Biol*, 62(4-5), 637-653.
- Lopez, A. J. (1998). Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annual Rev Genet*, 32(1), 279-305.

- Lu, L., Lee, Y. R., Pan, R., Maloof, J. N., et Liu, B. (2005). An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, 16(2), 811-823.
- Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., et Misteli, T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, 144(1), 16-26.
- Lupas, A. (1996). Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, 21(10), 375-382.
- Lupas, A., Van Dyke, M., et Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252(5009), 1162-1164.
- Lupas, A. N., et Gruber, M. (2005). The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv Protein Chem*, 70, 37-78.
- Macknight, R., Bancroft, I., Page, T., Lister, C., Schmidt, R., Love, K., Dean, C. (1997). FCA, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell*, 89(5), 737-745.
- Malashkevich, V. N., Kammerer, R. A., Efimov, V. P., Schulthess, T., et Engel, J. (1996). The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science*, 274(5288), 761-765.
- Manley, J. L., et Krainer, A. R. (2010). A rational nomenclature for Sérine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes Dev*, 24(11), 1073-1074.
- Mann, M., et Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 21(3), 255-261.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., et Bryant, S. H. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D225-229.
- Marcussen, T., Heier, L., Pfeiffer, M., Sandve, S. R., et Spannagl, M., I. W. G. S. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194), 1251788.
- Marshall, J., et Holberton, D. V. (1995). Giardia gene predicts a 183 kDa nucleotide-binding head-stalk protein. *J Cell Sci*, 108 (Pt 7), 2683-2692.

- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fisette, J. F., Revil, T., et Chabot, B. (2008). 8 hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol*, 623, 123-147.
- Mastrangelo, A. M., Belloni, S., Barilli, S., Ruperti, B., Di Fonzo, N., Stanca, A. M., et Cattivelli, L. (2005). Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. *Planta*, 221(5), 705-715.
- Matlin, A. J., Clark, F., et Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Rev. Mol Cell Biol*, 6(5), 386.
- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T. A., et Seki, M. (2008). Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant Cell Physiol*, 49(8), 1135-1149.
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A., Guerra, D., Di Fonzo, et N., Mastrangelo, A. (2006). The e3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation. *Curr Genomics*, 7(8), 509-522.
- McGinnis, S., et Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue), W20-25.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., et Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404-405.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., et Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9(10), 490-498.
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirn, V., Miura, T., et Hasegawa, P. M. (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(4), 1403-1414.
- Mohseni-Masouleh, S. (2012). *Identification de nouveaux gènes CBF chez le blé hexaploïde Norstar et identification de polymorphismes au niveau de gènes CBF chez des cultivars de blé possédant des capacités différentes d'acclimatation au froid*. (Mémoire de maîtrise). Université du québec à Montréal. Récupéré de <http://archipel.uqam.ca/5457/>
- Mott, I. W., et Wang, R. R.-C. (2007). Comparative transcriptome analysis of salt-tolerant wheat germplasm lines using wheat genome arrays. *Plant Science*, 173(3), 327-339.

- Monroy, A. F. et R. S. Dhindsa (1995). "Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. *Plant Cell*, 7(3), 321-331.
- NDong, C., Danyluk, J., Wilson, K. E., Pocock, T., Huner, N. P., et Sarhan, F. (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant physiology*, 129(3), 1368-1381.
- Nelke, M., Nowak, J., Wright, J. M., McLean, N. L., Laberge, S., Castonguay, Y., et Vezina, L.-P. (1999). Enhanced expression of a cold-induced gene coding for a glycine-rich protein in regenerative somaclonal variants of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Euphytica*, 105(3), 211-217.
- Neven, L. G., Haskell, D. W., Guy, C. L., Denslow, N., Klein, P. A., Green, L. G., et Silverman, A. (1992). Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. *Plant Physiol*, 99(4), 1362-1369.
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., et Banno, H. (2002). Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell*, 109(1), 87-99.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., et Kakimoto, T. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, 23(6), 2169-2183.
- Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L., et Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci*, 10(2), 79-87.
- Olszewski, N. E., West, C. M., Sassi, S. O., et Hartweck, L. M. (2010). O-GlcNAc protein modification in plants: evolution and function. *Biochimic Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(2), 49-56.
- Ouellet, F., et Charron, J. B. (2001). Cold acclimation and freezing tolerance in plants. eLS.
- Ozheredova, I. P., Parnikoza, I. Y., Poronnik, O. O., Kozeretska, I. A., Demidov, S. V., et Kunakh, V. A. (2015). [The mechanisms of Antarctic vascular plants adaptation to abiotic environmental factors]. *Tsitol Genet*, 49(2), 72-79.

- Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F., et Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J*, 23(6), 785-794.
- Padgett, R. A. (2012). New connections between splicing and human disease. *Trends Genet*, 28(4), 147-154.
- Palusa, S. G., Ali, G. S., et Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre - mRNAs of Arabidopsis Sérine/arginine - rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant J*, 49(6), 1091-1107.
- Papadopoulos, J. S., et Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*, 23(9), 1073-1079.
- Parry, D. A., Fraser, R. B., et Squire, J. M. (2008). Fifty years of coiled-coils and α -helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *J Struct Biol*, 163(3), 258-269.
- Pauling, L., et Corey, R. B. (1953). Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the α -keratin type. *Nature*, 171(4341), 59-61.
- Pearce, R. S. (2001). Plant freezing and damage. *Ann Bot*, 87(4), 417-424.
- Peleg, Z., et Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol*, 14(3), 290-295.
- Planes, M. D., Niñoles, R., Rubio, L., Bissoli, G., Bueso, E., García-Sánchez, M. J., et Rodriguez, P. L. (2014). A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of Arabidopsis thaliana based on inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase and decreased cytosolic pH, K⁺, and anions. *J Exp Bot*, 66(3), 813-825.
- Qin, D., Wu, H., Peng, H., Yao, Y., Ni, Z., Li, Z., et Sun, Q. (2008). Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (Triticum aestivum L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics*, 9, 432.
- Rackham, O. J., Madera, M., Armstrong, C. T., Vincent, T. L., Woolfson, D. N., et Gough, J. (2010). The evolution and structure prediction of coiled coils across all genomes. *J Mol Biol*, 403(3), 480-493.

- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E., et Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci*, 114(Pt 12), 2255-2263.
- Raphaël, L. (2008). *Phénotypage métabolique des réponses aux stress abiotiques chez Arabidopsis thaliana. Analyse fonctionnelle et intégrative du métabolome.* (Thèse de doctorat) Université de Rennes 1.
- Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 267-294.
- Reddy, A. S., Marquez, Y., Kalyna, M., et Barta, A. (2013). Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell*, 25(10), 3657-3683.
- Reddy, K. J., Rao, K., et Raghavendra, A. S. (2006). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer & Bussiness Media.
- Roberts, G. C., Gooding, C., Mak, H. Y., Smith, C. W., et Proudfoot, N. J. (1998). Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic Acids Res*, 26(24), 5568-5572.
- Rose, A., et Meier, I. (2004). Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol Life Sci*, 61(16), 1996-2009.
- Roughan, P. G. (1985). Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol*, 77(3), 740-746.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., et Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J*, 23(3), 319-327.
- Sandve, S. R., Rudi, H., Asp, T., et Rognli, O. A. (2008). Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 245.
- Sanghera, G. S., Wani, S. H., Hussain, W., et Singh, N. B. (2011). Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Curr Genomics*, 12(1), 30-43.
- Scebba, F., Sebastiani, L., et Vitagliano, C. (1998). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiol Plant*, 104(4), 747-752.
- Schachtman, D. P., et Goodger, J. Q. (2008). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci*, 13(6), 281-287.

- Segrest, J. P., Garber, D. W., Brouillette, C. G., Harvey, S. C., et Anantharamaiah, G. (1994). The amphipathic α helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. In *Advances in protein chemistry* (Vol. 45, pp. 303-369): Academic Press.
- Seo, P. J., Kim, M. J., Park, J. Y., Kim, S. Y., Jeon, J., Lee, Y. H., et Park, C. M. (2010). Cold activation of a plasma membrane - tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis. *Plant J*, 61(4), 661-671.
- Sharma, P., Sharma, N., et Deswal, R. (2005). The molecular biology of the low-temperature response in plants. *Bioessays*, 27(10), 1048-1059.
- Sharma, P., Sharma, N., et Deswal, R. (2005). The molecular biology of the low - temperature response in plants. *Bioessays*, 27(10), 1048-1059.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., et Yang, S. (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(6), 2578-2595.
- Shibasaki, K., Uemura, M., Tsurumi, S., et Rahman, A. (2009). Auxin response in Arabidopsis under cold stress: underlying molecular mechanisms. *Plant Cell*, 21(12), 3823-3838.
- Shih, M.-D., Hoekstra, F. A., et Hsing, Y.-I. C. (2008). Late embryogenesis abundant proteins. In *Advances in Botanical Research, Elsevier*, 48, 211-255.
- Shin, C., et Manley, J. L. (2004). Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(9), 727-738.
- Simpson, C. G., Fuller, J., Maronova, M., Kalyna, M., Davidson, D., McNicol, J., et Brown, J. W. (2008). Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. *Plant J*, 53(6), 1035-1048.
- Sinz, A. (2006). Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev*, 25(4), 663-682.

- Soulages, J. L., Kim, K., Walters, C., et Cushman, J. C. (2002). Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiol*, 128(3), 822-832.
- St Maurice, M., Mera, P. E., Taranto, M. P., Sesma, F., Escalante-Semerena, J. C., et Rayment, I. (2007). Structural characterization of the active site of the PduO-type ATP:Co(I)rrinoid adenosyltransferase from *Lactobacillus reuteri*. *J Biol Chem*, 282(4), 2596-2605.
- Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J., et Thomashow, M. F. (1998). Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14570-14575.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., et Zhu, J. K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci*, 12(7), 301-309.
- Suzuki, I., Los, D. A., Kanesaki, Y., Mikami, K., et Murata, N. (2000). The pathway for perception and transduction of low - temperature signals in *Synechocystis*. *The EMBO J*, 19(6), 1327-1334.
- Swire-Clark, G. A., et Marcotte, W. R., Jr. (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol*, 39(1), 117-128.
- Szabados, L., et Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15(2), 89-97.
- Štros, M. (2010). HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(1-2), 101-113.
- Štros, M., Launholt, D., et Grasser, K. D. (2007). The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*, 64(19-20), 2590.
- Takahashi, H., Nozawa, A., Seki, M., Shinozaki, K., Endo, Y., et Sawasaki, T. (2009). A simple and high-sensitivity method for analysis of ubiquitination and polyubiquitination based on wheat cell-free protein synthesis. *BMC Plant Biol*, 9(1), 39.
- Tamura, T., Hara, K., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., et Sano, H. (2003). Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-

- located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol*, 131(2), 454-462.
- Taoka, K.-i., Ham, B.-K., Xoconostle-Cázares, B., Rojas, M. R., et Lucas, W. J. (2007). Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell*, 19(6), 1866-1884.
- Thomas, J., Palusa, S. G., Prasad, K. V., Ali, G. S., Surabhi, G. K., Ben - Hur, A., et Reddy, A. S. (2012). Identification of an intronic splicing regulatory element involved in auto - regulation of alternative splicing of SCL33 pre - mRNA. *Plant J*, 72(6), 935-946.
- Thomashow, M. F. (1998). Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol*, 118(1), 1-8.
- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50(1), 571-599.
- Thomashow, M. F. (2001). So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol*, 125(1), 89-93.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., et Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673-4680.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*, 27(10), 527-533.
- Tompa, P., Szasz, C., et Buday, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci*, 30(9), 484-489.
- Torres, M. A., et Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, 8(4), 397-403.
- Townley, H. E., et Knight, M. R. (2002). Calmodulin as a potential negative regulator of Arabidopsis COR gene expression. *Plant Physiol*, 128(4), 1169-1172.

- Tremblay, K., Ouellet, F., Fournier, J., Danyluk, J., et Sarhan, F. (2005). Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant Cell Physiol*, 46(6), 884-891.
- Tunnacliffe, A., Hinch, D. K., Leprince, O., et Macherel, D. (2010). LEA proteins: versatility of form and function. In *Dormancy and resistance in harsh environments* (pp. 91-108): Springer, Berlin, Heidelberg.
- Uemura, M., Joseph, R. A., et Steponkus, P. L. (1995). Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiol*, 109(1), 15-30.
- Ulrich, H. D. (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol*, 15(10), 525-532.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., et Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 11(9), 1743-1754.
- Valiellahi, E., et Niazi, A. (2009). Isolation of a Cold-Responsive Gene (Wcor14) Encoding a Chloroplast-Targeted Protein from *Aegilops tauschii*. *Biotechnology*, 8(3), 351-357
- Van Buskirk, H. A., et Thomashow, M. F. (2006). *Arabidopsis* transcription factors regulating cold acclimation. *Physiol Plant*, 126(1), 72-80.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., et Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci*, 12(4), 160-168.
- Viklund, H., Bernsel, A., Skwark, M., et Elofsson, A. (2008). SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics*, 24(24), 2928-2929.
- Vincent, T. L., Green, P. J., et Woolfson, D. N. (2012). LOGICOIL—multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. *Bioinformatics*, 29(1), 69-76.
- Wahl, M. C., Will, C. L., et Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), 701-718.
- Wang, W., Vinocur, B., et Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.

- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., et Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9(5), 244-252.
- Weng, Y., et Parker, W. (2008). Adaptive variation in fall cold hardiness of aspen from northwestern Ontario. *Tree Physiology-Victoria-*, 28(1), 143.
- Wilkinson, S., et Davies, W. J. (2008). Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *J Exp Bot*, 59(3), 619-631.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M., Maier, A., et Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(4), 1209-1220.
- Winfield, M. O., Lu, C., Wilson, I. D., Coghill, J. A., et Edwards, K. J. (2009). Cold- and light-induced changes in the transcriptome of wheat leading to phase transition from vegetative to reproductive growth. *BMC Plant Biology*, 9(1), 55.
- Wise, M. J. (2003). LEAPing to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 52.
- Wise, M. J., et Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci*, 9(1), 13-17.
- Xin, Z., et Browse, J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ*, 23(9), 893-902.
- Xing, L., Li, J., Xu, Y., Xu, Z., et Chong, K. (2009). Phosphorylation modification of wheat lectin VER2 is associated with vernalization-induced O-GlcNAc signaling and intracellular motility. *PLoS One*, 4(3), e4854.
- Yu, X.-M., Griffith, M., et Wiseman, S. B. (2001). Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiol*, 126(3), 1232-1240.
- Yu, Y., Zhen, S., Wang, S., Wang, Y., Cao, H., Zhang, Y., et Yan, Y. (2016). Comparative transcriptome analysis of wheat embryo and endosperm responses to ABA and H₂O₂ stresses during seed germination. *BMC genomics*, 17(1), 97.

- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., et Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7(1), 85.
- Zachara, N. E., O'Donnell, N., Cheung, W. D., Mercer, J. J., Marth, J. D., et Hart, G. W. (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*, 279(29), 30133-30142.
- Zhao, C., Lang, Z., et Zhu, J. K. (2015). Cold responsive gene transcription becomes more complex. *Trends in plant science*, 20(8), 466-468.
- Zhou, Z., et Fu, X.-D. (2013). Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*, 122(3), 191-207.
- Zimmermann, P., L. Hennig et W. Gruissem (2005). "Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator." *Trends Plant Sci*, 10(9): 407-409.