

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA SPÉCIFICITÉ D'EXPRESSION
CELLULAIRE DE GÈNES CBF DU BLÉ

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

HUA CHE

NOVEMBRE 2008

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.01-2006). 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

À ma famille, tous mes amis de m'encourager à poursuivre mes études.

À mon directeur de recherche, le Pr. Jean Danyluk de me guider dans mon cheminement.

À tous les professeurs du groupe végétal: Pr. Fathey Sarhan, Pr. Mario Houde, Pr. François Ouellet, Pr. Normand Chevrier.

Aux membres du jury de mémoire.

À Yoko Tominaga, Mohamed Badawi de m'apprendre des techniques.

À mes collègues et au personnel du laboratoire surtout Khalil Kane pour son aide indispensable.

Au TOXEN de me permettre d'utiliser leur laboratoire d'histologie.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ.....	xiii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Les basses températures et l'acclimatation au froid	1
1.1.1 L'initiation de la glace chez les plantes	2
1.1.2 Les dommages causés par le froid et le gel.....	3
1.1.3 Les facteurs contre la glace formée dans la plante	4
1.2 Modifications biochimiques au cours de l'acclimatation au froid	5
1.3 Modifications moléculaires au cours de l'acclimatation au froid.....	6
1.3.1 L'acclimatation au froid induit l'expression des gènes COR	6
1.3.2 Localisation de gènes COR chez les céréales	7
1.3.3 La régulation des gènes pendant l'acclimatation	9
1.4 Facteurs de transcription de type AP2 et CBFs	11
1.4.1 Facteurs de transcription de type AP2	11
1.4.2 L'origine et structure du domaine AP2.....	12
1.4.3 La classification des gènes AP2/ERF	13

1.5 Les DREBs/CBFs et les autres régulateurs de la réponse au froid	15
1.5.1 La caractérisation des CBFs chez <i>Arabidopsis</i>	15
1.5.2 Facteurs de régulation additionnels associés à l'acclimatation.....	17
1.5.3 Les DREBs/CBFs chez les autres dicotylédones.....	21
1.5.4 Les DREBs/CBFs chez les céréales.....	22
1.5.5 Les DREBs/CBFs chez le blé	23
1.6 Problématique	26
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	29
2.1 Préparation du matériel végétal	29
2.2 Préparation du tissu.....	29
2.3 Préparation des sondes pour l'hybridation in situ.....	30
2.4 Hybridation in situ	30
3. RÉSULTATS.....	32
3.1 Production des sondes pour l'hybridation in situ.....	32
3.2 Optimisation de l'hybridation in situ	33
3.3 Localisation des gènes avec l'hybridation in situ	44
4. DISCUSSION	52
5. CONCLUSION.....	58
6. BIBLIOGRAPHIE.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1 : Effet d'une durée accrue de fixation au paraformaldéhyde (PFA) et d'une exposition au ter-butanol (TBA) sur la morphologie de feuilles de blé	35
2 : Effet de l'épaisseur de la coupe sur la morphologie de feuilles de blé.....	36
3 : Effet de la concentration de sonde dans la solution d'hybridation sur le signal spécifique.....	37
4 : Effet de la température d'hybridation et de lavage sur le signal spécifique d'hybridation.....	38
5 : Effet d'un traitement à la protéinase K sur le signal obtenu lors de l'hybridation in situ.....	41
6 : Effet du Polyvinyl Alcool (PVA) sur la réaction de coloration de la phosphatase alcaline utilisant les substrats BCIP-NBT.	43
7 : Localisation du gène LTP dans le collet et le coléoptile.....	47
8 : Localisation de la petite sous-unité de Rubisco dans la feuille mature, le coléoptile et le collet	48
9 : Localisation de la petite sous-unité de Rubisco selon le développement du tissu.....	49
10 : CBF_B4 s'exprime dans plusieurs tissus du blé traité par le froid	50
11 : Localisation de CBFIVd_B4 dans les feuilles matures et le coléoptile	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I. Liste des sondes isolées pour l'hybridation in situ	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP2: APETALA2

ABA: acide abscissique

BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt

CBF: C-repeat binding factor

CoA: acetyl-coenzyme A carboxylase

COR: cold-regulated

CRT: C-repeat

DRE: dehydration-responsive element

DREB: DRE-binding protein

EREBP: Ethylene responsive element binding protein

ERF: Ethylene-responsive element binding factor

GA: glutaraldéhyde

ICE1: inducer of CBF expression 1

ISH: hybridation in situ

LTP: Lipid transfer protein

NBT: Nitroblue tetrazolium chloride

PFA: paraformaldéhyde

PVA: polyvinyl alcool

Srub: Small subunit rubisco, Petite sous unité de Ribulose 1, 5-Bisphosphate
Carboxylase/Oxygénase, un gène nucléaire

TBA: ter-butanol

RÉSUMÉ

La tolérance au froid est une propriété importante pour la survie des plantes dans les régions nordiques. Plusieurs études montrent que des gènes inductibles collectivement par le froid sont impliqués dans l'adaptation à la croissance à basse température et à l'amélioration de la tolérance au gel du blé. La caractérisation des gènes *COR* (gènes régulés par le froid) nous renseigne sur leurs fonctions dans l'acclimatation au froid. Les facteurs CBF (C-repeat Binding Factor) jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de gènes par le froid. Plus de 25 différents facteurs CBF ont été identifiés chez le blé, classifiés en 10 groupes avec une origine phylogénétique commune et des caractéristiques structurales différentes. Une des hypothèses émises pour expliquer le nombre élevé de gènes *CBF* chez le blé est qu'il existe une spécialisation au niveau de leur expression tissulaire et cellulaire. Afin de répondre à cette possibilité, nous avons utilisé la technique sensible d'hybridation *in situ* pour examiner la distribution de l'expression des gènes *CBF* durant un traitement au froid. Des expériences préliminaires avec les gènes contrôles *LTP* (Lipid Transfer Protein) et *Srub* (Small subunit rubisco) ont permis d'optimiser la technique et de détecter l'expression de ces gènes dans les tissus appropriés. L'observation de *Srub* a aussi montré que les variations d'expression dépendaient du développement du tissu. La localisation du gène *TaCBFIVd-B4* montre qu'il est exprimé dans les tissus vasculaires de feuilles, de coléoptiles et de collet chez les plantes exposées à 4°C tandis qu'il est présent seulement dans les tissus vasculaires de collet chez des plantes contrôles exposées à 20°C. Une augmentation d'expression a été observée particulièrement dans les cellules du mésophylle de feuilles matures à 4°C comparativement aux plantes à 20°C. La localisation des autres gènes *CBF* par hybridation *in situ* permettra de connaître leurs distributions et d'assigner des rôles spécifiques ou synergiques pour certains CBF dans le développement de la tolérance au froid d'un tissu où type cellulaire donné.

Mots clés : facteur de transcription, CBF, tolérance au froid, hybridation *in situ*, optimisation

1. INTRODUCTION

La croissance et la productivité des céréales, une source importante alimentaire, sont considérablement affectées par des stress biotiques tels que les insectes nuisibles, les virus et les champignons, et par des stress abiotiques, tels que le stress hydrique, le stress salin, le froid, le stress oxydatif et les UV (Tester et Bacic 2005). Parmi eux, la baisse de température est un des facteurs environnementaux importants qui limite la distribution géographique et réduit le rendement des plantes. Le gel est plus néfaste car il peut causer aussi le stress osmotique dans un tissu. Il en résulte une dénaturation des protéines, la précipitation de molécules et de multiples formes de lésions au niveau de la membrane. La réaction des plantes à ces stress est complexe et comprend des changements aux niveaux génétique, biochimique, physiologique et même morphologique. La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la tolérance au froid d'une plante pourrait nous renseigner sur les stratégies utilisées par les plantes et ainsi nous guider pour potentiellement améliorer la productivité agricole au niveau mondial.

1.1 Les basses températures et l'acclimatation au froid

Des plantes peuvent être classifiées dans trois larges catégories selon leur capacité de réponses à des basses températures: les plantes sensibles au froid (survivent à $>15^{\circ}\text{C}$), les plantes tolérantes au froid (survivent à 0°C - 15°C), et celles tolérantes au gel (survivent à $<0^{\circ}\text{C}$) (Sharma et al. 2005). Beaucoup de plantes d'importance agronomique, tels que le coton, le soja, le riz, la tomate et le maïs sont sensibles au froid et peuvent être endommagées à $+4^{\circ}\text{C}$. Dans le cas de fruits tropicaux, les dommages peuvent même se produire à $+12^{\circ}\text{C}$. D'autres espèces, tels que l'épinard et la patate peuvent survivre à des températures avoisinant 0°C tandis que des céréales tempérées comprenant l'orge, l'avoine, le blé et le seigle, peuvent

survivre à des températures de -3°C à -30°C (Lyon et Raison 1970; Sharma et al. 2005).

Beaucoup de plantes provenant des régions tempérées peuvent augmenter leur tolérance au gel après avoir été exposées aux basses températures (de 0°C à 10°C), un processus connu sous le nom d'acclimatation au froid. Un blé d'hiver en condition de croissance normale (20°C) va mourir à -5°C , mais il peut survivre à -27°C après une période d'acclimatation au froid de 5 semaines (Thomashow 1998; 1999). C'est un processus réversible qui disparaît une fois que les températures remontent au-dessus de zéro, et il est nommé désacclimatation au froid. Chez le blé, une exposition de 5 jours à une température de 20°C suffit pour perdre la tolérance.

Dans la nature, les basses températures au dessus de 0°C de l'automne et du début de l'hiver sont les principaux déclencheurs de l'acclimatation au froid bien que la qualité de la lumière et la photopériode peuvent aussi être impliquées dans cette réponse (Stitt et Hurry 2002). Les plantes qui restent actives pendant l'hiver doivent maintenir leur métabolisme primaire essentiel pour conserver une croissance minimale. Elles doivent lutter contre le froid qui diminue la vitesse des réactions enzymatiques et modifie la conformation des lipides membranaires et d'autres macromolécules ce qui a des conséquences sur la plupart des processus biologiques (Stitt et Hurry 2002). Ce processus complexe inclut des changements physiologiques, biochimiques et moléculaires. Ces changements influencent la croissance d'une plante, l'équilibre physiologique dans une cellule, la composition des membranes cellulaires, la quantité de produits antioxydants, et l'expression de gènes et de protéines spécifiques (Hannah et al. 2005).

1.1.1 L'initiation de la glace chez les plantes

Quand la température chute en dessous de 0°C , une conséquence physique est l'initiation ou la nucléation de la glace chez les plantes (Pearce 2001). L'agrégation

de molécules d'eau pour former un noyau stable de glace peut arriver spontanément (nucléation homogène) ou être catalysé par d'autres substances (nucléation hétérogène). Dans la nature, la nucléation homogène arrive à des températures avoisinant -38.5°C car c'est à cette température qu'elle exige le moins de molécule d'eau. La réaction de nucléation hétérogène peut être catalysée par plusieurs substances dont les bactéries qui activent la nucléation de glace, d'autres molécules biologiques et structures, et les débris organiques et inorganiques. Ils sont distribués à l'intérieur et en surface de la plante et leurs activités de nucléation augmentent avec l'humidité à des températures sous le point de congélation mais proche de 0°C . La glace extrinsèque formée entre à l'intérieur de la plante par les hydathodes ou les stomates (Pearce 2001). Dans les régions tempérées où les températures durant la nuit tombent souvent sous 0°C , la fermeture des stomates empêche la pénétration de la glace formée en surface de la plante (Pearce 2001).

1.1.2 Les dommages causés par le froid et le gel

La formation de glace dans une plante affecte sévèrement la survie et la croissance d'une plante. La glace intracellulaire fait périr immédiatement les cellules par une destruction de l'intégrité du protoplasme. Il est un peu plus commun qu'il y ait formation de glace à l'extérieur de la cellule dans les espaces tissulaires (Guy 2003). Le liquide extracellulaire gèle à une température plus élevée que l'eau intracellulaire. La glace formée dans les espaces extracellulaires provoque un écart entre la concentration de liquide intra- et extracellulaire et ainsi cause un mouvement de l'eau intracellulaire vers l'extérieur. De toute évidence, ce déséquilibre osmotique provoque la déshydratation cellulaire (Thomashow 1998). Les effets du gel dépendent du génotype de la plante, de l'âge de la plante, et de la durée et sévérité du froid. En général, une plante germinale est plus sensible au gel. Les symptômes de dommages en raison d'une baisse de température incluent des lésions visibles telles que l'apparence de tissu rempli d'eau, la décoloration interne du tissu, et la sénescence

accélérée (Sharma et al. 2005). Lorsque la température baisse à la vitesse de 1°C par heure dans la nature, la formation de cristaux de glace cause un déséquilibre d'eau entre le milieu intracellulaire et l'espace extracellulaire. Ces changements physiologiques sont des dysfonctionnements transitoires car si la plante regagne la température normale de croissance, une demi-heure est assez pour faire la transition entre ces deux états chez le trèfle blanc et le pavot de Californie, deux plantes tolérantes au froid (McCully et al. 2004). Toutefois, chez les plantes sensibles au froid, les changements auront des répercussions irréversibles au niveau des membranes cellulaires et du métabolisme cellulaire (Sharma et al. 2005). Une forme de blessure fatale peut survenir lorsque l'eau gèle dans le conduit du xylème et le gaz qui s'échappe de cette masse de glace peut former une bulle d'air et interrompre la circulation d'eau pour causer directement un stress hydrique (Pearce 2001).

1.1.3 Les facteurs contre la glace formée dans la plante

Plusieurs barrières existent pour contrôler le progrès de la glace chez la plante tel que la membrane plasmique et les stomates fermés. De plus, des protéines chitinases de type protéines-antigels (AFP) ont été détectées dans les feuilles de seigle et empêcheraient la glace de se propager librement dans les tissus de la plante (Pihakaski-Maunsbach et al. 2001). Ces chitinases-AFPs jouent des rôles importants en modifiant la cristallisation de l'eau et/ou la recristallisation de la glace. Elles ont été détectées durant l'acclimatation du seigle dans les parois cellulaires de l'épiderme, des parenchymes de la gaine, des mésophylles, des vaisseaux du xylème et des parenchymes vasculaires. Étant présents, dans plusieurs types cellulaires, elles peuvent efficacement absorber le front de glace et ralentir le procédé de la formation de la glace. Une congélation plus lente signifie une plus grande capacité des cellules à s'ajuster osmotiquement et métaboliquement contre la perte de l'eau cellulaire retirée par la glace extracellulaire (Pihakaski-Maunsbach et al. 2001).

1.2 Modifications biochimiques au cours de l'acclimatation au froid

L'acclimatation au froid est essentielle pour stabiliser les membranes de plantes qui sont des sites primaires de dommages causés par le gel (Thomashow 1999). Dans les conditions de gel, les cellules qui perdent l'eau vers les cristaux de glaces extracellulaires subissent une condition équivalente à un stress hydrique (Thomashow 1999). Le type de lésion observé chez les plantes non-acclimatées est la transition de la bicouche lipidique d'une phase lamellaire vers une structure non-bicouche hexagonale-II qui peut causer la déstabilisation des membranes. Un deuxième type de lésion est la perte du protoplasme chez la plante, lorsqu'elles se réchauffent suite à une exposition à des températures entre 0°C et -5°C. Elle survient parce que suite à une contraction de la cellule, il y a une perte irréversible de la surface membranaire par vésiculation (Uemura et Steponkus, 1989). Un autre type de lésion rencontré est la fusion des endomembranes avec la membrane plasmique à des températures plus basse que -5°C. Ce type de lésion est grandement diminué chez les plantes acclimatées à cause de modifications au niveau de lipides (Uemura et Steponkus 1997; Steponkus et al. 1993). Cette modification accrue de la tolérance au froid de plantes est due aux proportions plus élevées de phospholipides insaturés et des changements quantitatifs et qualitatifs au niveau des stérols et céroside (Thomashow 1998). En outre, il est proposé que des déhydrines, des protéines très hydrophiles et solubles à l'ébullition, peuvent stabiliser les membranes soit par une interaction directement avec la surface des membranes, ou indirectement, par leur forte interaction avec l'eau environnante (Pearce 2001).

De plus, plusieurs études ont rapporté l'accumulation d'osmoprotectants durant l'acclimatation tels que le saccharose et d'autres sucres simples (Thomashow 1998). Ces sucres servent à augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme; ils peuvent aussi stabiliser les protéines et membranes contre la déshydratation associée au stress de gel.

1.3 Modifications moléculaires au cours de l'acclimatation au froid

En 1985, Guy et ses collègues ont trouvé des changements dans l'expression de 2 gènes pendant l'acclimatation au froid chez l'épinard et ont présumé qu'ils avaient des rôles dans le développement de la tolérance au froid. Dans les années suivantes (1985-1999), plusieurs gènes inductibles au froid ont été isolés et caractérisés chez plusieurs autres espèces, par exemple: *HVA1* (orge), *FAD8* et *COR15a* (*Arabidopsis*), *cas15* (luzerne) (décrit dans Thomashow 1999), et cette liste continue de croître.

1.3.1 L'acclimatation induit l'expression des gènes *COR*

Les gènes induits par le froid chez les plantes sont nommés gènes *COR* (Cold Regulated), *CS* (Cold Specific), *LTI* (Low Temperature Induced), *KIN* (cold-inducible), *RD* (Responsive to Desiccation), *ERD* (Early Dehydration-inducible) et *LEA* (Late Embryogenesis Abundant). L'identification des gènes *COR* a été réalisée chez plusieurs espèces telles qu'*Arabidopsis*, l'orge et le blé. Chez *Arabidopsis*, une étude utilisant des micro-puces à ADN a permis de détecter des changements d'expression au froid au niveau de 306 gènes sur 8000 testés (Fowler et Thomashow, 2002). Ces gènes codent pour des protéines antigél, des protéines hydrophiles similaires au déhydrines, les protéines impliquées dans le transfert des lipides, les désaturases de lipides, les chaperonnes moléculaires, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de cryoprotectants et des protéines impliquées dans la signalisation et la régulation de la transcription (Fowler et Thomashow, 2002). L'effet de ces gènes sur la tolérance au froid démontre une spécificité de protection d'organes où ils se trouvent. Le gène *COR15a* dont l'expression est localisée dans le stroma chloroplastique peut augmenter directement la cryostabilité de l'enveloppe interne chloroplastique par stabilisation de lipides membranaires en phase lamellaire et ainsi reporte la formation de la structure hexagonale-II de -4°C à -8°C. Par contre, il n'a pas d'effet sur la lyse induite par l'expansion de la cellule entre -5°C et 0°C

(Steponkus et al. 1998). De plus, aucun effet sur la survie de la plante entière n'a pu être démontré par sa surexpression (Jaglo-Ottosen et al. 1998). Ces observations signifient probablement que pendant l'acclimatation au froid, COR15a agirait avec les autres protéines codées par les gènes *COR* pour augmenter la tolérance au gel de la plante entière (Thomashow et al. 2001). L'analyse de l'expression des gènes chez *Arabidopsis* à l'aide de micropuces à ADN a montré que les racines et les feuilles avaient une réponse très différente durant l'acclimatation au froid (Kreps et al. 2002). Par exemple, 86% des gènes induits par le froid démontraient qu'ils s'exprimaient spécifiquement dans les racines ou les feuilles. Un résultat intéressant est que certains facteurs de régulation posséderaient aussi cette spécificité d'expression tissulaire par le froid (Kreps et al. 2002).

1.3.2 Localisation de gènes *COR* chez les céréales

Chez le blé, l'acclimatation au froid induit un groupe de gènes nommés *Wcor* et *Wcs* qui démontrent un niveau d'expression supérieur chez les cultivars de blé d'hiver comparativement aux cultivars de blé de printemps. Plusieurs de ces gènes d'acclimatation codent pour des protéines de type déhydrine (DHN) telles que la WCS120 (Houde et al. 1992), *Wcor39* (Guo et al. 1992), *Wcs66* (Chauvin et al. 1994), *Wcs200* (Ouellet et al. 1993), *Wcor726*, *Wcor80* et *Wcor410* (Danyluk 1997; Danyluk et al. 1998). Un grand nombre de gènes déhydrines ont été isolés aussi chez d'autres céréales. Elles sont localisées généralement à proximité des tissus vasculaires et l'expression de leurs gènes sont détectés dans le cytosol ou le noyau de certaines cellules et fonctionnent comme cryoprotectants en stabilisant les macromolécules cellulaires ou des structures. Chez l'orge, la DHN-like protéine P-80 s'accumule dans le tissu vasculaire et l'épiderme où sont des zones préférentielles de formation de glace au début de la congélation (Bravo et al. 1999). Chez le blé, l'immunolocalisation de la déhydrine WCS120 montre que cette protéine s'exprime uniquement dans le cytoplasme et le nucléoplasme de cellules de la région vasculaire

(Houde et al. 1995). Cette région serait plus sensible au froid et doit être protégée pour la croissance de la plante en condition de basses températures. De plus, l'accumulation des déhydrines acides telle que WCOR410 du blé contribuerait à la cryoprotection de la membrane plasmique de cellules de la région vasculaire (Danyluk et al. 1998).

La caractérisation de gènes du blé appartenant au groupe III LEA a démontré que plusieurs membres étaient exprimés spécifiquement dans les feuilles. Le gène *WCS19* est régulé par le froid, mais aussi, il exige la lumière pour atteindre son expression maximale. Cette observation suggérait que *WCS19* peut être impliquée dans la protection des chloroplastes contre les dommages causés par le gel (NDong et al. 2002). Deux autres protéines de ce groupe, *WCOR14* et *WCOR15* (Takumi et al. 2003), sont aussi ciblées au chloroplaste chez le blé et protégeraient le système photosynthétique II lors d'une croissance à basse température ou pendant un stress de lumière (Kobayashi et al. 2004).

Travaillant chez l'orge, Phillips et ses collègues (1997) ont caractérisé l'expression d'une famille de gène nommée *blt14*. Ils ont montré qu'à 15°C, *blt14.0*, s'exprimaient constitutivement dans les tiges et *blt14.1* dans la racine. Lors d'un traitement au froid (2°C), *blt14.0* et *blt14.1* était induit fortement seulement dans la tige et dans les feuilles matures tandis que *blt14.2* était induit que dans les feuilles matures. Des résultats similaires ont été obtenus avec des homologues chez le seigle (*rlt1412* et *rlt1421*) (Zhang et al. 1993) et le blé *WLT10* (Ohno et al. 2001). Dans une étude subséquente, Pearce et ses collègues (1998) ont examiné la localisation des gènes régulés par le froid *blt101*, *blt14* et *blt4.9* au niveau des collets et feuilles matures par hybridation in situ. *Blt4.9* code pour une protéine de transfert de lipides non-spécifique et les deux autres codent pour des protéines de fonctions non connues. Chez les plantes non acclimatées, les gènes *blt101* et *blt4.9* n'ont pas été détecté tandis que *blt14* s'exprime seulement à l'intérieur du cortex du collet. Chez les plantes

acclimatées au froid, *blt101* a été détecté dans plusieurs tissus mais plus fortement dans la zone de transition vasculaire présente dans le collet. *Blt14* s'exprime seulement dans les couches internes du cortex et dans les cellules entourant le tissu vasculaire tandis que *Blt4.9* a spécifiquement été trouvé dans les cellules épidermiques des feuilles et du collet plus matures (Pearce et al. 1998). Ensemble ces travaux suggèrent qu'il est essentiel d'avoir une spécificité tissulaire et cellulaire d'induction de gènes pour le développement approprié de la tolérance au gel.

1.3.3 La régulation des gènes pendant l'acclimatation

Pendant l'acclimatation au froid, les plantes induisent l'expression de deux groupes de gènes. Le premier groupe inclut des gènes qui s'expriment rapidement et transitoirement et code pour des facteurs de régulation de la réponse au froid. Le deuxième groupe inclut des gènes qui s'expriment graduellement (de quelques heures à quelques jours) après le stress et code pour des protéines fonctionnelles, telles que les protéines COR. Tous ces gènes inductibles par le froid sont impliqués collectivement dans l'amélioration de la tolérance au froid. Pour le moment, on ne connaît pas la fonction exacte de tous ces facteurs ni leur contribution au développement de la tolérance (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006).

Dans des travaux réalisés chez *Arabidopsis*, Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (1994) ont identifié chez les promoteurs de gènes COR, *rd29A* et *rd29B*, un motif nommé CRT (C-repeat, CCGAC) ou DRE (dehydration responsive elements, A/GCCGAC), qui répondait au froid et au stress hydrique mais non à l'ABA. Dans les régions promotrices de ces gènes, il y a aussi l'élément ABRE (ABA-responsive element) qui peut répondre au stress hydrique, à l'ABA et au froid en même temps. Ces divers éléments sont nécessaires à l'expression de cette protéine durant la maturation d'embryons et à la tolérance aux stress abiotiques des tissus végétatifs (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 1994). L'étude des promoteurs des gènes *Wcs120* (Ouellet et al. 1998) et *WCOR15* (Takumi et al. 2003) montre qu'ils

contiennent plusieurs motifs de type CRT/DRE ce qui implique que ces éléments CRT/DRE seraient conservés chez le blé.

En 1997, Stockinger et ses collègues ont trouvé par criblage simple hybride chez la levure une liaison entre le facteur de transcription C-repeat Binding Factor 1 (CBF1) et le motif CRT/DRE chez *Arabidopsis*. Plus tard, l'expérience de la surexpression de CBFs (Jaglo-Ottosen et al. 1998; Gilmour et al. 2000) chez des plantes *Arabidopsis* non-acclimatées a conduit à l'augmentation de l'expression de gènes *COR* et de la tolérance au froid. Ces expériences ont permis de démontrer le potentiel de facteurs CBF dans la régulation d'un processus multigénique (Thomashow 1998).

Jusqu'à présent, une grande variété de gènes induits par les stress s'expriment dans diverses plantes et fonctionnent non seulement dans la tolérance du stress mais également dans la régulation de l'expression de gènes ou la transmission du signal pour répondre aux stress. Après la découverte du régulon CBF (gènes cibles induits par un CBF) chez *Arabidopsis*, de plus en plus d'expérience montrent que les mécanismes similaires sont essentiels pour répondre au froid chez des plantes d'importance agronomique (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006). Les chercheurs ont porté beaucoup d'attention aux CBFs en raison de leur rôle dans la régulation de l'expression de gènes par le froid. Ses effets portent non seulement sur l'induction mais aussi sur la répression de l'expression de gènes cibles. (Fowler et al. 2002). Les protéines CBFs contiennent un domaine de liaison à l'ADN de type AP2 et fonctionnent comme des activateurs de transcription pour répondre au stress hydrique et au froid chez les plantes (Stockinger et al. 1997).

1.4 Facteurs de transcription de type AP2 et CBFs

1.4.1 Facteurs de transcription de type AP2

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient aux gènes à des sites spécifiques, tels que les promoteurs, et ainsi jouent des rôles dans l'activation ou la répression de la transcription de gènes (Zhang 2003). Ils peuvent posséder plusieurs domaines différents: un domaine capable de lier l'ADN, un domaine d'activation ou de répression de la transcription et un domaine capable d'interaction avec d'autres protéines. Les facteurs de transcription qui coopèrent avec l'ARN polymérase peuvent être divisés en trois groupes (Lodish et al. 1999).

1) Les facteurs de transcription généraux sont nécessaires à l'initiation de la synthèse de l'ARN au niveau des gènes de classe II (gènes codant pour des protéines). Ils forment avec l'ARN pol II un complexe au niveau du site d'initiation de la transcription et déterminent ainsi le site de démarrage de la transcription; ce complexe est appelé complexe basal de transcription.

2) Les facteurs de transcription généraux qui reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN. Ils sont localisés en amont du site de démarrage de la transcription.

3) Les facteurs de transcription inductibles qui reconnaissent des séquences cis spécifiques et ainsi ils fonctionnent comme des régulateurs.

Au cours du développement de la plante, l'expression appropriée des gènes est contrôlée spécifiquement par l'intermédiaire d'un ou multiples facteurs de transcription. Ils jouent un rôle critique dans la vie de tous les organismes vivants. Par exemple, plus de 1500 gènes codent pour des facteurs chez *Arabidopsis*, qui peuvent être divisés en une trentaine de familles possédant leurs caractéristiques propres.

Certaines familles, comme les MYB, MADS et AP2/ERF, ont plus de 100 membres (Gong et al. 2004).

1.4.2 L'origine et structure du domaine AP2

Dans la littérature, le domaine de liaison à l'ADN de type AP2 a longtemps été considéré spécifique aux plantes florales car il n'a pas été détecté chez les animaux (Magnani et al. 2004). Toutefois, des études récentes indiquent qu'un domaine similaire apparaît dans la portion C-terminale des protéines bifonctionnelles "homing (HNH) endonucléase". Ces protéines sont présentes chez certaines bactéries, ciliés, virus et parasites de la famille apicomplexans (Wuitschick et al. 2004; Magnani et al. 2004; Balaji et al. 2005). Les groupes de recherche de Wuitschick et ses collègues et Magnani et ses collègues ont analysé ce domaine chez les HNH endonucléases et chez les facteurs de plantes et ils ont trouvé une similarité de séquence d'acides aminés. De plus, ils ont souligné que la majorité des gènes AP2/ERF de plantes manquaient d'introns comme les HNH endonucléases. L'ensemble des résultats ont indiqué que le domaine HNH:AP2 des HNH endonucléases des ancêtres des ciliés et cyanobactéries ont été transférés horizontalement aux plantes durant l'endosymbiose ou par infection virale. Les auteurs ont démontré que de façon similaire au domaine de type AP2 des plantes, le domaine HNH:AP2 s'associe aux sites riches en G et C (Magnani et al. 2004).

En 1998, Allen et ses collègues ont identifié une région d'une soixantaine d'acides aminés conservés dans les protéines ERF qui correspondent au domaine liant l'ADN (AP2). Ce domaine lie le motif GCC (AGCCGCC) dans AtERF et forme une structure en trois dimensions comprenant trois feuillets- β antiparallèles en tandem suivie d'une hélice α . Ce sont les résidus Arg et Trp des feuillets- β qui se lient à 8 des 9 paires de bases au niveau du grand sillon d'ADN et en même temps au squelette des sucres-phosphates (Allen et al. 1998).

1.4.3 La classification des gènes AP2/ERF

Les gènes codant pour des protéines avec un domaine AP2 sont définis comme étant des facteurs de type AP2/ERF. Chez *Arabidopsis*, la séquence complète du génome a permis de détecter et classifier tous les gènes AP2/ERF. Se basant sur le nombre, la similarité et la nature des domaines de liaison à l'ADN de type AP2, les facteurs AP2 ont été classifiés en trois sous familles.

1. Les gènes de type AP2 codent pour des protéines avec 2 domaines de liaison à l'ADN AP2, eg: ANT et AP2. Ces gènes régulent le système de floraison, eg: établissement du méristème floral, l'expression de gènes floraux, le développement d'ovules et la croissance de fleurs (Kim et al. 2006).

2. Les gènes de type RAV (*RAV1* et *RAV2*) codent pour des protéines avec 1 domaine AP2 et un domaine B3 de liaison à l'ADN conservé dans VP1/ABI3, un autre facteur de transcription spécifiquement retrouvé chez les plantes. *RAV1* (Kagaya et al. 1999a) s'exprime après 1 h d'acclimatation au froid et fonctionnerait comme un facteur négatif pour la croissance et le développement des plantes et serait impliqué dans le retardement du développement des racines latérales et des feuilles rosettes (Fowler et Thomashow 2002; Hu et al. 2004). *RAV2* (RAP2.8) est aussi inductible par le froid (Teige et al. 2004) et l'obscurité (Lee et al. 2005). Il est aussi impliqué dans le développement de racines latérales (Kagaya et al. 1999b). Ces protéines sont retrouvées dans presque toutes les parties de la plante chez *Arabidopsis*.

3. Les gènes de type ERF codent pour des protéines avec 1 domaine AP2, eg: ERF et CBF. Ces gènes régulent les systèmes répondant aux stress biotiques ou abiotiques (Kim et al. 2006). En utilisant les motifs présents à l'extérieur du domaine AP2, la présence ainsi que la position d'introns, Nakano et ses collègues (2006) ont classifié les gènes de la famille ERF (122 chez *Arabidopsis* et 139 chez le riz) en douze groupes et certains de ces groupes ont été, en plus, subdivisés en sous-groupes. Les

domaines conservés chez les membres d'un même ou entre sous-groupes peuvent potentiellement jouer des fonctions similaires. Plusieurs gènes ERF qui régulent les réponses aux stress abiotiques/biotiques appartiennent à deux groupes importants : le groupe III (divisé en 4 sous-groupes) contient des membres qui répondent au froid, au stress hydrique et au stress salin et les membres du groupe IX (divisé en 3 sous-groupes) répondent à l'infection par les pathogènes. Selon cette nomenclature, les CBFs ont été classifié dans le sous-groupe IIIc (Nakano et al. 2006). Toutes les plantes possèdent des facteurs CBF même si elles ne sont pas capables d'acclimatation au froid (Zhang et al. 2004). D'après l'alignement des CBFs d'*Arabidopsis* et des protéines homologues de CBF du canola, du blé, du seigle et de la tomate, Jaglo et ses collègues (2001) ont déduit les motifs conservés suivants: PKK/RPAGRxKFXETRHP en amont et DSAWR en aval du domaine AP2. Certains acides aminés à l'intérieur du domaine AP2 peuvent avoir un rôle crucial. Par exemple, l'alanine à la 37^e position est essentiel pour l'hybridation entre le domaine AP2 et les motifs DRE et GCC (Liu et al. 2006). D'ailleurs, en analysant les résultats de plusieurs autres, Sakuma et ses collègues (2002) concluaient que les protéines ERF lient le motif GCC (AGCCGCC) impliqué dans la régulation des gènes répondant aux stress biotiques et les protéines DREB lient le motif DRE (A/GCCGAC) pour réguler les gènes répondant aux stress abiotiques. Cette propriété provient des divergences dans les séquences d'acides d'aminés; les protéines ERF contiennent Ala14 et Asp19 et les protéines DREB contiennent Val14 et Glu19. L'analyse de deux homologues de DREBs montre que Val14 est plus important pour DREB1 afin de lier le motif DRE dans les conditions de froid ou stress salin tandis que Val14 et Glu19 sont importants pour DREB2 dans les conditions de stress salin et hydrique (Sakuma et al. 2002).

1.5 Les DREBs/CBFs et les autres régulateurs de la réponse au froid

1.5.1 La caractérisation des CBFs chez *Arabidopsis*

Le gène codant pour DREB1A/CBF a été isolé chez *Arabidopsis* par Liu et ses collègues (1998). L'expérience de surexpression de l'ADNc de DREB1A chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* indique que non seulement DREB1A induit fortement des gènes cibles dans des conditions normales de croissance mais également cause des phénotypes de retard de croissance ou plantes naines. Ces plantes possèdent une tolérance accrue au gel et au stress hydrique. Ils ont trouvé 2 homologues de DREB1A/CBF3 (DREB1B/CBF1 et DREB1C/CBF2) en utilisant le criblage simple hybride chez la levure (Liu et al. 1998). Depuis six homologues DREB1/CBFs ont été identifiés et partiellement caractérisés chez *Arabidopsis* (Sakuma et al. 2002). Les gènes *CBF1-3* sont induits spécifiquement par le froid, et le gène *CBF4/DREB1D* est induit par un stress osmotique et l'ABA (Haake et al. 2002). Les deux autres CBFs, *DDF1/DREB1F* et *DDF2/DREB1E*, sont induits par le stress salin suggérant que le groupe CBF est impliqué dans plusieurs voies de signalisation lors d'exposition aux stress (Sakuma et al. 2002).

Novillo et ses collègues (2004) ont proposé un modèle pour les trois *CBFs* induits par le froid: un régulateur de CBF induit très rapidement l'expression des gènes *CBF1* et *CBF3*. Une fois que *CBF1* et *CBF3* atteignent un certain niveau, *CBF2* est induit et provoque la répression de l'expression de *CBF1* et *CBF3*. Ce modèle décrit bien les résultats car *CBF1* et *CBF3* s'expriment rapidement mais de façon transitoire tandis que *CBF2* commencent à s'exprimer tardivement mais son niveau d'expression est maintenue plus longtemps (Hannah et al. 2005). Toutes ces expressions varient avec le cycle circadien (photopériode de 12 h) et un test de délétion de la région promotrice de *CBF2* a montré que ce mécanisme implique une régulation transcriptionnelle (Fowler et al. 2005). Les niveaux d'accumulation au

froid des *CBF* étaient plus élevés en début de journée (4 heures après le début du cycle de lumière) et plus faible durant la nuit (16 heures après le début du cycle de lumière).

La surexpression de *CBF1* (Jaglo-Ottosen et al. 1998) et *CBF3* (Gilmour et al. 2000) chez *Arabidopsis* a montré qu'ils activent des gènes inductibles au froid et possédant un élément CRT/DRE sans la stimulation de la basse température. Présentement, plus de 40 gènes *COR* ont été détectés dans des régulons CBFs de la réponse au froid (Fowler et Thomashow 2002, Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006), et 38 de ces gènes ont été confirmés comme les gènes cibles de CBF3 par deux systèmes de micropuces (Maruyama et al. 2004). CBF1 peut activer des gènes comme *COR6.6*, *COR15a*, *COR47*, *COR78* tandis que CBF3 peut activer des gènes comme *COR15a*, *COR15b*, *COR78* (Thomashow 1998). Vogel et ses collègues (2005) ont observé que dans le régulon de CBF2, il avait 85 gènes induits et 8 gènes réprimés par le froid. Au total, 109 gènes sont régulés par les CBFs (Maruyama et al. 2004, Fowler and Thomashow 2002, Vogel et al. 2005), et ils ont été catégorisés en 4 groupes selon la nature des protéines codées. Le plus grand groupe possède plus de 50% des protéines et elles ont des fonctions inconnues; le deuxième possède des protéines cryoprotectrices telles que les protéines LEA; le troisième contient des protéines biosynthétiques qui fonctionnent dans le métabolisme des sucres (Gilmour et al. 2000; Fowler and Thomashow 2002) et des lipides (Maruyama et al. 2004); et le quatrième contient des protéines régulatrices (10% environ) qui fonctionnent comme des facteurs de transcription, des composantes de la voie de la transduction du signal ou comme des protéinases et des inhibiteurs des protéinases. Étant donné que certains de ces gènes n'avaient pas un motif DRE dans la région promotrice, Vogel et ses collègues (2005) ont proposé que CBF2 co-régule aussi d'autres facteurs comme *RAP2.1*, et des protéines contenant un doigt de zinc telle que *CONSTANS B-box* qui jouent à leur tour un rôle dans la régulation de gènes *COR*. Au fait, Fowler et Thomashow (2002) avait déjà proposé que *RAP2.1* et *RAP2.6* régulent des sous-

régulons du régulon CBF qui contiennent des gènes n'ayant pas le motif DRE dans le premier 1000pb de leur région promotrice. Les recherches de Hannah et ses collègues (2005) ont montré que 23% des gènes induits au froid possédaient un élément DRE dans le premier 500pb de leur promoteur.

Pour délimiter les domaines fonctionnels chez les CBFs, Wang et ses collègues (2005) ont caractérisé les domaines d'AtCBFs chez la levure et *Arabidopsis*. Ils ont trouvé que la région N-terminale jusqu'à la sérine 115 contient le domaine de liaison à l'ADN tandis que la portion C-terminale à partir de la thréonine 116 contient le domaine d'activation. Ce domaine est composé de six motifs contenant de multiples acides aminés hydrophobes. Les auteurs ont montré que quatre de ces motifs (HC2-5) contribuent à l'activité de transactivation et que le motif HC6 diminuerait l'activité (Wang et al. 2005).

1.5.2 Facteurs de régulation additionnels associés à l'acclimatation

La réaction au froid exige une coordination spatiale et temporelle de divers signaux moléculaires dans une cellule de plante. Elle commence par l'activation des senseurs (eg: des histidines kinases, des phospholipases C ou D et des senseurs de calcium) qui régulent les changements de fluidité de la membrane et ainsi passent les signaux à l'intérieur de la membrane cytoplasmique. Ensuite, le Ca^{2+} module probablement certaines kinases Ca^{2+} -dépendantes et inactive aussi les phosphatases 2A et 2B afin de hausser l'activation des kinases qui régulent alors tous les gènes/protéines inductibles par le froid associés aux voies indépendantes ou dépendantes de CBF. L'activation des kinases Ca^{2+} -indépendantes comme MAPKs et RLKs a aussi été observée chez la plante pendant l'exposition au froid. Cela signifie que deux voies de transductions de signaux sont activées après un réarrangement du cytosquelette à cause d'un changement de fluidité de la membrane (Vergnolle et al. 2005; Sharma et al. 2005). Teige et ses collègues (2004) ont décrit un modèle de la voie MAPK.

MAPK4 et MAPK6 sont activés par MKK2 durant le stress salin et le froid. L'activation de cette cascade amène une expression différentielle de 152 gènes dont 127 gènes inductibles qui incluent certains facteurs de transcription tels que RAV1, RAV2 et CBF2. Aussi, certains gènes *COR* chez *Arabidopsis*, incluant *COR6.6* qui est régulé par CBF, ont été trouvés dans la voie dépendante de calcium (Knight et al. 1996).

Le gène codant pour l'inducteur de l'expression de CBF (ICE1) a été identifié chez *Arabidopsis* (Chinnusamy et al. 2003). Cette protéine appartient à la famille d'activateurs de transcription MYC (bHLH). Sous l'effet du froid, une modification post-traductionnelle de la protéine ICE ou une interaction avec une protéine permet à ICE1 de se lier spécifiquement à des séquences MYC dans le promoteur *CBF3* et activer la transcription de régulateurs CBFs. ICE1 agit comme un régulateur positif de *CBF3* et s'exprime constitutivement dans tous les tissus. Dans le promoteur de *CBF2*, une région de 125pb contient deux segments essentiels appelés ICER1 et ICER2 impliqués dans sa régulation par le froid (Zarka et al. 2003). ICER1 a un motif CACATG qui ressemble au site spécifique des bHLH, et pourrait donc être un site potentiel pour ICE1. Toutefois, il n'y a pas encore d'évidence montrant qu'ICE1 régule *CBF2*. Dans le segment ICER2, l'absence de site de bHLH suggère qu'un autre type de facteur est impliqué.

L'étude sur le gène *MYB15* induit par le froid et membre de la famille R2R3-MYB, a montré que la protéine MYB15 interagit spécifiquement avec la région de 358–494 de la séquence d'acides aminés d'ICE1 (Agarwal et al. 2006). Toutefois, la fonction de cette combinaison n'est pas connue. Pour le moment, ICE1 est considéré comme un régulateur négatif de l'expression de *MYB15* tandis que MYB15 régule négativement l'expression des gènes *CBF1-3* en se liant à leurs régions promotrices par le motif Myb situé dans le premier 500pb. Toutefois il ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des gènes cibles de ces CBFs comme *COR15A* et *RD29A*. En

analysant tous ces résultats, Agarwal et ses collègues (2006) ont suggéré qu'en plus de ces deux facteurs de régulation, MYB15 et ICE1, il existe probablement d'autres facteurs de transcription de type MYB et MYC impliqués dans la régulation des gènes *CBF* (Agarwal et al. 2006).

En plus du régulon de CBF chez *Arabidopsis*, le facteur de transcription ZAT12 de type doigt de zinc C2H2, répond au froid, au stress oxydatif et à la faible quantité d'oxygène (Fowler et al. 2005). Selon Fowler et ses collègues (2005), le patron d'expression de *ZAT12* suit un rythme circadien inverse de celui observé pour *CBF* et *RAV1*. Dans une étude plus approfondie, Vogel et ses collègues (2005) ont confirmé que le régulon de ZAT12 joue aussi un rôle dans la tolérance au froid. Leur expérience sur la surexpression de *ZAT12* chez *Arabidopsis* a indiqué que le régulon ZAT12 inclut au moins 24 gènes (9 gènes induits et 15 réprimés) avec seulement deux gènes en commun avec le régulon de CBF. ZAT12 régule négativement l'expression des gènes *CBF1-3* indiquant un rôle de ZAT12 dans le système de régulation de la réponse au froid des plantes (Vogel et al. 2005).

Dans le cas de ZAT10, un autre facteur de transcription de type C2H2 doigt de zinc, il pourrait représenter un sous-régulon de CBF parce que la surexpression de CBF3 a montré une augmentation de l'expression de *ZAT10*. Ce dernier serait un répresseur des gènes impliqués dans la photosynthèse et le métabolisme carboné afin d'inhiber la croissance de la plante (Maruyama et al. 2004). Il réprime aussi l'expression d'un gène *COR* – *RD29A* (Chinnusamy et al. 2006). Réciproquement, dans un travail ultérieur, ils ont observé une baisse d'expression de *ZAT10* dans un mutant *ice1* déficient dans l'expression de *CBF3* (Chinnusamy et al. 2003). Donc, les facteurs de type C2H2 doigt de zinc répriment l'expression de gènes *COR* directement et/ou par la répression de CBF (Chinnusamy et al. 2006).

L'expression des *CBFs* est régulée par plusieurs protéines telles que FRY2 qui agit comme un répresseur de transcription et HOS1 (une ligase de type E3) qui régule la protéolyse de protéines cibles en liant un substrat spécifique et induisant la dégradation (Lee et al. 2001; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006). Le mutant de FIERY2 (FRY2) a démontré une augmentation significative de l'expression des gènes possédant l'élément cis DRE/CRT, mais les gènes inductibles par le froid sans DRE/CRT ont été moins affectés (Xiong et al. 2002). Cette régulation spécifique semble être provoquée par la répression de l'expression de leurs facteurs de transcription CBF/DREB. Chez le mutant *hos1* d'*Arabidopsis*, l'expression des *CBFs* et des gènes cibles est induit plus fortement lors d'une exposition au froid (Lee et al. 2001) suggérant qu'il dégrade les composants en amont de la signalisation ou les régulateurs de CBF. Dans une étude subséquente, Dong et ses collègues (2006) ont observé que HOS1 interagit physiquement avec ICE1 et provoquait l'ubiquitination *in vitro* et *in vivo*. La polyubiquitination et protéolyse d'ICE1 ont été constatées après 12 h d'exposition au froid dans le type sauvage, mais pas dans le mutant *hos1*. Par ailleurs, la surexpression de HOS1 démontre la réduction de la protéine GFP-ICE1, et de l'expression de CBF et de leurs gènes cibles. La plante d'*Arabidopsis* transgénique est devenue beaucoup plus sensible au gel. Ces résultats confirmaient que HOS1 régule négativement des gènes cibles d'ICE1 par ubiquitination et que HOS1 affecte la tolérance au gel de plantes indirectement (Dong et al. 2006). Ces protéines sont présentes dans le cytoplasme à la température normale de croissance et s'accumulent dans le noyau après l'exposition au froid. Ces observations concordent avec l'expression des *CBFs* qui augmente rapidement puis diminue avec le temps d'exposition au froid. Le gène LOS4 code pour une ARN hélicase de type DEAD-box et démontre une influence positive sur l'expression des CBF (Gong et al. 2002). Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme de l'ARN, tel que la transcription, l'épissage, la stabilité et le transport noyau-cytoplasme. Les mutants sensibles au froid, *los4-1*, ont montré une expression réduite de CBF3 et une expression retardée de CBF1 et de CBF2 pendant l'acclimatation au froid (Gong et al. 2002; Chinnusamy

et al. 2003). Cette expérience montre que le métabolisme d'ARN peut être impliqué dans les réponses au froid (Chinnusamy et al. 2003). En somme, l'expression des CBFs est effectuée sous un contrôle strict (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006).

1.5.3 Les DREBs/CBFs chez les autres dicotylédones

Zhang et ses collègues (2004) ont trouvé 3 gènes *CBF* en tandem dans le génome de la tomate mais seulement *LeCBF1* répondait au froid et codait pour une protéine fonctionnelle homologue aux *AtCBF1-3*. La surexpression de *LeCBF1* et *AtCBF3* chez la tomate a permis de détecter seulement 3 gènes qui augmentaient légèrement leur expression. Donc la tomate qui est une plante sensible au froid possède un régulon CBF, mais il y a moins de gènes dans ce régulon et leurs fonctions sont moins variées. Jaglo et ses collègues (2001) ont trouvé un régulon BnCBF chez *B. napus*. Les trois *BnCBFs* testées accumulent rapidement et induisaient les gènes *Bn115* et *Bn28* qui ressemble au gène *COR15a* d'*Arabidopsis*. Plus récemment, Zhao et ses collègues (2006) ont classifié les 11 gènes *BnCBFs* en 2 groupes, d'après un alignement de séquences. Les gènes du 1^{er} groupe ont une taille de 750pb et codent pour des protéines contenant deux insertions dans leur portion C-terminale par rapport à celles du 2^e groupe codées par des gènes en taille de 650pb. Ces deux protéines lient le motif DRE de gènes cibles de façon similaire, mais présentent des capacités variées d'activation de la transcription. L'exposition au froid chez *B. napus* provoque l'expression de *BnCBFs* du 1^{er} groupe qui activent des gènes cibles rapidement afin d'évoquer un mécanisme de la réponse au froid. Par contre, les *BnCBFs* du 2^e groupe sont induits plus tardivement, ils lient le motif DRE mais ne sont pas capables d'activer la transcription des gènes *COR*. Donc, après quelque temps, le régulon sera diminué en intensité à cause de l'accumulation des BnCBFs du 2^e groupe sur le motif DRE. Ces résultats fournissent un nouveau mécanisme possible de la voie de régulation en réponse au froid. La régulation des *BnCBFs* dépend de leurs fonctions synergiques, c'est-à-dire que les *BnCBFs* ont besoin d'une division du

travail et aussi une coordination pour réguler les gènes *COR*. Pour le moment, il n'est pas connu si ce type de régulation est retrouvé chez d'autres espèces (Zhao et al. 2006).

1.5.4 Les DREBs/CBFs chez les céréales

La régulation des gènes *COR* par les DREB/CBFs est conservée chez les plantes, bien que la tolérance au froid des plantes varie beaucoup. Des gènes homologues à AtCBFs ont été identifiés et caractérisés chez les monocotylédones tels le seigle (3 *ScCBFs*), le riz (10 *OsCBFs*), l'orge (20 *HvCBFs*) et le blé (15 *TaCBFs* et 13 *TmCBFs*) (Skinner et al. 2005; Badawi et al. 2007; Miller et al. 2006; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 2006).

Chez l'orge, 20 gènes au total codent pour 14 *HvCBFs* différents (Skinner et al. 2005). Les caractéristiques générales des *HvCBFs* sont similaires à ceux d'AtCBFs, telles que la présence des différents domaines de cette famille, la capacité de réguler des gènes *COR* après l'expression ectopique chez *Arabidopsis*, la liaison spécifique au motif CRT et l'accumulation en réponse au froid. Après avoir comparé les structures primaires des CBFs de plantes, les auteurs ont trouvé que les motifs présents chez les dicotylédones sont similaires à ceux des monocotylédones. Ils ont classifié les *HvCBFs* en 3 sous-groupes selon des analyses basées sur l'alignement des CBFs et la phylogénie. Ces analyses ont permis à Skinner et ses collègues (2005) de suggérer que la classification pourrait s'appliquer aussi à d'autres espèces. Dans l'étude récente de Badawi et ses collègues (2007), ces mêmes gènes ont été classifiés en 10 groupes et c'est cette nomenclature suggérée qui est utilisée dans ce texte. Les profils d'expression de certains gènes *CBF* d'orge ont été étudiés suite aux stress tels que le froid, le stress hydrique, l'ABA et le stress salin (Skinner et al. 2005). Un gène du groupe CBF1 répond à deux stress en même temps et s'exprime différemment chez l'orge cv Dicktoo et cv Morex (les génotypes tolérant et sensible au froid,

respectivement) (Skinner et al. 2005). *HvCBFIa-1* répond au froid et au stress hydrique plus fortement chez Dicktoo. Deux gènes s'expriment de façon similaire chez Dicktoo et Morex lors d'expositions aux stress. *HvCBFIIIc-3* n'est pas induit par les stress testés et *HvCBFIIIa-6* répond plus tardivement au froid. Trois gènes répondent rapidement au froid et s'expriment différemment chez les cultivars, avec *HvCBFIVa-2A* et *HvCBFIVd-9* s'accumulant plus chez Dicktoo et *HvCBFIVd-4A* chez Morex.

L'étude de Xue (2002) a indiqué que *HvCBFIa-1* active les gènes contenant un motif GCCGAC dans la région promotrice plus efficacement que les gènes qui contiennent CCGAAA, un motif LTRE (low-temperature responsive element) conservé dans le gène *blt4.9*, un des gènes *COR* induit par le froid. Cette liaison n'est pas dépendante de la température. Dans une autre étude, Xue (2003) a montré que *HvCBFIVa-2A* lie préférentiellement le motif GTCGAC. Cette liaison est beaucoup plus efficace à 2°C qu'à 20°C (Xue 2003). De plus, des essais de retardement sur gel suggèrent que les gènes du groupe CBFIV pouvaient tous avoir la propriété de lier l'ADN plus efficacement au froid (Skinner et al. 2005).

Les résultats obtenus montrent que l'expression des *HvCBFs* est différente entre les cultivars tolérants et sensibles, et qu'un facteur environnemental peut causer l'activation plus spécifique de certains groupes de CBFs.

1.5.5 Les DREBs/CBFs chez le blé

Chez *Triticum monococcum*, 11 *CBFs* ont été identifiés sur le chromosome 5 tandis que *TmCBFII-5* et *TmCBFIIIb-18* ont été localisés aux chromosomes 7 et 6, respectivement (Miller et al. 2006). Badawi et ses collègues (2007) ont isolé 37 gènes du blé hexaploïde, *T. aestivum*, codant pour 15 *TaCBFs* différents. Certains de ces gènes sont des orthologues de gènes présents chez l'orge. L'analyse phylogénétique des gènes *CBF* présents chez *T. aestivum*, *Triticum monococcum* et d'autres

monocotylédones révèle que le blé contient jusqu'à 25 *CBFs* qui sont séparés en au moins 10 groupes distincts. Les gènes du groupe I et II (*TaCBF1a-A11* et *TaCBFII-5*) ne sont pas induits par le froid et ne démontrent pas de fluctuation avec le rythme circadien. *TaCBFII-5* est exprimé de façon constitutive chez le blé d'hiver et *TaCBF1a-A11* est indétectable chez les cultivars. Ils sont localisés ailleurs que sur le chromosome 5. Les gènes des groupes IIIa, IIIc et III d (*TaCBFIIIc-3*, *TaCBFIIIa-6*, *TaCBFIIIc-B10*, *TaCBFIII d-12* et *TaCBFIII d-15*) sont induits après 2 h d'exposition au froid chez le blé d'hiver et n'ont pas démontré de changement d'expression marqué lors d'un cycle circadien, sauf *TaCBFIII d-19*. *TaCBFIII d-6* est induit très peu chez les cultivars et *TaCBFIII d-12*, *TaCBFIII d-15* et *TaCBFIII d-19* augmentent clairement chez le blé d'hiver en réponse au froid. Les gènes des groupes IVa, IVb, IVc et IVd (*TaCBFIVa-2*, *TaCBFIVd-9*, *TaCBFIVc-14*, *TaCBFIVb-20*, *TaCBFIVb-21* et *TaCBF IVd-22*) sont induits rapidement par le froid (< 2 h), leur niveau d'expression est plus élevé chez le blé d'hiver, et leur expression à 20°C suit le cycle circadien avec un sommet entre 8 et 14 h après l'aube et un minimum entre 20 et 24 h après l'aube. Ces données au sujet de gènes *TaCBFs* suggèrent un rôle important pour certains groupes comme III d, IVa, IVb, IVc et IVd dans le développement de la tolérance au gel. De plus, il existe peut être comme les *BnCBFs* une fonction synergique entre eux selon le moment où ils commencent à s'exprimer. Pour le moment, il n'existe pas d'information sur les régulateurs COR contrôlés par les divers *TaCBFs* inductibles par le froid.

En comparant les patrons d'expression obtenus chez le blé (Badawi et al. 2007) et l'orge (Skinner et al. 2005), on voit une assez bonne concordance dans les profils *CBFs* provenant d'espèces différentes. Par exemple, lors d'exposition au froid, les gènes des groupes IVa, IVb, IVc et IVd (*HvCBFIVa-2A*, *HvCBFIVd-9*, *TaCBFIVa-2*, *TaCBFIVd-4* et *TaCBF IVd-9*) s'expriment plus fortement chez le génotype tolérant au gel. Au contraire, *HvCBFIVd-4A* s'expriment plus chez le génotype sensible à la basse température. Les membres du groupe IIIa (*HvCBFIIIa-6*

et *TaCBFIIIa-6*) s'expriment similairement chez les deux génotypes. Cela démontre la complexité de la régulation des CBFs. Il apparaît que la nature exacte des CBFs présents et leur niveau d'expression sont associés avec la capacité des génotypes à développer la tolérance au gel. Ces mêmes caractéristiques pourraient influencer la distribution des plantes dans des régions avec des conditions climatiques différentes.

L'objectif de cette recherche est de poursuivre la caractérisation des groupes démontrant une importante association avec la tolérance au gel. Plus spécifiquement nous allons localiser les types cellulaires qui expriment les gènes *CBFs* des groupes IIIId, IVa, IVb, IVc et IVd (*TaCBFIIIId-D19*, *TaCBFIVa-2*, *TaCBFIVb-D20*, *TaCBFIVc-14* et *TaCBFIVd-B4*) chez le blé hexaploïde afin de clarifier la fonction individuelle de ces CBFs. Ces recherches permettront de comprendre comment les différents CBFs sont utilisés pour augmenter la tolérance chez les céréales.

1.6 Problématique

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. 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 (Lyon et Raison 1970; Sharma et al. 2005). La capacité de tolérer le gel chez les céréales tempérées est induite pendant l'acclimatation au froid, un processus qui permet d'augmenter la tolérance après une exposition aux basses températures (de 0°C à 10°C) pour une période allant de quelques jours (7 jours) à quelques semaines (6 semaines).

Pendant l'acclimatation au froid, les plantes induisent graduellement l'expression de plusieurs gènes qui codent pour des protéines ayant des rôles variés. Les études effectuées à l'aide de micro puce d'ADN suggèrent que l'expression d'une bonne proportion du génome est modifiée durant la réponse au froid (Kreps et al. 2002). Pour le moment, la contribution exacte de tous ces gènes au développement de la tolérance au gel reste inconnue (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006). Toutefois, plusieurs études ont montré que leur expression est en corrélation avec l'exposition au froid et dans plusieurs cas avec la capacité accrue de certains génotypes à développer une tolérance au gel (Sarhan et al. 1997; Kreps et al. 2002). Ces études suggèrent que collectivement ces gènes inductibles sont impliqués dans l'adaptation à la croissance à basse température et à l'amélioration de la tolérance au gel chez les plantes. La caractérisation des gènes *COR* (gènes régulés par le froid) commence à révéler leurs fonctions dans l'acclimatation au froid.

En utilisant la technique d'hybridation in situ, Pearce et al. (1998) ont observé une corrélation positive entre la spécificité d'expression tissulaire des gènes *COR* et la tolérance au gel des tissus dans l'orge. L'expression chez le tissu tolérant au gel (eg : vasculaire, épiderme) était plus élevée que chez le tissu sensible (eg : tunica) au froid. Par exemple, le gène *blt4.9* code pour une protéine de transfert de lipides qui s'exprime fortement dans l'épiderme des feuilles et du collet mature. Cette protéine aurait comme fonction d'éviter la perte d'eau en jouant un rôle dans la formation des cuticules pendant l'exposition aux basses températures. Parmi les gènes de fonctions inconnues, *blt101* est exprimé à l'intérieur du système vasculaire et *blt14* s'exprime dans les cellules entourant le tissu vasculaire des feuilles et du collet. Aucune expression des ces gènes n'a été détectée dans les tunicas. Chez *Brassica napus*, le gène *COR15a* a été localisé dans les chloroplastes de cellules de feuilles où il augmenterait directement la cryostabilité des membranes par stabilisation des lipides membranaires (Steponkus et al. 1998). Chez le blé et le seigle, plusieurs gènes *COR* ont été identifiés et caractérisés en détail (Kobayashi et al. 2004; NDong et al. 2002; Takumi et al. 2003). Ces études ont montré que certains gènes tels que *Wdhn13*, *Wrab17*, *Wrab18*, *Wcor726* et *Wcs120* s'expriment dans tous les tissus testés tandis que d'autres tels que *Wcor14*, *Wcor15*, *Wcs19* et *Rep14* ont été spécifiquement détectés dans les feuilles. Ces derniers codent pour des protéines chloroplastiques exprimées dans les feuilles matures et joueraient des rôles dans la protection du système photosynthétique contre un stress causé par la lumière et/ou un stress causé par le froid (Kobayashi et al. 2004). De plus, Houde et al. (1995) ont trouvé que la famille de protéines WCS120 était fortement exprimée dans le cytoplasme et le nucléoplasme de cellules de la région vasculaire du collet et des feuilles immatures et moins fortement dans les cellules épidermiques de feuilles immatures. Les auteurs ont suggéré que cette famille régulée par le froid jouerait un rôle dans la protection des membranes. Ces études commencent à montrer que globalement le développement de la tolérance nécessite des réponses spécifiques chez divers tissus et type cellulaires.

Plusieurs des gènes *COR* contiennent des copies du motif CRT/DRE (C-

repeat/Dehydration-Responsive Element) dans leurs promoteurs, et ce motif leur confère la capacité d'être induits par le froid. Des facteurs de transcription qui lient le motif CRT/DRE ont été identifiés chez *Arabidopsis* et nommés CBF/DREB1 (CRT-Binding Factors/DRE-Binding proteins 1). Leur surexpression chez *Arabidopsis* est capable de remplacer l'acclimatation au froid en induisant les gènes *COR* et la tolérance au gel (Jaglo-Ottosen et al. 1998; Liu et al. 1998). Six gènes *CBFs* ont été identifiés et partiellement caractérisés chez *Arabidopsis* et seulement 3 de ces gènes jouent un rôle dans la régulation de gènes par le froid (Sakuma et al. 2002). L'étude portant sur les *CBFs* présentes chez les céréales (Badawi et al. 2007) a montré que le blé posséderait au moins 25 gènes *CBF* qui peuvent être classifiés en 10 groupes démontrant une origine phylogénétique commune et une similarité structurale. Cinq de ces groupes (contenant 14 gènes) sont induits lors d'une exposition aux basses températures et démontrent une expression plus élevée chez le cultivar d'hiver possédant une capacité accrue de développer la tolérance au gel. La conservation du nombre élevé de gènes *CBF* chez le blé et d'autres céréales tempérées suggère qu'au cours de l'évolution, une spécialisation au niveau de la fonction des différents groupes et gènes *CBF* aurait eu lieu. Une des hypothèses plausibles est que les différents groupes (ou gènes *CBF*) ont des fonctions différentes ou complémentaires car ils ont développé des spécificités d'expression tissulaire et cellulaire. Donc, l'identification des tissus et cellules cibles serait une étape importante pour la caractérisation des groupes de gènes *CBF* car non seulement elle dévoilerait la complexité de leur associations pour accomplir leur fonction mais aussi nous renseignerait sur leur régulation potentielle en amont. Une technique sensible, l'hybridation in situ, sera utilisée pour localiser des gènes *CBF* du blé afin d'associer les différents groupes avec le développement de la tolérance au gel de divers tissus et cellules du blé.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Préparation du matériel végétal

Le blé d'hiver a été utilisé dans notre étude car ce type de cultivar avait démontré des inductions plus élevées de gènes *CBF* après un traitement au froid de 4 à 6 heures (Badawi et al. 2007). Les graines du blé d'hiver cv Claire ont été germées dans de la vermiculite sous une longue photopériode (16 heures) à un taux d'humidité de $75 \pm 5\%$ et une température de 20 ± 1 °C. Après une semaine de germination, la moitié des plantes ont été transférées dans une chambre à 4°C pour amorcer le traitement de 4 heures au froid tandis que l'autre moitié a été conservée à 20°C.

2.2 Préparation du tissu

Les plantes au temps désiré (4 heures à 4 et 20°C) (Badawi et al. 2007) ont été utilisées pour préparer les blocs de tissus. Six types de tissus (collet, deux parties du coléoptile et trois parties de feuilles matures) ont été coupés en morceau de 1cm et fixés avec une solution de 4% paraformaldéhyde, 0.05 M NaCl, 0.05 M Na-Phosphate (pH 7.5) et 0.06% Tween-20. Pour la première heure, le vide a été appliqué aux échantillons (sur glace) pour faciliter l'infiltration du tampon dans les tissus et ensuite les tissus ont été gardés à 4°C pour 18 h. Le lendemain, les tissus ont été déshydratés avec des dilutions successives croissantes en éthanol, puis transférés vers le solvant intermédiaire tert-Butanol, infiltrés avec du Paraplast X-Tra à 58°C et les blocs contenant les tissus ont été générés dans des moules de plastique jetable et conservés à 4°C.

Les blocs contenant les tissus ont été coupés (10 μ m) avec un microtome, les rubans ont été déposés sur la surface de l'eau distillée et ensuite sur une lame de microscope traitée (superfrost Plus, VWR International). Les coupes ont été séchées à la température de la pièce pour 18 h puis une heure à 37°C avant l'expérience. Les

tissus ont été déparaffinés avec du substitut de xylène et réhydratés en utilisant une série d'éthanol dilué jusqu'à l'eau distillée. A ce stade, les lames sont prêtes pour la coloration tandis que pour l'hybridation les lames ont été incubées dans une solution de 2X SSC pour 10 minutes. Pour vérifier l'intégrité des tissus, certaines lames ont été colorées avec le bleu de toluidine pour 30 secondes, lavées avec de l'eau, séchées et couvertes avec une lamelle en utilisant du Permount (Fisher Scientific).

2.3 Préparation des sondes pour l'hybridation in situ

Les oligos spécifiques aux différents gènes à localiser ont été dessinés dans la région 3' non-codante de l'ARN messager du gène. Les fragments spécifiques d'ADN ont été amplifiés en utilisant la *Pfx* DNA polymérase (Invitrogen) et une librairie d'ADNc du blé disponible dans notre laboratoire. Le fragment d'ADN a été ensuite cloné dans le vecteur pCR®-Blunt II-TOPO® qui possède des promoteurs spécifiques d'ARN polymérase T7 et SP6 placés en amont et en aval de l'ADN cloné. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries compétentes, étalées sur pétri LB-agar-kanamycine et incubées 18 heures à 37°C. Quelques colonies ont été choisies pour l'analyse par miniprep de plasmides. Les plasmides contenant la séquence désirée ont été traités par des enzymes ne digérant qu'à un site spécifique (BamHI pour T7 et XhoI pour SP6), et ensuite transcrits par les ARN polymérases T7 et SP6 (Roche) en présence d'UTP-digoxigénine pour synthétiser des sondes anti-sens et sens. La quantité et l'intégrité des sondes ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose. Un test supplémentaire pour déterminer l'efficacité de l'incorporation d'UTP-digoxigénine a été fait selon le manuel de Roche (DIG RNA Labeling Kit SP6/T7).

2.4 Hybridation in situ

La sonde sens ou anti-sens (0.3ng/μl) a été ajoutée à la solution d'hybridation: 50% Formamide, 2X SSC, 1 mM EDTA (pH 8.0), 1X solution Denhardt', 100ng/μl

d'ADN dénaturé, 100ng/μl d'ARNt de levure, 10% Dextran Sulfate. Le mélange a été chauffé à 80°C pour 10 min, refroidi, distribué sur les lames et le tout incubé à 55°C pour un minimum de 16 h en atmosphère saturée en humidité. Après l'hybridation, les lames ont été lavées en utilisant des solutions contenant des concentrations décroissantes de SSC (2XSSC à 0.1XSSC) à 60°C pour 1 h chacune. Pour la détection immunologique, les lames ont été bloquées durant 30 min en utilisant 1% réactif de blocage (Roche) dans 100 mM Tris HCl (pH 7.5) et 150 mM NaCl, incubées pendant 90 min avec une dilution 1:1000 de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) dans le tampon de blocage, et lavées avec le tampon sans réactif de blocage. La coloration a été révélée en utilisant le NBT/BCIP dans le tampon de coloration 100 mM Tris HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 10% PVA (polyvinyl alcool) et 50 mM MgCl₂ pour 16 heures. La réaction a été arrêtée avec 10 mM Tris-HCl (pH 8) et 1 mM EDTA. Certaines lames ont été traitées avec Contrast Red (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), un colorant pour identifier les noyaux cellulaires en rouge. Les lames ont été lavées à l'éthanol 95% pour 1 heure. Les tissus ont été stabilisés avec du Crystal/Mount puis les lames montées avec du Permount (Fisher Scientific) pour l'observation des tissus sous microscope et photographiés avec une caméra digitale attachée au microscope.

3. RÉSULTATS

3.1 Production des sondes pour l'hybridation in situ

Le rôle des sondes contrôles sert à vérifier que la technique utilisée fonctionne et donne des résultats crédibles. Trois gènes connus soient *CoA* (acetyl-coenzyme A carboxylase), *LTP* (Lipid transfer protein) et *Srub* (Small subunit rubisco, Petite sous unité de Ribulose 1, 5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase, un gène nucléaire) (Tableau I.) sont assez abondants pour permettre une optimisation efficace et aussi en même temps une caractérisation de leur spécificité de localisation. Dans cette étude, nous avons préparé deux sondes contre des gènes *CBF* différents. Tous les clones produits ont été vérifiés par séquençage.

Tableau I. Liste des sondes isolées pour l'hybridation in situ

Nom du clone	Nom du gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence des amorces Sens 5'-3'et anti-sens 5'-3'	Nombre de base
E. CoA-1	acetyl-coenzyme A carboxylase	U10187	GAGCATCCATTTCAGCCAGCATAAACCC; TGCCTCCTACCTATGTGCAAACAATGTG	178
E. LTP-1	Lipid transfer protein	CJ550101	GACGCGCTTGCGTGGAGCTTA; GGACGCGTGCATACATGTGCGATA	175
M_Srub-1	Small subunit rubisco	CJ562094	GGAGTCCGGCAAGGCCTAAACTACA; GTAGCCGTGCATGCTCCACAACCTA	165
CBFIVd-B4-2	TaCBFIVd - B4	EF028781	TCAGCACGCAGTGTAAGTTGTCGAT; TCACAAAAGTAGAAACCGGGAGCTTCA	128
CBFIVa-A2-1	TaCBFIVa - A2	EF028769	AGAGAGAGTAAGCATCGGGGAAAGG; GGAGCGAATGATTGATCTACTACTGCTCATT	150

3.2 Optimisation de l'hybridation in situ

L'hybridation in situ (ISH) permet la localisation d'une séquence d'acide nucléique spécifique dans un tissu, une cellule ou un génome (Lawrence and Singer, 1985). Pour des gènes qui s'expriment à un faible niveau, la technique ISH est suffisamment sensible et spécifique pour détecter quelques molécules d'ARNm dans une seule cellule, ainsi que de légères variations d'expression entre les cellules. Donc, l'optimisation de la technique s'est avérée importante pour avoir la sensibilité de comparer la localisation des ARNm fonctionnels.

Afin d'améliorer la sensibilité de la technique et l'intégrité des tissus analysés, l'effet de plusieurs paramètres ont été examinés dans cette étude. Premièrement, nous avons étudié le milieu de fixation. Le but de cette étape est de préserver la structure morphologique du tissu, d'éviter la perte d'ARNm cellulaires et de permettre aux sondes de pénétrer dans les tissus. La fixation des feuilles du blé qui sont couvertes par la cuticule exige un fixatif efficace. Il existe plusieurs types de fixatif : le FAA (4 % formaldéhyde, 5% acide acétique, et 50% méthanol (v/v)), le paraformaldéhyde (PFA) et le glutaraldéhyde (GA). Nos résultats ont montré plus d'avantages à utiliser le PFA seul ou en mélange avec GA que le FAA (résultats non présentés). Le PFA une fois hydrolysé possède une pénétration plus rapide que le GA, une considération importante pour diminuer l'autolyse du tissu par des réactions endogènes. De plus, plusieurs modifications ont été testées basées sur les informations disponibles dans la littérature, par exemple, 0.06% tween-20 a été ajouté dans le tampon de fixation pour faciliter la pénétration du fixatif. Nous avons observé que seule l'inclusion de ce détergent et l'application d'un vide permettait une infiltration rapide des tissus provenant de coléoptiles et de feuilles. Un volume du fixatif supérieur à 20 fois celui des tissus est recommandé pour s'assurer d'un excès du fixatif et du tamponnement de la solution. Le type de fixatif utilisé affectera aussi la sensibilité d'ISH (Lawrence and Singer, 1985). Quoique la fixation à la GA donne aussi des bons résultats sur la

morphologie du tissu, son effet sur la réticulation des macromolécules et tissus défavorise la pénétration de la sonde (Lawrence and Singer, 1985). L'avantage principal de la fixation à la PFA est qu'il fixe le tissu par une réticulation flexible et donc rend l'ARN cellulaire plus accessible aux sondes de tailles diverses sans avoir besoin de protéolyse cellulaire. Donc, le 4% paraformaldéhyde a été adopté car il offre un compromis intéressant en raison de sa capacité de préserver la structure morphologique et de sa perméabilité aux sondes d'ARN (Lawrence and Singer, 1985).

L'effet de la fixation est d'autant plus compliqué que le temps est critique car il affecte le taux de réticulation. Des résultats obtenus avec une autre céréale (Livingston III et al. 2005) suggéraient qu'un traitement plus long au tert-butanol (TBA) peut durcir les tissus et ainsi empêcher qu'ils s'émiettent pendant le sectionnement des échantillons. Donc nous avons étudié l'effet du temps de fixation (3 h pour Figs 1A et B versus 18 h pour Figs 1C et D) et la durée d'un traitement au TBA (1 jour pour Figs 1A et C versus 4 jours pour Figs 1B et D) sur des coupes provenant du coléoptile. Les résultats montrent qu'une fixation de 18 h et un traitement de 4 jours au TBA (Figs 1D) permettent de mieux préserver l'intégrité des tissus. Aussi, l'épaisseur de la coupe est un élément qui ne doit pas être négligé. Nous avons adopté une épaisseur de 10 μm (Figs 2B) pour tous les tissus afin d'éviter les problèmes montrés dans la figure 2. Une épaisseur de 8 μm (Figs 2A) est trop mince pour des tissus fragiles comme les feuilles tandis qu'une épaisseur de 12 μm et plus entravait l'observation des signaux car il y avait masquage des cellules plus petites (Figs 2C).

Comme pour toutes les types hybridations, un ratio élevé entre l'hybridation spécifique et non-spécifique (S / N), détermine la spécificité d'expression d'une ARNm cible détectée par l'ISH. On voit par là qu'un bon ratio S / N est crucial pour une détection d'ARNm moins abondant dont leurs signaux peuvent être camouflés

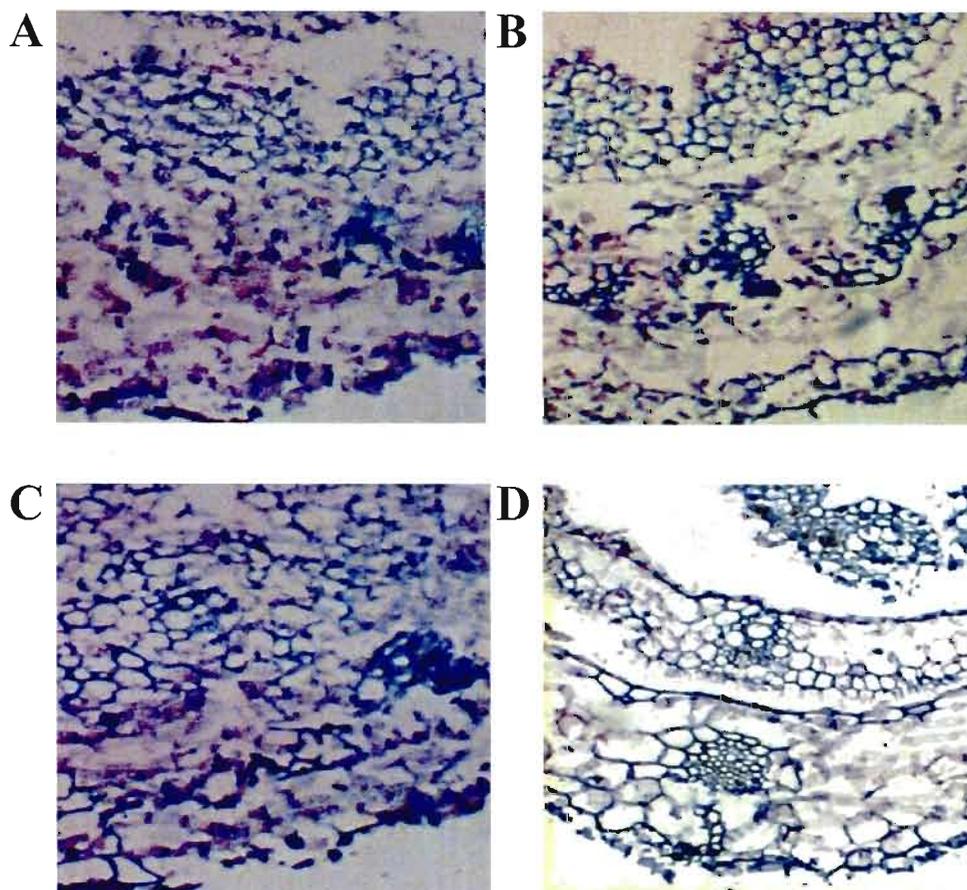


Figure 1 : Effet d'une durée accrue de fixation au paraformaldéhyde (PFA) et d'une exposition au ter-butanol (TBA) sur la morphologie de feuilles de blé.

Les coléoptiles ont été coupés de façon transversale (10 μm) et les sections de tissus ont été colorées avec le bleu de Toluidine. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

- (A) tissus fixés par PFA 4% pour 3 h et traités avec ter-butanol 1 jour.
- (B) tissus fixés par PFA 4% pour 3 h et traités avec ter-butanol 4 jours.
- (C) tissus fixés par PFA 4% pour 18 h et traités avec ter-butanol 1 jour.
- (D) tissus fixés par PFA 4% pour 18 h et traités avec ter-butanol 4 jours.

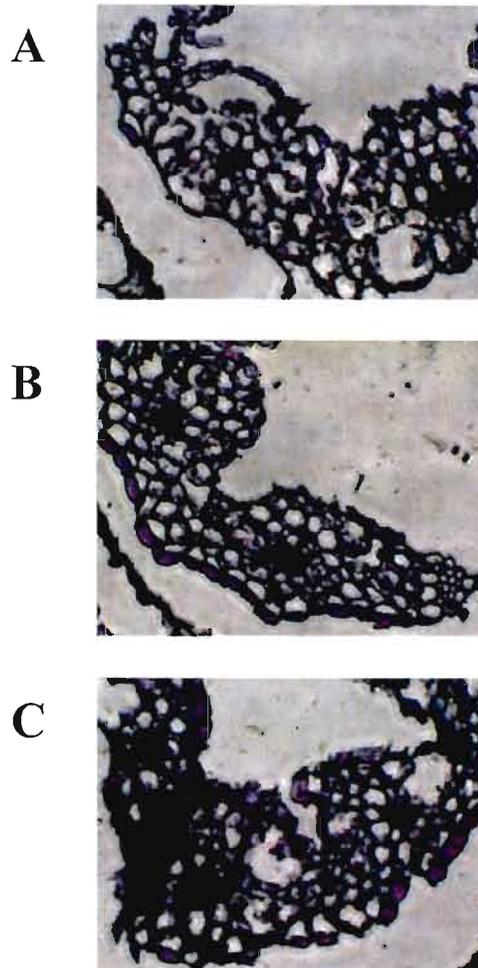


Figure 2 : Effet de l'épaisseur de la coupe sur la morphologie de feuilles de blé.

Les feuilles ont été coupées de façon transversale avec une épaisseur de 8 μm (A), 10 μm (B) et 12 μm (C). La solution d'hybridation contenait 2 ng/ μl de sondes 18S anti-sens marquées par la digoxigénine et l'incubation a été effectuée à 50°C pour 18 h. Ensuite, les lames ont été lavées à 55°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

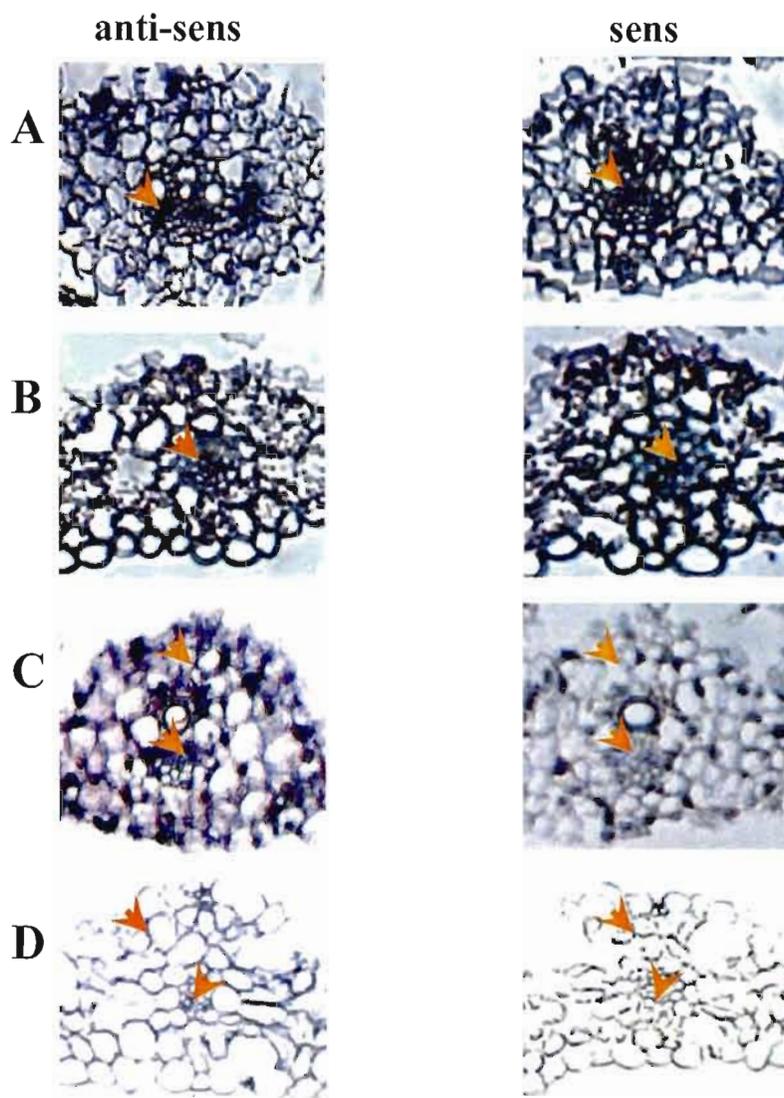


Figure 3 : Effet de la concentration de sonde dans la solution d'hybridation sur le signal spécifique.

Les feuilles ont été coupées de façon transversale (10 μm) et les solutions d'hybridation contenaient 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (A), 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (B), 0.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (C) et 0.3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (D) de sondes LTP anti-sens ou sens marquées par la digoxigénine. L'incubation a été effectuée à 50°C pour 18 h. Ensuite, les lames ont été lavées à 62°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

Les flèches indiquent les régions où les signaux ont été détectés avec les sondes anti-sens et les mêmes positions dans les tissus avec les sondes sens.

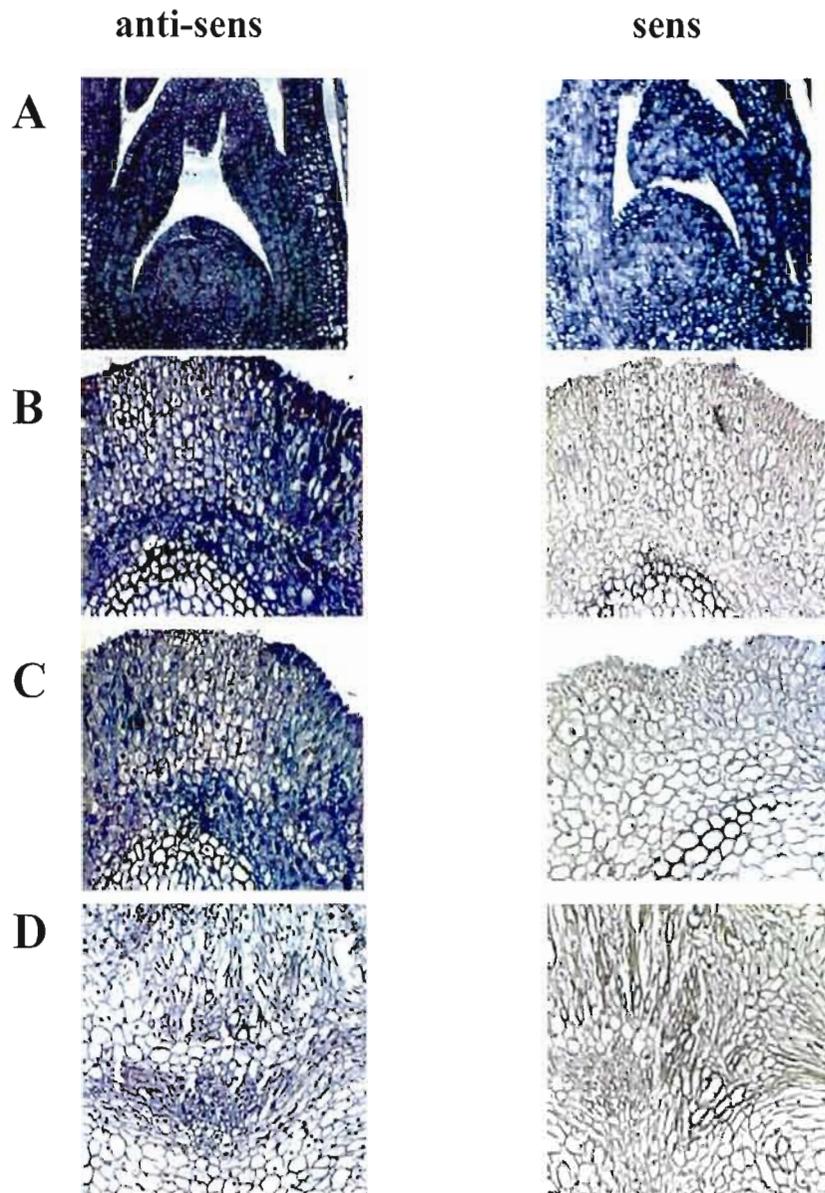


Figure 4 : Effet de la température d'hybridation et de lavage sur le signal spécifique d'hybridation.

Les collets ont été coupés de façon longitudinale (10 μ m) et les solutions d'hybridation contenaient 0.3 ng/ μ l de sondes CBFIVd-B4 anti-sens ou sens marquées par la digoxigénine. L'incubation a été effectuée pour 18 h, les lames ont été lavées et la réaction de coloration avec NBT/BCIP a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

Les températures d'hybridation/ de lavage testées sont : (A) 42°C/ 50°C; (B) 50°C/ 62°C; (C) 50°C/ 67°C; (D) 55°C/ 62°C.

par les hybridations non-spécifiques. L'effet final de l'hybridation est la conséquence de plusieurs variables dont la concentration de sonde dans la solution d'hybridation. Des résultats typiques montrés à la Figure 3 comparent l'effet de concentrations de sonde de 2, 1, 0.5 et 0.3 ng/ μ l. Ces résultats montrent que les concentrations les plus faibles (0.5 et 0.3 ng/ μ l) sont optimales car elles nous ont permis de détecter spécifiquement des signaux avec très peu de bruit de fond.

Basé sur plusieurs références publiées sur l'ISH, nous avons testés plusieurs autres variables tels que la composition du tampon d'hybridation, les températures d'hybridation et de lavage. Il est souvent assumé que des lavages post-hybridations sont nécessaires pour nettoyer des sondes non hybridés qui sont probablement piégées dans la matrice cellulaire. Une fois que des sondes ARNc pénètrent dans le tissu, ils forment des hybrides ARN-ARN thermostables, il est possible d'utiliser les conditions de lavage plus strictes pour enlever les hybridations non-spécifiques. Toutefois, certains ARNm et même l'hybride peuvent être perdus à cause de la destruction des tissus puisque les réticulations obtenus par le PFA ne résistent pas à des hautes températures. Nous n'avons pas réussi à conserver des morceaux de tissus sur les lames pour la température d'hybridation de 55°C et de lavage de 67°C, mais les résultats présentés à la Figure 4 illustrent suffisamment l'effet de la température sur l'hybridation. L'augmentation de la température de lavage pouvait diminuer généralement l'hybridation non-spécifiques (Figs 4C versus Figs 4A et B). Toutefois, la plus grande spécificité de signal a été obtenue lorsqu'une hybridation était effectuée à la température de 55°C et le lavage à 62°C (Figs 4D versus les autres).

L'influence de la perméabilité d'un tissu aux sondes est un autre facteur jouant sur la sensibilité d'ISH. Le but de cette étape est de faciliter la diffusion des sondes dans et hors de la cellule et ceci est fait par une réaction de protéolyse cellulaire du tissu créant des espaces plus grand afin d'exposer au maximum les

ARNm ciblés pour la sonde. En utilisant les conditions d'hybridation optimisées, l'effet d'une digestion à la protéinase K a été testé chez plusieurs tissus. Nos résultats montrent qu'il n'y avait pas de différence prononcée entre les temps de traitements testés (Figs 5). L'observation des coupes entières suggèrent qu'il y a seulement une légère augmentation du signal après 5 minutes de traitement (Figs 5A) et que cette augmentation provient de signaux dans les tissus vasculaires (Figs 5C) et dans les structures d'initiation de racines (Figs 5D). Malgré cette variation, nous avons observé les signaux dans tous les temps de traitements, même sur les tissus non traités par la protéinase K. De plus, le signal dans certains tissus était constant pendant tout le traitement, par exemple, les jonctions de graine (Figs 5E) et les jeunes feuilles aériennes (Figs 5F). Ces résultats montrent que notre sonde de moins de 200 pb est capable de pénétrer dans tous les tissus et type cellulaire de nos échantillons. Étant donné que la protéinase K n'améliorait pas significativement le signal nous n'avons pas inclus cette étape dans le protocole standard.

Un autre produit, le polyvinyl alcohol (PVA), peut augmenter la sensibilité de détection de l'ISH car il renforce la réaction de la phosphatase alcaline en empêchant la diffusion des produits intermédiaires de la réaction (De Block et Debrouwer, 1993). L'utilisation de PVA dans la solution de coloration nous a permis d'avoir des signaux beaucoup plus forts dans plusieurs tissus avec la sonde anti-sens (Figs 6A et C versus Figs 6B et D, respectivement), sans augmenter les bruits de fond avec la sonde sens.

Ces optimisations sont importantes car elles améliorent la sensibilité et permettent d'analyser l'expression des gènes CBF dans des conditions de croissance normales (20°C) ou l'expression est faible.

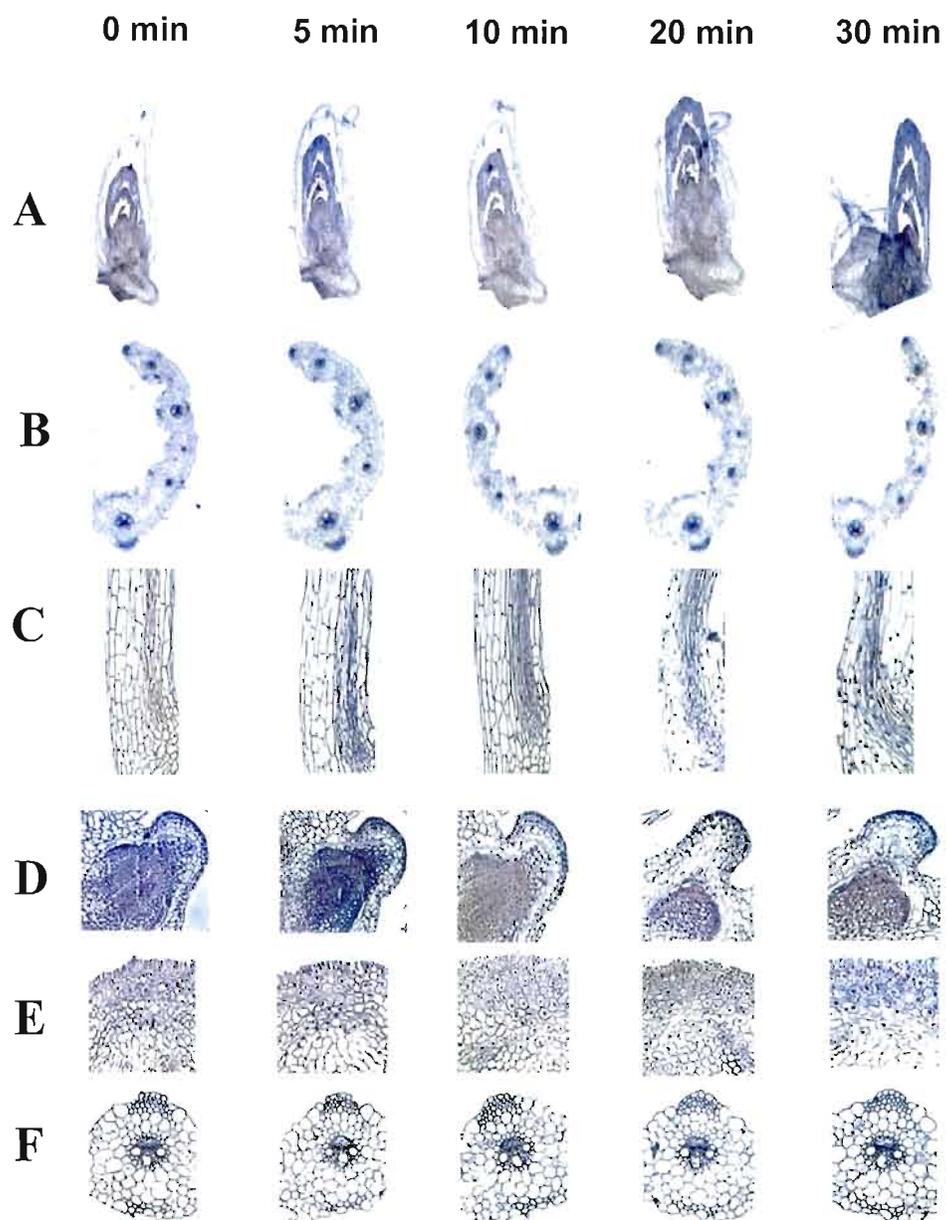


Figure 5

Figure 5 : Effet d'un traitement à la protéinase K sur le signal obtenu lors de l'hybridation in situ.

Des coupes (10 µm) longitudinales du collet (A, C, D et E) et transversales de la feuille (B et F) ont été traitées à la protéinase K pour les temps indiqués et hybridées avec 0.3 ng/µl de sondes LTP anti-sens ou sens (non présentées) marquées par la digoxigénine. L'incubation a été effectuée à 55°C pour 18 h, les lames lavées à 62°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP est effectuée pour 18 h. Les photos en A et B ont été prises avec un grossissement de 3X et celles de C à F ont été prises avec un grossissement de 10X.

(A), collet; (B), feuille; (C), tissus vasculaires des jeunes feuilles dans le collet, (D) les initiations de racine au niveau du collet, (E) la jonction avec la graine au niveau du collet; et (F), mésophylle de jeunes feuilles aériennes.

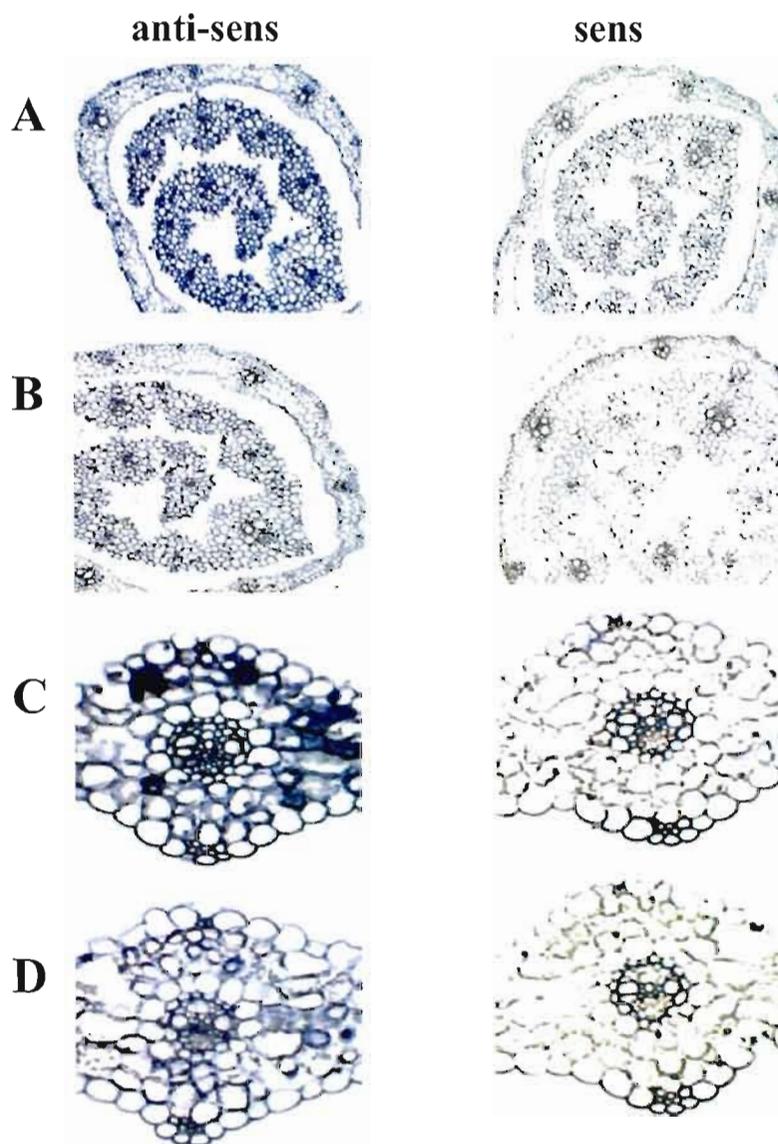


Figure 6 : Effet du Polyvinyl Alcool (PVA) sur la réaction de coloration de la phosphatase alcaline utilisant les substrats BCIP-NBT.

Les coléoptiles (A et B) et les feuilles (C et D) ont été coupées de façon transversale ($10\ \mu\text{m}$) et hybridées avec $0.3\ \text{ng}/\mu\text{l}$ de sondes CBFIVd_B4 anti-sens ou sens marquées par la digoxigénine. L'incubation a été effectuée à 55°C pour 18 h, les lames lavées à 62°C et les réactions de coloration avec NBT/BCIP seul (B et D) ou avec PVA (A et C) ont été effectuées pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

3.3 Localisation des gènes avec l'hybridation in situ

Avant d'examiner la localisation des gènes *CBFs*, nous avons commencé les expériences avec des gènes contrôles, *LTP* (Lipid Transfer Protein) et *Srub* (Small Rubisco). Les LTPs sont des petites protéines solubles ubiquistes impliquées dans le transfert ou l'échange non-spécifique des lipides entre les membranes (revue dans Arondel et Kader, 1990). Se basant sur les résultats de la spécificité tissulaire de ce gène chez *Arabidopsis* et l'orge (Thoma et al. 1993; Gausing, 1994), ce gène a été choisi comme contrôle pour l'optimisation de la technique. Chez le blé, le gène *LTP* a été localisé préférentiellement dans l'épiderme (Figs 7A et C) et le tissu vasculaire (Figs 7C) de jeunes feuilles, et aussi dans le tissu vasculaire du collet (Figs 7B). Ces résultats correspondent à la localisation des gènes *LTP* chez *Arabidopsis* et l'orge.

Dans le cas de *Srub*, nous avons été capables de détecter ce gène dans les tissus vasculaires (Figs 8A, B et C) et le mésophylle (Figs 8A et B) de jeunes feuilles et de feuilles matures, même dans les cellules de garde (Figs 8A) de feuilles matures. De plus, les signaux ont été détectés dans certains tissus de la base du collet, jonction avec la graine (Figs 8E) et une région d'initiation de racine (Figs 8F). Ces résultats décrivent plus en détail la spécificité d'expression de ce gène dans les feuilles et confirment les résultats obtenus avec northern blot (Galili et al. 1998; Rapp et Mullet 1991). Il est important de mentionner que dans le coléoptile (Figs 8B), le mésophylle de la plus jeune feuille (au centre) démontre une expression plus faible du gène *Srub* que celle de la vieille feuille dont le développement est plus avancé. Le panneau 8D illustre ce phénomène d'un autre angle. Ces résultats sont similaires à l'étude d'expression de *Srub* dans le tissu du méristème de tomate avec l'hybridation in situ (Fleming et al. 1993). Avec ces images, nous n'avons pas observé l'expression de *Srub* dans le méristème comparativement aux feuilles adjacentes. Ces résultats confirment que l'expression de *Srub* est limitée aux tissus verts de la plante. De plus, nos résultats montrent aussi les variations d'expression du gène dans ces tissus. À la

Figure 9, nous observons l'accumulation d'ARNm de ce gène dans le mésophylle de feuilles plus matures (collet et la coléoptile C1), et dans le mésophylle de régions C2, F1 et le maximum est atteint en F2. En F3, le signal diminue rapidement. Ces observations signifient que l'expression spécifique du gène est influencée par le stade de développement du tissu. De façon similaire aux travaux de Rapp et Mullet (1991) avec l'orge, l'expression de *Srub* varie selon le développement graduel des cellules non-différenciées et des chloroplastes qu'elles contiennent. Donc, la technique était optimisée et pourrait être utilisée pour la localisation de gènes *CBF* chez le blé.

TaCBFIVd-B4 est le premier gène ciblé dans notre étude. Il est induit par le froid et possède aussi une expression basale chez le blé non-acclimaté (Badawi et al. 2007). Les résultats de localisation présentés dans la Figure 10 montrent que *TaCBFIVd-B4* est induit fortement au froid dans les tissus vasculaires du collet et des jeunes feuilles (Figs 10A, 4°C versus 20°C) mais que les spécificités d'expression sont similaires. Dans les feuilles matures, une forte induction de *TaCBFIVd-B4* (Fig 10B) a été détectée à 4°C dans le mésophylle et dans les cellules de garde, et une plus faible expression dans certaines cellules du système vasculaire. Étant donné la faible expression observée à 20°C chez les feuilles matures, il n'est pas possible pour le moment de comparer les spécificités d'expression basale et au froid de ce tissu. En augmentant davantage la sensibilité de la technique, il sera possible de répondre à ce type de questions. En utilisant un grand grossissement (Fig 10C), il a été possible de voir que l'induction de *TaCBFIVd-B4* dans les tissus vasculaires de feuilles matures est concentrée seulement chez quelques cellules (Fig 10C, à 4°C). Ce type de localisation montre que ces cellules sont des cellules compagnons du tissu vasculaire de feuilles. Chez le coléoptile, au contraire de feuille matures (Fig 11A et B), une plus forte expression du gène a été mesurée dans les tissus vasculaires de feuilles non-développées comparativement aux mésophylles (Fig 11C). Ces résultats suggèrent que l'expression de ce gène *CBF* semble être influencée par le stade de développement d'un type cellulaire donné.

Dans le cas de *CoA* et *TaCBFIVa-A2*, nous n'avons pas réussi à détecter spécifiquement ces ARNm dans les tissus. Les hypothèses les plus probables pour *TaCBFIVa-A2* seraient que ce gène est exprimé à un niveau plus faible et/ou aurait une demi-vie plus courte (dégradé avant d'être stabilisé par fixation). Toutefois, des expériences plus récentes (non présentées) indiquent que la concentration de sonde anti-sens avait été sous estimée. En effet après avoir déterminé l'efficacité de l'incorporation de la digoxigénine (protocole de Roche), nous nous sommes aperçus que la quantité de sonde synthétisée par l'ARN polymérase T7 pour les deux gènes (*CoA* et *TaCBFIVa-A2*) avait 3 fois plus d'UTP-digoxigénine incorporé que celle synthétisée par l'ARN polymérase SP6. Évidemment ceci nous donnait moins de signal spécifique versus non spécifique. Ces expériences seront répétées avec des quantités équivalentes de sondes anti-sens et sens.

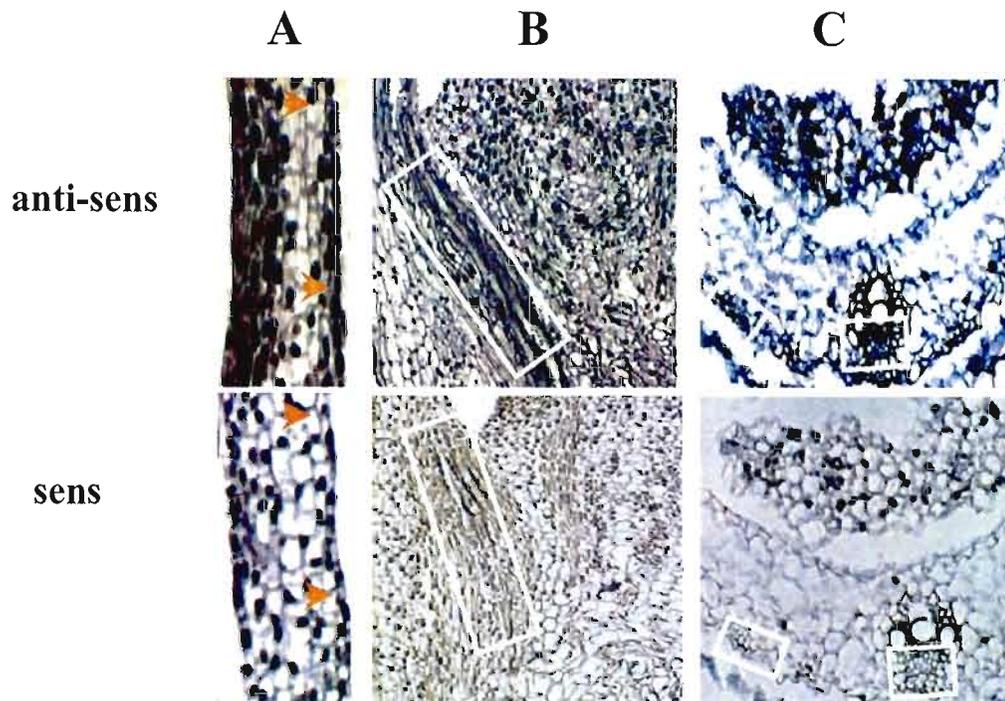


Figure 7 : Localisation du gène LTP dans le collet et le coléoptile.

Le collet a été coupé de façon longitudinale (10 μm) (A et B) et le coléoptile a été coupé de façon transversale (10 μm) (C). L'hybridation des lames avec 0.3 ng/ μl de sondes anti-sens ou sens marquées par la digoxigénine a été effectuée à 55°C pour 18 h. Ensuite, les lames ont été lavées à 62°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X.

Les cadres indiquent les régions comparables entre les expériences avec les sondes anti-sens et sondes sens. (A) jeune feuille provenant du collet. (B) tissus vasculaires du collet. (C) l'épiderme et les tissus vasculaires de jeune feuille du coléoptile.

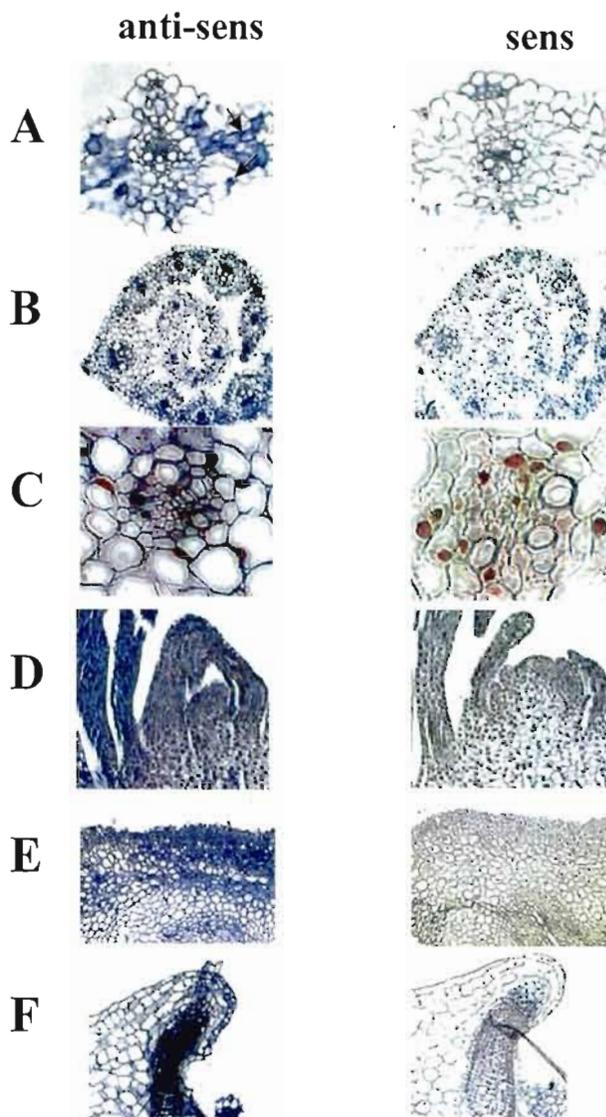


Figure 8 : Localisation de la petite sous unité de Rubisco dans la feuille mature, le coléoptile et le collet.

Des coupes (10 μm) transversales de feuilles matures (A) et de coléoptiles (B et C) et des coupes longitudinales du collet (D, E et F) ont été hybridées avec 0.3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de sondes anti-sens ou sens marquées par la digoxigénine. L'incubation a été effectuée à 55°C pour 18 h, les lames ont été lavées à 62°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP (et PVA) a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X pour A, B, D, E et F; et une autre de 40X pour C.

Les flèches (en A) indiquent les mésophylles et une cellule de garde. Le colorant Contrast Red a été utilisé dans le panneau C pour identifier les noyaux cellulaires en rouge.

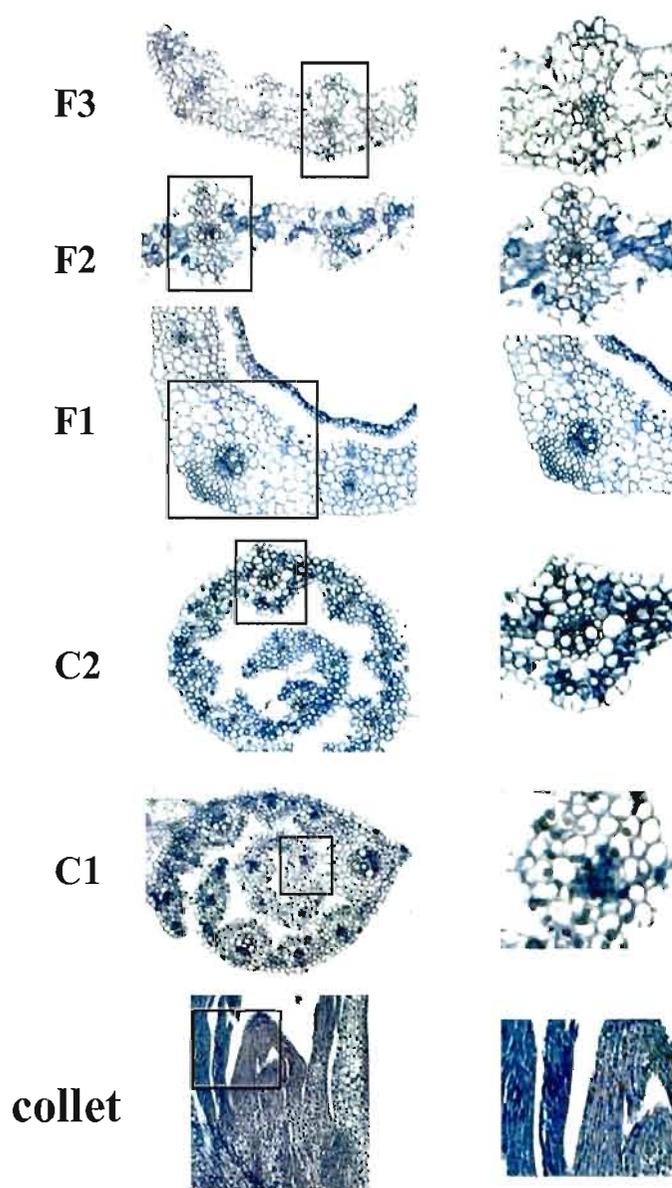


Figure 9 : Localisation de la petite sous unité de Rubisco selon le développement du tissu.

Les différentes sections de la plante telles que le collet, le coléoptile C1 et C2, et les feuilles F1, F2 et F3 ont été coupées ($10\ \mu\text{m}$) de façon longitudinale (collet) ou transversale (pour les autres tissus). L'hybridation avec la sonde anti-sens, le lavage et la coloration sont comme décrits à la Figure 8. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X. Les sections encadrées dans les panneaux à gauche ont été grossies. Les régions C1, C2, F1, F2 et F3 sont à environ 1, 3, 4, 8 et 15cm, respectivement du collet.

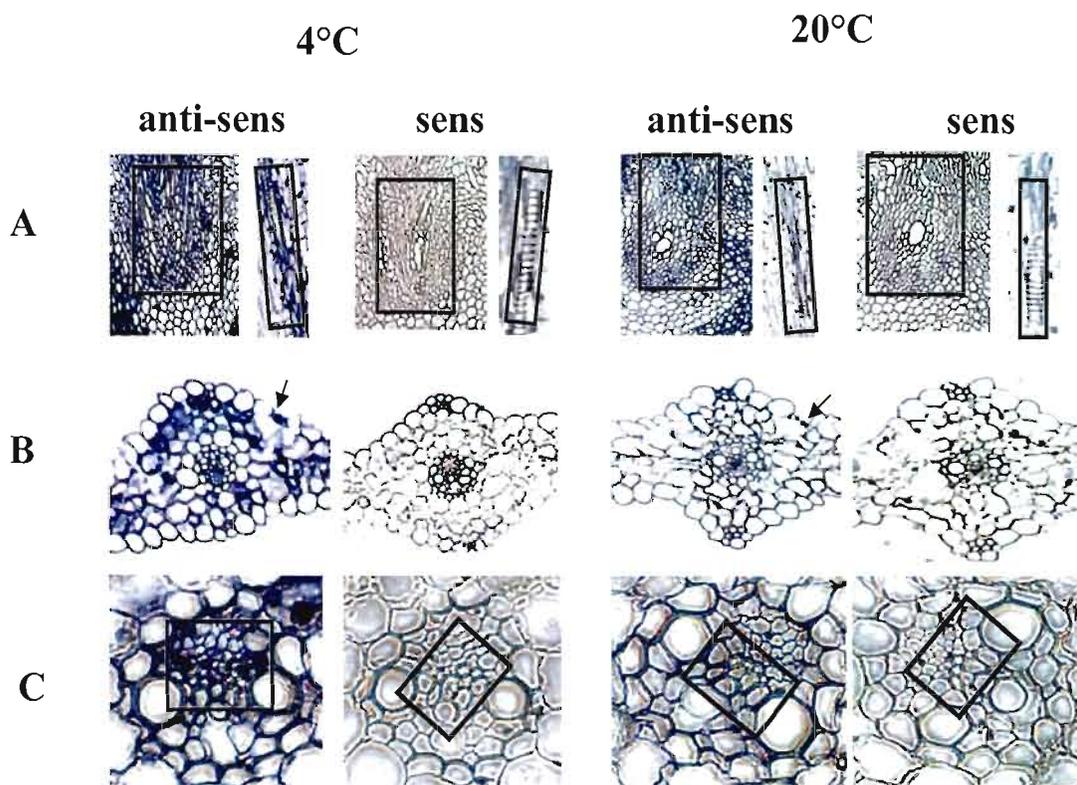


Figure 10 : CBFIVd_B4 s'exprime dans plusieurs tissus du blé traité par le froid.

Les collets de blé ont été coupés (10 μm) de façon longitudinale (A) ou transversale pour les feuilles (B et C) traitées à 4°C et 20°C, respectivement. Les hybridations ont été effectuées à 55°C pour 18 h avec les sondes anti-sens ou sens (0.3 ng/ μl) marquées par la digoxigénine. Ensuite, les lames ont été lavées à 62°C et la réaction de coloration avec NBT/BCIP a été effectuée pour 18 h. Les photos ont été prises avec un grossissement de 10X pour (A) et (B) et de 40X pour (C).

(A) tissu vasculaire de la base du collet et de la base de jeunes feuilles. (B) région d'une feuille mature. (C) agrandissement de la région vasculaire en (B). Les cadres indiquent les régions où les signaux ont été détectés avec les sondes anti-sens et les mêmes positions dans les tissus avec les sens. Les flèches (en B) indiquent les cellules de garde.

4. DISCUSSION

Plusieurs protocoles ont été développés pour effectuer l'hybridation in situ chez divers organismes. La compréhension des différentes étapes de cette technique est importante afin de pouvoir optimiser la technique d'hybridation in situ.

La préparation de tissus a attiré notre attention parce qu'un tissu morphologiquement intact sur la lame jusqu'à la fin de l'expérience est la condition préalable pour une bonne ISH. Pour fixer les feuilles du blé qui sont couvertes par une cuticule, nous avons utilisé une solution de fixation préparée à partir du paraformaldéhyde, qui est couramment utilisée dans les fixateurs pour la microscopie électronique. Basyuk et al. (2000) ont trouvé que la fixation dans un tampon alcalin (pH 9.5) pouvait augmenter de 5 à 6 fois la sensibilité de l'ISH et ceci serait dû à la dénaturation des ARN et protéines cellulaires. Cette modification pouvait aider les hybridations avec les sondes d'ARN, surtout pour les gènes qui s'expriment moins. Nos résultats sur le pH de la solution de fixation n'ont pas montré de différences entre les pH neutre et alcalin mais la fixation alternative nous a donné l'idée d'améliorer l'efficacité de fixation. La fixation des tissus est déterminée par la formation des réticulations entre les protéines cellulaires et les fixatifs, ces réactions chimiques vont augmenter avec l'augmentation de la concentration du fixatif. De plus, lorsque le tissu est fixé, il agit également comme une barrière pour la diffusion de fixatifs. Le fixatif va pénétrer dans toutes les cellules par un gradient croissant de sa concentration (Srinivasan et al. 2002). Ainsi, nous avons augmenté la concentration de paraformaldéhyde de 3% à 4% en se référant à la littérature disponible.

L'infiltration est un autre processus critique pour la préparation de tissus. Nous avons choisi le paraplast X-Tra comme le matériel d'infiltration et formation de blocs. Comparativement aux autres matériaux, le paraplast X-Tra possède un point de fusion de 50 à 54°C et permet d'abaisser les températures d'infiltration. De plus, sa

faible viscosité permet de compléter l'infiltration dans les tissus denses le plus vite possible. Ces avantages permettent d'éviter la dégradation d'ARNm cellulaires causés par l'autolyse cellulaire et conserver les ARNm cibles, ce qui augmente les chances de détecter les gènes moins exprimés. De plus, ils permettent de préserver la morphologie des tissus qui peuvent être endommagés lors d'exposition prolongée aux hautes températures.

La protéinase K et le HCl sont des agents communs utilisés pour augmenter la perméabilité des tissus et par conséquent la sensibilité d'ISH. Mais ces traitements sont aussi des points de discussion. L'expérience de Lawrence et Singer (1985) sur des cellules de cerveaux fixées par 4% paraformaldéhyde pour 18 h a montré que la digestion protéolytique a endommagé les tissus, causé des pertes d'ARNm cellulaires et a résulté en une perte de signaux dans ces régions. Nos résultats ont indiqué que pour une sonde de petite taille, il n'y avait pas de différence critique entre les temps de traitement à la protéinase K. En considérant que tous nos sondes ont des petites tailles de moins de 200pb et que certains sont des facteurs de transcription qui peuvent s'exprimer peu dans une cellule, nous avons éliminé cette étape afin d'exclure les possibilités de pertes d'ARNm cibles et de dommages sur la morphologie de tissus. Les variables qui avaient une importance considérable pour l'amélioration du signal étaient les températures d'hybridation et de lavage optimaux, et la concentration de sonde dans le tampon d'hybridation. De plus, les traitements à l'ARNase A pour diminuer le bruit de fond ont été annulés, car les résultats obtenus n'ont pas permis de voir une amélioration du signal spécifique.

L'ISH est utilisé pour localiser et caractériser la fonction d'un gène en corrélant son expression à un tissu ou type cellulaire. Les LTPs sont supposées jouer un rôle dans la biogenèse des membranes par la médiation de transport des lipides de leurs sites de biosynthèse, typiquement le réticulum endoplasmique, à d'autres membranes chez les plantes. Chez le blé, il existe deux familles de protéines qui sont

différenciées sur la base de leurs masses moléculaires et de leur structure 3D, les LTP1 et les LTP2. Les protéines du premier groupe ont une masse moléculaire de 9 kDa et celles de LTP2 ont une masse de 7 kDa. Dans notre cas, la sonde produite correspond à un gène du groupe 1, des gènes plus étudiés chez plusieurs espèces (De Lamotte et al. 2001). Pendant la germination, les gènes *LTP1* s'expriment spatialement et temporellement chez l'embryon et l'endosperme du maïs et de la carotte (Sossountzov et al. 1991; Sterk 1991). Gausing (1994) a montré que des gènes *LTP* de l'orge s'exprimait dans les feuilles et le coléoptile, au niveau de l'épiderme et du tissu vasculaire. Cette étude montrait que la localisation de gènes suggérait des fonctions possibles dans des compartiments spécifiques (Gausing, 1994). L'accumulation spécifique de *LTP* dans les tissus épidermiques de feuille est conforme à la suggestion que les LTPs participent à la formation de la cuticule (Sterk et al. 1991) tandis qu'une fonction dans la défense contre des agents pathogènes peut expliquer l'expression des gènes *LTP* dans le tissu vasculaire (Molina et al. 1993). Ce groupe a aussi montré que deux gènes codant pour des LTP inductibles par le froid possédaient des spécificités d'expression tissulaire et de réponse aux pathogènes (Molina et al. 1996). Les LTPs semblent participer à la réponse à des stress tels la sécheresse (Plant et al. 1991) et le stress salin (Torres-Schumann et al, 1992). Nos résultats sur la localisation de LTP chez le blé traité au froid montrent que ce gène est présent dans les tissus vasculaires, les épidermes, les initiations des racines, les jonctions de graine et le mésophylle. Ses expressions diversifiées peuvent être une conséquence d'une fonction plus diversifiée de ce gène *LTP* chez le blé. Ces résultats varient avec ceux de Pearce et al (1998) qui ont détecté l'expression de leur LTP d'orge (*blt4.9*) exclusivement dans l'épiderme. Cette différence s'explique par le fait que ce sont des gènes différents ne démontrant que 43% d'identité et 63% de similitude au niveau de leur protéine respective.

Dans le cas de la localisation de *Srub*, les résultats montrent une spécificité qui est en accord avec les fonctions de sa protéine, une enzyme critique pour la

photosynthèse et la photorespiration chez les plantes. Chez le blé, l'accumulation d'expression de ce gène a été observée au début de la biogenèse du chloroplaste (Dean et Leech 1982). La localisation était associée avec des feuilles matures compétentes pour la photosynthèse et moins chez les jeunes feuilles proches du méristème. Ces résultats concordent avec une étude sur le développement du chloroplaste (Boffey et al. 1979). L'augmentation des signaux est dans les tissus où il y a une forte division cellulaire (près du collet et C1) et une forte division chloroplastique sans la division cellulaire (C2). Par contre, F1 est dans une région où le nombre de chloroplastes est semblable et les cellules sont beaucoup plus allongées (Boffey et al. 1979). Cela peut causer la variation de la concentration d'expression. Chez le collet, ce gène a aussi été localisé dans des régions contenant des méristèmes de nouvelles racines et le mésocotyl (jonction entre la graine et la plumule). La raison exacte de notre résultat est incertaine mais peut être due à un rôle inconnu mais nécessaire de cette enzyme dans ces tissus et/ou que l'ARNm n'est jamais traduit dans ces cellules. Les 22 gènes *Srub* chez le blé hexaploïde ont été classifiés en 4 sous-familles (Sasanuma 2001; Galili 1998) et posséderaient des caractéristiques d'expression variables selon les cultivars testés, les types de tissus, les stades de développement des tissus et même leur régulation par la lumière.

Jusqu'à date, plusieurs gènes *COR* ont démontré une expression tissu-dépendante chez les céréales. Pearce et al. (1998) et Ohno et al. (2001) ont observé chez l'orge et le blé une corrélation positive entre l'expression de certains gènes *COR* (telle que l'expression de *wlt10*) et la tolérance au froid d'un tissu. De plus, DHN5 (une déhydrine) de l'orge et les protéines WCS120 (une famille de protéines de type déhydrine) du blé ont été localisées dans le tissu vasculaire, zones préférentielles pour la formation de glace au début de la congélation et donc protégées durant la croissance de plantes à des températures avoisinant le point de congélation (Houde et al 1995; Bravo et al. 1999). En se basant sur la fonction putative des déhydrines qui seraient de protéger divers macromolécules d'une perte en eau, Houde et al. (1995)

ont suggéré que les protéines de la famille WCS120 peuvent jouer un rôle dans le maintien du transport de métabolite à basse température. Cette fonction peut être réalisée en protégeant l'enzyme saccharose synthase dans les cellules compagnons du phloème des feuilles matures (Nolte et Koch, 1993). Les spécificités d'expressions des gènes *COR* sont une conséquence directe de l'activité des facteurs de transcription régulés par le froid. Chez le blé, plusieurs facteurs *CBF* sont exprimés à un niveau plus élevé pendant l'acclimatation au froid du blé d'hiver plus tolérant au gel (Badawi et al. 2007). Dans le cas du gène *CBFIVd-B4*, les expériences de localisation indiquent que son expression au froid est associée préférentiellement avec les tissus vasculaires du collet et des jeunes feuilles et avec le mésophylle chez les feuilles matures. Comme les protéines CBF jouent un rôle important dans l'induction des gènes *COR* impliqués dans le développement de la tolérance au gel, il est possible d'inférer que dépendamment du stade développemental, les deux types cellulaires ont des besoins variables pour des protéines COR.

Comme la fonction des protéines COR et les gènes cibles du facteur CBFIVd-B4 restent inconnues, il est difficile d'expliquer adéquatement leur profil d'expression. Toutefois l'expression du gène CBF se trouve préférentiellement dans la partie inférieure du collet, une région qui contient le système vasculaire initial pour toute la plante. Cette région, essentielle pour la régénération de la plante après un stress au gel, doit développer une plus grande tolérance au froid (Tenino et McKersie 1984). Le profil d'expression de *CBFIVd-B4* suggère qu'il fonctionne dans le maintien de la tolérance de cette région importante de la plante. D'autre part, l'expression du gène *CBF* se trouve préférentiellement dans le mésophylle et cellules de garde de feuilles matures. Ces types cellulaires sont exposés à la chambre sous-stomatique où la glace se forme facilement à une température aussi élevée que -2.4°C (Pearce et Ashworth 1992). Il est donc fort probable que ces régions soient plus exposées à un stress hydrique lorsque l'eau sort de la cellule pour rejoindre les cristaux de glace. Étant donné que le blé possède plusieurs gènes *COR* qui

s'expriment dans les feuilles matures (*Wcs19*) et les cellules épidermiques (*WCOR15*), ces gènes pourraient servir pour la protection de ces cellules. La corrélation de l'expression de *CBFIVd-B4* avec de jeunes tissus vasculaires et cellules matures de mésophylle et des cellules épidermiques (inclut des cellules de garde) suggèrent qu'il est impliqué dans un mécanisme de protection pour ces types cellulaires qui seront exposés à des stress sévères.

Une recherche intéressante sur l'expression des gènes d'*Arabidopsis* par micro-puce a montré que 86% des gènes induits par le froid ont une spécificité d'expression au niveau tissulaire (racines versus feuilles) incluant des régulateurs d'expression par le froid (Kreps et al. 2002). Après 3 h d'acclimatation au froid, *AtCBF1* et un gène qui code pour la protéine phosphatase ABA Insensitive-2 s'expriment que dans les feuilles. En même temps, des homologues de ces deux types de gène – (*CBF1*-like et un autre gène qui code pour la protéine phosphatase correspondante) s'expriment dans les racines. Ce profil d'expression illustre bien la spécificité d'expression tissulaire des gènes et des changements dans leurs transcriptions causant potentiellement des changements dans le fonctionnement cellulaire (Kreps et al. 2002). Plusieurs gènes *COR* caractérisés à ce jour font partie des régulateurs des protéines régulatrices CBF1, CBF2 et CBF3 d'*Arabidopsis*. Ces gènes codent pour des déhydrines, des LTPs, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de cryoprotectants et des protéines impliquées dans la signalisation et la régulation de la transcription (Fowler and Thomashow 2002).

La localisation de l'expression de d'autres gènes/groupes *CBF* permettra de dire si ces régulateurs ont des fonctions tissulaires spécifiques ou synergiques. Pour aider à dévoiler la fonction exacte d'un gène *CBF*, l'information précise sur la transcription de gènes *COR* dans ces tissus reste essentielle. De plus, une étude éventuelle sur les motifs spécifiques liés par les différents *CBF* aidera à expliquer la voie de la régulation de *CBFIVd-B4*.

5. CONCLUSION

L'hybridation in situ a été choisie parce que c'est une technique sensible qui permet la localisation des gènes (ARNm) exprimés. Les transcrits codant pour les facteurs de transcription CBF existent soit en petite quantité ou transitoirement durant un traitement au froid. Ceci nécessite une technique suffisamment précise pour détecter nos gènes cibles, ainsi que de légères variations dans les niveaux d'ARNm entre les cellules. Les optimisations effectuées à ce jour ont permis de détecter spécifiquement les gènes contrôles (*LTP* et *Srub*) et le gène *TaCBFIVd-B4*. Dans le cas de *CoA* et *TaCBFIVa-A2*, nous n'avons pas réussi à détecter spécifiquement ces ARNm dans les tissus. Toutefois, les résultats récents indiquent que les concentrations des sondes anti-sens étaient sous estimées suggérant que même ces gènes seront localisés prochainement.

La localisation du gène *TaCBFIVd-B4* a montré que le tissu/ stade développemental dans lequel se trouve un type cellulaire influence l'expression de ce gène. Par exemple le tissu vasculaire a montré l'expression la plus élevée au niveau du collet et du coléoptile (feuilles immatures) tandis que le mésophylle et les cellules de garde ont montré l'expression la plus élevée chez les feuilles matures. Ces résultats démontrent la complexité des voies régulant un *CBF* car en plus des facteurs exogènes connus comme le froid et la lumière cette étude révèle que des facteurs endogènes comme le tissu/ type cellulaire/ stade développemental peuvent moduler l'expression d'un *CBF*. De plus, ces résultats positifs offre une possibilité de réaliser notre objectif de localiser tous les gènes *CBF* du blé afin de clarifier le rôle possible (fonctions différentes ou complémentaires) des dix groupes *CBF* dans le développement de la tolérance au gel du blé. Cette caractérisation permettra de savoir si leurs spécificités d'expression tissulaire et cellulaire expliquent en partie la conservation du nombre élevé de gènes *CBF* chez le blé et d'autres céréales tempérées.

6. BIBLIOGRAPHIE

Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong C-H, Fujii H, Zheng X and 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: 37636-37645.

Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M and Suzuki M (1998) A novel mode of DNA recognition by α -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *The EMBO Journal* 17: 5484-5496.

Arondel V and Kader JC (1990) Lipid transfer in plants. *Experientia* 46: 579-585.

Badawi M, Danyluk J, Boucho B, Houde M and Sarhan F (2007) The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Molecular Genetic and Genomics* 277: 533-554.

Balaji S, Babu MM, Iyer LM and Aravind L (2005) Discovery of the principal specific transcription factors of *Apicomplexa* and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucl. Acids Res.* 33: 3994-4006.

Basyuk E, Bertrand E and Journot L (2000) Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucl. Acids Res.* 28: E46.

Boffey SA, Ellis JR, Sellden G and Leech R M (1979) Chloroplast Division and DNA Synthesis in Light-grown Wheat Leaves. *Plant Physiol.* 64: 502-505.

Bravo LA, Close TJ, Corcuera LJ and Guy CL (1999) Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiol. Plant.* 106: 177-183.

Chauvin LP, Houde M and Sarhan F (1994) Nucleotide sequence of a new member of the freezing tolerance-associated protein family in wheat. *Plant Physiol.* 105: 1017-1018.

Chinnusamy V, Ohta M, Kanarar S, Lee B, Hong X, Agarwal M and Zhu JK (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Gene and Development* 17: 1043-1054.

Chinnusamy V, Zhu J and Zhu JK (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.* 126: 52-61.

Danyluk J (1997) Identification et caractérisation moléculaire de gènes induits au cours de l'acclimatation au froid chez le blé (*Triticum aestivum*). Thèse de doctorat en biologie moléculaire. Université de Montréal.

Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N and Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *The Plant Cell* 10: 623-638.

Dean C and Leech RML (1982) The co-ordinated synthesis of the large and small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase during early cellular development within a seven day wheat leaf. *FEBS Lett* 140: 113-116.

De Block M and Debrouwer D (1993) RNA-RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled probes: the use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Anal. Biochem.* 215: 86-89.

De Lamotte F, Vagner F, Pons, Gautier MF, Roumestand C and Delsuc MA (2001) Protein dynamics studies on a wheat type 2 lipid transfer protein. *C. R. Acad. Sci. Paris, Chimie / Chemistry* 4: 839-843.

Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q and Zhu JK (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8281-8286.

Fleming AJ, Mandel T, Roth I and Kuhlemeier C (1993) The pattern of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell* 5: 297-309.

Fowler SG, Cook D and Thomashow MF (2005) Low temperature induction of *Arabidopsis CBF1*, 2 and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol.* 137: 961-968.

Fowler S and Thomashow MF (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690.

Galili S, Avivi Y and Feldman M (1998) Differential expression of three RbcS subfamilies in wheat. *Plant Sci.* 139: 185-193.

Gausig K. (1994) Lipid transfer protein genes specifically expressed in barley leaves and coleoptiles. *Planta* 192: 574-580.

Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD and Thomashow MF (2000) Overexpression of the *Arabidopsis CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation1. *Plant Physiol.* 124: 1854-1865.

Gong W, Shen YP, Ma LG, Pan Y, Du YL, Wang DH, Yang JY, Hu LD, Liu XF, Dong CX, Li M, Chen YH, Yang XY, Gao Y, Zhu D, Tan X, Mu JY, Zhang DB, Liu YL, Dinesh-Kumar SP, Yi L, Wang XP, Gu HY, Qu LJ, Bai SN, Lu YT, Li JY, Zhao JD, Zuo J, Huang H, Deng XW and Zhu YX (2004) Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol.* 135: 773-782.

Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B and Zhu JK (2002) RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11507-11512.

Guo W, Ward RW and Thomashow MF (1992) Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis Cor47*. *Plant Physiol.* 100: 915-922.

Guy CL. (2003) Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Can. J. Bot.* 81: 1216-1223.

Guy CL, Niemi KJ and Brambl R (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3673-3677.

Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O and Thomashow MF (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130: 639-648.

Hannah MA, Heyer AG and Hinch DK (2005) A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 1: e26.

Houde M, Danyluk J, Laliberté JF, Rassart E, Dhindsa RS and Sarhan F (1992) Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding a 50 kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiol.* 99: 1381-1387.

Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberté S and Sarhan F (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* 8: 583-593.

Hu YX, Wang YH, Liu XF and Li JY (2004) *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research* 14: 8-15.

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T and Thomashow MF (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* 127: 910-917.

Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O and Thomashow MF (1998) *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.

Kagaya Y, Ohmiya K and Hattori T (1999a) RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* 27: 470-478.

Kagaya Y, Ohmiya K and Hattori T (1999b) Regulation by external and developmental signals of the RAV2 gene encoding a DNA binding protein containing AP2 and B3-like domains. *Plant Biotechnology* 16: 135-140.

Kim S, Soltis PS, Wall K and Soltis ED (2006) Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Mol. Biol. Evol.* 23: 107-120.

Knight H, Trewavas AJ and Knight MR (1996) Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8: 489–503.

Kobayashi F, Takumi S, Nakata M, Ohno R, Nakamura T and Nakamura C (2004) Comparative study of the expression profiles of the Cor/Lea gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiol. Plant.* 120: 585–594.

Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X and Harper JF (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130: 2129–2141.

Lawrence JB and Singer RH (1985) Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucl. Acids Res.* 13: 1777–1799.

Lee D, Polisensky DH and Braam J (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness- regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and *XTH* genes. *New Phytologist* 165: 429–444.

Lee H, Xiong L, Gong Z, Ishitani M, Stevenson B and Zhu JK (2001) The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.* 15: 912–924.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1998) Two transcription factors DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways

in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.

Liu Y, Zhao T, Liu JM, Liu WQ, Liu Q, Yan YB and Zhou HM (2006) The conserved Ala37 in the ERF domain is essential for binding with the DRE element and the GCC box. *FEBS Letters* 580: 1303-1308.

Livingston III DP, Tallury SP, Premakumar R, Owens S and Olien CR (2005) Changes in the histology of cold hardened oat crowns during recovery from freezing. *Crop Sci.* 45: 1545-1558.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell JE (1999) *Molecular Cell Biology*, New York: W. H. Freeman & Co. Chapitre 10.

Lyons JM and Raison JK (1970) Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45: 385-389.

Magnani E, Sjölander K and Hake S (2004) From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16: 2265-2277.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Yusuke I, Motoaki S, Yideki G, Yukihiisa S, Yosida S, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB/CBF3 transcription factors using two microarray systems. *Plant Journal* 38: 982-993.

McCully ME, Canny MJ and Huang CX (2004) The management of extracellular ice by petioles of frost-resistant herbaceous plants. *Annals Bot.* 94: 665-674.

Miller AK, Galiba G and Dubcovsky J (2006) A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum*. *Mol Gen Genomics* 275: 193-203.

- Molina A and Garcia-Olmedo F** (1993) Developmental and pathogen-induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins. *The Plant J.* 4: 983-991.
- Molina A, Diaz I, Vasil IK, Carbonero P and Garcia-Olmedo F** (1996) Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens. *Mol. Gen. Genet.* 252: 162-168.
- NDong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NPA and Sarhan F** (2002) Cold-regulated cereal chloroplast Late Embryogenesis Abundant-Like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.* 129: 1368-1381.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T and Shinshi H** (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 140: 411-432.
- Nolte KD and Koch KE** (1993) Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading. *Plant Physiol.* 101: 899-905.
- Novillo F, Alonso JM, Ecker JR and Salinas J** (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3985-3990.
- Ohno R, Takumi S and Nakamura C** (2001) Expression of a cold responsive Lt-Cor gene and development of freezing tolerance during cold acclimation in wheat (*Triticum aestivum L.*). *J Exp. Bot.* 52: 2367-2374.
- Ouellet F, Houde M and Sarhan F** (1993) Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat. *Plant and Cell Physiology* 34: 59-65.
- Ouellet F, Vazquez-Tello A and Sarhan F** (1998) The wheat Wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Lett.* 423: 324-328.
- Pearce RS** (2001) Plant freezing and damage. *Annals of Bot.* 87: 417- 424.

Pearce RS and Ashworth EN (1992) Cell shape and localization of ice in leaves of overwintering wheat during frost stress in the field. *Planta*. 188: 324-331.

Pearce RS, Houlston CE, Atherton KM, Rixon JE, Harrison P, Hughes MA and Dunn MA (1998) Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiol*. 117: 787-795.

Phillips JR, Dunn MA and Hughes MA (1997) mRNA stability and localisation of the low-temperature-responsive barley gene family *blt14*. *Plant Mol. Biol*. 33: 1013-1023.

Pihakaski-Maunsbach K, Moffatt B, Testillano P, Risueno M, Yeh S, Griffith M and Maunsbach AB (2001) Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots. *Physiol. Plant*. 112: 359-371.

Plant ALI, Cohen A and Bray EA (1991) Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and ABA-induced gene of tomato. *Plant Physiol*. 197: 900-906.

Rapp JC and Mullet JE (1991) Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *RbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently. *Plant Mol. Biol*. 17: 813-823.

Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Hiroshi A, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2002) DNA-Binding Specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 290: 998-1009.

Sarhan F, Ouellet F and Vazquez-Tello A (1997) The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol. Plant*. 101: 439-445.

Sasanuma T (2001) Characterization of the *rbcS* multigene family in wheat: subfamily classification, determination of chromosomal location and evolutionary analysis. *Mol. Genet. Genomics* 265: 161–171.

Sharma P, Sharma N and Deswal R (2005) The molecular biology of the low-temperature response in plants. *Bioessays* 27: 1048-1059.

Skinner JS, von Zitzewitz J, Szucs P, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen TH and Hayes PM (2005) Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Mol. Biol.* 59: 533-551.

Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E and Delseny M (1991) Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 923–933.

Srinivasan M, Sedmak D and Jewell S (2002) Effects of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161: 1961–1971.

Steponkus PL, Uemura M, Joseph RA, Gilmour SJ and Thomashow MF (1998) Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14570-14575.

Steponkus PL, Uemura M and Webb MS (1993) A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat. Two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. *In* PL Steponkus, ed. *Advances in Low-Temperature Biology*. Vol 2. JAI Press, London, pp 211–312.

Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Vankammen A and Devries SC (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 907-921.

Stitt M and Hurry V (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Biol.* 5: 199-206.

Stockinger EJ, Gilmour SJ and Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.

Takumi S, Koike A, Nakata M, Kume S, Ohno R and Nakamura C (2003) Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) Cor gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein. *J. Exp. Bot.* 54: 2265-2274.

Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Déoczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL and Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15: 141-152.

Tenino KK and McKersie BD (1984) Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Can. J. Bot.* 63: 432-436.

Tester M and Bacic A (2005) Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiol.* 137: 791-793.

Thoma S, Kaneko Y and Somerville C (1993) A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal* 3: 427-436.

Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-7.

Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.

Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR and Zarka DG (2001) Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol. Plant* 112: 171-175.

Torres-Schumann S, Godoy JA and Pintor-Toro JA (1992) A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18: 749–757.

Uemura M and Steponkus PL (1997) Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope isolated from rye leaves. *Plant Physiol.* 114: 1493-1500.

Uemura M and Steponkus PL (1989) Effect of cold acclimation on the incidence of two forms of freezing injury in protoplasts isolated from rye leaves. *Plant Physiol.* 91: 1131-1137.

Vergnolle C, Vaultier MN, Taconnat L, Renou JP, Kader JC, Zachowski A and Ruelland E (2005) The cold-induced early activation of phospholipase C and D pathways determines the response of two distinct clusters of genes in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* 139: 1217-1233.

Vogel JT, Zarka DG, Van Buskirk HA, Fowler SG and Thomashow MF (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41: 195-211.

Wang Z, Triezenberg SJ, Thomashow MF and Stockinger EJ (2005) Multiple hydrophobic motifs in *Arabidopsis* CBF1 COOH-Terminus provide functional redundancy in trans-activation. *Plant Mol. Biol.* 58: 543-559.

Wuitschick JD, Lindstrom PR, Meyer AE and Karrer KM (2004) Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APETELA2 DNA binding domains. *Eukaryotic Cell* 3: 685-694.

Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, Koiwa H, Bresson RA, Hasegawa PM and Zhu JK (2002) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10899–10904.

Xue GP (2002) An AP2 domain transcription factor HvCBF1 activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif. *Biochim. et Biophys. Acta* 1577: 63-72.

Xue GP (2003) The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *The Plant Journal* 33: 373-383.

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (1994) A novel cis acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264.

Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781-803.

Zarka DG, Vogel JT, Cook D and Thomashow MF (2003) Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF Expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* 133: 910-918.

Zhang JZ (2003) Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 430-440.

Zhang L, Dunn MA, Pearce RS and Hughes MA (1993) Analysis of organ specificity of a low temperature responsive gene family in rye (*Secale cereale* L.). *J. Exp. Bot.* 44: 1787-1793.

Zhang X, Fowler SG, Cheng H, Lou Y, Rhee SY, Stockinger EJ and Thomashow MF (2004) Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 39: 905-919.

Zhao T, Sun S, Liu Y, Liu J, Liu Q, Yan Y and Zhou H (2006) Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions

of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. J. Biol. Chem. 281: 10752-10759.