

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION DES GÈNES CODANT POUR LES ÉNOLASES ET LA
2-CYS PEROXYRÉDOXINE BAS1 PENDANT L'ACCLIMATATION
AU FROID CHEZ LE BLÉ

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
BANTÉNAL KOLANI KONN

OCTOBRE 2023

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.04-2020). 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 mon directeur de recherche, le Pr. François Ouellet de m'avoir aidé et guidé dans mon cheminement.

À tous les professeurs du département des sciences biologiques et particulièrement du groupe végétal.

Aux membres du jury de mémoire.

À William Bouard, de m'avoir aidé à m'adapter et à m'intégrer au système du labo, pour son soutien inestimable sur le plan technique.

À Mélanie et Tom pour leur franche collaboration.

À mes collègues et au personnel du laboratoire, pour leur aide indispensable.

À ma famille et à tous mes amis qui m'ont encouragé.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ	x
CHAPITRE I REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 Introduction	2
1.2 Processus de développement des plantes.....	3
1.3 Facteurs environnementaux influençant le développement des plantes	4
1.3.1 Développement normal des plantes	4
1.3.2 Développement des plantes sous stress au froid.....	5
1.3.3 Modifications biochimiques membranaires au cours de l'acclimatation au froid.....	5
1.4 Développement chez le blé d'hiver	6
1.5 Acclimatation au froid.....	7
1.5.1 Définition.....	7
1.5.2 Dommages causés par le froid et le gel	9
1.5.3 Ajustements métaboliques en réponse à l'exposition au froid	9
1.6 Voie de signalisation en réponse au stress au froid (ICE-CBF-COR).....	10
1.6.1 Facteurs de transcription « Inducer of CBF Expression » (<i>ICE</i>).....	13
1.6.2 Facteurs de transcription « C-repeat Binding Factors » (<i>CBF</i>)	14
1.6.3 Gènes « cold-regulated » (<i>COR</i>).....	15
1.7 Régulation dans la réponse au froid	17
1.7.1 Régulation hormonale dans la réponse au froid.....	17
1.7.2 Régulation de l'expression génétique par les basses températures.....	18

1.8	Protéines induites lors de l'acclimatation au froid	19
1.8.1	Protéines de tolérance au gel du blé d'hiver	20
1.8.2	Nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la tolérance au gel chez le blé	21
1.9	Étude présente.....	27
1.9.1	Problématique	27
1.9.2	Hypothèse et objectif	27
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		28
2.1	Matériel végétal et conditions de croissance	28
2.2	Planification des points et prélèvement des échantillons	29
2.3	Extraction des ARN totaux	30
2.4	Conversion des ARNm en ADN complémentaires	31
2.5	Fabrication des amorces et réalisation de la PCR quantitative.....	32
2.6	Analyse des séquences promotrices	34
2.7	Analyse d'expression génétique chez <i>Arabidopsis</i>	34
2.7.1	Lignées <i>Arabidopsis</i> utilisées	34
2.7.2	Amplification des stocks de graines	35
2.7.3	Conditions de croissance et traitement des plantes pour mesure de l'expression génique	35
2.8	Analyses statistiques.....	36
CHAPITRE III RÉSULTATS		37
3.1	Vérification de la qualité et quantité des échantillons d'ARN de blé.....	37
3.2	Validation des amorces pour la PCR quantitative en temps réel.....	38
3.3	Validation de la qualité du traitement au froid	39
3.4	Expression des gènes <i>ENO</i> dans les feuilles du blé.....	43
3.5	Expression des gènes <i>ENO</i> dans les collets du blé.....	44
3.6	Expression du gène <i>BASI</i> dans les feuilles du blé.....	46
3.7	Analyse des régions promotrices potentielles.....	49
3.8	Expression de <i>LOS2</i> et <i>2CPA</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	54

CHAPITRE IV DISCUSSION	58
4.1 Validation de la qualité du traitement au froid par les gènes <i>CBFIVd-A22</i> , <i>WCS120</i> et <i>VRN1</i>	59
4.2 <i>ENO-a</i> , <i>ENO-b</i> et <i>ENO3-4D</i> s'expriment en réponse au stress au froid dans les feuilles	62
4.3 Peroxyrédoxine <i>BASI</i>	63
4.4 Analyse des séquences promotrices potentielles	64
4.5 Expression de <i>LOS2</i> et <i>2CPA</i> chez les lignées sauvages et mutantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
CHAPITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES	68
BIBLIOGRAPHIE	71

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Voies de transduction du signal du stress au froid chez les plantes	12
1.2 Voie de signalisation ICE-CBF-COR.....	17
3.1 Gel de vérification de la qualité et de la quantité des ARN totaux extraits des feuilles de blé	38
3.2 Gel d'électrophorèse des produits qPCR obtenus après le gradient thermique	41
3.3 Expression des gènes <i>CBFIVd-A22</i> (A), <i>WCS120</i> (B) et <i>VRNI</i> (C) dans les feuilles des cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid	42
3.4 Expression des gènes ENO-a (A) et ENO-b (B) dans les feuilles deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid	44
3.5 Expression des gènes ENO3-4A (A), ENO3-4B (B) et ENO3-4D (C) dans les feuilles deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid.....	45
3.6 Expression des gènes ENO-a (A) ENO-b (B), ENO3-4A (C), ENO3-4B (D) et ENO3-4D (E) dans les collets deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid.....	47
3.7 Expression du gène BAS1 dans les feuilles deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid	48
3.8 Analyse des séquences promotrices potentielles de ENO-a et ENO-b avec PlantCARE	50
3.9 Analyse des séquences promotrices potentielles de ENO3-4A, ENO3-4B et ENO3-4D avec PlantCARE.....	52
3.10 Analyse de la séquence promotrice potentielle de BAS1 avec PlantCARE.....	54
3.11 Expression des gènes LOS2 et 2CPA dans les feuilles d'Arabidopsis.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Amorces utilisées pour les analyses d'expression par qPCR dans le cadre de ce projet.....	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA	« Abscisic acid » (acide abscissique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
bHLH	« basic Helix-Loop-Helix » (hélice-boucle-hélice basique)
CBF	« C-repeat-Binding Factor » (facteur liant l'élément répété C)
COR	« Cold regulated » (régulé par le froid)
DRE	« Dehydration-responsive element » (élément de réponse à la déshydratation)
DREB	« Dehydration-responsive element binding protein » (protéine liant l'élément DRE)
ICE	« Inducer of CBF expression » (inducteur de l'expression de CBF)
LTRE	« Low Temperature-Responsive Element » (élément de réponse aux basses températures)
TaENO	Protéine émolase du blé <i>Triticum aestivum</i> .

RÉSUMÉ

Dans toutes les régions du monde, les plantes subissent les conséquences des changements climatiques parfois brutaux, et utilisent des stratégies efficaces pour s'adapter aux stress environnementaux. L'acclimatation à ces stress se fait par l'activation des voies de signalisation et canaux moléculaires impliquant la perception du stress, la transduction du signal et l'expression de gènes et de métabolites spécifiques liés au stress. Dans ce travail il est question de caractériser l'expression génique des gènes codant pour les protéines potentiellement impliquées dans la tolérance au gel chez le blé *Triticum aestivum*. L'étude s'est penchée sur l'expression génétique de l'énolase (*ENO*) et de la 2-Cys peroxyrédoxine *BASI* au cours du traitement au froid. Elle s'est faite sur deux variétés de blé qui diffèrent par leur tolérance au gel, le CDC Buteo (variété d'hiver tolérante au gel) et KANE (variété de printemps moins tolérante au gel). Ces deux variétés ont été cultivées et traitées au froid pendant sept semaines. Des prélèvements de tissus de feuilles et de collets ont été effectués, les ARN totaux ont été extraits puis une PCR quantitative a été réalisée avec les amorces spécifiques de cinq gènes de l'énolase et du gène *BASI*. Les résultats de cette étude ont montré des niveaux d'accumulation significatifs des transcrits des gènes de l'énolase et de la 2-Cys peroxyrédoxine au cours du traitement au froid chez le blé. Les analyses préliminaires d'expression chez *Arabidopsis* n'ont toutefois pas permis de déterminer si les gènes *LOS2* et *2CPA* sont des orthologues de *TaENO* et *TaBASI* du blé. Ceci serait une information utile pour déterminer si la plante-modèle *Arabidopsis* pourrait être utilisées pour faciliter les analyses fonctionnelles. Néanmoins, les résultats de cette étude suggèrent une possible implication des protéines TaENO et TaBAS1 dans la tolérance au gel chez le blé, et que l'information pourrait être utilisé dans les programmes de sélection de plantes plus tolérantes au gel.

Mots clés: blé, 2-Cys peroxyrédoxine, énolase, expression génique, froid

CHAPITRE I

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les plantes sont utilisées par l'homme comme source de nourriture et de médicaments pour ses effets bénéfiques et toxiques sur la santé, mais aussi comme matériau de construction et de décoration. Sans les plantes, il n'y aurait pas de vie sur Terre. En effet, en tant que producteurs primaires, elles captent l'énergie solaire et la convertissent en énergie chimique (glucose) que d'autres organismes peuvent consommer. Les plantes sont également chargées de produire l'oxygène que nous respirons dans l'air et de recycler le dioxyde de carbone que nous produisons (Kahn, 1999; Thomas *et al.*, 2008). Les êtres vivants, humains et animaux, se nourrissent de fruits, d'herbes et d'autres éléments des végétaux. Les hommes en profitent le plus, car ils mangent non seulement des aliments végétaux, mais aussi les animaux utiles aux humains qui consomment à leur tour les plantes pour leur croissance (Kahn, 1999). De tous ces végétaux, les céréales occupent une place importante pour l'alimentation humaine ce qui amène beaucoup de recherches sur les facteurs climatiques environnementaux qui entravent leur bonne production et leur bonne répartition géographique.

1.1 Introduction

Avec l'évolution des découvertes scientifiques au dix-neuvième et vingtième siècle, l'explosion démographique et industrielle a eu beaucoup de conséquences sur la production agricole. On est passé d'une agriculture de subsistance à une agriculture d'exportation en vue de faire face au besoin des populations. Cette agriculture est sous l'influence des facteurs environnementaux comme les précipitations, le vent, la chaleur, le froid et la neige. Il est donc nécessaire de comprendre l'action des facteurs environnementaux sur le développement des plantes céréalières en général et particulièrement celles qui se trouvent en régions hivernales. Cela permettra d'apporter des contributions pour améliorer le rendement. Selon Statistique Canada, le Canada est le sixième plus grand producteur de blé au monde et l'un des plus grands exportateurs (Statistique Canada, 2021). La production annuelle est en moyenne de plus de 35 millions de tonnes, et le volume des exportations est d'environ 60% de la production totale. Cette production a connu une baisse en raison des intempéries climatiques ces dernières années. La production de blé au Canada en 2021 a chuté de 38,5 % pour s'établir à 21,7 millions de tonnes, selon Le Quotidien de Statistique Canada du vendredi 3 décembre 2021 (Statistique Canada, 2021). Cette baisse est principalement attribuable à une baisse de la production dans les Prairies. Cette chute de production liée aux conditions climatiques notamment la sécheresse et surtout la neige amène le monde scientifique à faire des études et trouver des variétés de semences plus résistantes et mieux adaptées à chaque région.

Moins de 10% de la production de blé au Canada provient du blé d'hiver (2,77 millions de tonnes de grains sur les 35 millions de tonnes totales en 2020). Ceci est dû au cycle de reproduction du blé d'hiver, qui inclut une nécessité de vernalisation (hivernation), et à la tolérance maximale que le blé peut acquérir suite à l'acclimatation au froid survenant à l'automne. La rigueur des hivers canadiens ne permet de cultiver le blé d'hiver que dans les régions moins froides. Des études sont menées depuis plusieurs

décennies en particulier sur le plan physiologique et moléculaire pour mieux comprendre les modifications qui surviennent pour permettre au blé d'hiver de survivre aux conditions difficiles de son environnement.

1.2 Processus de développement des plantes

Le développement des plantes en général, et des plantes céréalières en particulier, regroupe la phase végétative et la phase reproductrice, au cours de laquelle la plante effectue la photosynthèse et rassemble les ressources nécessaires à sa croissance, floraison et reproduction. Il convient de noter que les plantes ont des habitudes de croissance différentes selon leur espèce et leur situation géographique. Dans les pays froids, la plupart des plantes céréalières économiquement importantes poussent dans des zones où la température est parfois très basse. Des chutes de température soudaines en fin de saison de croissance (avant les récoltes), pendant la période d'acclimatation au froid à l'automne (avant acquisition de la tolérance au gel) ou pendant la phase de déacclimatation au printemps (lors de la reprise de croissance) peuvent générer des dommages et entraîner de mauvaises récoltes. Pour ces raisons, la plante doit mettre en place un système de résistance au froid et au gel. Il est important de rechercher et de comprendre les mécanismes afin de pouvoir sélectionner de meilleures variétés plus résistantes (Ouellet et Charron, 2013). Ainsi les plantes qui ont un cycle de vie court comme la plupart des plantes céréalières se développent en fonction de leur nature (génétique), du temps (saison) en mettant tout en œuvre pour résister aux facteurs environnementaux afin d'assurer leur reproduction (Ouellet et Charron, 2013).

1.3 Facteurs environnementaux influençant le développement des plantes

Les facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer collectivement ou individuellement le développement des plantes. Parmi les facteurs biotiques, on note les infections par les bactéries, virus et champignons, et les dommages causés par les herbivores (Calatayud et al., 2013). Les plantes doivent aussi s'adapter à différentes sortes de stress abiotiques tels que la pénurie ou l'excès d'eau, la forte ou la faible luminosité, la pollution de l'air, la salinité du sol, les températures extrêmes, le vent, et la toxicité dans le sol de certains métaux tels que l'aluminium, le cadmium ou l'arséniate. Parmi les facteurs abiotiques, les plus importants sont la lumière, la température et l'eau (Génére, 1997), car ces facteurs environnementaux influencent le développement des céréales. La température est d'une importance capitale pour les plantes hivernales car elle influence positivement et négativement le rendement des plantes céréalières. Ces dernières années, les épisodes extrêmes sont devenus plus fréquents et plus prononcés, causant d'énormes pertes aux régions géographiques touchées.

1.3.1 Développement normal des plantes

Chez les graminées le développement d'une plante commence par la germination, suivi de la mise en place des différents organes de croissance (racines, tiges et feuilles) et de reproduction (floraison, pollinisation, fructification). La croissance d'une plante dépend de son cycle de vie, de son cycle de reproduction, et aussi des conditions climatiques dont l'eau, la lumière, la température, et les éléments minéraux du sol. On a aussi les facteurs internes liés à la physiologie de la plante (hormones de croissance) qui sont indispensables à son développement. Lorsque les bonnes conditions sont réunies, les plantes font leur cycle de vie et se perpétuent en fonction de leur espèce. Dans leur milieu naturel, les végétaux doivent composer avec les changements environnementaux qui surviennent au cours de leur développement.

1.3.2 Développement des plantes sous stress au froid

Les végétaux se développent sous différents stress environnementaux qui influencent leur croissance et leur reproduction. Pour qu'une plante puisse survivre et se reproduire face aux multiples stress environnementaux, elle doit développer des mécanismes de tolérance ou de résistance aux différents changements qui se produisent autour d'elle. Ces mécanismes de défense se développent principalement au niveau moléculaire et cellulaire, car les cellules représentent les unités structurelles et fonctionnelles des organismes. Le froid est l'un des principaux stress environnementaux des pays tempérés qui limite la production céréalière à cause des dommages qu'il crée au niveau cellulaire. Ainsi les plantes mettent en place des mécanismes qui leur permettent de s'acclimater au froid puis de résister au gel.

1.3.3 Modifications biochimiques membranaires au cours de l'acclimatation au froid

Les cellules sont constituées d'une enveloppe protectrice appelée membrane cellulaire. Cette couverture protectrice entoure toutes les cellules vivantes, isolant leur intérieur et les protégeant du monde extérieur. La membrane est composée d'une bicouche composée de molécules grasses appelées phospholipides (Danielli et Davson, 1935; Singer et Nicolson, 1972). Le type et la forme des lipides dans la membrane aident à maintenir la fluidité et la semi-perméabilité de la membrane. Ces caractéristiques déterminent les solutés qui pourront entrer dans les cellules et les autres qui en sortiront (Singer et Nicolson, 1972).

La membrane cellulaire contient également des protéines sur sa surface interne ou externe (appelées protéines périphériques) ou des protéines intégrées à la membrane appelées protéines intégrales. Parce que les membranes sont fluides et non rigides, ces protéines peuvent se déplacer à travers les membranes pour répondre aux besoins des cellules et les maintenir en bonne santé. (Singer et Nicolson, 1972). De plus, à mesure

que les cellules grandissent et grossissent, la membrane augmente de taille et maintient sa fluidité pour faciliter cette croissance.

De nombreux facteurs influencent ce comportement membranaire, et des facteurs environnementaux tels que la température jouent un rôle fondamental. Des températures trop élevées ou trop basses peuvent gravement endommager les membranes cellulaires, et des températures extrêmes peuvent tuer les cellules en affectant la membrane cellulaire. Les températures plus basses entraînent moins de mouvement des queues d'acides gras des phospholipides, ce qui entraîne des membranes plus rigides. Cela peut réduire la fluidité globale de la membrane et également réduire sa perméabilité, limitant l'entrée de molécules clés telles que l'oxygène et le glucose dans la cellule. (Singer et Nicolson, 1972). Les basses températures peuvent également ralentir la croissance cellulaire en empêchant l'augmentation de la taille des cellules. Dans des situations extrêmes telles qu'une exposition prolongée à des températures inférieures à zéro, le fluide extracellulaire peut commencer à geler, formant des cristaux de glace. Ceci cause une sortie massive d'eau cellulaire, menant à une déshydratation qui peut éventuellement tuer les cellules (Singer et Nicolson, 1972).

1.4 Développement chez le blé d'hiver

Dans les zones de l'hémisphère nord où il y a des variations de températures extrêmes tel que le Canada, les plantes céréalières telles que le blé se développent en fonction de leurs conditions physiologiques et génétiques pouvant leur permettre de passer du stade végétatif au stade reproducteur pour perpétuer leurs lignées. Ainsi les périodes favorables de développement diffèrent d'une espèce à l'autre. Le blé de printemps est semé au printemps c'est-à-dire fin avril et début mai dans les pays à hiver plus rude, et récolté en automne de la même année. La différence principale avec le blé d'hiver est

que le blé de printemps supporte assez difficilement les températures basses. Le blé de printemps n'a pas besoin de vernalisation pour atteindre le stade reproductif (Curtis *et al.*, 2002).

Comme l'orge et le seigle d'hiver, le blé d'hiver doit subir une vernalisation, une période de fraîcheur (inférieure à 5°C) pour passer du stade végétatif au stade reproducteur. Pour le blé, le stade cinq feuilles est le meilleur moment pour la vernalisation, mais il peut se produire une fois la germination commencée. Dans l'hémisphère nord, le blé d'hiver est généralement semé entre septembre et novembre et récolté l'été suivant. Chez le blé d'hiver (*Triticum aestivum*), le stade physiologique de la montaison est retardé jusqu'à la vernalisation de la plante (30 à 60 jours à des températures comprises entre 0°C et 5°C). (Curtis *et al.*, 2002). Le blé d'hiver semé au printemps et qui n'a pas subi de vernalisation n'atteint donc jamais le stade reproductif (Curtis *et al.*, 2002).

1.5 Acclimatation au froid

1.5.1 Définition

L'acclimatation au froid est un processus complexe qui implique des changements physiologiques et métaboliques sous contrôle génétique qui se produit pendant une période d'exposition à des températures basses non négatives conduisant chez de nombreuses espèces à une tolérance accrue aux températures négatives (Bourion *et al.*, 2003). Dans la nature, les températures basses non négatives de la fin de l'automne ou 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. L'acclimatation au froid est le processus relativement lent par lequel la plante acquiert la tolérance au gel. Au printemps, la tolérance au gel est perdue lorsque les

températures remontent en haut du point de congélation. Le processus de désacclimatation est plus rapide que l'acclimatation (Ouellet, 2002).

Au Canada, l'hiver est très dur sur les végétaux car le froid ralentit les réactions enzymatiques, altère la conformation des lipides membranaires et autres macromolécules, et arrête la plupart des processus biologiques. Ceci fait en sorte que seules les plantes possédant les dispositions génétiques nécessaires pour s'acclimater au froid en vue de développer la tolérance au gel pourront survivre (Stitt et Hurry, 2002). Lorsque la température descend en dessous de zéro degré, de la glace se forme dans l'espace intercellulaire où la concentration de soluté est faible, ce qui facilite la congélation provoquant la perte d'eau des cellules et donc la déshydratation de la plante. Les plantes sont capables de survivre aux dommages causés par le gel, en résistant au froid et au stress hydrique (Levitt et Siminovitch, 2011). Pour résister au froid puis au gel, des modifications ultrastructurales physiques ou biophysiques au niveau de la membrane plasmique sont nécessaires au cours de l'acclimatation au froid.

Pendant l'acclimatation au froid on observe une augmentation à la fois du contenu en acides gras insaturés et du rapport phospholipides sur protéine dans la membrane. Cette asymétrie lipidique membranaire semble contribuer à la stabilité de la membrane à basse température (Sung et al., 2003). Ces changements permettent de maintenir la fluidité de la membrane et la fonction des protéines de transport de façon à éviter la fuite des électrolytes et autres molécules vers l'environnement extérieur. Dans ce phénomène, les cellules doivent être protégées du gel et surtout de la formation de glace qui draine l'eau disponible des compartiments cellulaires et endommage mécaniquement le système membranaire (Guy et al., 1992).

1.5.2 Dommages causés par le froid et le gel

Les températures négatives entraînent pour l'eau le passage de l'état liquide à l'état solide. Cette situation, qui survient durant l'hiver, affecte sévèrement la survie et la croissance des plantes, car la formation de glace cause des dommages structuraux et ceux-ci peuvent mener à la mort des cellules. La glace formée dans les espaces extracellulaires provoque un écart entre la concentration de liquide intra- et extracellulaire et cause ainsi un mouvement de l'eau intracellulaire vers l'extérieur. Ce déséquilibre osmotique va donc provoquer la déshydratation cellulaire (Thomashow, 1999). Les effets de la glace dépendent de la vitesse de la baisse de la température, de la sévérité et de la durée du froid. Chez les plantes sensibles au froid, les baisses de température entraînent des répercussions irréversibles au niveau des membranes cellulaires et du métabolisme cellulaire. Chez les plantes résistantes au gel, plusieurs barrières existent pour empêcher la formation ou contrôler le progrès de la glace comme la rigidification de la membrane plasmique et la synthèse de diverses protéines et molécules avec des propriétés antigel (Pihakaski-Maunsbach *et al.*, 2001).

1.5.3 Ajustements métaboliques en réponse à l'exposition au froid

L'acclimatation au froid provoque une augmentation du contenu en sucres chez plusieurs plantes hivernales comme le seigle, la pomme de terre et le blé (Perras et Sarhan, 1984; Siminovitch et Cloutier, 1983). En effet, chez les plantes vivaces de climat tempéré, une forte augmentation des glucides solubles et une diminution de la teneur en amidon des tissus sont observées en automne et en hiver (Guy *et al.*, 1992). Chez le blé d'hiver, on assiste pendant l'acclimatation au froid à une augmentation en contenu de sucres solubles, en sucres réducteurs et en ATP, alors qu'on n'observe pas les mêmes changements chez le blé de printemps (Perras et Sarhan, 1984). L'accumulation en sucres et autres composés augmente l'osmolarité intracellulaire, ce qui peut réduire la température de cristallisation de la glace et la quantité de glace

formée. Pendant l'acclimatation au froid, les activités métaboliques cellulaires des plantes sont ralenties, c'est-à-dire que les cellules réduisent les activités de croissance et de reproduction pour se concentrer sur la production de protéines et de molécules pouvant aider à résister contre le gel. Certains composés produits dans ces périodes dans la cellule peuvent agir comme osmoprotecteurs; ce sont des acides aminés comme la proline et la glycine bêtaïne, mais aussi des sucres solubles comme le sorbitol ou les polyamides. Ces ingrédients sont très solubles et non toxiques pour les cellules. Les osmoprotecteurs agissent pour augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme et peuvent stabiliser les protéines et les membranes même à des températures défavorables (Breton et al., 2000). Ces solutés dans le cytoplasme contribuent à la survie des cellules en cas de gel en réduisant les pertes d'eau durant la déshydratation induite par la cristallisation de l'eau extracellulaire pour former la glace.

1.6 Voie de signalisation en réponse au stress au froid (ICE-CBF-COR)

Les mécanismes par lesquels les plantes perçoivent les signaux environnementaux et les transmettent à la machinerie cellulaire pour déclencher des mécanismes de réponse appropriés sont cruciaux pour leur croissance et leur survie. La transmission ou la transduction des signaux de stress est la première étape par laquelle les plantes établissent des mécanismes d'adaptation ou des réponses à divers stress environnementaux (Zhu, 2016). Dans ce contexte de stress environnementaux, une voie de transduction du signal débute par la reconnaissance de ce signal au niveau membranaire constituant le premier messenger, suivie de la production du deuxième messenger et éventuellement des facteurs de transcription (Zhu, 2016). Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress, incluant des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques à court et à long terme (Calatayud *et al.*, 2013; Zhu, 2016). Ce phénomène est connu sous le nom de cascade de signalisation due au stress (au froid par exemple) qui implique plusieurs

facteurs connus et d'autres en cours d'étude. Les voies de signalisation de différents stress abiotiques partagent parfois des éléments communs. Des études sur la signalisation cellulaire en réponse au froid ont montré que plusieurs éléments sont impliqués dans les diverses voies (Figure 1.1).

L'une des voies étudiées chez plusieurs plantes en réponse au froid est la voie de signalisation ICE (inducer of *CBF* expression) - CBF (C-repeat Binding Factor) – COR (cold-regulated). La voie de signalisation ICE-CBF-COR a été identifiée et étudiée dans un certain nombre de plantes modèles des zones d'hiver (*Arabidopsis*, blé, seigle, riz, tomate, patate) et s'est avérée nécessaire pour l'adaptation de ces plantes au froid et au gel (Shi *et al.*, 2018). Le premier signal de cette voie est encore mal connu, mais la rigidification de la membrane pourrait donner le coup d'envoi. L'activation des canaux calciques provoquant l'entrée du calcium dans le cytoplasme constitue le second messenger. Ceci entraîne l'activation des protéine-kinases dépendante du calcium (CDPK) qui relaient les signaux calciques (Ca^{2+}) entraînant la phosphorylation et l'activation de la cascade MAPK (mitogen-activated protein kinase) dû à l'entrée du calcium dans le cytoplasme. Cela a pour effet d'activer des facteurs de transcription (CBF/DREP) qui déclenchent l'induction des gènes de réponse au stress au froid (ICE, COR) (Koc *et al.*, 2015).

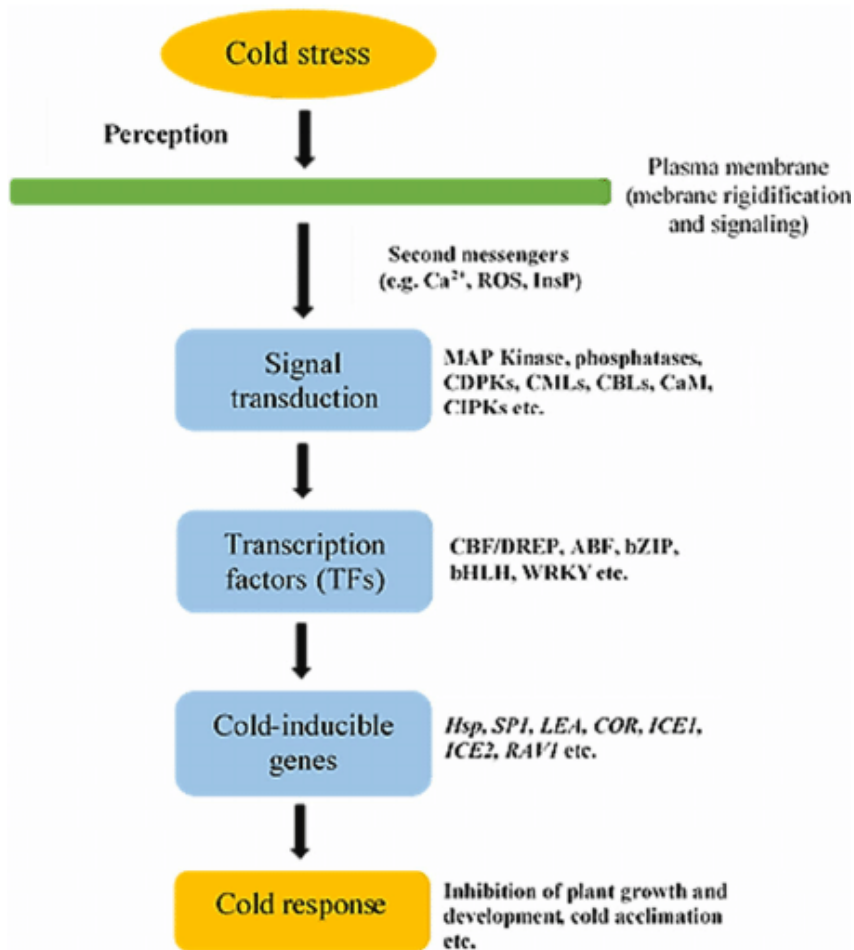


Figure 1.1 Voies de transduction du signal du stress au froid chez les plantes. Lors de la perception d'un stress dû au froid par les récepteurs inconnus entraînant la rigidification des membranes, une cascade de signalisation intracellulaire complexe est activée impliquant des molécules secondaires, des protéines kinases, des facteurs de transcription, etc. pour développer une réponse au froid (tiré de Koc *et al.*, 2015).

1.6.1 Facteurs de transcription « Inducer of CBF Expression » (*ICE*)

Les protéines ICE sont essentielles dans la voie de signalisation ICE-CBF-COR en tant que transducteur de signal lié à la tolérance au gel chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, deux membres de la famille *ICE*, *ICE1* et *ICE2*, ont été identifiés. *ICE1* code pour un facteur de transcription de type MYC bHLH (basic helix-loop-helix) qui se lie au promoteur de *CBF3* et active son expression dans les situations de basses températures (Chinnusamy *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que la mutation *ice1* dominante bloque l'induction de *CBF3* par le froid mais pas de *CBF1* ou *CBF2*. La surexpression de *ICE1* entraîne une augmentation de la tolérance au gel, alors que les plantes mutantes *ice1* sont hypersensibles au stress et sont incapables de s'acclimater au froid (Chinnusamy *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2017). *ICE1* s'exprime de façon constitutive, et la protéine a été localisée dans le noyau. Certaines études ont montré qu'il n'induit l'expression des *CBFs* que sous stress de froid. Comme l'expression de ICE est constitutive et que ICE induit l'expression de CBF seulement au froid, cela suggère que le froid induit des modifications post-traductionnelles de ICE qui la rendent active (Thomashow, 2010). D'autres études ont démontré une homologie entre *ICE1* et *ICE2*, ainsi la surexpression de *ICE2* chez *Arabidopsis* augmente la capacité des plantes transgéniques à survivre à des températures négatives après une acclimatation au froid. De plus, la surexpression d'*ICE2* contribue à la formation des stomates et à la régulation du temps de floraison (Kurbidaeva *et al.*, 2014). Des homologues *ICE* ont été identifiés chez le blé, *TaICE41* et *TaICE87* dont la surexpression chez *Arabidopsis* améliore la tolérance au gel, suggérant l'importance des homologues *ICE* dans la réponse au stress dû au froid chez le blé d'hiver (Badawi *et al.*, 2008). Plusieurs études ont pu identifier des homologues de *ICE1* chez plusieurs espèces de plantes et leur implication dans la régulation de la réponse au froid, agissant dans les premières étapes de la voie de signalisation liée au froid ICE-CBF-COR (Hwarari *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2017).

1.6.2 Facteurs de transcription « C-repeat Binding Factors » (*CBF*)

Les *CBF* représentent une famille de gènes impliquée dans les processus de tolérance à différents stress, dont le gel. En 1997, une étude a rapporté l'isolement d'un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* qui code pour une protéine nommée CBF1 (C-repeat/DRE Binding Factor 1) pouvant lier l'élément C-repeat/DRE. L'analyse de la séquence d'acides aminés a indiqué que la protéine a une masse moléculaire de 24 kDa, une séquence de localisation nucléaire potentielle et un possible domaine d'activation acide (Stockinger et al., 1997). Cette étude a révélé que CBF1 possède également un domaine AP2, qui est un motif de liaison à l'ADN d'environ 60 acides aminés présent dans les protéines APETALA d'*Arabidopsis* (Stockinger et al., 1997). Dans cette étude, la liaison de CBF1 au C-repeat/DRE a été démontrée dans des tests de retard sur gel utilisant la protéine CBF1 recombinante exprimée dans *Escherichia coli*. De plus, l'expression de *CBF1* dans la levure s'est avérée efficace pour activer la transcription des gènes rapporteurs contenant la répétition C/DRE en tant que séquence activatrice en amont, mais pas les versions mutantes de l'élément d'ADN. Ceci veut dire que CBF1 peut fonctionner comme un activateur transcriptionnel qui se lie spécifiquement à l'élément régulateur de l'ADN C-repeat/DRE et, par conséquent, est susceptible de jouer un rôle dans l'expression des gènes régulés par le froid et la déshydratation chez *Arabidopsis* (Stockinger et al., 1997).

En 2002, quatre orthologues des gènes *CBF/DREB1* de l'oléagineux d'hiver *Brassica napus* (BNCBF5, 7, 16 et 17), un parent d'*Arabidopsis*, ont été isolés et caractérisés et leurs similitudes et différences avec les gènes *CBF/DREB1* ont été rapportées (Gao et al., 2002). L'étude a révélé que les BNCBF5, 7 et 16 sont très similaires au CBF1 d'*Arabidopsis* alors que BNCBF17 est différent car il contient deux régions supplémentaires de 16 et 21 acides aminés dans le domaine acide. Les transcrits de *BNCBF17* et autres *BNCBF* s'accumulent dans les feuilles dans les 30 minutes suivant l'exposition au froid des semis de Brassica et précèdent l'accumulation de transcrits du

gène *BN28* inductible par le froid, un orthologue du gène *cor6.6* ou *KIN* d'*Arabidopsis* (Gao *et al.*, 2002). L'accumulation d'ARNm de *BNCBF17* induite par le froid était rapide mais de courte durée par rapport aux transcrits *BNCBF5/7/16*.

En 2007 une étude chez le blé a dénombré 37 gènes *CBFs* subdivisés 15 groupes différents (Badawi *et al.*, 2007). Les *CBF* sont des éléments clés pour augmenter la tolérance au froid chez les plantes car une étude a montré que la surexpression des *CBF* dans le riz, le maïs, l'orge, le blé et autres espèces végétales conduit à une amélioration significative de la tolérance aux basses températures chez les plantes transgéniques (Hu *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2004). En 2016 des études de mutation et d'insertion d'ADN-T ont utilisé la technologie CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ caspase 9) pour muter *CBF1* et *CBF1/CBF2* et générer des mutants doubles *cbf1 cbf3* et un mutant triple *cbf1 cbf2 cbf3* (Jia *et al.*, 2016). Ces expériences ont montré que la réponse de ces mutants *cbfs* au stress au froid est altérée et l'on observe la présence d'une biomasse plus importante que le type sauvage, signifiant que les *CBF* agissent pour équilibrer la tolérance au froid et la croissance des plantes (Jia *et al.*, 2016). Plusieurs de ces gènes *CBF* ont été caractérisés chez des espèces de *Triticeae*, dont *TaCBF14* et *TaCBF15*, deux facteurs de transcription *CBF* du blé qui joueraient un rôle important dans la réponse au stress dû au froid (Soltész *et al.*, 2013).

1.6.3 Gènes « cold-regulated » (*COR*)

Les gènes *COR* (Cold Regulated) font généralement référence aux protéines protectrices codées par les gènes régulés par le froid. Ces protéines s'accumulent pour faciliter l'acclimatation au froid et la tolérance au gel (Liu *et al.*, 2022). Plusieurs études montrent que les *CBFs* jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de ces gènes lors de l'acclimatation au froid. Pour activer la transcription des gènes *COR* en réponse au stress au froid, les *CBFs* se lient à la séquence C-Repeat/Dehydration

Responsive Element (CRT/DRE) (5'-CCGAC-3') dans les promoteurs des gènes *COR* (Shi *et al.*, 2017). Dans le blé, l'expression du gène *TaDREB1* (dehydration responsive element binding protein1), un homologue du gène *DREB2* chez *Arabidopsis*, est élevée sous stress de froid (Shen *et al.*, 2003). L'acclimatation au froid conduit à l'activation d'un groupe de gènes nommés *Wcor* (wheat cold-regulated) et *Wcs* (wheat cold-specific) qui démontrent un niveau d'expression plus élevé chez les cultivars de blé d'hiver comparativement aux cultivars de blé de printemps. Certains de ces gènes inductibles par le froid codent pour des protéines de type déhydrine (DHN) telles que la *WCS120* (Houde *et al.*, 1992), *Wcs200* (Ouellet *et al.*, 1993), *Wcor410* (Danyluk *et al.*, 1998). Des études de délétions de la région promotrice du gène *WCS120* ont révélé la présence de deux éléments CRT/DRE qui induisent l'activation des gènes responsables de la réponse au stress au froid (Ouellet *et al.*, 1998). La transcription du gène *WCS120* est activée par *TaDREB1* et est corrélée avec l'augmentation de la tolérance au gel chez le blé. L'expression du gène *TaDREB1*, un homologue du gène *DREB2* chez *Arabidopsis*, est aussi activée par le froid (Egawa *et al.*, 2006). On rencontre d'autres gènes qui répondent fortement au stress au froid chez le blé tel que le gène *T. aestivum* Abiotic Stress-Induced DNA Binding Factor a (*TaAIDFa*) qui est nettement activé par le stress dû au froid. Certaines études ont montré que la surexpression de *TaAIDFa* chez *Arabidopsis* augmente la transcription des gènes régulés par le froid comme *RD29A* et *COR15A* pour améliorer la tolérance au froid des lignées transgéniques (Xu *et al.*, 2008).

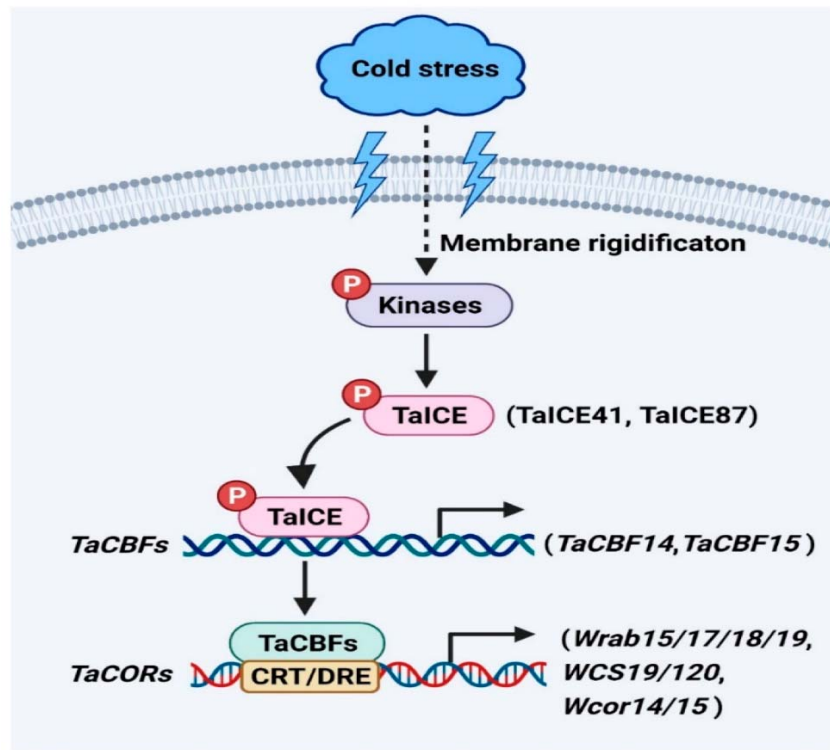


Figure 1.2 Voie de signalisation ICE-CBF-COR. La voie de signalisation ICE-CBF-COR joue un rôle vital chez le blé. Le stress au froid rigidifie la membrane plasmique altérant sa fluidité, et active les protéines kinases. Les kinases régulent positivement la voie de signalisation due au froid du blé en phosphorylant les protéines TaICE, notamment TaICE41 et TaICE87. TaICE se lie directement aux promoteurs des *TaCBF* pour réguler leur expression. Ensuite, les TaCBF se lient à la séquence CRT/DRE dans les promoteurs des gènes *TaCOR* tels que *Wrab15*, *Wrab17*, *Wrab18*, *Wrab19*, *WCS19*, *WCS120*, *Wcor14* et *Wcor15* pour l'activation de la transcription en réponse au stress dû au froid (tiré de Liu *et al.*, 2022).

1.7 Régulation dans la réponse au froid

1.7.1 Régulation hormonale dans la réponse au froid

Les études des substances retrouvées chez les plantes résistantes pendant les périodes hivernales montrent la présence de certaines hormones telles que les brassinostéroïdes (BR). Ce sont des hormones végétales stéroïdiennes qui jouent un rôle dans la

croissance et le développement des plantes par la régulation de processus tels que la division et l'expansion cellulaires. Ces hormones peuvent également protéger les plantes contre une variété de stress abiotiques tels que la sécheresse, le sel, la chaleur et le froid. Certains travaux ont mis en lumière les mécanismes moléculaires par lesquels les BR contribuent à augmenter la tolérance des plantes au froid et au gel chez la tomate et *Arabidopsis* (An *et al.*, 2023; Eremina *et al.*, 2016). On note également une réponse adaptative par laquelle les plantes augmentent leur tolérance au gel après exposition à des températures basses non négatives (Eremina *et al.*, 2016). Ces travaux démontrent qu'une application exogène des BR augmentent l'expression de *CBF* (An *et al.*, 2023; Eremina *et al.*, 2016).

Il existe au moins deux voies de signalisation pour la régulation de l'expression des gènes en réponse au froid. La voie la plus commune est la voie dépendante de l'acide abscissique (ABA), mais une voie indépendante de l'ABA joue également un rôle mineur, mais significatif (Gusta *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, le système de régulation des gènes inductibles par le froid le mieux compris qui appartient à la voie indépendante de l'ABA a été identifié chez *Arabidopsis*. D'autre part, la voie dépendante a été mise en évidence par le fait que le niveau de l'ABA augmente chez plusieurs plantes traitées au froid, et que de nombreux gènes inductibles par le froid réagissent à l'application exogène d'ABA (Baker *et al.*, 1994). Certaines études ont montré que l'expression des gènes *COR* dépendants de l'ABA et des gènes *COR* indépendants de l'ABA (*WCS19*, *WCS120*, *Wcor14* et *Wcor15*) est significativement augmentée par le stress de froid chez le blé (Shi *et al.*, 2017).

1.7.2 Régulation de l'expression génétique par les basses températures

L'expression des gènes est soit ubiquitaire dans la plante ou spécifique à un tissu ou à un groupe de tissus donné (Callen, 2005). La transcription d'un gène est déterminée par son promoteur et les facteurs de transcription requis. Le promoteur est une portion

de l'ADN située en amont de la région codante et qui porte séquences cis-régulatrices spécifiques (Callen, 2005; Pribnow, 1975). La fixation et l'activation de l'ARN polymérase est sous le contrôle des facteurs de transcription qui se fixent au niveau de ces éléments pour démarrer la synthèse de l'ARN (Callen, 2005). L'organisation des séquences promotrices est très différente entre les procaryotes et les eucaryotes, mais elle est beaucoup plus complexe chez les eucaryotes. Les éléments rencontrés ne sont cependant pas observés dans l'ensemble des promoteurs eucaryotes et ne sont pas nécessaires à l'initiation de la transcription. Chez les plantes beaucoup d'études ont été menées pour déterminer des éléments communs à différents stress environnementaux qui sont capables d'activer l'expression de différents gènes. Les différents stress environnementaux dans cette étude qui ont parfois des éléments communs sont la température, la sécheresse, la salinité, et certains régulateurs de croissance comme l'ABA, le méthyl jasmonate.

1.8 Protéines induites lors de l'acclimatation au froid

Les différentes protéines et solutés produits lors de l'acclimatation au froid sont le résultat de l'activation de plusieurs gènes (Thomashow, 1999). Les gènes induits par le froid chez les plantes sont nommés gènes *COR* (Cold Regulated), *CS* (Cold specific), *LTI* (Low Temperature Induced), *KIN* (inductible par le froid), *RD* (Responsive to Desiccation), *ERD* (Early Dehydration-inducible) et *LEA* (Late Embryogenesis Abundant). Ces gènes codent pour des protéines antigels, des protéines hydrophiles similaires au déhydrines, des protéines impliquées dans le transfert des lipides, des désaturases de lipides, des chaperons moléculaires, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de cryoprotecteurs et des protéines impliquées dans la signalisation et la régulation de la transcription (Thomashow, 1999). L'identification des gènes *COR* a été réalisée chez plusieurs espèces telles qu'*Arabidopsis*, l'orge, le riz et le blé.

L'activation de ces gènes se fait suivant plusieurs canaux appelés voies de signalisations liées au stress.

1.8.1 Protéines de tolérance au gel du blé d'hiver

Le degré de tolérance au gel d'une plante dépend de sa capacité à maintenir l'expression de gènes inductibles par le froid à un haut niveau pendant la période d'acclimatation (Ouellet, 2002). Chez le blé d'hiver, plusieurs protéines ont été caractérisées expérimentalement et les études ont montré leur association dans le phénomène de tolérance au gel chez la plante. *WCS120* (wheat cold-specific), un gène codant pour l'une des déhydrines, s'accumule à des niveaux élevés lors d'une exposition au froid et a été suggéré comme pouvant jouer un rôle de protection des molécules et des structures cellulaires pendant la congélation (Houde *et al.*, 1995; Vazquez-Tello *et al.*, 1998). Le nombre de copies et l'organisation des gènes inductibles chez les cultivars de blé sensibles et tolérants au gel sont les mêmes. Cependant, l'expression des gènes induits par les basses températures comme *WCS120* chez les espèces tolérantes reste toujours élevée lors de l'exposition aux basses températures, alors qu'elle demeure à un niveau bas chez les espèces moins tolérantes (Ouellet, 2002). Un grand nombre de protéines de type déhydrine dans la plupart des céréales inductibles au froid sont localisées à proximité des tissus vasculaires (Houde *et al.*, 1995). Elles ont été détectées dans le cytosol ou le noyau de certaines cellules et elles fonctionnent comme cryoprotecteurs en stabilisant les macromolécules cellulaires ou les structures cellulaires. Chez le blé, les travaux de Houde par la technique de l'immunolocalisation ont montré que la déhydrine *WCS120* s'exprime uniquement dans le cytoplasme et le nucléoplasme de cellules de la région vasculaire (Houde *et al.*, 1995). Ces régions sont connues comme étant très sensibles aux basses températures et jouent un rôle important dans la protection des cellules qui entourent les canaux vasculaires parce que c'est là que surviennent les premiers dommages causés par le gel. Chez le blé, certaines déhydrines acides telle que

WCOR410 seraient impliquées dans la cryoprotection de la membrane plasmique des cellules de la région vasculaire (Danyluk *et al.*, 1998).

Parmi les gènes inductibles par les basses températures, on rencontre plusieurs gènes qui codent pour des protéines antigel qui ont une affinité pour la glace et possèdent la propriété d'inhibition de la recristallisation de la glace mais pas celle d'hystérèse thermique (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Jia *et Davies*, 2002; Tremblay *et al.*, 2005). C'est l'exemple des gènes *TaIRI-1* et *TaIRI-2* (*Triticum aestivum* ice recrystallization inhibition) qui sont régulés à la hausse pendant l'acclimatation au froid (Tremblay *et al.*, 2005). Ces travaux ont montré que chez le blé d'hiver Norstar, les transcrits du gène *TaIRI-1* ont été observés dans les feuilles, les collets et les racines. Les transcrits du gène *TaIRI-2* ont été observés uniquement dans les feuilles. Les protéines *TaIRI-1* et *TaIRI-2* s'accumulent également dans des conditions froides et minimisent les dommages aux cellules pendant les processus de gel et dégel en inhibant la croissance des cristaux de glace à travers les domaines de liaison à la glace (Chow-shi-yée *et al.*, 2016a; Tremblay *et al.*, 2005).

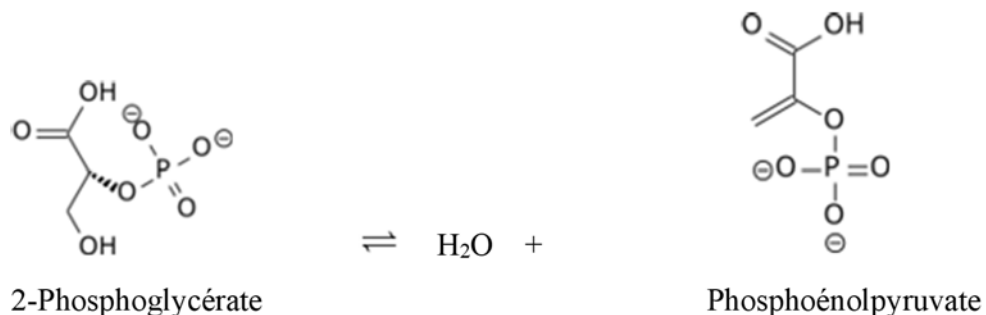
1.8.2 Nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la tolérance au gel chez le blé

Des études sur la cryoconservation des cellules animales avec un mélange de protéines solubles du blé d'hiver ont permis de révéler des protéines qui pourraient être impliquées dans la tolérance au gel chez le blé. Il a été démontré que ces protéines candidates avaient une haute efficacité pour la conservation des cellules des mammifères à ultra-basse température. Parmi les protéines caractérisées, on a l'énolase (*TaENO*), la 2-Cys peroxyrédoxine *BAS1* (*TaBAS1*) et la chaperonine 60 (*TaCPN60*) (Grondin *et al.*, 2015). En plus d'améliorer la viabilité des cellules post-décongélation, ces protéines maintiennent les fonctions métaboliques spécifiques aux cellules du foie de rat à des cellules pancréatiques d'une lignée humaine. La suite de ces études a montré

que WCS120, TaIRI-2, TaENO et TaBAS1 protègent les hépatocytes contre l'activation de l'apoptose pendant la cryoconservation (Chow-shi-yée *et al.*, 2020). Le mode d'action précis de ces protéines reste à élucider, mais les résultats indiquent que ces protéines pourraient jouer un rôle protecteur chez les plantes qui ont besoin de survivre à la congélation.

1.8.2.1 Protéines Énolase

L'énolase connue sous les noms de phosphopyruvate hydratase ou 2-phosphoglycérate déshydratase, découverte par Lohmann et Meyerhof en 1934, est une métalloenzyme responsable de la conversion du 2-phospho-D-glycérate (2PG) en phosphoénolpyruvate (PEP), la 9^e et avant-dernière étape de la glycolyse avec un pH optimum de 6,5 (Díaz-Ramos *et al.*, 2012; Pancholi, 2001). Elle appartient à la famille des lyases qui catalyse également la réaction inverse selon l'accès de la cellule au glucose. Le sens de la réaction est déterminé en fonction des besoins de la cellule, qui doit adapter son métabolisme pour obtenir l'énergie indispensable pour la réalisation des processus vitaux (Pancholi, 2001). La protéine est un homo- ou hétérodimère d'un poids moléculaire total qui varie entre 82000 daltons à 100000 daltons suivant son isoforme et l'espèce (Díaz-Ramos *et al.*, 2012).



L'énolase est considérée comme un enzyme clair de lune (« moonlighting functions »), car de nombreuses fonctions différentes de sa fonction classique lui ont été attribuées

à ce jour aussi bien chez les bactéries que chez les eucaryotes. Parmi ces rôles, on note une participation au maintien de la forme cellulaire ainsi qu'au trafic vésiculaire en interagissant avec les protéines du cytosquelette. Dans le noyau des cellules de mammifères, elle agit comme un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes associés à la prolifération cellulaire. Elle coopère pour maintenir la stabilité des ARNm dans le dégradosome chez les bactéries. Chez les agents pathogènes tels que *Streptococcus pneumoniae* et *Trypanosoma cruzi*, elle semble agir comme un facteur de virulence important. Il a également été constaté que chez *Streptococcus pyogenes*, l'énolase est excrétée dans l'environnement extracellulaire, facilitant la dégradation tissulaire et l'évasion du système immunitaire chez l'hôte.

L'énolase est une enzyme présente dans tous les tissus et organismes qui réalisent la glycolyse. On distingue à ce jour trois isoformes d'énolase, ENO1 (ENO- α), ENO2 (ENO- γ) et ENO3 (ENO- β). Chaque isoforme peut être sous forme hétéro ou homodimère $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ et $\gamma\gamma$ (Zhu *et al.*, 2015). Les énolases sont localisées principalement dans le cytosol, un compartiment dans lequel la glycolyse et la gluconéogenèse ont lieu dans la plupart des organismes. Cependant, certaines énolases ont également été détectées dans d'autres compartiments cellulaires tels que la membrane plasmique de nombreux agents pathogènes, et dans les chloroplastes chez les plantes. L'énolase se retrouve à la surface d'une variété de cellules eucaryotes animales en tant que puissant récepteur liant le plasminogène (Nakajima *et al.*, 1994). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'une des nombreuses protéines de choc thermique (HSP) induites à des températures élevées est la HSP48, identifiée comme une α -énolase. L' α -énolase est un produit du gène *ENO1* et on pense qu'elle est impliquée à la fois dans la tolérance thermique et dans le contrôle de la croissance de la levure (Mitsutake *et al.*, 1996). Certaines études ont montré que le gène qui exprime l'énolase n'est pas un gène domestique puisque son expression varie selon les conditions physiopathologiques, métaboliques ou de développement des cellules (Mc Alister et Holland, 1982). Plusieurs études chez les bactéries et certaines cellules

animales ont rapporté que les ARN messagers (ARNm) spécifiques de l'énolase augmentent à un niveau très élevé dans les cellules en croissance exponentielle, mais reste à un niveau presque indétectable dans la phase stationnaire (phase de repos cellulaire) (Giallongo *et al.*, 1986).

Dans les cellules non photosynthétiques, l'énolase joue comme déjà mentionné un rôle très important dans la glycolyse pour le maintien du métabolisme énergétique. Cependant, la situation est différente chez les végétaux parce que les cellules végétales dépendent principalement de la photosynthèse pour leur approvisionnement en énergie. Ainsi une étude chez la tomate a montré une forte accumulation des ARNm de l'énolase au niveau des racines, mais seulement une faible quantité d'ARNm au niveau des feuilles et des fruits (Mitsutake *et al.*, 1996). Chez *Arabidopsis*, cette enzyme est retrouvée dans les mitochondries. Ceci est lié au rôle que jouent les mitochondries dans les réactions métaboliques.

Une étude a montré que le gène *LOS2*, qui code pour une énolase, est essentiel pour la tolérance au gel chez *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2002). En effet, la mutation *los2-1* diminue l'expression des gènes inductibles par le froid, tels que *COR15A*, *COR47*, *KINI* et l'alcool déshydrogénase (*ADH*). Cependant, le niveau de transcrit *CBF2* n'est pas affecté dans la mutation *los2-1*, ce qui implique que *LOS2* ne fonctionne pas en amont du gène *CBF2*.

Dans les études de cryoconservation de cellules mammifères mentionnées plus haut, il a été démontré que la protéine TaENO recombinante protégeait mieux que le diméthylsulfoxyde (DMSO), un agent de cryoconservation utilisé couramment. Les protéines recombinantes confèrent leur protection même si l'activité enzymatique de la protéine a été détruite (Grondin *et al.*, 2013). Une étude subséquente a révélé que TaIRI-2 et TaENO ont une forte activité d'inhibition de la recristallisation de la glace (une propriété qui caractérise les protéines antigel), mais que TaENO ne possède pas

de domaines typiques de liaison à la glace (Chow-shi-yée et al. 2016a). Ceci suggère l'existence de nouveaux domaines qui n'ont pas encore été caractérisés.

1.8.2.2 Protéine 2-Cys peroxyrédoxine BAS1

Les peroxyrédoxines (PRX), découvertes à l'origine dans la levure, sont impliquées dans l'homéostasie redox et en réponse au stress oxydatif associé à la maladie, au vieillissement ou au stress environnemental (Baier et Dietz, 1997; Dietz, 2011). Chez les animaux, c'est la famille d'enzymes antioxydantes ubiquitaires qui contrôlent également le taux de peroxyde induit par les cytokines, et interviennent de ce fait dans les mécanismes de transduction de signal dans les cellules (Baier et Dietz, 1997; Rhee *et al.*, 2005). Chez les humains, les PRX identifiées sont PRX1, PRX2, PRX3, PRX4, PRX5 et PRX6, et elles sont retrouvées dans divers compartiments sous-cellulaires. Celles-ci sont distinguées historiquement en trois classes: les peroxyrédoxines 1-Cys, les peroxyrédoxines 2-Cys typiques et les peroxyrédoxines 2-Cys atypiques.

Chez les plantes comme *Arabidopsis thaliana*, 10 gènes nucléaires codent pour les PRX classées en quatre groupes en fonction du nombre de résidus Cys redox-actifs et sur la forme catalytique (Dietz, 2011). Les 2-Cys PRX sont des protéines plastidiques codées par deux gènes, 2-Cys *PRXA* et 2-Cys *PRXB*. Elles possèdent deux résidus cystéine conservés et sont actives comme homodimères affichant une conformation tête-bêche typique. Dans les feuilles, les PRX sont abondantes et représentent environ 1% des protéines chloroplastiques (Dietz, 2011). Les fonctions physiologiques des 2-Cys PRX végétales ont été étudiées principalement chez *Arabidopsis thaliana*. Comme mentionné plus haut, les 2-Cys Prx sont des enzymes antioxydantes responsables de la réduction de H₂O₂ en H₂O, à l'aide d'un système catalytique impliquant la thiorédoxine (Trx) et la thiorédoxine réductase dépendante du NADPH (TrxR) (Poynton et Hampton, 2014). Les 2-Cys Prxs peuvent également détoxifier les hydroperoxydes lipidiques et le peroxy-nitrite (Poynton et Hampton, 2014). Cette fonction dépend de la

position et de la configuration tridimensionnelle de deux résidus Cystéine qui jouent un rôle fondamental dans leur site actif. Le résidu Cys peroxydatif est oxydé en une forme sulfénique (Cys-SOH) par des hydroperoxydes, notamment H₂O₂, des peroxydes organiques, des hydroperoxydes de protéines, et du peroxydinitrite (Poynton et Hampton, 2014). La forme sulfénique oxydée réagit alors avec la Cys de position adjacente (« resolving cysteine ») pour former un pont disulfure, qui est réduit par le système Trx/TrxR/NADPH. Dans ce processus les 2-Cys Prxs pourraient être considérés comme des capteurs redox efficaces qui maintiennent de faibles niveaux de H₂O₂ à l'état d'équilibre (Dietz, 2011; Rhee *et al.*, 2005).

Chez les plantes, la 2-Cys peroxyrédoxine BAS1 est une protéine du chloroplaste qui a été localisée dans les tissus verts principalement (Baier et Dietz, 1997). La localisation cellulaire des protéines BAS1 a été étudiée dans les feuilles primaires de l'orge fractionnées en protoplastes de mésophylle et en protoplastes d'épiderme non vert. Une analyse d'immunobuvardage a été réalisée avec un anticorps anti-BAS1. Les résultats ont montré une forte bande antigénique visualisée dans les extraits de protoplastes de mésophylle. Les recherches approfondies de ces résultats ont indiqué une relation positive entre la teneur en chloroplastes des fractions respectives et la force du signal immunogène (Baier et Dietz, 1997). Chez le blé, une étude a démontré que la double suppression de *PRXA* et *PRXB* entraîne une diminution de la croissance chez la plante (Pulido *et al.*, 2010). L'activité cryoprotectrice de TaBAS1 sur les cellules mammifères pourrait venir d'une protection contre les ROS générés lors de la congélation/décongélation. Une fonction similaire pourrait survenir dans les chloroplastes des plantes qui doivent passer l'hiver.

1.9 Étude présente

1.9.1 Problématique

Dans les pays où l'hiver est très rude, on assiste parfois à des pertes de récoltes céréalières, notamment le blé qui est largement cultivé dans ces zones. Des études sont menées afin de trouver des variétés qui résistent mieux aux variations brutales et sévères du climat, précisément le gel et le dégel. Dans ces dernières décennies, des recherches sont menées chez les plantes hivernales céréalières pour comprendre les modifications physiologiques, moléculaires et biochimiques qui surviennent chez ces plantes avant, pendant et après les périodes hivernales. Plusieurs protéines associées à la tolérance au gel ont été identifiées chez le blé en utilisant des approches classiques de criblage de bibliothèques d'ADNc. Plus récemment, une étude sur la cryopréservation de cellules mammifères a montré que les protéines énoïase (TaENO) et 2-Cys peroxyrédoxine (TaBAS1) sont efficaces pour la conservation des cellules mammifères à des températures ultra basses (Chow-Shi-Yée *et al.*, 2016b; Grondin *et al.*, 2015). Des hypothèses se posent alors sur la possible implication de ces protéines dans une protection du blé contre les dommages résultant du gel et du dégel.

1.9.2 Hypothèse et objectif

Mon hypothèse est que les protéines énoïase et peroxyrédoxine BAS1 sont associées à la tolérance au gel chez le blé. Pour pouvoir vérifier cette hypothèse, je m'étais fixé comme objectif de déterminer les profils d'expression des différents gènes *ENO* et *BAS1* pendant le traitement au froid. J'ai choisi deux variétés de blé qui diffèrent dans leur tolérance au gel (un blé d'hiver plus tolérant et un blé de printemps moins tolérant), et les analyses ont été faites par qPCR.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Pour faire cette étude, j'ai utilisé des géotypes de blé de printemps et d'hiver (*Triticum aestivum* L.), deux variétés de blé qui diffèrent par leur tolérance au gel. CDC Buteo est un cultivar de blé roux d'hiver de l'Ouest canadien, très tolérant au gel. C'est une variété de taille moyenne, moyennement résistante à la rouille des tiges et des feuilles, rustique et avec un bon potentiel de rendement en grain. Il est bien adapté aux prairies de l'Ouest canadien, avec des grains de haute qualité et des rendements élevés, et est largement acceptée commercialement en Saskatchewan (Fowler, 2010). KANE est une variété de blé de printemps moins tolérante au gel dont la qualité d'utilisation finale et les caractéristiques visuelles du grain sont comparables à celles de la classe de blé roux de printemps de l'Ouest canadien. KANE a été évalué dans les essais de la Central Bread and Wheat Coopérative de 2003 à 2005 et s'est bien adapté aux régions productrices de blé du Canada (Manitoba et est de la Saskatchewan) (Fox *et al.*, 2007). KANE est résistant aux agents biologiques locaux tels que la rouille des feuilles et des tiges. Les tests de qualité à l'utilisation finale ont montré que les grains KANE ont un taux d'extraction de farine supérieur de 0,7 % à celui de la meilleure variété témoin et se situe dans les valeurs de contrôle pour d'autres paramètres de qualité (Fox *et al.*, 2007). Ces deux variétés ont été choisies car elles sont cultivées dans la même zone de

l'ouest du Canada et elles sont classées parmi les meilleures variétés résistantes aux facteurs biologiques locaux, avec un bon rendement.

Pour mon projet de recherche j'ai planifié et exécuté trois séries de semis : août 2021, décembre 2021 et juillet 2022. Les graines des deux variétés (15-20 par pot) ont été semées dans un mélange fait de tourbe de sphaigne canadienne (75-85%), de vermiculite, de perlite et calcaire dolomitique et calcitique (ajusteur de pH). Les pots ont été déposés dans une chambre de croissance à environnement contrôlé pendant 10 jours à 20°C sous une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit et humidité 70%, avec une irradiance de 200 μ E. Au dixième jour de croissance certaines plantes ont été transférées au froid à 4°C pendant 49 jours et d'autres ont été gardées à 20°C comme contrôle.

2.2 Planification des points et prélèvement des échantillons

Les échantillons prélevés sont les feuilles des deux variétés à des temps bien définis toujours à la même heure du jour (sauf pour la cinétique courte) pour tenir compte de la régulation par les rythmes circadiens. Les collets ont été aussi collectés pour les plantes d'août 2021. Pour la cinétique de courte durée, les échantillons ont été prélevés en triplicata au temps 0h avant le transfert au froid, puis 2h, 6h, J1, J2, J3 après le transfert au froid. Pour une cinétique plus longue, les échantillons ont été prélevés au J7, J21, J28, J35 et J49. Pour avoir les plantes comparables en termes de développement entre la croissance à 4°C et à 20°C, des prélèvements ont été effectués sur les plantes gardées à 20°C à J1, J2, J3, J4, J6, J7, J10. Il est à rappeler qu'un jour de croissance d'une plante à 20°C correspond à cinq jours de croissance d'une plante à 4°C (Cadieux *et al.*, 1988). Les tissus de feuilles ou de collets (110 mg ; environ 11 collets) ont été prélevés et déposés sur glace, pesés puis congelés sur glace sèche avant leur entreposage à -80°C. Après avoir analysé les résultats de la qPCR des semis d'août

2021, j'ai décidé ne plus faire les prélèvements de collets pour les semis suivants car les résultats obtenus étaient très variables (voir section résultats).

2.3 Extraction des ARN totaux

La trousse Monarch Total RNA Miniprep de la compagnie New England Biolabs (NEB; no. T2010S) a été utilisée pour l'extraction des ARN totaux. Chaque échantillon de feuilles et de collets de blé (110 mg) a été broyé dans de la glace sèche avec un mortier et pilon, et la poudre a été soigneusement mélangée avec 800 μ l de « protection solution 1X ». L'homogénat a été transféré dans un tube de 1,5 ml libre d'ARNase et centrifugé à 16 000 g pendant 2 minutes. Le surnageant a été mélangé avec un volume égal de « lysis solution » puis vortexé pendant 30 secondes. Le mélange a été passé sur une colonne à ADN montée dans un tube collecteur puis centrifugé à 16 000 g pendant 30 secondes. L'éluat a été mélangé à un volume égal d'éthanol pur (95°C) puis passé sur une colonne à ARN montée dans un tube collecteur et centrifugé à 16 000 g pendant 30 secondes. La solution de lavage (500 μ l) a été passée sur la colonne puis centrifugé à 16 000 g pendant 30 secondes. Pour éliminer le reste d'ADN qui aurait suivi dans le mélange, une solution de DNase libre de RNase a été déposée sur la colonne et laissée agir pendant 15 minutes. La « Priming solution » (500 μ l) a été passée sur la colonne et centrifugé à 16 000 g pendant 30 secondes. Un premier lavage de la colonne a été faite avec 500 μ l de solution de lavage et centrifugé à 16 000 g pendant 30 secondes, suivi d'un second lavage de 500 μ l de la même solution et centrifugé à 16 000 g pendant 2 minutes pour assécher la colonne. L'ARN total a été élué avec 100 μ L d'eau nanopure, puis quantifié par spectrophotométrie et conservé à -20°C pour une semaine ou à -80°C pour une longue durée.

La qualité et la quantité des ARN totaux a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante. Ainsi 4 μ g d'ARN ont été soumis à

l'électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du tampon MOPS contenant 6% (v/v) de formaldéhyde. Les échantillons ont été préparés de la façon suivante : un prémélange (pour 20 échantillons) a été préparé (200 μ l formamide, 80 μ l formaldéhyde 37%, 50 μ l MOPS 200 mM pH 7,0, et 5 μ l bromure d'éthidium 10 mg/ml), et 17 μ l ont été mélangés à 10 μ l d'ARN puis chauffés à 60°C pour 15 min. Les échantillons ont été refroidis sur glace et 2 μ l de tampon de charge ont été ajoutés à chaque échantillon, et le tout a été chargé sur gel. Le gel a été soumis à un voltage constant de 120 V pour 30 à 45 min, avec recirculation continue du tampon de cuve (MOPS) à l'aide d'une pompe péristaltique. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel a été placé sur un transilluminateur U.V. et des photos ont été prises.

2.4 Conversion des ARNm en ADN complémentaires

La trousse SensiFAST cDNA Synthesis a été utilisée pour convertir les ARNm contenus dans les échantillons en leurs ADN complémentaires (ADNc). Cette trousse contient la transcriptase inverse (enzyme) et son tampon de réaction (5x Trans Amp Buffer). Tous les échantillons d'ARN ont été dilués à une concentration finale de 100 ng/ μ l. Pour une réaction d'un volume total de 10 μ l, 0,5 μ l de transcriptase inverse, 2 μ l du tampon de réaction, 2,5 μ l d'ARN (500 ng) et 5 μ l d'eau nanopure ont été utilisés et bien mélangés dans un tube PCR puis placé dans l'appareil thermocycleur Bio-Rad T100. Les différentes étapes de réaction ont été programmées comme suit : liaison primaire des amorces 25°C pendant 10 minutes; transcription inverse 42 °C pendant 20 min; une étape pour une bonne structuration de l'ARN à 48°C pendant 15 min; inactivation de l'enzyme à 85°C pendant 5 min; 4°C pour conserver les échantillons dans l'appareil après la fin de la réaction. À la fin de la réaction, une partie des échantillons d'ADNc obtenus a été diluée pour les réactions de la qPCR et le reste a été conservé à -80°C.

2.5 Fabrication des amorces et réalisation de la PCR quantitative

Pour fabriquer les amorces des différents gènes étudiés, j'ai utilisé les numéros d'accèsion de ces gènes pour aller récupérer les séquences correspondant aux ARNm complets sur GenBank et EnsemblPlants. La séquence de la région 3'UTR de l'ARNm de chaque gène a été utilisée pour le design d'amorces spécifiques avec le logiciel Primer3 (voir Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Amorces utilisées pour les analyses d'expression par qPCR dans le cadre de ce projet

GÈNES	AMORCES	AMPLICONS (pb)
<i>ARNr-18s</i>	F1: GTGTTTCCGGCATCGTACT R1: TCATTACTCCGATCCCGAAG	130
<i>TaENO-a</i>	F1: CGAGCAAGTACGCCTGATTACCTT R1: CTGCAACAAGATTAAAGTGACGCC	89
<i>TaENO-a</i>	F2 : ACTCGCGGAATGAACTATGG R2 : GTACTTGCTCGCTCACCACA	131
<i>TaENO-b</i>	F1: AGATGGGATCTGCACGAGTT R1: ACATGCGCGGCATTCATTAT	104
<i>TaENO-b</i>	F2 : GATGGGATCTGCACGAGTTT R2 : TTGGGGGTACATATCCGTTT	135
<i>TaENO3-4A</i>	F1: CTCAGCAAAGGCAAGGAAAG R1: CAGTTCAGCCACTGCACCTA	88
<i>TaENO3-4B</i>	F1: TGGCTTACTGGATTCCCTTG R1: CTCTTTCCTTGCCTTTGCTG	92
<i>TaENO3-4D</i>	F1: CAGCAAAGGCAAGGAAAGAG R1: GTCCCTGCAGTTCAACCACT	89

<i>TaBASI</i>	F1: AAGGAGGGTGTGATTCAGCA R1: CTTGGACGTATTGCAGAGCC	100
<i>TaWCS120</i>	F1: CCGCTACCCTTGCAGAATAA R1: ATTCTCTCCTCCAACGACCA	88
<i>TaVRN1</i>	F1: TGTCCACCTCAGTTTCCCTC R1: ACATAAACAACACCCGCTCG	116
<i>TaJCE87</i>	F1: AACCAAGAGCAGAGGACAGC R1: ATTGCAAATTCGTCTTTTGGA	75
<i>TaCBFIVd-A22</i>	F1: AGAGTAAGCATCGGGGGAAA R1: AGCTCATTGTGCCCTTCC	78
<i>AtBASI</i>	F1: GGTACAATCTTTGTTATATGTGAGCA R1: TGGGGACAAAGTGAGAATCA	83

Le Luna Universal qPCR Master Mix (NEB) a été utilisé pour réaliser les réactions de PCR quantitative dans des microplaques qPCR comportant 96 puits. Pour une réaction de 20 µl par puit, la préparation a été faite de la manière suivante : 10 µl d'enzyme master 2X, 0,3 µl par amorce de concentration de 10 µM, 2 µl de l'échantillon d'ADNc dilué 1/10, et 7,4 µl d'eau nanopure. La microplaque de réaction a été placée dans l'appareil qPCR Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, programmé comme suit : dénaturation initiale 95°C durant 2 minutes; 42 cycles de dénaturation 95°C 15 secondes, liaison des amorces et élongation 30 secondes (à température optimale, voir plus bas), et finalement des courbes de dénaturation (65-95°C, par 0,5 °C, 5 secondes par étape).

Pour déterminer la température optimale de réaction de la qPCR (T_{opt}), un gradient de température a été effectué pour chaque paire d'amorce utilisée. Comme la plupart des T_{opt} des paires d'amorces ont toutes tourné autour de 58°C, celle-ci a été utilisée pour toutes les analyses. Concernant l'analyse des résultats, la méthode de Livak et Schmittgen (2001), également connue sous le nom de méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$, a été utilisée

basée sur l'analyse de la valeur du seuil de cycle (Ct) aussi appelé quantification du cycle (Cq). C'est une formule simple utilisée afin de calculer l'expression relative des gènes des échantillons par rapport à un gène de référence (ARNr 18S dans cette étude).

2.6 Analyse des séquences promotrices

Une analyse de la région promotrice potentielle des gènes étudiés a été réalisée. Les séquences génomiques de 2000 nucléotides en amont des gènes ont été récupérées de EnsemblPlants. Ces séquences ont été analysées avec le logiciel PlantCARE pour identifier les motifs cis impliqués dans les stress environnementaux (Lescot *et al.*, 2002).

2.7 Analyse d'expression génétique chez *Arabidopsis*

2.7.1 Lignées *Arabidopsis* utilisées

Différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues du *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) de l'Ohio State University pour étudier l'expression des gènes de l'énolase *LOS2* et de la 2-Cys peroxyrédoxine *2CPA*. La lignée Col-0 a été utilisée comme lignée parentale. Pour étudier *LOS2* (AT2G36530), les lignées suivantes ont été utilisées : la lignée C24 RD-LUC (ABRC Stock Number: CS24939), obtenue par transformation de la lignée C24 avec la construction RD-LUC qui porte une fusion du promoteur du gène RD29A (inductible par sécheresse, froid et salinité) et du gène rapporteur luciférase; la lignée mutante *los2-1* (ABRC Stock Number: CS24937), obtenue par mutagenèse à l'éthylméthanesulfonate de la lignée C24 RD-LUC; et la lignée mutante *los2-2* (ABRC Stock Number LK_021737C), obtenue par transformation de Col-0 avec pROK2. Pour étudier *2CPA* (AT3G11630), les lignées

mutantes ADN-T (ABRC Stock Number : SALK_002598 et ABRC Stock Number : SALK_002593) ont été utilisées.

Pour les analyses de qPCR, des amorces spécifiques ont été dessinées avec Primer3 à partir des séquences des ADNc : NM_129209 et NM_001336601.1 pour *LOS2* et AF419578 pour *2CPA*.

2.7.2 Amplification des stocks de graines

Les graines des différentes lignées ont été stérilisées par lavages avec une solution composée d'hypochlorite de sodium 0,8% et de triton 0,1%, puis rincées avec de l'eau stérile. Après le dernier lavage, les graines ont été déposées sur une gélose (2,15 g/l Murashige and Skoog salts (0,5X), 0,5 g/l MES-KOH pH 5,6) contenant 50 µg/ml de kanamycine et incubée à l'obscurité à 4°C pour une stratification pendant 3 jours. Les géloses ont ensuite été déposées dans une salle de culture *in vitro* à 22°C pour 10 jours. Les plantules ont été transférées individuellement dans des pots contenant un mélange fait de tourbe de sphaigne canadienne (75-85%), de vermiculite, de perlite, de calcaire dolomitique et calcitique (ajusteur de pH). Ces pots ont été déposés dans une chambre de croissance à 20°C, humidité 70%, rayonnement 200 µE avec une photopériode de 16 heures jour/8 heures nuit. Après une bonne floraison, l'arrosage a été cessé pour laisser les graines sécher. Les graines de chaque lignée ont été collectées et stockées.

2.7.3 Conditions de croissance et traitement des plantes pour mesure de l'expression génique

Afin de mesurer les niveaux d'expression des gènes *LOS2* et *BASI* au cours du traitement au froid, les graines ont été semées dans un mélange de terreau, puis stratifiées et cultivées tel que décrit précédemment. Au 21^e jour, ces plantes ont été transférées au froid à 4°C pendant 7 jours. Des parties aériennes (110 mg; 4-6 plantes)

ont été collectés en triplicata avant le transfert au froid, puis au premier et septième jour après le transfert au froid. Les extractions d'ARN, les synthèses d'ADNc et les réactions de qPCR ont été faites comme décrit pour le blé aux sections 2.3, 2.4, et 2.5.

2.8 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été menées en utilisant au moins 3 répliques. Les données sont rapportées sous forme de moyennes \pm SEM d'au moins trois expériences indépendantes. Des comparaisons entre les moyennes des différents traitements ont été effectuées par ANOVA à un facteur suivi du test post-hoc de Newman-Keuls (niveau de signification $P < 0,05$), en utilisant le logiciel GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

Les stress environnementaux notamment le froid entraînent chez les plantes une réaction qui se traduit par l'expression de certains gènes inductibles. Plusieurs méthodes permettent de mesurer l'expression d'un gène inductible par un stress donné. Dans l'étude présente, on a mesuré les niveaux d'accumulation des ARNm générés par les gènes cibles avant et pendant le stress au froid. Deux variétés de blé qui diffèrent par leur tolérance au gel, notamment le blé d'hiver (Buteo) et le blé de printemps (KANE), ont été utilisées pour cette étude. La PCR quantitative a été réalisée pour mesurer les niveaux d'expression des gènes de l'énolase (*TaENO-a*, *TaENO-b*, *TaENO3-4A*, *TaENO3-4B*, *TaENO3-4D*) et de la 2-Cys peroxyrédoxine (*TaBASI*). Après les premiers résultats de la qPCR des échantillons de collets, comme les résultats obtenus étaient difficiles à interpréter, il a été décidé de continuer l'étude seulement avec les tissus de feuilles.

3.1 Vérification de la qualité et quantité des échantillons d'ARN de blé

Pour vérifier la quantité et la qualité des ARN totaux obtenus, un gel dénaturant a été réalisé. Les résultats de l'électrophorèse montrent bien une bonne qualité des ARN

avec plusieurs bandes visibles qui représentent les sous unités ribosomiques (Figure 3.1).

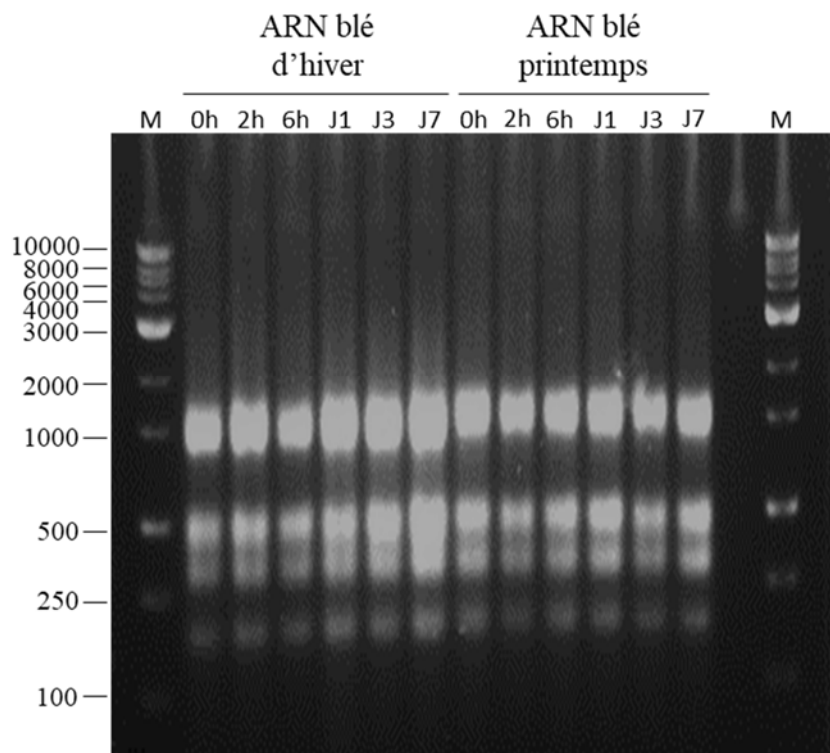


Figure 3.1 Gel de vérification de la qualité et de la quantité des ARN totaux extraits des feuilles de blé. Un gel dénaturant 1,2% composé de MOPS et formaldéhyde. Échantillon de migration 3 ug d'ARN dans formamide, formaldéhyde, MOPS et bromide d'éthidium. Échantillons contrôle à 20°C (0h), et après traitement à 4°C pour 2 heures (2h), 6 heures (6h), 1 jour (J1), 3 jours (J3), et 7 jours (J7). Les pistes M sont les marqueurs de poids moléculaire.

3.2 Validation des amorces pour la PCR quantitative en temps réel

Les amorces spécifiques des gènes cibles d'*ENO*, de *BASI* ainsi que les différents gènes contrôles utilisés ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 en utilisant les séquences des régions 3'UTR de chaque gène. Une analyse BLAST a été faite dans EnsemblPlants en utilisant la séquence de chaque amorce, et on a pu voir que c'est le gène ciblé qui montre la meilleure homologie (100% identité, valeur e de 0) alors que

les valeurs C_q pour les gènes semblables sont plus élevées. Ceci indique une haute spécificité des amorces. Un gradient de température d'hybridation T_a (annealing temperature) de 55°C à 65°C a été réalisé pour déterminer la température à laquelle on aura une parfaite hybridation des amorces aux brins complémentaires de l'ADN. La réaction à 58°C a donné la valeur C_q la plus basse pour toutes les paires d'amorces et a été choisie comme température d'hybridation pour la qPCR de ces gènes. Les tailles des amplicons qPCR générés après le gradient de température ont été vérifiées par un gel. Le résultat de l'électrophorèse des produits qPCR sont présentés dans la Figure 3.2. Les tailles des différents amplicons qPCR correspondent bien à celles attendues des gènes cibles, soit 131 pb pour *ENO-a* dans les 2 variétés lorsqu'on utilise les amorces F2 et R2 (Figure 3.2 A), et 130 pb pour le gène *ARNr 18S*, 89 pb pour *ENO-a* (amorces F1 et R1), et 104 pb pour *ENO-b* (Figure 3.2 B). Pour les analyses subséquentes de *ENO-a*, seule la paire d'amorces F1-R1 a été utilisée.

3.3 Validation de la qualité du traitement au froid

Pour savoir si les traitements des plantes au froid ont été faits de façon appropriée et efficace, il faut utiliser des contrôles appropriés tel que des gènes déjà caractérisés pour leurs réponses aux basses températures. Le *CBFIVd-A22* est un gène qui est induit tôt après le transfert au froid, c'est-à-dire dans les premières heures après l'exposition au froid, et le niveau de transcrits diminue ensuite dans les heures qui suivent (Badawi *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2004; Soltész *et al.*, 2013). L'expression des gènes *COR* comme *WCSI20* dépend de la présence des facteurs de transcription CBF. Ils sont par conséquent exprimés plusieurs heures après l'exposition au froid, et le niveau de ces transcrits est maintenu en plateau pendant la durée de l'exposition au froid chez le blé d'hiver alors que le niveau diminue pendant le traitement au froid chez le blé de printemps (Danyluk *et al.*, 1998; Houde *et al.*, 1995; Ouellet, 2002). Le gène *VRNI* est un gène déjà caractérisé chez les variétés de blé d'hiver et blé de

printemps. Il est exprimé de façon constitutive chez le blé de printemps indépendamment du traitement au froid, alors que chez le blé d'hiver il n'est pas exprimé avant le traitement au froid, mais s'exprime fortement dans les heures qui suivent l'exposition au froid et demeure élevé durant toute la période d'exposition au froid (Danyluk *et al.*, 2003; Kane *et al.*, 2005). Ainsi, les amorces spécifiques de ces gènes ont été utilisées pour la réalisation de la PCR en temps réel sur tous les échantillons des feuilles.

Pour le gène *CBFIVd-A22* les résultats obtenus (Figure 3.3 A) montrent une accumulation importante des transcrits de ce gène à la deuxième heure de traitement au froid. L'accumulation de ces transcrits est plus importante avec le blé d'hiver que le blé de printemps. Les valeurs de cette expression diminuent très rapidement après le premier jour de traitement au froid pour se maintenir très bas.

L'accumulation des ARNm du gène *WCSI20* survient après l'accumulation des transcrits *CBFIVd-A22* (Figure 3.3 B). L'accumulation des transcrits de ce gène reste élevée et se maintient en plateau pendant le traitement au froid chez le blé d'hiver, alors que les niveaux diminuent graduellement chez le blé de printemps.

Pour le gène *VRNI*, les résultats chez le blé de printemps ne sont pas ceux qui étaient attendus selon ce qui est connu dans la littérature (Figure 3.3 C). En effet, ce gène est habituellement exprimé de façon constitutive chez les variétés de printemps car il n'a pas besoin d'acclimatation au froid pour être exprimé. En revanche, les résultats chez le blé d'hiver concordent avec la littérature. L'accumulation des ARNm est observée lors de l'exposition au froid et demeure élevée durant les 49 jours de la période d'acclimatation.

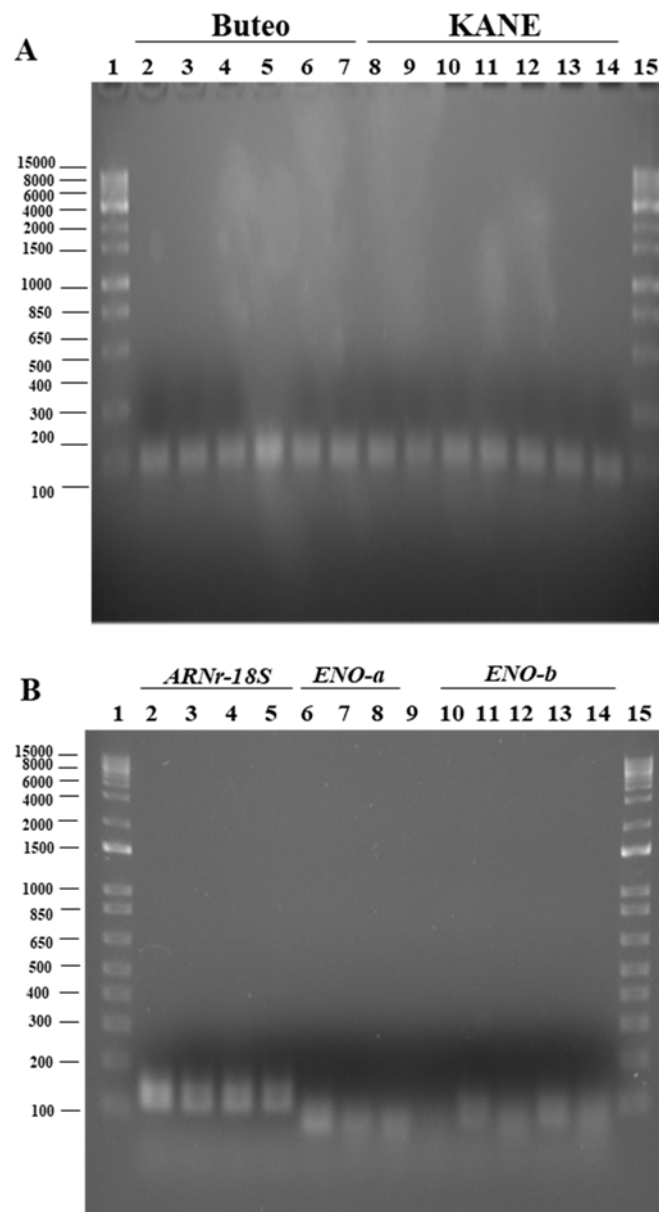


Figure 3.2 Gel d'électrophorèse des produits qPCR obtenus après le gradient thermique. Les échantillons d'ADNc ont été utilisés pour réaliser une qPCR avec 9 points de température différents à intervalles réguliers sur une plage de 55°C et 65°C. A, gène *ENO-a* du blé d'hiver Buteo (2 à 7) et du blé de printemps KANE (8 à 14) avec les amorces F2-R2. B, *ARNr-18S* (2 à 5), *ENO-a* avec les amorces F1-R1 (6 à 8), *ENO-b* (10 à 14). Les marqueurs de poids moléculaire sont dans les pistes 1 et 15).

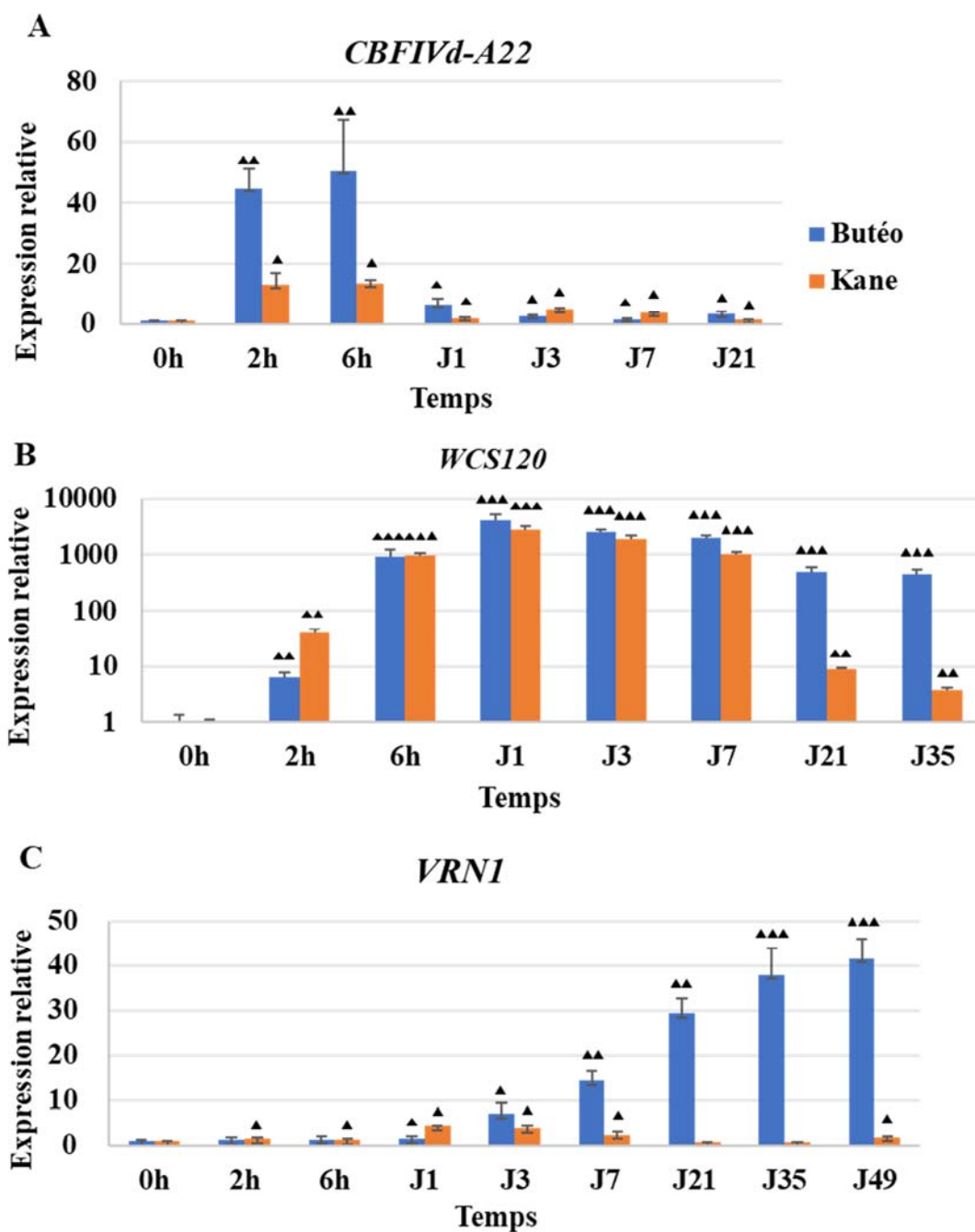


Figure 3.3 Expression des gènes *CBFIVd-A22* (A), *WCS120* (B) et *VRNI* (C) dans les feuilles des cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid. Les graines ont été germées à 20°C pendant 10 jours, puis une partie des plantes a été transférée à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés en heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, les ARNm convertis en ADNc et une PCR

quantitative a été réalisée. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau des transcrits de l'ARNr 18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 5 différents réplicas testés pour chaque point de prélèvement. $P < 0,05$ (\blacktriangle), $P < 0,001$ ($\blacktriangle\blacktriangle$) où $P < 0,0001$ ($\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$) indiquent des différences statistiquement significatives entre l'expression des ARNm chez les plantes traitées au froid par rapport aux plantes contrôles respectives.

3.4 Expression des gènes *ENO* dans les feuilles du blé

Les amorces spécifiques des gènes *ENO-a*, *ENO-b*, *ENO3-4A*, *ENO3-4B*, *ENO3-4D* ont été utilisées pour réaliser la PCR quantitative afin de déterminer l'expression relative en fonction du temps de ces gènes chez le blé pendant toute la durée du traitement au froid. Les résultats sont présentés aux Figures 3.4 et 3.5. L'accumulation des transcrits dans les tissus des feuilles des gènes *ENO-a* et *ENO-b* est plus élevée par rapport au contrôle à partir de J2 pour le blé d'hiver. On observe aussi un pic au J7 pour *ENO-a* et au J21 pour *ENO-b*. En revanche pour le blé de printemps, on n'observe pas d'accumulation importante des transcrits mise à part le J3 dont l'accumulation est supérieure à celle du contrôle. Une décroissance du niveau de ces transcrits est constatée après le pic jusqu'à la septième semaine aussi bien pour le blé d'hiver que le blé de printemps (Figure 3.4). On observe une augmentation des niveaux des transcrits de ces gènes au J49 de façon très significative pour les deux gènes au niveau du blé d'hiver.

L'accumulation des ARNm des gènes *ENO3-4B* et *ENO3-D* dans les feuilles de blé d'hiver est élevée après 7 jours de traitement au froid par rapport au contrôle. Le niveau de ces transcrits décroît rapidement jusqu'au niveau du contrôle et se maintient jusqu'à la septième semaine. Le gène *ENO3-4A* ne montre pas une accumulation des transcrits significativement différente de la valeur du contrôle durant le traitement au froid jusqu'au J35. Cependant on remarque un niveau d'accumulation des transcrits plus élevé au J49 pour les trois gènes *ENO3* (Figure 3.5).

3.5 Expression des gènes *ENO* dans les collets du blé

Les résultats de qPCR des collets sont différents de ceux obtenus au niveau des feuilles. On n'observe pas d'accumulation significative des transcrits pour les cinq gènes de l'énolase au niveau du blé d'hiver, sauf au J49 où ce niveau est élevé par rapport au contrôle pour les gènes *ENO-a* et *ENO-b*. Cependant, au niveau du blé de printemps, on observe des niveaux élevés d'accumulation des transcrits pour les cinq gènes surtout aux J7, J14 et J28 (Figure 3.6).

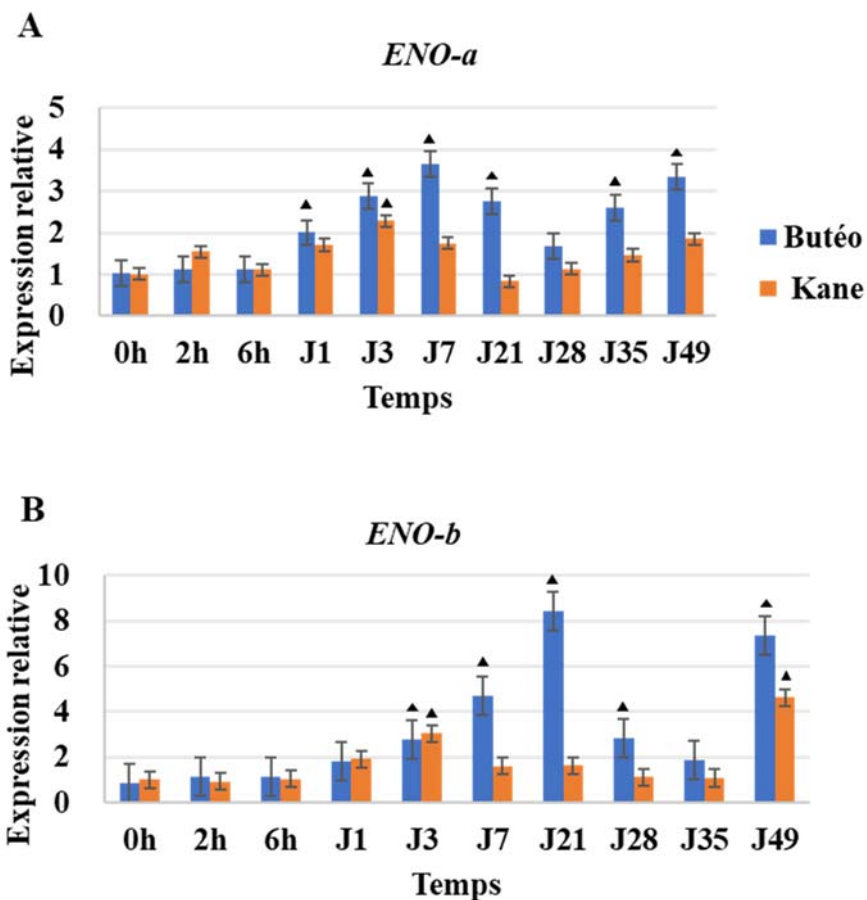


Figure 3.4 Expression des gènes *ENO-a* (A) et *ENO-b* (B) dans les feuilles de deux cultivars de blé Butéo (bleu) et Kane (orange) en réponse au froid. Les graines de blé d'hiver et printemps ont été germées à 20°C pendant 10 jours. Au dixième jour les plantes ont été transférées au froid à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés en

heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, les ARNm convertis en ADNc et une PCR quantitative a été réalisée. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau de transcrits de l'ARNr 18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 5 différents réplicas testés pour chaque point de prélèvement. $P < 0,05$ (\blacktriangle) indique des différences statistiquement significatives entre l'expression des ARNm chez les plantes traitées au froid par rapport aux plantes contrôles.

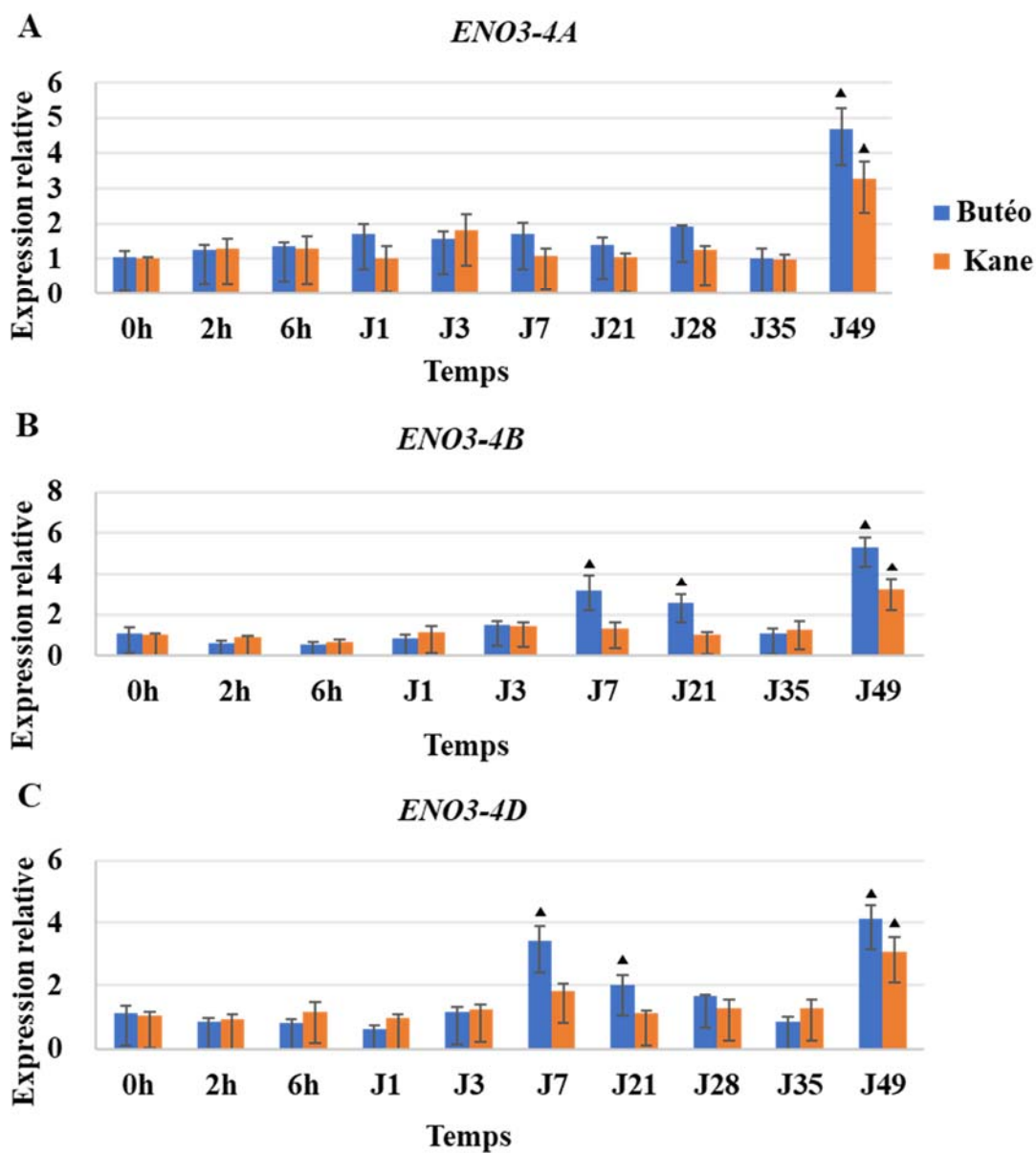


Figure 3.5 Expression des gènes *ENO3-4A* (A), *ENO3-4B* (B) et *ENO3-4D* (C) dans les feuilles deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid. Les graines de blé d'hiver et printemps ont été germées à 20°C pendant 10 jours. Au dixième jour les plantes ont été transférées au froid à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés en heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, les ARNm convertis en ADNc et une PCR quantitative a été réalisée. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau de transcrits de l'ARNr 18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 5 différents réplicas testés pour chaque point de prélèvement. $P < 0,05$ (\blacktriangle) indique des différences statistiquement significatives entre l'expression des ARNm chez les plantes traitées au froid par rapport aux plantes contrôles.

3.6 Expression du gène *BASI* dans les feuilles du blé

Les analyses d'expression du gène 2-Cys peroxyrédoxine *BASI* a été réalisée dans les feuilles du blé de printemps et du blé d'hiver comme précédemment. Les résultats obtenus sont presque identiques à ceux observés pour *ENO-a* et *ENO-b*. On observe un niveau d'accumulation des ARNm plus élevé par rapport au contrôle aux J7 et J21 chez le blé d'hiver, suivi d'une décroissance du niveau d'accumulation de ces transcrits au J35. Pour le blé de printemps on n'observe pas une différence d'accumulation des transcrits par rapport au contrôle, sauf au J49 où on observe un niveau élevé des transcrits pour les deux variétés (Figure 3.10). Un résultat semblable avait été obtenu dans le cas des gènes de l'énolase,

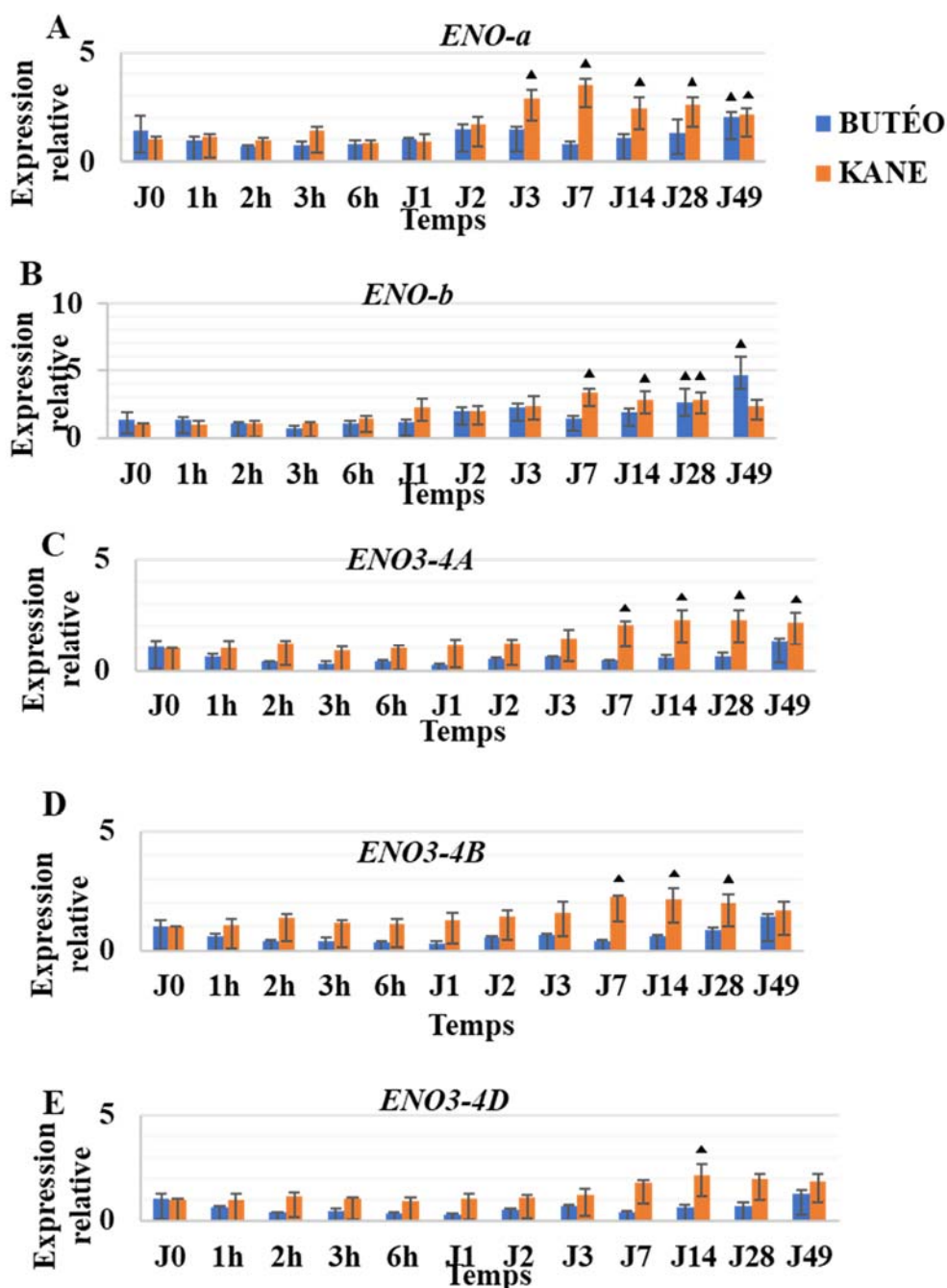


Figure 3.6 Expression des gènes *ENO-a* (A) *ENO-b* (B), *ENO3-4A* (C), *ENO3-4B* (D) et *ENO3-4D* (E) dans les collets deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid. Les graines de blé d'hiver et printemps ont été germées à 20°C pendant 10 jours. Au dixième jour les plantes ont été transférées au froid à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés en heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, les ARNm convertis en ADNc et une PCR quantitative a été

réalisée. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau de transcrits de l'ARNr 18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 5 différents réplicas testés pour chaque point de prélèvement. $P < 0,05$ (\blacktriangle) indique des différences statistiquement significatives entre l'expression des ARNm chez les plantes traitées au froid par rapport aux plantes contrôles.

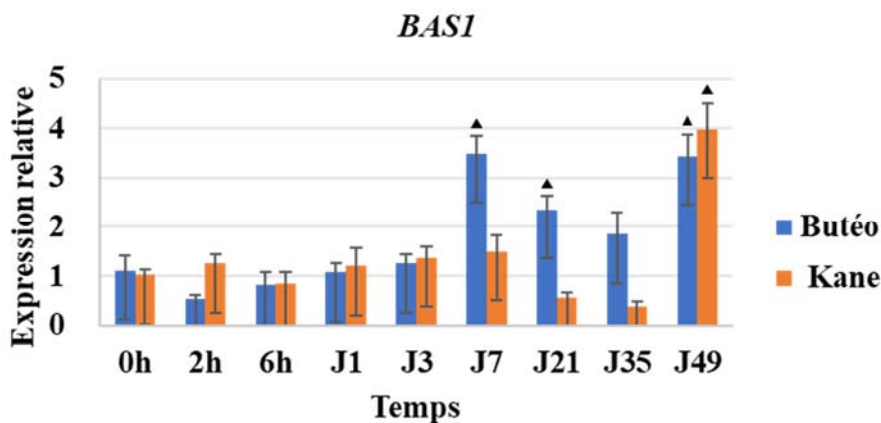


Figure 3.7 Expression du gène *BASI* dans les feuilles deux cultivars de blé Buteo (bleu) et KANE (orange) en réponse au froid. Les graines de blé d'hiver et printemps ont été germées à 20°C pendant 10 jours. Au dixième jour les plantes ont été transférées au froid à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés en heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, les ARNm convertis en ADNc et une PCR quantitative a été réalisée. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau de transcrits de l'ARNr 18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 5 différents réplicas testés pour chaque point de prélèvement. $P < 0,05$ (\blacktriangle) indique des différences statistiquement significatives entre l'expression des ARNm chez les plantes traitées au froid par rapport aux plantes contrôles.

3.7 Analyse des régions promotrices potentielles

Afin de déterminer les éléments des promoteurs des gènes cibles en lien avec les stress environnementaux, notamment le stress au froid, 2000 nucléotides en amont des régions codantes ont été utilisés et analysés avec le logiciel PlantCARE. Les résultats des analyses ont montré la présence d'éléments en lien avec les réponses à l'acide abscissique et au méthyl jasmonate dans tous les gènes cibles. Aussi, on note la présence d'éléments en rapport avec la protéine Myc, qui est un facteur de transcription qui active l'expression d'un bon nombre de gènes et qui peut réprimer aussi l'expression d'autres gènes. Pour les gènes *ENO3-4B* et *ENO3-4D*, on a observé la présence d'éléments de réponse aux basses températures (LTREs) qui sont en lien direct avec le stress au froid. Au niveau du gène *ENO-b*, on a pu observer aussi la présence d'éléments répétés TC-rich, qui sont des séquences riches en nucléotides TC en lien avec la réponse aux stress et à la défense (Figures 3.9, 3.10 et 3.11).





ENO-a

GCGGAGGAGAAAACGGGCTGAGCCCTTTATAAAGGCATGAATATCAAACGCCTCTCATAGGCCTTAAAGCCCGCTATTCCCA
 AGGGATCATGCCAACGGAACAAATTGGGTTATCACGCCATATTAATGAGAATACCGTGATAAGGGGACATGATCTCTGCTTCGACAA
 GACGTGCCAATAAAACCGCTCTTAAACCGTGAGCGGGAGGCTAAAAATGGTTCGAAATAATGGCCGGGCTGGGACGTGATGTCGT
 GCTACAAAAATGTCAGCAAATGGACTTGTAAAATAATTATACTCTTTGCGGATATATGTGGTGTGTTTTCAGAGGCGGACATGT
 TCTTTGTGTTGAGAGCTGTTTTGGAGTATTCGGAGGAGAACCCGCCCTCAATGTGCAAGACGATCTGCGCGCCGGACGCCTCATCA
 TTGAAGCCTGGTTTAGGGGCTACTGAGGGAGTCTGGATTAAAGGGGTCCTCGGGCGCTGACCTGTTGGACATGGGCCGGACTAATGC
 ATGGGCTATGAAGATACAAGACAGAAGACTCTCCCCGTGTCGGATGGGACTCTCCTTGGCGTGGATGGCAAGCTTGGCGTTGGAT
 ATGAAGATTCTTCTCTGTAAACCGACTTGTACAACCCCTAGTCCCCCTCGGTGTCTATATAAACCGGATGGTTTAGTCCGTAGAGGC
 AATCATAATCATACTAGACTTCTTAGGGTTTTCGCCATTACGATCTCGTGGTAGATCAACTCTTGTAAACCGCATACTCATCAAT
 ATCAATCAAGCAGAACATAGGGTATTACCTCCATCAAGAGGGTCCGAACCCGGTAAACTTCTGTTCCCTGTCTCTTACCATC
 AACCTTAAACGCACAGTTCAGGAGCCCTACCCGAGATCCGCGGGTTTTGACACCGACAGCAATCCTGAAAAACAAATTTTAAACGT
 ACCAAATTCACAATGATGATGACTTCTTCTTCTTCTCCAACGATCAATCCATGTGGAACGAGGCTTGAACCTCTCCGACCTCCTCT
 ACGTTGGCTACGACATATTAAGGTTGAAGACTGACTTTTTTTTCCGAGGATGGGCCTACAAGGGCCATCTTTGCTTTGAGGACATCC
 CTAAAGCATGATGGTTAGCTCGAGAATGTGACAGCTCGTCAACGATCAGTCCGGCGGAACCATGCTGTGAACCTTTCGACCTCCT
 CTACGCCGCTATGCCATATCGAGGTTCAAGGCACGGACAAAATTATGTGAAAGGAGTCTTTTATCATGCGTACAAGGTTTGTCTTT
 TTTTGTGTTGCTGCTTTGAGGGCATCTCAAGCATTGTTAGCTTGAGAGCGACGACTGCTCCTTTTCATCAGATTTTTTATGAT
 GGTCCCCAGTTATTCAAGTAGGAGGTGTCGCTACTACCTTTGGTGTGCCGACTGTTCCCTGGAGCCATTGGTGTGCAAAATGATC
 TCAATCTGGAGAGTGCCTGTGTCTCCCGTTAGTATGAAGTCAAACCTTGATAAAGTTTTTCCCGCAAAAAAACTTCATAAAGT
 TTGACCATATTTATATGAAAAAATATCAACATCTACAATACTTAAGCTATACTACAAATTTAAACTGAATTCATGACGTATCTAATG
 ATATTGGTTACATATTATGAATGTTGATGCTTTTTTCAATATAAAGTCTGATCAAGTCTGACTTCAGACAAAAATCTATATGCGGA
 GTAAAAACATAACGGGCCCAAAGAAAAATAATACCGAGGGAGTATAAGAAAGAAAGCTCCTTATAAGTAATGAAAAATCTTTTGG
 CCCCTTGAACAAGCATTGTTAAGACGATCCATCCCGTCAAGTTTCCGAGACACGAAAGCCCCTTCCATGCGGGCCCCGGGAGAGCGC
 GCGCCACTGGCCACAGGCAGCGGCACGGCTAAAAACGGGGGACGCTTCCCTTTCATCTCG

ENO-b

AATAATAACGAAATCTCAAAGGAAAACTCAATTCATCACAA CAAGATAGAGAGGGAGAAACACCATA TGATCCAACCATATTAACAA
 AGCTCGTGATACATCAAGATCGTGCCAAATCAAGAACACGAGAGAGAGAGAGAGTAACACATAGCTATTGGTACAAACCCCTCAAC
 CACGTGGGTGGACTACTCCTCCTCATCATGGAGACCATAGGGATGATGAAGATGGCTCCGATGATGATTTCCCTCCGACAGGGT
 GCCCGAACGGGCTCCCGATTGGCTTTTCTGGCTACAGGGGTTGCGGCAGCCAACTTCTCATCTAGAGTTATTTTTGGGGTTTTAT
 GCATTTATAGGATTTTTTGGCATCGATTTACGCGAAGATGGGCCTGAGGGGGCCACTACACTCTTGGGCGCGCCAAATGGGGGGTG
 GCGTGCCCTCGTGCCTTGTGGGCAGCAGCCCCCTTCTGTGTTCTTTGTCTCAGTATTTTTATTTATTCAAAAAATCATCAAAA
 AATTTCAATCAATTCCGAGAATTTTTATTTCTGCACAAAAAACAACACATGGTAGTTGTGTTGAAAAACAGTCCAGTCTGGGTTAGT
 TCCATGCAAAATCATAACAAAACCATATAAAATGTTGTAAACATGGCAATAAATACTTATAAAATTAGATACGTTGGAGACATATCA
 AGGCACCACGGCACCATCACCCCTGGGCACGCCAAGTGCCTCGTGGGCACGTGCTCTTGTAAAAAATTTGTCAAAATAGTT
 TCACTCCATTCTGAGAACTTTATTTCTGCACAAAAACAACACAATGGTAGTTCTGCTGAAAACATTGTCAGTCCGGATTAGTTCCA
 TTCAAATCATAACAAAACCATATAAAATTTGTTGTAACATGACATGAGTACTTCATAAAATTATAGATACGTTGGTGACGCATCAGTGCC
 CGGGCACACCAGCCATGTAGGACTGACGAAAGGGTCCACGTGGACTCATCCGGAACTCGGCGGTCTGATAGACATCTCCTTCGTG
 CCGCAGTGTAAACGCCGCTGGCGCCGCTTCGACTCGCCGCCGAGAGAAAATCGCCTATTTAACTCGCCGGAGCTCGCAACCCTA
 GTCCATCCACCTTCCCTCTCCGCGCCGCCAGTCCAAGCCATCCACCTCCTCCTCTCCTGCTCTGGCGCTCTGCCCATGCTCCAGT
 GGTCTGCCATGGTCCGGAATAAGATAAATCTACTACGCAGTGTCCACGTCCGGAGCGTCGCGTGCAGATCCAGCAGGAGATCCGGACGAG
 AAAAGCCGCGCGCAACCCGGCATCGCTGTCGGGCTGCCTCCGGACTCTCGGAGCCGAGGAGGAGGAGGTTGGCTCCGATGAAGTG
 GAGGAGGCGGAGCAGTGTGTCGGGCTCAATATGGAGCAGGCGGAGGCAGATTTGCGGTCGCCAGTCTGTCGAGATGGCGGAGC
 AGCAAGCCATCCTGGAGTCCATCCAGGATGAGGCCTGTGTGGAGGCCAACCGCACTATCCTCCAGCAGGAGATGCGGAGTCCGAAGC
 GCTCTTCGCCAACTCGATGCGGAGATAGAGGCTGGGGAGGC CGGAGC GGAGCAGCCGAAAGGAGGCGGAGCTGCCGCTGCCGCCGAG
 CCCGGCACGGAGATCGTCGACATCTCCCTCCGACGAGTAGTA GTTGATCGACGAGTACTTAGGTTTATTTTATGTTGTAATGGATTT
 GAGAATCTAATATGCGATGTCCGGATGCAATGTTGAAATTTGAGACGTGTCGATCACTGCTCGCGGACGCGGGCATTTGAAGGGCC
 GGATTTGCCGAGTCCCGTGTAGATGCTCAATTAATGAGAAATCTTTTGGCCCTTGAACAAGTATTGTTTTCGATACGGGCTTGG
 AGGAGTACAAACGGTAGATACGATGCATTACATCAGCAGATCCATCCCGTGTGCGGC

Figure 3.8 Analyse des séquences promotrices potentielles de *ENO-a* et *ENO-b* avec PlantCARE.

-  ABRE, séquences ACGTG ou AACCCGG, éléments agissant en cis et impliqués dans la réponse à l'acide abscissique
-  MYC, séquence CATTG, élément en lien avec la protéine Myc
-  Motif-TGACG agissant en cis et impliqué dans la réponse au méthyl jasmonate
-  TC-rich repeats, séquence GTTTTCTTAC, élément agissant en cis et impliqués dans la réponse aux stress et dans la défense

ENO3-4A

CTCGACGTGCTCCGGGTATCTGTGGCGGAGCTCCGCCATGTATGCTTCCGCCGCTTGCCTCGCCTCGAGGGCGCTCCCTAGCCTCC
 CGGTCTTCTGCATCTCCTGTGCGGTGGCTAACCGAGGGTGTGACGGGCGCCAACTACGACAGGCCGTTGGAGAAAGTTCAGCTGGT
 GTTGGCATCGTGGAGGACGACCGACATAATGTGGCATTCTGTCGCCCTCCTTACCAGGAGTGGGAGGAGCCAATCCAAATACTC
 TCGCGGGTCTTGCCTGAGTATTTGCTCCACGTCCCCACTGGTGTGCCACTCGAGGTAGTTCCGGCTGCGACGGCGG
 CAACGGCGAGAGGCCAGGGGTGAGGGTGCCTCGACCGGAAAGGATGAAGCGTGTGCGCAGGAGGAGGATGCGTCCGACGGCCA
 CGGGCTCGGGACGGCATGGCAGCGTGGATCCACTAGGGATGGACGGTGGGGAGTGAAGCGCAGCTGGATCCGGCCATTATCAGC
 GCGGGGCGATGTGCGGGTGGAGATGGGGCGAGGGCGTCCCGCGGGCATCAAAACCTAACATTAAAGCTTAGCCTTAGAGCATC
 TCCAGCCGTTCCGGCCCCAGGGCGCCAAAAAGAGCGGCCCTAGGAATGAACTGGTGTAGATTGGCCCTGGGGCCGACTTCAT
 TCCCAGTGTGCGCCACAGGTGCGCGTGGGTTCAGCGATATCCGTTCAATTTTTGCAAACCTCGACGACTTTTGCACGAACTC
 GCGGATACTTCACTGAAATTTGTATAAAAAATAAAAAATGCAAACCTACACCAAATAATAAAAGCTAGCCACCGTGTGCGC
 TACATGCGGAAAGCTGTAGAAGCGGGTGTAGTCCGCGCTGTGCTGTGCGCGCCCTCGCCTGCGCTGCGCGCTCCCGTCCCTGC
 TGCAGCCCTGCGCGGGTCCGCGACACGCGGGCGGGCGTTGGACGTCTCTCCTTGTGCTGTCGAGGACGATGACACCGCTCT
 CCTCGCGGGCGGAGACGGGCTGGAGTCCAGGTAACGCGCGGCGTGGCGGCGACCTGCTCGCGAACGTAGTCTCTCTCGC
 TCACTTGTGGGCGGTGCGTGTGCGGGGCCACATGTGACGTGCTCCGGCACGGGGAGCAGCCAGCTCGGGCTTCGGCCGGA
 CCAGGGCGAGGGAGCGCTCGCGGGTCCGGAACAGGCGGGGCGGCTGGGCAACGCTGTTGATGACGAGGGCGTGTGCGAGT
 GCGGGCGCCGAGCGGGCTCTCTCCGGCTCGGGCTTGAAGGGCAAAGGGCGGCGAGCCGGAGCCGACGAGGAGGACCC
 GCCTTATCCGACGCGGGCTCCAGGAGTGCACGGCGAGAGAAGGATGACCGCGGGGCTACTCGAGGCGCGGCACATTGCCGG
 TCTCGATGTGGTTCGAGGACGGCCTTGAAGGTGCGACAGGCAACCCACCCTCGCGTCCGCGTTCGGCTGAGACGATCGCG
 GGGGATGACGTTGTTGGTGGAGGCAATCTGCTCCTCGCGGGCGCGCTGAAGTACATGGACACATGATGTGGCTGTGCGGGCG
 TACCGGATTCGTTCCGCTGCTCCTCCGACAGGGACGAGCGGATGCGGGCGATCTCGACCCGCGCGCCCGCTTCGAAACAT
 GTGGCACCGGACCGCACCCGCTCAGCCTCACGTCCCCGGCAAGGCGATGTCTGCGGGGCGCGGATTCGAGGCTCGTAGAG
 GAGGCACGCTTCGGCTCTTGGAGGTGGCGACGGTCCGAAGCCGTTGCGCGCGCGCTGCGCTGGAAACCTCTCAGCATCTGT
 TCGTCCGGGAAAGCGGGAAGATGGGGAGAGTGTAGCTTTTGTGTGTGCAAGTAGGGAACTGAGAACTGCGCCGTCACCGGC
 GGGGACGTGCGCTTTTATAGCCGAGCGAGGCCGGCGAGAGGCTGC

ENO3-4B

ATTATTTTTTGTTTTTATATCTGTGAGAGAACATGTGTGCTTCCGCGTAGAGCATAGCGTCTTCATCTCATGGGAGCACAAATT
 AGTTCACCTGAGGAGCATGGGTGTGCTTCCCTCTTGGGAAGCGGGTCTAGTTAGCTTGGGAGCATTGGTTAGTGTGGTTGGGA
 GAACACACTATAAGCACCAATGTTAGTGTAACTAGAAGCAGTTGGGAAACACATATGCTGGTTGGAGCACAAAGTTAGTTCACATT
 GGAAGCATGCCAATATGTTAGTGTAGTACTAGTTGGGAGCATAGAGTTATCGGAAAAAAAATTCATGAAAAATATCAAGAAGA
 GGTTTAGTTTCAAAGGTCTCGACGAAAAAATAATGATGAAAACATACGATATTTTGTATGCACTGTCCACGAGATATTTTATT
 CAGAAAAATGATTTTTTTTTTAAAAAGTGAACAACAGCAACAAAGACCTTAGTCCAAACAAGTTGGGGTGGGTAGAGATG
 AAACTCGTAAGATCTCGCAACCAACTCATGGTTCTAGCACATGATAGCAAGCTTCCACACACTTTGTCCATGACCAATTTCTG
 GTGATATAGCAAGCTTCCACACACCTCTGTCCATGACTAGTTCTCCGGTGATACTTACGCTTCCAGATCCCTCTTTACGGACTCC
 TCTCCATGTCAAGTTCCGCTTACCCGATCTCTTTGACATATCAGCACACTTTAGCCGCCGCTATGCACTAGCGCTTCTGGA
 GGCTTGCCTGAATATGCCCAAACCTTCCAGACGATGTGGACAAGCTTCTATTCAATCTACGACAAATGATGCGCATGATGCGC
 CACTTATACCAATTAGAGAAGATGAAAGTAACCTTTTCAATAGATACTTGGGAACTAAGCCTAGGTAGATGTTTTGTTTCTTG
 TGGTGGAACTCAACTTGTTCAGTTCTAAACTGACGATGTACTCATAATTTACTGGATTTATTTAGGCTCTCTGATGC
 TGGTGTGTTAGTGCCTACGAGTACCCCTGGAGATTTCAAAGCTATGTAAAGCATCTCCAACCGATCCCAAAACAATTAAGGAT
 GATACGACCAAGTACCTTTAGAGGAGCATATTTGCTCCTCTAGTAACTGTAGTTTCTAACCGATCCCGATACTTAACTCCCTAA
 GAAAAATCAACAATTCGGTGCAAAATTTGGTTCAAACCTACTACATCAAACCTGATTCGAAATATTTTACATAACTTGAACGAAG
 ATTAGACTAGATGCATAAGAACTTATTAATAAATAATGCTAATCGTTCTCCAGTCTGATTCGGTAAGCGTGTATGTCAGAGT
 CGTGGAGCAACGGTCAATGACCTCCTTTGCCCCAGTCTGTACTGCTTACATTCCGGCTCCGCTCTCGACGTGCTCCGTGTATCTG
 CGGGCGGAGCTCCGCGATGTATGCCTGCAGGCTTGTCTCCGCTCGAGGCACTCGTGGCCCTCCGATCTTCCGCGAGCTCCCATG
 CGGTGGCTACCCGGGGTGTGAGGGGCAACACTACGATAGGCGCTCGGGGAAAGTTTCCAGGCGGTGTTGGGACCGTAGAGGTGAAC
 AACATAATGTGGCATTCTGTGCTCTTTACTGCGGAGTGGGAGGAGCAATCCAAATCCTCTCGCGGGTGTGCGGGTGTAGTATG
 ATCCGCGACCACTCCCGCTGATGCTGCTGCATCGAGGATTTTCGGTTGCGGTAACAGCAACGATGAGAGGCCAAGGATGCG
 GGCTGCGTCCGCGGACGAAAGGATGCTCGCAAGAGGAGGATGCGCCGCGGACACGTTGGTGAATCCGCAATAGG
 GATAAACGGTGGGAAGCGACGGCGGAAAGCGGGCTATGCGGGAGGGCGAGGAAAGTGCACCGGGTCAAACCCCTAACACTAAAGCT
 TAGCCTTACGCCCTTACCCCTC

ENO3-4D

GGATCCGCACTAGGGATAAACTGTGGGGAGCGACGGCGGCTGGATCTGGCCATTATCGGCGGCAGGGCTATGCGGGAGTGGAGATGG
GGTCCCGCGTGCACGGGGTCAAACCCCTAACATTAAAGCTTAGAGCATCTCCAGCCGTTGGCCCCCAGGGGGCGCTAAAATCG
CCGCTGGGGGTGACCCGGCGAAAAAATGGGCTGGGGCGAGTTGGCCCCAGCCGCGCCCCCAGGGCCGGCCAGGGCGGGGAA
AAAAATTGTAGCAAATTTACGCAAAGTTCGGCTAAAACACGCCAAAATTTCGGCAAACCTGGGCTTATATTTCGGGATATAAGTCG
AGTAGTCGCCATTACATATAAAAACTAATAAAAAAACTTGTGTAAGGCCGAGAAGTCGTCGTCGTCGCGCCATCGTCGGCCTTCT
CCTCCTTGACTCGGGCGCCCTGCTGGACCCCTCCCCGGGTGGTGGCGGGCGCGCTCGTCATCGTTGTCGTCGATGATGAAGACTC
CTCCTTCGTCGCGGCCCTCGGCGACGCTGCTCGAAGCGCCGAGGGCGGCGCGCTGGAGCTCCGTCGCCATCTTGATGGAGTCTGGC
GTGCCCATTCAGGGCCGCGTCGTCGTCGAGCTCGACCTCGCCGTCGCTCCGCTTTCACCGGCGCGAGCCCCGGCTCCGCTTTGGCT
TGACGAAGCGCGGAGGAGGAGCCGACGAGGAGGCGCGCCGGCCGCTCGTTGATGACGATGCCGGGCTCGGCCTTGACGCCGAGCA
GCGTCGGAGTGC CGGAGCAGTGGGAGGAGGAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCCGCCGAACCTCCTTGGCGCCATTGCCCCT
CGCGTCGGCGGTGCGCCGGGGCGGCCGCCCTCGCCGGGGGTACGCCAACGGCGGGTTGTTGCCGCCCTCGAGGTGTGTCAGCACGC
CCTCAAGTGTGCGGCCGGGGCGCCCCACCACAGGTGGCGTCCCTCGCTGTTCTTTCACGCCGCGACCACCGGTGCCCGTTGGTGG
ACGCCAGCCGCTGCTGCTGGCGGCGCTTAAGTACGCCGCCAAAGCCGCGTGGTTGTCGGCGGCGTACTGGGGGAGGGAGAGCTCGG
CGTCGGTGAGGGAGGCGCGCACGATCGCGACCTCGTCCGGCGAAGTAGGATGGTTTGGCCACGGCGTCCGGCAACGGGGGAATGGGCA
CTCCCCATTGCTGAGCCTCCAGCCGTCGGCCCGGCGCGCATGTCCGGCGGCGCCGGGATGTTCCGCTGGAA CAGGAGCCAGGACT
CCTGTTCCGGAGCGAACGGCGGCCGAAGCCGTTGGCCCGCCCTCGTCTCCGGGAAACGCTCGGCCATCGGGGAGATGGAGTGGC
TGGGGAGAAAAGATCGGCGGCGGCGCTCGGGAGATGGAGTGGCTGGGGGAGAAGAGATCCGCGGCGGCGCTCGGGAGAGGGAGGGCT
GGGGGAGAAGAGCTCGGCGGCGGCGCTCGGGAGAGGTGAAGAGGTGGCACTCATCACAGGCGAGCGAGCCATATATAGCCGCGCCG
CGTCCGTGTGTACGCGTCCGAGGGAGGGAGGCGTCCGCGCGCCGCCCGTGAACGTGCCCTGTGAGGAATCAATGGCAAAGCTG
ACCGGCGGCGAGTCTTGCCATTGATTCCCGCGGGAAACCGAGGCGTCCGGGAGAAGACGAGGCGGGCGGTGTTGCTGACGCCGGCTGGC
CCGCGGCGCTTTCCGCGCAAAAACGATTCGTCGGGCGCCAAAAGCGCCCCAGCGCGCCGGGTTCCGGTTGGGTCCGCCGGCGCC
AAATTCGGCCCCGAGCCGGCGAAAAAAGAGCCCTGAGGGCGTGACTGGGCCGATTTTTTGACGCCGGCGCCGAAAATCGTCTGGA
AAGCCTTGTGGCGGTGCGGTTGGAGATGCTCTTAGCCTTACGCCCTTCCCTCATAAGAAAAAGAAAAAACACAGGGTGTG

Figure 3.9 Analyse des séquences promotrices potentielles de *ENO3-4A*, *ENO3-4B* et *ENO3-4D* avec PlantCARE.

- ABRE, séquences ACGTGT ou AACCCGG, éléments agissant en cis et impliqués dans la réponse au stress lié l'acide abscissique
- MYC, séquence CATTGT
- Motif-TGACG agissant en cis et impliqué dans la réponse liée au stress à l'acide méthyl jasmonate.
- LTR éléments agissant en cis et impliqués dans la réponse aux basses températures.

BAS1

TATATACTTGAGAATCAATAGAACCGAGGACTGATGGTCCATTCACCTTTCATTCAATCTCGGTTTACTCTAACAAAGAGGCACGTAGT
 GCGCACCCAGATCATCACAGCATACGTGGCACGCTGATCCTTCCAGACGTCATGTCCCGCTACGTGTCGCTCGACCTGTACATGCC
 TGATCCATGCACACATCAGCAATCGATACGTACGTATGTATAGGCCGGCTGCATGCACGCATGGCCCAAGGAGGATAGCCCAAGTC
 CCAATCCCCGTGACAAAACCTCAGTTAATCCGCGGTGCTAACACCTGCTTAGCGTAAGCCATACATACACCAGGCATGCGTCAT
 TTGTACAAGTCCTTGGCAGAGGCAGAGGAAGAGCAGAGCAGAGCAGAGCAGAGGAGCAAACATGCCCGTTGTCGTTTCGCC
 ATCTACCTCATAATTCCTTCGACACATCATTTGACCCCGGTGTTGTTAAAGTAATATCTTCAGAGGCAAGCTACACATGCTAAACA
 AAGTTCACTTAACTGCCGCTGCTCGACACCTAATCGACAAGTGACAACCTAATCGATGAGGTGGAAACCGTGGCTGAGTTGGGGAA
 CCTTGCCGGCGGGGAGCTTGC CGAGCTTAGT CAGCCCCCTTCCGGCAAGGATCTTGCCGGTCCCCAGGCTGGTTTTTCGAATATT
 TGTGATCTCTGGCGGCAACTTTAACCTTGGTCTTCTTGATGCGCTCCTTGATCTCACGAAGAGTGGCTTTTTTGGAAACCGTGTATTC
 AATATTTCTGATCCCACCTTCTAAGATTTTCTTTCTTTCATTAAATCTGGTCTTGTGTTTTTCTTTTGGTTATCTCCAGTCAAGC
 CTCATACCGTCGGGGAGGCTACTACTGCATGTGCATAACTCTGGGGTATTAAGGACCCATTCTTAATATACCACAAATTGAGTGAG
 GCGTTTTGGCTCGAGGTCATCTTCACTGCATTGAATAAAAAATCAAACAAATACTAGAAAAATCAAAAAAATCTAATTTTT
 TGCATGGTAGATAAATTTGGTATGTATGTCGCTTTAAATTTCAAATCATTTGGACATTTGAGTAGCTCTCGGCAAAAAGACAAATC
 TGGAGTCCGTTAAAAGTATAATTTTTATATACTGTTTTGATCCAATTTGCTTTTTTGGCTGAGAGCTACTCGGGTGTCAAAGACTC
 TGAAATTTTCTGCGAACCTCACGCACCAATATCTACCTTGCACAAATTTTTTGGATTTTTTTTGAATTTTTTATGAACTGGGCC
 GGGCTCAGAATTGGATATTCGCGGCAATCTCTATTGCTCTTTCATGTGCTAGTCGTATATGTCGTATTTATAGATGTTTCAGTT
 CTATGCTTGATACATGCTCACACGTGATGATTTTGGTATGCGTTTCATACTTTTATTGCTTTGTTTCATAAAACTCTTTTCGCTCCTG
 AATTTGATGGTATGCTTTGTTAACATGCATGCCATATATAATACCTCAACCTATTGTCAAAGTTAACTCGAAACCCGTAATAA
 AATAACCACAAAAGCTCGTATTAGACCTTTGTATATGTGGACGGAATGAGTCCGAGGAACGGAGGTAACAACCTGGCTCACCTGCAT
 TGCATGCGTACATGCATGCGCAGTACACACGCACCTGCTGGGATGCAGCCAGCGGATTCCTGTCTCGCTGGCGGCAGAGGCACCCA
 GATCATACCCACACGTGGCACGCGGTTCTTCCAGAGGCCATCCCCGGCTACGTGTCGCTCGAGCTGTACATGCATGATCCATG
 CACGCATCAGCGACCATACGTACGTACGTATGCATAGGCCGGCTGCATGCACGCATGGCCCAAGGAGGGTAGGGGAGGGTAGCC
 AAGTCCCAACCCCGTGACAAAACCTCAGTTAATAATCCGCGCGTAAGCCATATATACACGCAGGCCGCGCTCATTTGTACAAG

Figure 3.10 Analyse de la séquence promotrice potentielle de *BAS1* avec PlantCARE.

- ABRE, séquences ACGTG ou AACCCGG, éléments en cis et impliqués dans la réponse au stress lié l'acide abscissique
- MYC, séquence CATTG
- Motif-TGACG en cis et impliqué dans la réponse liée au stress à l'acide méthyl jasmonate.
- LTR éléments en cis et impliqués dans la réponse aux basses températures.
- TC-rich repeats, séquence GTTTTCTTAC, éléments en cis et impliqués dans la réponse aux stress et dans la défense.

3.8 Expression de *LOS2* et *2CPA* chez *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis étant une plante modèle pour les recherches, plusieurs lignées ont été générées et rendues disponibles pour les études de caractérisation fonctionnelle. Le gène de l'énolase *LOS2* a été identifié chez *Arabidopsis* comme un gène important pour la tolérance au gel (Lee *et al.*, 2002). Pour faciliter les études de caractérisation des gènes de l'énolase du blé afin de mieux comprendre leurs fonctions, il serait

intéressant de déterminer quel gène de blé est l'orthologue de *LOS2*. Dans un premier temps, une étude d'expression génique a été réalisée.

L'expression des gènes *LOS2* (*ENO*) et *2CPA* (*BAS*) des lignées sauvages (Wild-type, WT) et mutantes a été réalisée dans les feuilles des plantes d'*Arabidopsis thaliana*. Les résultats ont montré la perturbation de l'expression de *LOS2* au niveau des lignées RD-LUC, *los2-1* et *los2-2* par rapport à la lignée parentale Col-0 (Figure 3.8 A). Ce ne sont pas les résultats qui était attendu. Selon la littérature, on n'aurait pas dû voir de modification pour l'expression de *LOS2* dans ces plantes (Lee *et al.*, 2002). Dans le cas des lignées pour *2CPA*, on observe une accumulation des ARNm plus élevée que le contrôle chez les mutants SALK_002598 et SALK_002593 durant le traitement au froid (Figure 3.8 B).

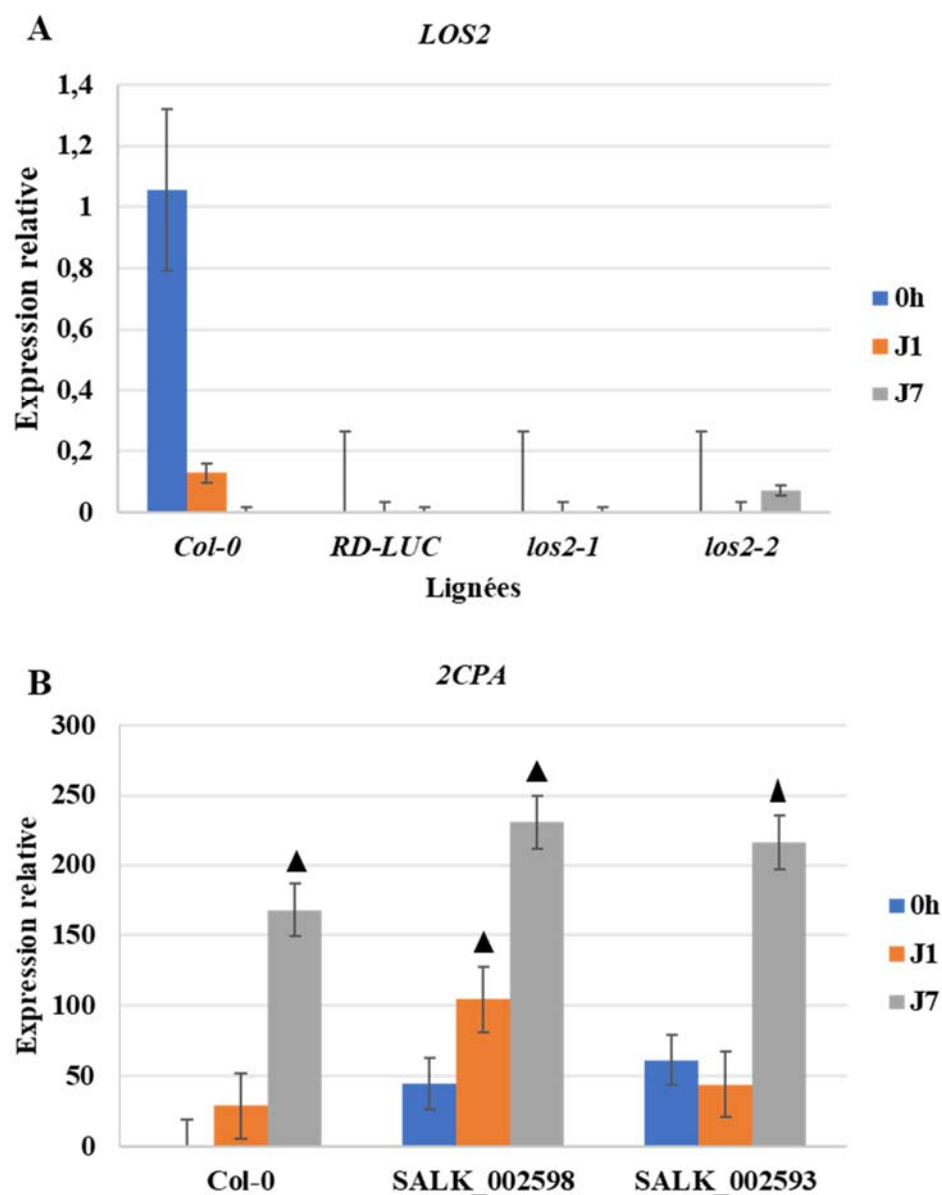


Figure 3.11 Expression des gènes *LOS2* et *2CPA* dans les feuilles d'*Arabidopsis*. (A), *LOS2* dans les lignées Col-0, C24 RD-LUC, *los2-1*, *los2-2*; (B), *2CPA* dans les lignées SALK_002598 et SALK_002593. Les graines des lignées ont été germées à 20°C pendant 21 jours, puis les plantes ont été transférées au froid à 4°C et des tissus de feuilles ont été prélevés aux périodes indiquées en heures (h) et jours (J). Les ARN totaux de ces tissus ont été extraits, convertis en ADNc, une PCR quantitative a été réalisée et le niveau d'expression de ces deux gènes a été mesuré. L'abondance relative des transcrits a été calculée et normalisée par rapport au niveau de transcrits de l'ARNr At18S. Les données représentent les moyennes (\pm) SEM d'au moins 3 différents

réplicas. $P < 0,05$ (▲) indique des différences statistiquement significatives de l'accumulation en ARNm par rapport au contrôle.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Parmi les stress environnementaux, le stress dû au froid est l'un des principaux facteurs climatiques qui limitent la productivité des cultures agricoles dans les pays froids, en affectant la qualité et la quantité des récoltes. La plupart des plantes des zones très froides acquièrent la résistance et tolérance au gel lors d'une exposition antérieure à de basses températures non négatives, un processus appelé acclimatation au froid (Ouellet, 2002). L'exposition au froid affecte pratiquement tous les aspects des fonctions cellulaires chez les plantes provoquant des changements moléculaires et physiologiques pour faire face aux conditions défavorables (Ouellet, 2002). Beaucoup de gènes codant pour des facteurs de transcription et d'autres protéines sont nécessaire pour ce processus. Certaines de ces protéines de tolérance au gel montrent un potentiel d'application en biotechnologie. En 2006, les études sur la cryoconservation ont révélé qu'un mélange de protéines solubles du blé d'hiver était efficace pour la conservation des cellules mammifères à ultra-basse température (Hamel *et al.*, 2006). Une analyse plus fine a mis en évidence que les protéines émolase et 2-Cys peroxyrédoxine (BAS1) pourraient être impliquées dans la tolérance au gel chez le blé (Chow-shi-yée *et al.*, 2016b; Grondin *et al.*, 2013). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai étudié le niveau d'expression des différents gènes de l'émolase et de *BAS1* chez deux variétés de blé qui diffèrent par leur tolérance au gel. Dans ce travail, j'avais pour objectif de déterminer parmi les cinq gènes d'émolase (*ENO-a*, *ENO-b*, *ENO3-4A*, *ENO3-4B*, *ENO3-4D*) et de

peroxyrédoxine *BASI* ceux qui répondent au stress au froid de façon significative et qui pourraient être impliqués dans la tolérance au gel chez le blé.

Deux variétés de blé actuellement cultivées au Canada, CDC Buteo connue pour sa haute tolérance au gel (blé d'hiver), et KANE connue pour sa faible tolérance au gel (blé de printemps) ont été choisies pour cette étude. Ce sont de nouvelles variétés qui n'ont pas encore été utilisées au laboratoire pour les études d'expression génétique. Il s'avère donc nécessaire de valider ces variétés, par exemple en étudiant l'expression de gènes dont les patrons d'expression au cours de l'acclimatation au froid sont déjà connus, comme *CBFIVd-A22*, *WCS120* et *VRNI*.

4.1 Validation de la qualité du traitement au froid par les gènes *CBFIVd-A22*, *WCS120* et *VRNI*

Parmi les stress environnementaux, le stress au froid et au gel est le plus important chez les plantes biannuelles comme le blé d'hiver qui survivent à l'hiver et reprennent leur croissance au printemps. Chez ces plantes, plusieurs gènes ont été identifiés et les études ont montré leur implication dans la cascade de signalisation liée au froid ou dans les ajustements métaboliques lors de l'exposition aux basses températures. Le profil d'expression de ces gènes pendant l'acclimatation au froid est connu.

Pour évaluer les conditions de traitement au froid des plantes dans ce travail, l'expression des gènes *CBFIVd-A22*, *WCS20* et *VRNI* a été mesurée et comparée à la littérature. Tel qu'anticipé, l'accumulation des transcrits du gène *CBFIVd-A22* survient avant l'accumulation des transcrits *WCS120* chez les deux variétés de blé. Cependant, chez le blé de printemps, le niveau des transcrits est relativement plus bas par rapport à celui du blé d'hiver. Ces résultats reflètent ceux trouvés par Mohamed Badawi et ses collègues dans leur travaux publiés en 2008. Leur étude a porté sur l'expression après

traitement au froid chez le blé *Triticum aestivum* de 15 gènes *CBF* parmi lesquels *CBFIVd-A22*. Les résultats de leurs travaux ont montré une augmentation significative du niveau des transcrits de ces gènes dans les premières heures suivant l'exposition au froid, suivi d'une diminution tout comme le montrent les résultats de la présente étude (Badawi *et al.*, 2008). En 2018, une étude sur la voie de signalisation ICE–CBF–COR chez *Aegilops–Triticum* sous stress au froid pendant 24 heures a donné les mêmes résultats que cette étude pour les mêmes temps de traitement au froid (Jin *et al.*, 2018). Au cours des dernières années, des gènes de type *CBF* ont été trouvés dans les génomes d'espèces végétales sensibles au froid telles que la tomate, le riz et le maïs. Ainsi une étude a révélé qu'une surexpression du gène *CBF1* d'*Arabidopsis* chez la tomate confère une tolérance élevée aux stress de froid et de sécheresse (Liu *et al.*, 2004). De même, en 2003, les travaux de Chinnusamy et ses collègues ont montré que la mutation du gène *ICE1* chez *Arabidopsis* rendait les plantes moins résistantes au froid et au gel car à la température de -10°C plus de 50% des plantes possédant la mutation *ice1* étaient mortes alors que moins de 20% des plantes sauvages étaient mortes (Chinnusamy *et al.*, 2003). Il ressort de cette étude que la mutation *ice1* bloque l'induction par le froid de *CBF3* et affecte l'expression d'autres gènes inductibles par le froid, démontrant ainsi l'interdépendance de la voie ICE–CBF–COR dans la réponse au froid chez certaines variétés de plantes.

Les résultats de l'expression du gène *WCSI20* ont montré des niveaux de transcrits plus élevés dès la deuxième heure et les niveaux de ces transcrits ont augmenté rapidement pour atteindre un pic dès la première journée de l'exposition au froid et ces niveaux restent très élevés en plateau durant toute la durée du traitement au froid. Le *WCSI20* est un gène codant pour une protéine très abondante qui semble jouer un rôle important lors de l'acclimatation au froid chez le blé et son expression dépend de l'augmentation des *CBF* (Fowler *et al.*, 1996; Houde *et al.*, 1992). Le nombre de copies et l'organisation du gène *WCSI20* sont identiques dans les cultivars de blé tolérants au gel et moins tolérants, et l'expression est régulée principalement au niveau transcriptionnel

(Vazquez-Tello *et al.*, 1998). Nos résultats vont dans ce sens pour le cultivar du blé d'hiver mais différent pour le cultivar de printemps, car le niveau des transcrits est aussi élevé chez le blé d'hiver, ce qui probablement peut exercer une influence sur le niveau d'abondance de la protéine. Il faut noter que nous n'avons pas utilisé les mêmes cultivars de printemps et d'hiver que les autres études, et qu'il n'y a pas encore eu d'études sur l'expression génétique liée du stress au froid chez ces cultivars.

Selon la littérature, VRN1 est une protéine indispensable chez les graminées pour permettre à la plante d'acquérir la capacité à former des fleurs. Le gène *VRN1* est exprimé de façon constitutive chez les variétés printanières, alors que chez les variétés hivernales son expression est induite pendant le traitement au froid. Ceci signifie que les variétés de printemps n'ont pas une obligation de vernalisation avant de fleurir (Danyluk *et al.*, 2003; Dhillon *et al.*, 2010; Kane *et al.*, 2005). Dans cette étude, l'accumulation des transcrits du gène *TaVRN1* au niveau du blé d'hiver est très faible dans les premières heures de l'acclimatation au froid mais devient plus élevée que le contrôle dès la première journée. Le niveau de ces transcrits a augmenté dans les semaines qui ont suivi et est resté élevé toute la durée de l'exposition des plantes au froid. Ces résultats concordent avec la littérature (Danyluk *et al.*, 2003; Dhillon *et al.*, 2010; Kane *et al.*, 2005). Toutefois, chez le blé de printemps, les niveaux de transcrits du gène sont très bas chez les plantes contrôles et chez les plantes traitées. Ce n'est pas ce qui était attendu. Mis à part les gènes de la voie de signalisation ICE-CBF-COR, les gènes de vernalisation, par exemple *VRN1*, *VRN2* et *VRN3*, répondent au stress de basses températures à travers la voie de floraison (Dhillon *et al.*, 2010).

De façon générale, les résultats obtenus avec les trois gènes de validation des conditions de traitement des plantes concordent relativement bien avec ce qui est rapporté dans la littérature. Les conditions de traitement au froid sont donc bien respectées pour notre étude et les résultats obtenus avec les gènes *ENO* et *BASI* ont pu être analysés sans

aucun doute majeur par rapport aux conditions de croissance et traitement des plantes et des tissus obtenus.

4.2 *ENO-a*, *ENO-b* et *ENO3-4D* s'expriment en réponse au stress au froid dans les feuilles

Les principaux résultats obtenus de cette étude ont montré une accumulation significative des transcrits de quatre des cinq gènes de l'énolase pendant le traitement au froid. Ces résultats suggèrent une implication potentielle dans la tolérance au gel chez les plantes hivernales après une période d'acclimatation au froid, mais ceci reste à être démontré. Le niveau d'accumulation de transcrits augmente au cours du traitement au froid et donne un pic au J7 pour *ENO-a*, *ENO3-4D* et *ENO3-4B* mais ce pic est observé plus tard (J21) pour *ENO-b*. En revanche au niveau du blé de printemps, on n'observe pas d'accumulation significative des transcrits pour tous les gènes *ENO3* sauf au J49, mais l'accumulation des transcrits est observée à des niveaux bas pour les gènes *ENO-a* et *ENO-b* par rapport à celle du blé d'hiver. Sharma en 2013 a partiellement obtenu les mêmes résultats (Sharma *et al.*, 2013). Ses travaux ont porté sur 2 cultivars de blé différents, soit le blé d'hiver Norstar et le blé de printemps Manitou, et des lignées Norstar de printemps et Manitou d'hiver. Pour ces dernières lignées, l'allèle dominant du type printanier, *Vrn-A1*, de Manitou était transféré dans le fond génétique du blé d'hiver Norstar pour produire un type printanier Norstar, et l'allèle récessif de type hivernal, *vrn-A1*, du blé d'hiver Norstar a été transféré dans le patrimoine génétique du blé de printemps Manitou pour produire un type hivernal Manitou. Il ressort que les deux gènes de l'énolase (*ENO-a* et *ENO-b*) répondent au traitement au froid aussi bien chez le blé d'hiver et le blé de printemps qu'au niveau des lignées d'introgession (Sharma *et al.*, 2013). De plus, le niveau d'accumulation des transcrits de ces gènes est plus élevé chez blé d'hiver que chez le blé de printemps (Sharma *et al.*, 2013). Il faudra bien sûr faire les études nécessaires pour déterminer si

l'accumulation des protéines correspondantes corrèle avec les niveaux d'accumulation en ARNm.

Dans les collets du blé d'hiver, les niveaux d'accumulation des transcrits des gènes de l'énolase ne sont pas assez significativement différents de ceux du contrôle, sauf pour *ENO-b* où on obtient un niveau des transcrits plus élevé par rapport à celui du contrôle. En revanche, pour le blé de printemps, on remarque que les niveaux des transcrits sont plus élevés par rapport au contrôle pour la plupart des gènes. Sharma en 2013 n'avait pas quant à lui obtenu des niveaux des transcrits plus élevés dans les collets pour les deux gènes (*ENO-a* et *ENO-b*) aussi bien chez le blé d'hiver que le blé de printemps (Sharma *et al.*, 2013). Il faut toujours rappeler que les variétés de blé de Sharma diffèrent des nôtres. De même, aucune information n'est disponible dans son article par rapport aux gènes de standardisation non-communs ARF et RPLS8 utilisés, et on n'a pas vu de résultats de validation qui montre que son expression ne varie pas entre les plantes utilisées et entre les conditions de traitement.

4.3 Peroxyrédoxine *BASI*

L'expression du gène peroxyrédoxine *BASI* dans les feuilles est semblable à celle des gènes *ENO-a* et *ENO-b* pour le blé d'hiver, c'est-à-dire que l'accumulation des transcrits augmente au cours du traitement au froid avec l'apparition tôt dans la période de traitement au froid. Chez le blé de printemps, les niveaux d'accumulation des transcrits ne sont pas significativement différents de ceux du contrôle le traitement au froid sauf au J49. Nous n'avons pas rencontré dans la littérature les travaux d'expression génique de *BASI* au niveau du blé pour une comparaison avec nos résultats obtenus.

Nous avons constaté un niveau d'accumulation des transcrits significatif au J49 pour la plupart des gènes de l'énolase et pour *BAS1* aussi bien au niveau du blé de printemps qu'au niveau du blé d'hiver. Ce niveau élevé des transcrits au J49 a une explication probable par rapport à la physiologie et au cycle végétatif du blé. Selon plusieurs études des modifications physiologiques et moléculaires sont observées à la fin de la période végétative et au début de la période de floraison (Danyluk *et al.*, 2003). Cette période se situe probablement entre J35 et J56 après le début de traitement des plantes au froid. À cette période, la plante a besoin de l'énergie pour mettre en place son système reproducteur pour perpétuer l'espèce. Comme l'énolase est impliquée dans la génération d'énergie cellulaire par son rôle dans la catalyse du glucose, il est possible qu'elle soit sollicitée en cette période de nécessité en énergie. Il faudrait valider cette hypothèse avec des analyses de l'activité glycolytique spécifique à l'énolase. On pourrait faire de même pour les activités antioxydante et chaperone de *BAS1*, mais ce sera plus difficile de départager l'activité spécifique de *BAS1* de l'activité des autres systèmes de détoxification et chaperones présentes dans les plantes.

4.4 Analyse des séquences promotrices potentielles

Un promoteur ou séquence promotrice est une portion de l'ADN située en amont d'un gène, et indispensable à la transcription de l'ADN en ARN. Le promoteur est la partie de l'ADN sur laquelle se fixe l'ARN polymérase, avant de démarrer la synthèse de l'ARN (Callen, 2005). Un promoteur est aussi constitué de plusieurs séquences (éléments cis) qui régulent l'expression des gènes. Ces éléments peuvent être ubiquitaires ou spécifiques à un gène, un tissu ou à un groupe de tissus donné (Callen, 2005). Parmi eux, on peut citer le cas de gènes activés en réponse à des facteurs externes, tels que la lumière, le froid, la sécheresse, la salinité, etc. (Misra et Ganesan, 2021; Ouellet *et al.*, 1998).

Dans cette étude, l'analyse des séquences promotrices a donc été réalisée afin de voir s'il y a des éléments en relation avec les stress environnementaux au niveau des promoteurs des différents gènes cibles. Cette analyse a montré la présence de LTRE en relation avec la réponse au froid, au niveau des gènes *ENO3-4B* et *ENO3-4D*. Ce résultat confirme que les deux gènes précités peuvent être inductibles par le froid, comme le montrent les résultats de la PCR quantitative. L'analyse n'a pas montré de LTRE pour les autres gènes cibles, mais cela ne signifie pas que ces gènes ne sont pas inductibles par le froid car plusieurs éléments connus ou encore inconnus peuvent intervenir directement ou indirectement dans l'initiation de l'expression d'un gène. En outre, l'analyse a montré la présence d'autres éléments en relation avec la réponse aux stress environnementaux y compris le froid. Parmi ces éléments, on a ceux qui sont en relation avec la réponse à l'acide abscissique qui fait partie des voies de signalisation au froid. L'analyse a aussi révélé des éléments en relation avec la réponse aux stress et au méthyl jasmonate qui sont parfois rencontrés dans les cascades de signalisation liées au froid. Donc en résumé, l'analyse des nucléotides situés en amont des séquences codantes a permis de mettre en évidence certains éléments communs aux différents stress environnementaux présents chez tous les gènes cibles, mais en particulier les LTRE chez deux gènes d'énolase.

4.5 Expression de *LOS2* et *2CPA* chez les lignées sauvages et mutantes d'*Arabidopsis thaliana*

Le blé est une espèce intéressante pour l'étude de la tolérance au froid, mais en tant que plante allohexaploïde typique, la complexité de son génome limite beaucoup son utilisation pour la recherche. Il est plus facile d'utiliser une plante modèle comme *Arabidopsis* puisque son génome est relativement simple. Les gènes *ENO* et *BASI* identifiés chez le blé sont régulés par le froid, et pourraient donc jouer un rôle dans la tolérance gel. Il serait intéressant de trouver les orthologues de ces gènes chez

Arabidopsis. L'énolase chez le blé est codée par six gènes, *ENO-a* et *ENO-b* (et probablement *ENO-d* mais celui-ci n'a pas été identifié) sont le même gène, qui est probablement l'équivalent de *LOS2* d'*Arabidopsis*. On a aussi étudié *TaENO3* (*4A*, *4B*, *4D*), et toutes les protéines correspondantes sont dans le cytoplasme. De même la peroxyrédoxine codée par *BASI* est une protéine chloroplastique chez le blé mais qui est nommée *2CPA* chez *Arabidopsis*. L'expression de ces gènes pendant l'acclimatation au froid chez *Arabidopsis* a été étudiée avec différentes lignées pendant le traitement au froid.

Les résultats obtenus concernant l'expression de *LOS2* dans les feuilles des lignées C24 RD-LUC et *los2-1* ne concordent pas avec les informations reçues de ABRC. C24 RD-LUC est une lignée parentale qui devrait montrer des résultats comparables à ceux de la lignée Col-0. De même, la lignée *los2-1* devrait aussi montrer des résultats semblables à Col-) par que cette lignée a été obtenue par mutation ponctuelle de la lignée RD-LUC, ce qui ne devrait pas avoir beaucoup d'impact sur l'expression du gène concerné. La raison de ces résultats est difficile à expliquer.

En 2002, une étude a montré que le mutant *los2-1* altère spécifiquement l'expression régulée par le froid des gènes COR/KIN/RD/LTI (Lee *et al.*, 2002). Il est à noter que normalement les gènes COR/KIN/RD/LTI sont régulés par le froid à travers l'élément CRT/DRE (Thomashow, 1999). Ces résultats indiquent que l'effet de *LOS2* sur l'expression de RD29A-LUC est spécifique au stress au froid et non aux autres stress testés (Lee *et al.*, 2002).

Les niveaux d'accumulation des transcrits du gène *2CPA* dans les feuilles de 2 lignées d'insertion ADN-T (SALK) sont plus élevés que ceux observés au niveau de la lignée parentale pendant la durée du traitement au froid. Ces résultats ne sont pas trop surprenants car les lignées SALK comportent normalement des ADN-T qui probablement devraient troubler ou non l'expression du gène *2CPA*, ceci

dépendamment du site d'insertion de l'ADN de transfert. Selon les informations que nous avons d'ABRC, les insertions des ADN-T pour les deux lignées SALK que nous avons utilisées sont au niveau des introns.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'augmentation fulgurante de la population mondiale au cours de ce vingt-et-unième siècle et l'intensification des intempéries naturelles qui influencent négativement la production agricole sont des sujets d'importance capitale qui font réfléchir les politiciens et particulièrement le monde scientifique. Partout dans le monde plusieurs cultures céréalières sont influencées par les facteurs environnementaux dévastateurs, parmi lesquels le froid et le gel. Dans cette perspective, plusieurs études sont menées afin de comprendre les mécanismes développés et mis en place par certains végétaux pour faire face aux effets perturbateurs des différents stress environnementaux. Chez le blé, des études sont menées pour mettre en évidence au niveau moléculaire les différents éléments impliqués dans la réponse aux stress environnementaux en général, et particulièrement au froid. Parmi les protéines identifiées, notre étude a porté sur l'expression génique des énolases et de la 2-Cys peroxyrédoxine *TaBAS1*. Nous avons cherché à voir et à comprendre les profils d'accumulation des ARNm de ces gènes chez deux variétés de blé qui diffèrent par leur tolérance au gel au cours du traitement au froid. Cette étude a montré des niveaux élevés des transcrits des énolases et de *TaBAS1* dans les feuilles du blé d'hiver. Cependant, chez le blé de printemps, les niveaux de ces transcrits sont relativement bas par rapport au blé d'hiver. L'analyse de ces résultats suggèrent une probabilité élevée de l'implication des protéines TaENO et TaBAS1 dans la tolérance au gel chez le blé.

Comme le génome du blé est très complexe, il faudra commencer les études fonctionnelles au niveau d'une plante modèle. On utilisera *Arabidopsis*, qui est l'une des plantes modèles largement utilisées dans beaucoup de laboratoires pour les études de génétique inverse compte tenu de la simplicité de son génome. Ainsi on cherchera à voir dans un premier temps lequel des gènes *ENO* chez le blé est l'orthologue de *LOS2* chez *Arabidopsis* en comparant le niveau d'expression de *LOS2* après une exposition des plantes au froid. Les analyses d'expression génique avec différentes lignées réalisées dans ce travail n'ont pas été concluantes, et devront donc être répétées. Une fois que l'orthologue de blé aura été identifié, on procédera à des tests de complémentations c'est-à-dire on va introduire des gènes « normaux » dans un background mutant pour voir si le gène peut « compléter » le phénotype (donc rendre le mutant comme un Wild-type). Dans notre contexte les séquences complètes de *ENO-a* et *ENO-b* du blé seront utilisées pour faire la complémentation dans *Arabidopsis*. Une analyse de l'expression génique par qPCR sera faite, et les résultats mettront en évidence probablement le ou les gènes d'*ENO* chez le blé est ou sont orthologues de *LOS2* chez *Arabidopsis*.

Pour la suite de l'étude au niveau des transformants, on procédera à la mesure de la tolérance au gel à l'aide de deux techniques différentes, une qui est le test de fuite d'électrolytes (Filipkowski *et al.*, 2015) et l'autre qui est le test de fluorescence de la chlorophylle (Aminot et Rey, 2001). Pour faire le test de fuite d'électrolytes, les feuilles détachées des plantes transformées non acclimatées ou acclimatées au froid (et des plantes non transformées comme témoin) seront congelées dans un congélateur à refroidissement lent, de type CryoMed (ThermoFisher) à une vitesse de 2 °C / h à des températures de -4 °C à -24 °C, à des intervalles de 2 °C. Les feuilles seront décongelées dans l'eau et les fuites d'électrolytes seront mesurées par conductivité avant et après l'autoclavage. On pourra aussi procéder par la mesure de la fluorescence dans les feuilles. Pour cela, les feuilles congelées seront décongelées lentement sur la glace, adaptées à l'obscurité pendant 20 minutes, et la fluorescence de la chlorophylle

sera mesurée avec le système d'imagerie NightOWL (Berthold). Les plantes non congelées serviront de contrôles. La tolérance sera exprimée par la température létale 50 (LT50), la température où il y a 50% de fuite d'ions / fluorescence par rapport aux plantes non congelées. Les résultats obtenus indiqueront si TaENO et TaBAS1 participent, comme prévu, au caractère de tolérance.

Ces travaux subséquents devront chercher à élucider comment ces deux protéines fonctionnent au niveau moléculaire pour contribuer à l'amélioration de la tolérance au gel. Les travaux de Chow-shi-yée de 2016 ont montré que TaENO a une activité IRI mais pas de domaines de liaison à la glace connus (Chow-shi-yée *et al.*, 2016). Ainsi il faudrait identifier les nouveaux domaines de liaison à la glace au niveau de la protéine émolase, et voir si ces protéines agissent individuellement ou en synergie avec d'autres protéines ou d'autres molécules dans la tolérance au gel.

Dans les prochaines études, pour mieux évaluer le rôle que jouent ces protéines dans la tolérance au gel chez le blé, je propose de faire des analyses de génétique inverse chez le blé. On utilisera deux versions du système Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) : la version originale à 3 composantes optimisée pour le silençage génique induit par le virus (VIGS), pour diminuer l'expression des gènes (Knock out, KO) ; et la version à 4 composantes développée pour la surexpression (Cheuk, 2018).

On pourra voir également si les variétés de tolérance différente expriment des niveaux différents de ces gènes. Si oui, et si les variétés les plus tolérantes expriment plus de *ENO* par exemple, on pourrait penser que *ENO* serait un marqueur de tolérance pouvant être utilisé pour la sélection de variétés plus tolérantes au gel dans les croisements traditionnels.

BIBLIOGRAPHIE

- Aminot A et Rey F (2001) Chlorophyll a: determination by spectroscopic methods. *ICES Tech Mar Environ Sci* 30: 1-18.
- An S, Liu Y, Sang K, Wang T, Yu J, Zhou Y et Xia X (2023) Brassinosteroid signaling positively regulates abscisic acid biosynthesis in response to chilling stress in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology* 65: 10-24.
- Antoun M et Ouellet F (2013) Growth temperature affects inflorescence architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Botany* 91: 642-651.
- Badawi M, Danyluk J, Boucho B, Houde M et Sarhan F (2007) The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 533-554.
- Badawi M, Reddy YV, Agharbaoui Z, Tominaga Y, Danyluk J, Sarhan F et Houde M (2008) Structure and functional analysis of wheat ICE (inducer of CBF expression) genes. *Plant and Cell Physiology* 49: 1237-1249.
- Baier M et Dietz KJ (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *The Plant Journal* 12: 179-190.
- Baker SS, Wilhelm KS et Thomashow MF (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* 24: 701-713.

- Bourion V, Lejeune-Hénaut I, Munier-Jolain N et Salon C (2003) Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *European Journal of Agronomy* 19: 535-548.
- Breton G, Danyluk J, Ouellet F et Sarhan F (2000) Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnology Annual Review* 6: 59-101.
- Cadieux C, Sarhan F et Perras M (1988) Osmotic adjustment and photosynthetic electron transport response to cold hardening in winter and spring wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 313-322.
- Calatayud PA, Garrec J-P et Nicole M (2013) Adaptation des plantes aux stress environnementaux. Dans *Interactions insectes-plantes*. Sauvion N, Calatayud PA, Thiéry D et Marion-Poll F, eds. Quae. Versailles, France.
- Callen JC (2005) *Biologie cellulaire: des molécules aux organismes, cours, questions de révision et QROC*. Dunod. Paris, France.
- Cheuk A (2018) *Caractérisation du facteur de transcription TaZFP1B chez le blé (Triticum aestivum) par la mise au point d'un nouveau système d'expression viral*. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada.
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M et Zhu JK (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 17: 1043-1054.
- Chow-shi-yée M, Briard JG, Grondin M, Averill-Bates DA, Ben RN et Ouellet F (2016a) Inhibition of ice recrystallization and cryoprotective activity of wheat proteins in liver and pancreatic cells. *Protein Science* 25: 974-986.
- Chow-shi-yée M, Grondin M, Averill-Bates DA et Ouellet F (2016b) Plant protein 2-Cys peroxiredoxin TaBAS1 alleviates oxidative and nitrosative stresses incurred during cryopreservation of mammalian cells. *Biotechnology & Bioengineering* 113: 1511-1521.

- Chow-shi-yée M, Grondin M, Ouellet F et Averill-Bates DA (2020) Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress and Chaperones* 25: 869-886.
- Curtis BC (2002) Wheat in the World. In: Curtis BC, Rajaram S and Macpherson HG, Eds., *Bread wheat : improvement and production*. Plant Production and Protection Series 30, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome Italie, pp 1-18.
- Danielli JF et Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5: 495-508.
- Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB et Sarhan F (2003) TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiology* 132: 1849-1860.
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler DB, Benhamou N et 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.
- Dhillon T, Pearce SP, Stockinger EJ, Distelfeld A, Li C, Knox AK, Vashegyi I, Vágújfalvi A, Galiba G et Dubcovsky J (2010) Regulation of freezing tolerance and flowering in temperate cereals: the VRN-1 connection. *Plant Physiology* 153: 1846-1858.
- Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A et López-Aleman R (2012) α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 156795.
- Dietz KJ (2011) Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* 15: 1129-1159.
- Egawa C, Kobayashi F, Ishibashi M, Nakamura T, Nakamura C et Takumi S (2006) Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat. *Genes & Genetic Systems* 81: 77-91.

- Eremina M, Unterholzner SJ, Rathnayake AI, Castellanos M, Khan M, Kugler KG, May ST, Mayer KF, Rozhon W et Poppenberger B (2016) Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E5982-E5991.
- Filipkowski K, Fulara J et Maier JP (2015) Electronic absorption spectra of linear C6Br and C6Br⁺ in neon matrices. *Journal of Molecular Spectroscopy* 311: 64-68.
- Fowler DB (2010) CDC buteo hard red winter wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 90: 707-710.
- Fowler DB, Limin AE, Wang S-Y et Ward RW (1996) Relationship between low-temperature tolerance and vernalization response in wheat and rye. *Canadian Journal of Plant Science* 76: 37-42.
- Fox SL, Humphreys DG, Brown PD, Townley-Smith TF, McCallum BD, Fetch TG, Gaudet DA, Menzies JG, Gilbert JA et Noll JS (2007) KANE hard red spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 87: 889-894.
- Gao MJ, Allard G, Byass L, Flanagan AM et Singh J (2002) Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 49: 459-471.
- Génére B (1997) Les facteurs influençant la qualité physiologique des plants plantés, et la prise en compte des risques climatiques après plantation. *Revue Forestière Française* 49: 313-323.
- Giallongo A, Feo S, Moore R, Croce CM et Showe LC (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human alpha enolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6741-6745.

- Grondin M, Chow-shi-yée M, Ouellet F et Averill-Bates DA (2015) Wheat enolase demonstrates potential as a non-toxic cryopreservation agent for liver and pancreatic cells. *Biotechnology Journal* 10: 801-810.
- Grondin M, Robinson I, Do Carmo S, Ali-Benali MA, Ouellet F, Mounier C, Sarhan F et Averill-Bates DA (2013) Cryopreservation of insulin-secreting INS832/13 cells using a wheat protein formulation. *Cryobiology* 66: 136-143.
- Gusta LV, Trischuk R et Weiser CJ (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 308-318.
- Guy CL, Huber JL et Huber SC (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502-508.
- Hamel F, Grondin M, Denizeau F, Averill-Bates DA et Sarhan F (2006) Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. *Biotechnology & Bioengineering* 95: 661-670.
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Laliberté S et Sarhan F (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *The Plant Journal* 8: 583-593.
- Houde M, Danyluk J, Laliberté J-F, Rassart E, Dhindsa RS et Sarhan F (1992) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiology* 99: 1381-1387.
- Hu Z, Ban Q, Hao J, Zhu X, Cheng Y, Mao J, Lin M, Xia E et Li Y (2020) Genome-wide characterization of the C-repeat Binding Factor (CBF) gene family involved in the response to abiotic stresses in tea plant (*Camellia sinensis*). *Frontiers in Plant Science* 11: 921.
- Hwarari D, Guan Y, Ahmad B, Movahedi A, Min T, Hao Z, Lu Y, Chen J et Yang L (2022) ICE-CBF-COR signaling cascade and its regulation in plants responding to cold stress. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 1549.

- Jia Y, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Gong Z et Yang S (2016) The *cbfs* triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 212: 345-353.
- Jia Z et Davies PL (2002) Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 101-106.
- Jin Y, Zhai S, Wang W, Ding X, Guo Z, Bai L et Wang S (2018) Identification of genes from the ICE-CBF-COR pathway under cold stress in *Aegilops-Triticum* composite group and the evolution analysis with those from *Triticeae*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24: 211-229.
- Kahn PH (1999) *The human relationship with nature: development and culture*. MIT Press, Cambridge, USA.
- Kane NA, Danyluk J, Tardif G, Ouellet F, Laliberte JF, Limin AE, Fowler DB et Sarhan F (2005) TaVRT-2, a member of the StMADS-11 clade of flowering repressors, is regulated by vernalization and photoperiod in wheat. *Plant Physiology* 138: 2354-2363.
- Koc I, Vatansever R, Ozyigit I et Filiz E (2015) Identification of differentially expressed genes in chilling-induced potato (*Solanum tuberosum* L.); a data analysis study. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177: 792-811.
- Kurbidaeva A, Ezhova T et Novokreshchenova M (2014) *Arabidopsis thaliana* ICE2 gene: Phylogeny, structural evolution and functional diversification from ICE1. *Plant Science* 229: 10-22.
- Lee H, Guo Y, Ohta M, Xiong L, Stevenson B et Zhu JK (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *The EMBO Journal* 21: 2692-2702.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P et Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30: 325-327.

- Levitt J et Siminovitch D (2011) The relation between frost resistance and the physical state of protoplasm: I. The protoplasm as whole. *Canadian Journal of Research 18*: 550-561.
- Liu FX, Tan ZB, Zhu JQ et Deng XJ (2004) [*Arabidopsis* CBF1 in plant tolerance to low temperature and drought stresses]. *Yi Chuan 26*: 394-398.
- Liu Q, Zhang X, Su YH et Zhang XS (2022) Genetic mechanisms of cold signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Life (Basel) 12*: 700.
- Livak KJ et Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods 25*: 402-408.
- Lohman, K et Meyerhof, O (1934). "Über die enzymatische umwandlung von phosphoglyzerinsäure in brenztraubensäure und phosphorsäure" [Enzymatic transformation of phosphoglyceric acid into pyruvic and phosphoric acid]. *Biochemische Zeitschrift 273*: 60-72.
- Mc Alister L et Holland MJ (1982) Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *Journal of Biology Chemistry 257*: 7181-7188.
- Medina J, Catalá R et Salinas J (2011) The CBFs: three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science 180*: 3-11.
- Misra S et Ganesan M (2021) The impact of inducible promoters in transgenic plant production and crop improvement. *Plant Gene 27*: 100300.
- Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, Yamamoto Y, Kakeya H, Otsubo T, Kawamura S, Hossain MA, Noda T, Hirakata Y, et al. (1996) Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology 34*: 1918-1921.

- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K et Kohsaka S (1994) Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *Journal of Neurochemistry* 63: 2048-2057.
- Ouellet F (2002) Out of the cold: unveiling the elements required for low temperature induction of gene expression in plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38: 396-403.
- Ouellet F et Charron JB (2013) Cold acclimation and freezing tolerance in plants. Dans: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020093.pub2
- Ouellet F, Houde M et 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 et Sarhan F (1998) The wheat *wcs120* promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. *FEBS Letters* 423: 324-328.
- Pancholi V (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 902-920.
- Perras M et Sarhan F (1984) Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides. *Physiologia Plantarum* 60: 129-132.
- Pihakaski-Maunsbach K, Moffatt B, Testillano P, Risueno M, Yeh S, Griffith M et Maunsbach AB (2001) Genes encoding chitinase-antifreeze proteins are regulated by cold and expressed by all cell types in winter rye shoots. *Physiologia Plantarum* 112: 359-371.
- Poynton RA et Hampton MB (2014) Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840: 906-912.

- Pribnow D (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 784-788.
- Pulido P, Spínola M, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz K-J, González M et Cejudo FJ (2010) Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* 61: 4043-4054.
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y-Q, Shinozaki K et Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays L.* *Plant and Cell Physiology* 45: 1042-1052.
- Rhee SG, Chae HZ et Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1543-1552.
- Sandve SR, Rudi H, Asp T et Rognli OA (2008) Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses. *BMC Evolutionary Biology* 8: 245.
- Sharma P, Ganeshan S, Fowler DB et Chibbar RN (2013) Characterisation of two wheat enolase cDNA showing distinct patterns of expression in leaf and crown tissues of plants exposed to low temperature. *Annals of Applied Biology* 162: 271-283.
- Shen YG, Zhang WK, He SJ, Zhang JS, Liu Q et Chen SY (2003) An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 923-930.
- Shi Y, Ding Y et Yang S (2018) Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation. *Trends in Plant Science* 23: 623-637.

- Shi Y, Huang J, Sun T, Wang X, Zhu C, Ai Y et Gu H (2017) The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 59: 118-133.
- Siminovitch D et Cloutier Y (1983) Drought and freezing tolerance and adaptation in plants: some evidence of near equivalences. *Cryobiology* 20: 487-503.
- Singer SJ et Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Soltész A, Smedley M, Vashegyi I, Galiba G, Harwood W et Vágújfalvi A (2013) Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany* 64: 1849-1862.
- Statistique Canada (2021) Production des principales grandes cultures. *Le Quotidien Vendredi 3 décembre 2021*.
- Stitt M et Hurry V (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 199-206.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ et 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 1035-1040.
- Sung DY, Kaplan F, Lee KJ et Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science* 8: 179-187.
- Thomas E, Vandebroek I, Goetghebeur P, Sanca S, Arrázola S et Van Damme P (2008) The relationship between plant use and plant diversity in the Bolivian Andes, with special reference to medicinal plant use. *Human Ecology* 36: 861-879.

- Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 571-599.
- Thomashow MF (2010) Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology* 154: 571-577.
- Tremblay K, Ouellet F, Fournier J, Danyluk J et Sarhan F (2005) Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant and Cell Physiology* 46: 884-891.
- Vazquez-Tello A, Ouellet F et Sarhan F (1998) Low temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of *Wcs120*, a cold-specific gene in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 257: 157-166.
- Wang DZ, Jin YN, Ding XH, Wang WJ, Zhai SS, Bai LP et Guo ZF (2017) Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants. *Biochemistry (Moscow)* 82: 1103-1117.
- Xu Z-S, Ni Z-Y, Liu L, Nie L-N, Li L-C, Chen M et Ma Y-Z (2008) Characterization of the TaAIDFa gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 280: 497-508.
- Zhu JK (2016) Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell Stress & Chaperones* 167: 313-324.
- Zhu X, Miao X, Wu Y, Li C, Guo Y, Liu Y, Chen Y, Lu X, Wang Y et He S (2015) NO1 promotes tumor proliferation and cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in Non-Hodgkin's Lymphomas. *Experimental Cell Research* 335: 216-223.