

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION DE MICROARNS ASSOCIÉS À LA TOLÉRANCE AU
FROID; CARACTÉRISATION DE MIR156 ET SA CIBLE, LA FAMILLE DE
GÈNES SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL),
CHEZ LE BLÉ

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

DEREK BOMBO

JUIN 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le professeur Fathey Sarhan, pour sa supervision.

J'aimerais également remercier le professeur François Ouellet pour sa disponibilité et ses conseils.

Merci à toute l'équipe de biologie végétale pour le soutien technique et moral que vous m'avez apporté durant mes études.

Merci à toute ma famille pour m'avoir supporté durant toutes ces années. Merci à ma blonde, Karine, pour m'avoir enduré et soutenu dans les bons moments comme dans les moins bons.

Un merci particulier aux Drs. Pierre Poitras, gastroentérologue, et Carole Richard, chirurgienne. Sans vos soins, je n'aurais jamais pu surmonter la maladie et mener à terme mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
RÉSUMÉ	ix
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Les dommages causés par la déshydratation et le gel.....	3
1.2 La perception du froid	4
1.3 Les facteurs de transcription impliqués	5
1.4 Les molécules effectrices.....	8
1.5 La floraison et la vernalisation	12
1.6 La régulation post-transcriptionnelle et les petits ARN	15
1.7 La biogénèse des microARNs	16
1.8 La régulation par les microARNs.....	19
1.9 Le rôle des microARNs chez les plantes	23
1.10 L'identification des microARNs	25
1.11 La détermination de leur profil d'expression	26
1.12 L'identification de leurs cibles	27
1.13 Applications pratiques à la recherche sur les microARNs	28
1.14 L'étude présente	29
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	30
2.1 Matériel végétal et conditions de croissance	30
2.2 Extraction de l'ARN total	30
2.3 Extraction et purification des petits ARN.....	31
2.4 Buvardage northern pour l'ARN total.....	32

2.5	Préparation et radiomarquage des sondes pour l'ARN messenger cible	32
2.6	Hybridation pour l'ARN messenger cible.....	33
2.7	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	34
2.8	Buvar dage northern pour les petits ARN.....	34
2.9	Radiomarquage des sondes pour les petits ARN.....	35
2.10	Hybridation pour les petits ARN.....	36
2.11	Bioinformatique.....	37
CHAPITRE III		
RÉSULTATS		38
3.1	Identification de miARNs ciblant des gènes associés à la tolérance au froid..	38
3.2	Extraction et purification des petits ARN.....	40
3.3	Optimisation de la détection des microARNs par buvar dage northern	41
3.4	Identification des gènes <i>SPL</i> chez le blé.....	44
3.5	Analyse du promoteur de <i>TaSPL3</i>	48
3.6	Analyse du promoteur de <i>TaSPL13</i>	54
3.7	Complémentarité entre <i>miR156</i> et ces cibles.....	58
3.8	Expression de <i>miR156</i> et des gènes <i>SPL</i> lors du traitement au froid.....	60
CHAPITRE IV		
DISCUSSION		62
4.1	Détection des microARNs	62
4.2	Les gènes " <i>Squamosa Promotor binding protein-Like</i> ".....	64
4.3	Régulation post-transcriptionnelle de <i>TaSPL3</i> et <i>TaSPL13</i>	66
4.4	Éléments de régulation <i>cis</i> des régions promotrices de <i>TaSPL3</i> et <i>TaSPL13</i> ...	68
4.5	Effet du froid sur l'expression de <i>miR156</i> et des gènes <i>SPL</i>	69
4.6	Les facteurs de transcription <i>SPL</i> activent la floraison	71
CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....		74
ANNEXES		76
RÉFÉRENCES.....		97

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
3.1 Contrôle de la qualité des extractions et purification de petits ARN	41
3.2 Comparaison entre les deux méthodes de fixation de l'ARN aux membranes de nylon	43
3.3 Séquence de TaSPL3	46
3.4 Séquence de TaSPL13	47
3.5 Éléments de régulation <i>cis</i> du promoteur de <i>TaSPL3</i>	49
3.6 Éléments de régulation <i>cis</i> du promoteur de <i>TaSPL13</i>	54
3.7 miR156 est complémentaire aux gènes <i>TaSPL</i>	59
3.8 Cinétique d'expression de <i>miR156</i> et des gènes <i>SPL</i>	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Influence de divers stress abiotiques sur l'expression de microARNs	24
2.1 Amorces utilisées pour amplifier RFL_Contig4144 (<i>TaSPL3</i>) et tplb0002m07 (<i>TaSPL13</i>)	33
2.2 MicroARNs prédits et sondes spécifiques utilisées pour leur détection au buvardage northern	36
3.1 Liste des microARNs potentiels et leur cibles prédites par bioinformatique.....	39
3.2 Liste des éléments de régulation <i>cis</i> dans l'intron 5' UTR et la région promotrice de <i>TaSPL3</i>	52
3.3 Liste des éléments de régulation <i>cis</i> du promoteur de <i>TaSPL13</i>	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABRE	"Abscisic acid responsive element"
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGO	Argonaute
AP1/2	APETALA1/2
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique transfert
bHLH	"Basic helix-loop-helix"
CBF	"C-repeat binding factor"
COR	"Cold regulated"
EDC	1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EST	"Expressed sequence tag"
FT	"Flowering locus T"
kDa	KiloDalton
LEA	"Late embryogenesis abundant"
LTRE	"Low temperature responsive element"
miARN	microARN
MYB	Myeloblastose
MYC	Myelocytomatose
NA	Non acclimaté
PCR	"Polymerase chain reaction"
RAB	"Response to abscisic acid"
RISC	"RNA-induced silencing complex"
ROS	"Reactive oxygen species"
qRT-PCR	"Quantitative real-time polymerase chain reaction"

SPL	"Squamosa promoter binding protein-like"
T _m	"melting temperature"
UTR	"Untranslated region"
U.V.	Ultraviolets
VRN	"Vernalization"
VRT	"Vegetative to reproductive transition"
WCS	"Wheat cold specific"

RÉSUMÉ

Les basses températures représentent un des facteurs environnementaux limitant la croissance et la productivité des plantes céréalières. Plusieurs microARNs ciblant potentiellement des gènes codant pour des facteurs de transcription et protéines majeures associés à la tolérance au froid ont été identifiés chez le blé d'hiver. Leur faible abondance nous a forcée à optimiser le buvardage northern des microARNs en utilisant le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide pour fixer l'ARN à la membrane et ainsi augmenter la sensibilité de la méthode d'analyse. Cette optimisation n'a pas été suffisante pour nous permettre de confirmer la présence des microARNs associés à la tolérance au froid mais nous a permis de détecter *miR156*, un microARN associé à la floraison chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. *miR156* est conservé chez les plantes et cible la famille de facteurs de transcription Squamosa Promoter binding protein-Like (SPL). Nous avons identifié deux gènes SPL présent chez le blé, *TaSPL3* et *TaSPL13*, et avons confirmé la présence d'une séquence de régulation par *miR156* sur chacun, dans la région codante et 3'UTR respectivement, suggérant leur régulation post transcriptionnelle par *miR156*. L'analyse des régions promotrices de *TaSPL3* et *TaSPL13* a révélé des motifs de régulation *cis* associés à une régulation par les facteurs de transcription MYB, MYC, WRKY, CBF et MADS. Nous avons analysé, par buvardage northern, l'expression de *miR156*, *TaSPL3* et *TaSPL13* lors d'un traitement au froid de 49 jours. L'expression de *miR156* diminue lors du traitement au froid alors que celle de *TaSPL3* et *TaSPL13* est à son maximum après 28 jours à 4°C. Nos résultats suggèrent que *miR156* et sa cible, les facteurs de transcription SPL, pourraient être impliqués dans le processus de réponse au froid induisant la transition florale du blé d'hiver.

Mots clés : microARN, Squamosa Promoter binding protein-Like, blé, froid, floraison.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

Les plantes sont essentielles pour le maintien de l'équilibre naturel sur terre. Par leur photosynthèse, elles produisent des sucres et de l'oxygène à partir de dioxyde de carbone, d'eau et d'énergie solaire. Elles occupent la base de la chaîne alimentaire et contribuent à diminuer la proportion de gaz à effet de serre présents dans l'atmosphère. Les végétaux occupent une place centrale dans plusieurs domaines de l'activité humaine. Beaucoup de recherche est donc effectuée pour mieux comprendre leur développement et leur résistance aux différents stress environnementaux.

Au cours de leur vie, les plantes font face à plusieurs stress. Non seulement doivent-elles se défendre contre les différents stress biotiques engendrés par les autres organismes présents dans leur environnement, mais elles ont également à s'adapter pour faire face aux stress abiotiques tel que la sécheresse, la surabondance d'eau, le pH du sol, la salinité, le froid et même le gel. Les plantes ont développé des mécanismes de protection pour minimiser l'impact des conditions climatiques défavorables sur leur développement.

La température et la lumière fournissent à la plante des informations cruciales leur permettant de réagir et de s'adapter aux changements climatiques saisonniers. Le blé, en plus d'avoir une importance agroalimentaire et économique, a su évoluer pour produire plusieurs variétés, génétiquement différentes, adaptées à des conditions climatiques diverses (Winfield *et al.*, 2010). On peut, entre autre, classifier les céréales des climats tempérés selon leur capacité à résister au froid et au gel. On parle alors de cultivar résistant au froid. La baisse de la température et de la photopériode lors de l'arrivée de l'automne provoque, chez les plantes résistantes au froid, une

modification de leur métabolisme afin de tolérer le gel lors de l'hiver. Le développement de la tolérance au gel nécessite une acclimatation au froid, c'est-à-dire une période de plusieurs jours consécutifs de températures près du point de congélation. Par exemple, le cultivar de blé Norstar, résistant au gel, ne peut survivre à une baisse de température rapide sous -5°C alors qu'une acclimatation au froid lui permet de tolérer jusqu'à -20°C (Jaglo *et al.*, 2001). En plus de leur capacité d'acclimatation au froid et de tolérance au gel, les plantes céréalières ont été classifiées en cultivars d'été ou d'hiver selon la nécessité d'une période prolongée de froid, une vernalisation, pour être capable de fleurir lorsque d'autres stimuli environnementaux, tel que l'augmentation de la température et de la photopériode, surviennent. Les basses températures induisent des changements physiologiques, métaboliques et génétiques chez les variétés hivernales permettant de retarder la floraison jusqu'au printemps. De cette manière, la plante protège ses organes reproducteurs des dommages causés par le gel. Bien que les variétés d'hiver soient généralement tolérantes au gel, les plantes tolérantes au gel ne nécessitent pas toutes une vernalisation pour fleurir (Winfield *et al.*, 2010). Les phénomènes de l'acclimatation au froid, de l'acquisition de la tolérance au gel, de la vernalisation et de la floraison sont tous dépendant d'une variété de gènes soumis à une régulation génétique au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Récemment, les chercheurs ont identifié une nouvelle classe de régulateurs post-transcriptionnels : les microARNs. Ces derniers ont été découverts au début des années 1990 chez *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Il a été démontré que le gène *lin-4*, ne codant pas pour une protéine, régulaient plusieurs stades de développement du nématode. Ce gène produisait plutôt un petit ARN de 22 nucléotides capable d'interagir avec la région 3' non codante de l'ARN messager *lin-14* et de réprimer l'expression de la protéine *lin-14* (Wightman *et al.*, 1993). Le petit ARN a été considéré comme une anomalie jusqu'au début des années 2000 où des

avancées technologiques, tel que le séquençage à haut débit, ont permis la découverte de plusieurs autres petits ARN non-codants. Près de 700 microARNs ont été détectés chez l'homme et ces derniers régulent plus de 30% du génome (Hussain, 2012). On dénombre moins de 50 micros ARN confirmés chez le blé et plus de 250 chez *Arabidopsis* (mirBase; <http://mirbase.org/>). Leur implication dans le processus de floraison a également été démontrée chez *Arabidopsis* (Yant *et al.*, 2010). Nous traiterons donc de leur biogénèse, de leur mode d'action ainsi que des principaux outils employés dans l'étude des microARNs, plus particulièrement chez les plantes.

1.1 Les dommages causés par la déshydratation et le gel

Bien qu'ils soient à première vue bien différents, la sécheresse et le froid sont des stress relativement similaires pour la plante. Par le manque d'absorption d'eau en temps de sécheresse, la plante se déshydrate. L'eau perdue par la plante provient du milieu interstitiel et cela modifie l'équilibre entre les pressions osmotiques extra et intra cellulaire. Il en résulte que les cellules se déshydratent pour rétablir l'équilibre. De plus, la modification des pressions osmotiques entraîne une migration des électrolytes intracellulaires vers le milieu extracellulaire. Le froid, dans une mesure très faible, et le gel, plus fortement, provoquent des symptômes similaires. Lors de périodes de gel, la formation de glace dans le milieu interstitiel modifie la pression osmotique de celui-ci. Comme pour la sécheresse, l'eau contenue dans les cellules environnantes va migrer vers le milieu interstitiel pour rétablir l'équilibre (Thomashow, 1999). La déshydratation due au gel engendre plusieurs formes de dommages à la membrane cellulaire telle que la lyse induite par l'expansion, la transition entre les phases lamellaires et hexagonales II et les lésions-fractures. La lyse induite par l'expansion résulte des cycles de gel/dégel. L'expansion et la contraction successive de la membrane, suite à des changements osmotiques et des échanges d'eau entre les milieux intra et extracellulaire, peut briser son intégrité et

donc entraîner la mort de la cellule (Dowgert et Steponkus, 1984). Le second type de dommages causés par le gel, la transition de phase entre lamellaire et hexagonale II, résulte d'un changement dans l'arrangement des lipides de la membrane. Suite à la déshydratation de la cellule, les lipides de la membrane peuvent passer d'une conformation en bicouche lipidique, dite lamellaire, à la conformation hexagonale II. Cette dernière a en fait la forme d'un cylindre où la tête hydrophile des lipides se retrouve au centre et leur queue hydrophobe à l'extérieur. Contrairement à la conformation lamellaire, la conformation hexagonale II n'est pas étanche. Il en résulte donc des dommages cellulaires importants. Bien que cette conformation soit réversible, cela implique une réorganisation importante des composantes membranaires. En effet, suite à la déshydratation, les membranes de plusieurs organelles de la cellule se retrouvent physiquement juxtaposées et peuvent fusionner lors du changement de conformation des lipides membranaires (Gordon-Kamm et Steponkus, 1984). Un dernier type de dommages est causé par une déshydratation extrême. Les lésions fractures sont produites lorsque le contenu en eau passe en dessous de 20%. Ici encore les membranes de différents organelles sont si proches qu'elles fusionnent mais sans former de phase hexagonale II (Uemura *et al.*, 1995).

1.2 La perception du froid

L'étape initiale de l'acclimatation au froid est la perception de ce dernier par les cellules de la plante. La température affecte de manière importante les lipides. Une des hypothèses est que le froid entraîne un changement dans la fluidité et la rigidité des membranes, lequel est perçu par des canaux calciques (Monroy *et al.*, 1997). Cette hypothèse est confirmée par des études ayant montrées qu'il était possible d'induire ou de retarder l'expression de plusieurs gènes associés à la réponse au froid en modifiant la fluidité de la membrane de manière artificielle (Orvar *et al.*, 2000). De plus, la photosynthèse est sensible aux variations environnementales. Bien que les

réactions photophysiques et photochimiques des photosystèmes I et II soient rapides et indépendantes de la température, les réactions biochimiques du photosystème II sont lentes et sensibles à une baisse de température. Le froid entraîne donc une désynchronisation des deux systèmes. Le photosystème I devra transférer le surplus d'électrons à l'oxygène produisant ainsi des espèces d'oxygène réactifs (ROS : reactive oxygen species) (Winfield *et al.*, 2010). Les ROS ont un rôle clé dans la perception du froid et d'autres stress puisqu'ils agissent également sur les canaux calciques. Ensemble, la rigidification de la membrane causée par une baisse de température et l'augmentation de la production de ROS provoquent l'ouverture de canaux calciques et un influx de Ca^{2+} dans le cytosol. Cet influx d'ions calciques est alors perçu par des protéines se liant au calcium (CBP : Ca^{2+} binding protein). En se liant au calcium, les CBPs changent de conformation et activent ou inactivent des protéines à la base de la cascade de signalisation menant à la transcription de gènes associés à l'acclimatation au froid (Winfield *et al.*, 2010).

1.3 Les facteurs de transcription impliqués

La famille de facteurs de transcription ICE (Inducer of CBF Expression) compte parmi les premières molécules impliquées dans la cascade de signalisation de l'acclimatation au froid. Celle-ci regroupe des gènes codant pour des protéines de type MYC bHLH (basic helix-loop-helix), capable de se lier à la région MYC (CANNTG) du promoteur de certains gènes CBF et ainsi induire leur transcription (Chinnusamy *et al.*, 2010). Chez le blé, les gènes *ICE41* et *ICE87* sont exprimés de manière constitutive et *trans*-activent les gènes *CBF* du groupe CBFIVd (Badawi *et al.*, 2008). Des mutants produits chez *Arabidopsis thaliana*, déficients pour le gène *ICE1*, sont incapables de s'acclimater au froid (Chinnusamy *et al.*, 2003). Inversement, la surexpression des gènes *TaICE41* ou *TaICE87* dans *Arabidopsis* augmente les niveaux d'expression des gènes *CBF*. Une augmentation de la tolérance

au gel est cependant observée uniquement suite à une acclimatation au froid (Badawi *et al.*, 2008). Ces derniers résultats suggèrent que les ICE ne sont pas actives dans leur forme native. Une modification post-traductionnelle, possiblement indirectement causée par le froid, serait nécessaire pour leur activation. Lors de l'exposition au froid, les ICE subissent une sumoylation par la ligase SUMO E3 ce qui a pour effet de les activer et de réduire leur taux de dégradation par le protéasome (Chinnusamy *et al.*, 2010). Cette modification post-traductionnelle permettrait ultimement l'induction des gènes *CBF* reliés à l'acclimatation au froid.

Les gènes *CBF* comptent parmi les facteurs de transcription associés au froid les mieux connus et sont rapidement induits lors d'un stress au froid. Chez le blé, plus de la moitié des gènes associés à la réponse au froid sont induits par cette famille de facteurs de transcription (Winfield *et al.*, 2010). Ceux-ci font partie de la famille de protéine AP2/EREBP se liant à un motif conservé de 5 paires de bases nommées CRT/DRE (C-repeat/déhydratation responsive element), CCGAC, présent dans le promoteur de plusieurs gènes de réponse au froid et à la déshydratation (Jaglo *et al.*, 2001). Les gènes *CBF* se distinguent des autres membres de la famille AP2/EREBP par deux séquences d'acides aminés, PKK/RRAGRxxFxETRHP et DSAWR, fortement conservées, bordant le domaine AP2/EREBP (Jaglo *et al.*, 2001). Les gènes *CBF* ont été classifiés en différents groupes grâce à des études phylogénétiques (Badawi *et al.*, 2007). Chez le blé hexaploïde, on dénombre au moins 15 gènes *CBF* dont la majorité appartient au groupe IV. De plus, ceux appartenant aux groupes CBFIIIId, IVa, IVb, IVc et IVd sont exprimés plus fortement chez les cultivars d'hiver (Badawi *et al.*, 2007). Ces gènes sont exprimés lors de l'exposition au froid selon un cycle circadien, ce qui implique également une régulation par la photopériode. En effet, les gènes *CBF* des groupes IIIId, IVa, IVb, IVc et IVd ont une plus forte expression après environ 6h d'exposition à la lumière. Il est supposé que, bien que leur expression ne coïncide pas avec la période la plus froide de la journée, ils soient

exprimés plus fortement en après-midi de manière à induire les molécules effectrices protégeant la plante contre le froid lors de la période la plus froide, la nuit. De plus, certains CBF (*HvCBFIVa-2* et *HvCBFIVd-A4*) ont une plus grande affinité pour le motif CRT/DRE lors de l'exposition aux basses températures (Xue, 2003; Skinner *et al.*, 2005). Les facteurs de transcription CBF des groupes IV seraient donc régulés par ICE, par la photopériode et par la température. Ils ont un rôle important dans la plus grande résistance au gel chez les variétés de blé d'hiver et sont des régulateurs importants dans le processus d'acclimatation au froid chez les céréales des climats tempérés en général.

La famille de facteurs de transcription WRKY regroupe des protéines ayant un domaine WRKY fortement conservé chez les plantes. Ce domaine d'environ 60 acides aminés comprend la séquence signature WRKYGQK, en N-terminal, ainsi qu'une structure à doigts de zinc, en C-terminal. Le domaine WRKY a une affinité pour la séquence de nucléotides TTGACC/T nommée boîte W. Cet élément de régulation *cis* a été identifié dans le promoteur de plusieurs gènes associés à la signalisation de l'acide abscissique tel qu'*ABF*, *MYB*, *DREB* et *RAB*. La boîte W a également été identifiée dans le promoteur de gènes associés à la réponse aux stress abiotiques tel que *COR47*. Dans plusieurs cas, la boîte W apparaît plus d'une fois dans les promoteurs ciblés par WRKY. Certains facteurs de transcription de cette famille agissent à la fois comme activateur et répresseur de la transcription (Rushton *et al.*, 2012). Ils ont également été associés à la synthèse de métabolites tel que les glucanases, chitinases et thaumatines qui jouent un rôle important dans la tolérance au gel (Winfield *et al.*, 2010).

Certains membres des familles de facteurs de transcription MYB (myeloblastose) et MYC (myelocytomatose) sont également induits lors de l'exposition au froid (Theocharis *et al.*, 2012). Les MYB sont caractérisés par leur domaine de liaison à

l'ADN, le domaine MYB. Celui-ci est constitué d'une à quatre séquences répétées d'acides aminés formant chacune trois hélices α . La famille est divisée en sous-groupes selon le nombre de ces séquences répétées ainsi que leur homologie. Ces facteurs de transcription sont représentés chez la plupart des eucaryotes et occupent plusieurs fonctions diverses chez les végétaux. Ils ont été impliqués dans des parties importantes de la régulation du métabolisme des plantes tel que la synthèse des flavonoïdes, des tannins et des parois cellulaires. Ils régulent des gènes liés à la différenciation cellulaire et au développement de la plante en général. Certains sont impliqués dans la voie de signalisation de l'ABA et régulent la réponse aux stress biotiques et abiotiques. AtMYB15 est impliqué dans la tolérance au froid, AtMYB2 contrôle l'induction d'ABA lors de la réponse à la déshydratation et AtMYB102 et AtMYB41 agissent dans le système de défense contre les insectes. Les facteurs de transcription MYB interagissent avec le promoteur de leur gène cible en se liant à la séquence consensus C/TAACG/TG (Dubos *et al.*, 2010). Les facteurs de transcription MYC quant-à-eux, font partie de la famille des hélice-boucle-hélice basiques (basic helix-loop-helix). Ils régulent l'expression de gènes ayant des boîtes G (CANNTG) et boîtes T/G (AACGTG) dans leur promoteur. Ils sont impliqués dans la signalisation du jasmonate ainsi que dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Abe *et al.*, 2003). Ultiment, ces facteurs de transcription et d'autres régulent des mécanismes capables de protéger la plante contre les dommages causés par le froid et le gel.

1.4 Les molécules effectrices

Parmi les effecteurs, on retrouve les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Ce groupe a été nommé parce qu'il est exprimé fortement dans les stades tardifs du développement de l'embryon (Dure *et al.*, 1981). Un sous-groupe des LEA, les déhydrines ou LEA-D11, s'accumule également dans les tissus végétatifs lors de divers stress. Les déhydrines ont également été nommées RAB (Response to Abscisic

Acid) puisque leur expression est aussi induite par la phytohormone ABA (Ingram et Bartels, 1996). Le groupe des déhydrines est caractérisé par la présence d'une séquence d'acide aminés riche en lysine fortement conservée chez les plantes, le segment K (EKKGIME/DKIKEKLPG), présent de une à onze fois. Certaines ont également d'autres motifs conservés. Un segment riche en tyrosine, le segment Y ((V/T)D(E/Q)YGNP), peut être présent dans la région N-terminale. Un segment riche en sérine, caractérisé par une succession de quatre à dix résidus sérine (LHRSGS4-10(E/D)3), peut également être présent (Hanin *et al.*, 2011). À cause de ces régions conservées, les déhydrines adoptent des structures différentes en fonction de leur microenvironnement. Sous des conditions de déshydratation, le segment K forme une hélice- α amphipathique. Sous cette conformation, le polypeptide a tendance à former des liens hydrogène avec d'autres protéines ou avec des membranes. Par ces interactions, les déhydrines protègent les protéines auxquelles elles sont liées en réduisant leur perte d'eau et en aidant à conserver leur structure secondaire. De cette manière, elles permettent à ces protéines de conserver leur fonction dans un environnement pauvre en eau et même d'éviter leur dénaturation. Pour cette raison, les déhydrines sont parfois qualifiées de chaperonnes (Hanin *et al.*, 2011). L'expression des déhydrines est inductible par différents stress abiotiques. On retrouve dans leur promoteur plusieurs séquences régulatrices avec lesquels interagissent des facteurs de transcription ou hormones tel que: l'élément de réponse à l'acide abscissique (ABRE, Abscisic acid Responsive Element), les éléments régulateurs myeloblastose (MYB) et myelocytomatose (MYC), et l'élément de réponse aux basses températures et à la sécheresse (CRT/DRE/LTRE, C-repeat / drought-responsive / low-temperature responsive element). Par ces éléments présents dans leurs promoteurs, les déhydrines subissent une régulation par les facteurs de transcription CBF, MYB et MYC dont nous avons parlé plus haut. Elles sont également induites par l'acide abscissique, une hormone impliquée dans la signalisation de la réponse au froid (Hanin *et al.*, 2011). Les déhydrines WCOR410 et

WLT10, spécifiques au blé, sont reconnues pour s'exprimer plus fortement lors de l'acclimatation au froid chez les variétés d'hiver que chez celles de printemps. De plus, elles sont exprimées à différents niveaux en fonction de la photopériode (Danyluk *et al.*, 1994; Ohno *et al.*, 2001).

La famille de protéine WCS (Wheat cold-specific) a été identifiée chez le blé. Ces protéines appartiennent également aux LEA et présentent certaines homologies avec les membres des déhydrines. Cette famille regroupe des protéines de masse moléculaire variant de 12 à 200 kDa et sont fortement exprimées lors de l'acclimatation au froid. On y retrouve cinq membres majeurs : WCS200 (200kDa), WCS180 (180kDa), WCS66 (66kDa), WCS120 (50kDa) et WCS40 (40kDa) (Sarhan *et al.*, 1997). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un segment-K, riche en lysine ainsi qu'une séquence riche en glycine, le segment- ϕ (GGTYGQ(Q/H)GH(T/A)G). À cause des homologies autant au niveau de leur structure primaire que secondaire, les WCS sont généralement considérées comme des déhydrines. Comme chez les déhydrines, le segment-K forme une hélice- α amphipathique dans des conditions de déshydratation, permettant de protéger les protéines et membranes contre des changements de conformation provoqués par la déshydratation (Thomashow, 1999). Elles sont très fortement exprimées et leur présence sert de marqueur moléculaire du niveau de tolérance au gel chez les graminées. Leur niveau d'expression est également utilisé comme moyen de comparaison entre les variétés de blé d'hiver et de printemps (Vitamvas et Prasil, 2008) tel que proposé par Houde *et al* (Houde *et al.*, 1992).

Parmi les autres métabolites protégeant la cellule contre le stress induit par le froid, on retrouve notamment des capteurs de radicaux libres (ROS scavengers). Bien que les ROS soient impliquées dans la signalisation du froid, elles sont néfastes pour la cellule lorsque présentes en trop grande quantité. Les ROS peuvent causer des

dommages irréversibles à plusieurs organelles et ultimement entraîner la mort cellulaire. Les chloroplastes y sont notamment très sensibles. La cellule produit donc plusieurs molécules antioxydantes ayant, entre autres, le rôle de capter ces radicaux libres et d'atténuer leur effet. L'acide ascorbique, la proline, le glutathion, la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase, la catalase, la glutathion peroxydase et la peroxyredoxine sont tous des métabolites ou enzymes ayant pour rôle d'atténuer les dommages provoqués par une surabondance de ROS (Gill et Tuteja, 2010).

Les plantes soumises à un stress au froid ou à la sécheresse produisent également une large gamme de molécules osmoprotectrices comme des sucres et des stérols. Ces molécules augmentent la pression osmotique intracellulaire et réduisent les dommages associés à la déshydratation. De plus, les sucres protègent la membrane cellulaire en formant des liaisons hydrogène avec les lipides membranaires. De cette manière, les sucres stabilisent la membrane (Theocharis *et al.*, 2012). Lors de l'acclimatation au froid, la plante produit des chitinases, des glucanases et des thaumatines qui s'accumulent dans les parois cellulaires et dans l'espace intercellulaire. Ces protéines se lient aux cristaux de glace et inhibent leur croissance. De plus, elles réduisent la recristallisation de la glace lorsque la température fluctue empêchant ainsi la migration des molécules d'eau des plus petits cristaux vers les plus grands. Bien qu'elles n'aient pas de domaine de liaison à la glace, leur structure tridimensionnelle présente une surface de liaison à la glace. Par cette surface, ces protéines sont capables de former des liaisons hydrogène avec les cristaux de glace (Yeh *et al.*, 2000; Griffith et Yaish, 2004). TaIRI-1 et TaIRI-2 (*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibitor) sont deux protéines inhibant la recristallisation de la glace spécifiques aux graminées. Elles contiennent un domaine N-terminal riche en leucine ainsi qu'un domaine C-terminal ayant une forte homologie avec les protéines inhibant la recristallisation mentionnées plus haut (Tremblay *et al.*, 2005).

Tous ces métabolites et protéines agissent ensemble pour diminuer les dommages à la cellule causés par la déshydratation due au froid. Ensemble, elles permettent d'augmenter la tolérance au gel des plantes acclimatées au froid.

1.5 La floraison et la vernalisation

La floraison est probablement l'étape la plus importante de la vie des plantes. Elle consiste en la transition entre les phases végétative et reproductive. À la fin de la phase végétative, le méristème apical commence à former le bourgeon terminal. Ensuite vient la transition caractérisée par le gonflement de l'apex au niveau de la zone axiale du méristème. Cette transition est très importante puisque c'est lors de cette étape que la plante acquiert sa capacité d'induire la floraison. Le gonflement se transformera ensuite en méristème floral puis en fleur (Simpson *et al.*, 1999). Pour permettre une reproduction efficace, il est important que la floraison se produise à une période de l'année où la température et la photopériode sont adéquates. Pour y parvenir, les plantes ont développé des moyens de sentir les changements de photopériode et de température. Les plantes des climats tempérés ont tendance à synchroniser leur floraison au printemps, lors du retour vers des températures plus chaudes, alors que les plantes tropicales fleurissent généralement après les canicules de la saison estivale. Chez le blé, qu'il soit de variété printanière ou hivernale, la floraison est initialement sous contrôle circadien. Le gène *Constans* (CO) est exprimé uniquement dans la journée, et beaucoup plus fortement après huit à neuf heures de lumière. Sa protéine est également stabilisée par la lumière (Greenup *et al.*, 2009). De cette manière, en période de jours courts, la protéine est plus fortement exprimée en soirée et se dégrade rapidement dans la nuit. Inversement, lorsque les jours deviennent plus longs au printemps, la protéine est exprimée plus fortement en après-midi et a suffisamment de temps avant sa dégradation pour jouer son rôle de facteur de transcription. CO est une protéine à doigts de zinc et sa structure comporte un

domaine CCT (CO, CO-like, Timing Of Cab1 expression 1 (TOC1)). Chez la plante modèle *Arabidopsis*, CO interagit avec d'autres protéines ayant un domaine CCT, tel que Heme Activating Protein 3 et 5 (HAP3 et HAP5), et se lie à la boîte CCAAT présente dans le promoteur du gène central régulant la floraison, *Flowering Locus T* (FT), induisant ainsi sa transcription (Greenup *et al.*, 2009). Chez le blé, HAP3 et HAP5 sont absentes. Par contre, une autre protéine à domaine CCT, Photoperiod1 (PPD1) module l'activité de CO. Comme CO, PPD1 est exprimé sous le contrôle de la photopériode. Ensemble, ces deux protéines régulent l'expression de FT (Greenup *et al.*, 2009). Lorsque CO et PPD1 sont produits dans les organes sensoriels de la photopériode, les feuilles, ils induisent la transcription de FT.

FT est également régulé par la vernalisation. Lorsque la période de froid se prolonge, 49 jours en moyenne pour le blé, on dit alors que les plantes sont vernalisées. Le gène *Vernalization2* (VRN2) code pour une protéine à doigts de zinc ayant un domaine CCT. Cette protéine est exprimée lorsque la photopériode est longue. VRN2 retarde la floraison en inhibant l'expression de FT. Lors de la vernalisation, l'expression de VRN2 est diminuée ce qui permet l'expression de FT (Greenup *et al.*, 2009). Cette diminution dans l'expression de VRN2 est possiblement régulée par VRN1, un gène de la famille des MADS-box appartenant à la sous-famille Apetala1/Squamosa identifiée chez diverses dicotylédones et monocotylédones. Chez le blé hexaploïde *Triticum aestivum*, le gène VRN1 est situé dans l'intervalle VRN1-FR1 sur le chromosome 5 (Galiba *et al.*, 1995). Ce gène est exprimé de manière constitutive dans les variétés printanières mais n'est pas exprimé dans les variétés d'hiver avant que la vernalisation soit complète (Danyluk *et al.*, 2003). En effet, l'action prolongée des basses températures augmente le taux de méthylation de la quatrième lysine de l'histone 3 (H3K4me3) des nucléosomes où se trouvent les régions promotrices de VRN1 et de FT chez le blé d'hiver. Cette méthylation est généralement associée à un relâchement de la chromatine, ce qui permet au gène d'être transcrit. De plus, cette

modification de la chromatine est transmissible de cellule mère à cellule fille, ce qui supporte la thèse que la plante garde une mémoire de la vernalisation (Diallo *et al.*, 2012). Un autre membre de la famille des MADS-box, le gène *VRT2* (Vegetative to Reproductive Transition 2), semble avoir un rôle dans la floraison du blé d'hiver. Son expression est modulée par le traitement au froid et il serait capable de collaborer avec *VRN2* pour réprimer l'expression de *VRN1* (Kane *et al.*, 2007). Ensemble, *VRN1* et *VRN2* déterminent si la variété de blé nécessite une vernalisation pour fleurir. Chez certaines variétés, *VRN1* est exprimé sans l'apport de la vernalisation. D'autres ont une délétion dans le gène *VRN2* le rendant inactif et permettant à *FT* d'être sous le contrôle unique de *CO* et de la photopériode. D'autres encore ont une insertion dans le promoteur de *FT*, ce qui a pour effet de rendre impossible sa régulation par *VRN2*. Les variétés ayant l'une ou l'autre de ces caractéristiques sont considérées comme étant des blés de printemps puisqu'elles ne nécessitent pas de vernalisation pour fleurir (Greenup *et al.*, 2009). Suite à la vernalisation, les variétés de blé d'hiver se comportent de la même façon que les blés de printemps et seront capables de produire la protéine *FT* lors de l'augmentation de la photopériode.

FT est généralement produite dans les feuilles, elle circule par les canaux de phloème et s'accumule à l'apex (Mathieu *et al.*, 2007). Elle y interagit avec le facteur de transcription Flowering Locus D (*FD*) et y induit la transcription du gène identitaire de la transition florale *Apetala1* (*AP1*), un membre de la famille MADS. Avec d'autres gènes identitaires du méristème floral, comme *AP2*, *AP3*, *Pistillata* (*PI*), *Sepallata1* (*SEP1*), *SEP2*, *SEP3* et *Agamous* (*AG*), il provoque la différenciation des cellules du méristème en organes floraux selon le modèle ABC (Jack, 2001).

1.6 La régulation post-transcriptionnelle et les petits ARN

La régulation post-transcriptionnelle est impliquée dans la plupart des mécanismes de la cellule. La transition entre les phases végétative et reproductrice, la floraison, la vernalisation et l'acclimatation au froid n'y font pas exception. Après la transcription d'un gène en ARN messager, alors nommé pré-messager, ce dernier subit plusieurs étapes de maturation avant d'être ultimement traduit en protéine. L'ajout d'une coiffe en 5', l'ajout d'une queue poly-adénylée ainsi que l'épissage des introns sont des étapes de maturation essentielles pour la plupart des ARNs pré-messagers. Chez les plantes, près de 20% des gènes sont soumis à un épissage alternatif. Ce dernier joue un rôle important dans la régulation de la photosynthèse, la floraison et la défense contre les stress abiotiques et biotiques (Chinnusamy *et al.*, 2010). Ces étapes sont la forme la plus connue de régulation post-transcriptionnelle. Cependant, les ARN messagers, matures et pré-messagers, sont également soumis à une régulation par de petits ARN non codants de taille variant entre 21 et 24 nucléotides. Ceux-ci peuvent réprimer la traduction, réguler la transcription et même induire la dégradation de certains ARN messagers (Fei *et al.*, 2013). Les petits ARN sont classés en différentes catégories en fonction de leur provenance et de leur biogénèse. Chez les plantes, on retrouve les petits ARN interférants de l'hétérochromatine (heterochromatic small interfering RNAs, hc-siRNA), les petits ARN interférants secondaires en phase (phased, secondary small interfering RNA, phasiRNA), les petits ARN interférants anti-sense naturels (natural antisense transcript small interfering RNA, NAT-siRNA) et les microARNs (miRNA) (Fei *et al.*, 2013). Ils ont en commun d'être tous produits par la même famille d'endoribonucléase, Dicer-Like (DCL) et d'être ultimement chargés dans une protéine de la famille argonaute (AGO) leur permettant ainsi de cibler une séquence d'acide nucléique complémentaire et de réguler un gène cible.

Des études récentes ont également montré que les petits ARN sont mobiles et qu'ils peuvent donc avoir un effet régulateur dans un organe différent de celui où ils sont produits (Fei *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013). Plus de 700 microARNs ont été détectés chez l'humain, soit de un à trois pourcent de notre génome. On estime cependant qu'ils régulent plus de 30% des gènes codants pour des protéines. Certains virus à ADN tel que la famille des *Herpesvirus* ont également des séquences codant pour des microARNs dans leur génome (Meyer *et al.*, 2011). Chez les plantes, les microARNs ciblent moins d'un pourcent des gènes codants. Leur impact n'est cependant pas négligeable puisque ces gènes sont en grande partie des facteurs de transcription. À cause de leurs cibles, les microARNs des plantes sont donc indirectement impliqués dans la régulation d'une quantité impressionnante d'étapes du développement des plantes et de leur réponses aux stress (Sunkar *et al.*, 2012).

1.7 La biogénèse des micros ARN

Chez les plantes, la plupart des microARNs sont codés par leur propre unité transcriptionnelle. Certains sont transcrits à partir de séquences polycistroniques générant de multiples miARN mais le phénomène est rare chez les plantes. Chez les animaux, les gènes *MIR* peuvent se trouver dans les régions inter-géniques, introniques ainsi que sur des exons. De plus, les séquences polycistroniques sont très fréquentes (Hussain, 2012). Les gènes *MIR* sont transcrits par l'ARN polymérase II, produisant ainsi un transcrit primaire nommé pri-miRNA. Comme pour les ARN messagers, ce dernier est stabilisé par l'ajout d'une coiffe méthyleguanosine en 5' et d'une queue poly-adénylée en 3'. L'ARN polymérase II est recrutée aux promoteurs des gènes *MIR* par le coactivateur de transcription Mediator, ce dernier interagissant avec la boîte TATA (Kim *et al.*, 2011). Plus de 21 éléments de régulation *cis* sont surreprésentés dans les séquences promotrices des gènes *MIR*, ce qui implique qu'ils soient régulés par plusieurs facteurs de transcription. Le facteur de transcription

Fusca3 est nécessaire à la transcription de certains membres de la famille *miR156* (Wang et Perry, 2013), *Apeta2* est recruté aux loci *MIR156* et *MIR172* et régule leur expression (Yant *et al.*, 2010), Short Vegetative Phase (SVP) interagit avec le motif CArG du promoteur de *miR172a* pour réprimer sa transcription (Cho *et al.*, 2012) et l'expression de *miR398* en réponse à une faible concentration de cuivre est régulée par l'expression de Squamosa Promoter binding protein-Like 7 (SPL7) (Yamasaki *et al.*, 2009).

Après sa transcription, le pri-miRNA se replie sur lui-même à cause de plusieurs régions partiellement complémentaires et forme la structure secondaire de type "stem-loop". Cette structure caractéristique des pri-miARN consiste en un long appariement imparfait d'environ 30 paires de bases ayant des extrémités 5' et 3' simple-brin (Hussain, 2012). Le pri-miARN est alors pris en charge par une enzyme de la famille ARNase III, Dicer-Like (DCL). Cette famille d'endonucléases reconnaît l'ARN double brin et clive le pri-microARN au début de la région appariée, libérant ainsi le pré-microARN. Celui-ci a une structure en épingle à cheveux spécifique des pré-microARNs. Le pré-microARN est lui aussi clivé une ou plusieurs fois par DCL pour finalement produire un duplex miARN/miARN* ayant 2 nucléotides non appariés aux extrémités 3'. Les divers membres de la famille DCL génèrent des petits ARN de taille différente: 21 nucléotides pour DCL1 et DCL4, 22 nucléotides pour DCL2 et 24 nucléotides pour DCL3 (Xie *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2005b; Cuperus *et al.*, 2010). Des microARNs de 19 et 20 nucléotides ont également été identifiés et sont possiblement produits par DCL1 (Reinhart *et al.*, 2002; Kurihara et Watanabe, 2004). Notre groupe et d'autres ont même détecté des évidences suggérant l'existence de micro ARN de 16 et 17 nucléotides (Meyer *et al.*, 2011; Valen *et al.*, 2011). En plus de leur rôle général de microARN régulateur post-transcriptionnel, il semble que les différentes tailles de miARN les rendent fonctionnellement distincts. Les microARNs de 21 et 22 nucléotides ont la capacité de déclencher la production de petits ARN interférants à

action *trans* (TasiRNA) et de petits ARN interférants (siRNA) respectivement (Fei *et al.*, 2013). Le clivage des pri-microARN et pré-microARN par DCL est assisté par trois protéines se liant à l'ARN. La protéine à domaine G Tough (TGH), la protéine à doigts de zinc Serrate (SE) ainsi que la protéine à domaine de liaison ARN double-brin Hyponastic Leaves 1 (HYL1) sont essentielles au recrutement et au positionnement de DCL sur le précurseur du microARN. Ces trois protéines régulent, avec DCL, l'accumulation du duplex microARN/microARN* et donc la production de microARN mature (Kurihara *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2012). Ce duplex est ensuite stabilisé par une méthylation des extrémités 3' par HUA Enhancer 1 (HEN1). Cette méthylation est essentielle à la stabilité du microARN mature. HEN1 est présent dans le noyau et le cytoplasme de la cellule et aucune étude n'a pu démontrer si la méthylation avait lieu avant ou après que le duplex microARN/microARN* ait quitté le noyau (Fang et Spector, 2007). Chez les animaux, ce dernier se lie alors à Exportine 5 qui le transporte vers le cytoplasme. Chez les plantes, l'homologue d'Exportine 5, Hasty (HST) est nécessaire à l'accumulation des microARNs mais ne semble pas impliqué dans le transport entre le cytoplasme et le noyau. Il pourrait cependant avoir un rôle à jouer dans leur stabilité, un autre rôle d'Exportine 5 (Park *et al.*, 2005).

Après son arrivée dans le cytoplasme, le duplex microARN/microARN* interagit avec plusieurs protéines pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex). La protéine centrale de ce complexe, Argonaute (AGO), appartient à une famille de protéines ayant un domaine PAZ, un domaine MID et un domaine PIWI (Hussain, 2012). Le brin mature du microARN est séparé de son brin passager, microARN*, et est chargé dans AGO. Le nucléotide en position 5' est la caractéristique principale déterminant quel membre de la famille AGO sera utilisé. La majorité des microARNs ont une uridine en position 5' et sont chargés dans AGO1. Parmi les 10 membres de la famille AGO répertoriés chez *Arabidopsis*, la plupart

s'expriment différemment d'un tissu à un autre, influençant également quelle protéine AGO sera utilisée par le microARN. Le choix du brin mature du microARN est déterminé par sa plus grande stabilité thermodynamique ainsi que par la position des protéines liant l'ARN impliquées plus tôt, tel que HYL1. L'identité du brin principal et du brin passager pourrait donc être déterminée lors des premières étapes de maturation du pri-microARN (Rogers et Chen, 2013). La protéine AGO est associée à la protéine chaperonne Heat Shock Protein 90 (HSP90) et à Squint (SQN). La dissociation du brin passager du complexe est associée à la dissociation de HSP90 et SQN de AGO. L'ordre des événements n'est pas encore clair, mais la dissociation de HSP90 pourrait déclencher un changement de conformation de AGO, ce qui induirait la séparation entre le brin principal et le brin passager du duplex microARN/microARN*. Le complexe RISC chargé du microARN peut maintenant effectuer une régulation des ARN messagers ayant une séquence complémentaire au microARN. Le brin passager sera quant-à-lui dégradé par Small RNA Degrading Nuclease (SDN), une famille de protéines ayant une activité 3'-5' exoribonucléase et ayant comme substrat les petits ARN simple brin (Ramachandran et Chen, 2008). Alternativement, le brin principal du microARN peut également s'associer à un ARN circulaire d'environ 100 nucléotides, ayant une séquence parfaitement complémentaire à la sienne. Le rôle présumé de ces ARN circulaire serait de réguler l'expression des microARNs en agissant comme des éponges. Certains proposent également un rôle dans le transport des petits ARNs entre les différents organes (Hansen *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013).

1.8 La régulation par les microARNs

La régulation par les microARNs est basée une complémentarité plus ou moins parfaite entre la séquence du microARN et celle de sa cible. La région complémentaire de la cible est généralement comprise dans la région 3'-UTR de

l'ARN messenger. Chez les animaux, cette complémentarité est souvent limitée aux huit à dix nucléotides en 5' du microARN. On nomme cette portion séquence de nucléation (seed sequence). Une complémentarité parfaite entre cette séquence et l'ARN messenger cible est essentielle dans tous les cas répertoriés. Chez les plantes le niveau de complémentarité entre le microARN et sa cible est généralement presque parfait. Il implique obligatoirement la séquence de nucléation mais peut comprendre quelques nucléotides non-appariés dans la région 3' du microARN (Rogers et Chen, 2013). Une fois chargé dans le complexe RISC, les microARNs ont plusieurs méthodes pour réprimer l'expression de leur ARN messenger cible. La voie de régulation utilisée dépend de la protéine AGO impliquée, du niveau de complémentarité entre la séquence du microARN et de sa cible ainsi que de la position de la région complémentaire sur l'ARN messenger cible.

Le mode de régulation le plus répandu chez les plantes est le clivage de l'ARN messenger cible. Le domaine PIWI présent dans la protéine AGO forme une pochette enzymatique ayant une activité semblable à la ribonucléase H et est capable de cliver un ARN messenger complémentaire à la séquence du microARN. Cette activité enzymatique a été démontrée pour AGO1, 2, 4, 7 et 10 chez *Arabidopsis* (Rogers et Chen, 2013). Pour permettre le clivage de leur cible, un très fort niveau de complémentarité du microARN est requis. Ce mode de régulation permet au plus deux à trois nucléotides non-appariés. Après leur clivage, les ARN messagers cibles se séparent du complexe RISC et sont sujets à une dégradation par des exoribonucléases tel que XRN1 et XRN4. Celles-ci sont impliquées dans la dégradation des produits de clivage 3'. Le fragment 5' est quant-à-lui poly-adenylé ou poly-uracilé à son extrémité 3' et est ensuite dirigé vers l'exosome pour sa dégradation (Ibrahim *et al.*, 2006). Certains produits de clivage ne sont pas immédiatement dégradés. La biogénèse des tasiARNs s'amorce par le clivage de leur transcrit par un complexe RISC chargé d'un microARN de 22 nucléotides. Dans ce

cas, Suppressor of Gene Silencing3 s'associe avec le complexe RISC, stabilise les produits de clivage 3' et 5', et permet à l'ARN polymérase 6 (RDR6 : RNA-Dependant RNA polymerase 6) de générer des fragments double-brin (Cuperus *et al.*, 2010). Une fois libéré de l'ARN messager complémentaire, le complexe RISC est de nouveau apte à s'associer à une nouvelle cible et à induire sa dégradation.

Chez les animaux le clivage est rare puisque la complémentarité entre le microARN et sa cible est généralement limitée à la région 5' du micro ARN. Le complexe RISC déstabilise plutôt l'ARN messager cible en induisant la dégradation de sa queue poly-adénylée. La protéine Decapping2 (DCP2) catalyse ensuite le retrait de la coiffe par un complexe formé de Decapping1 (DCP1) et Varicose (VCS) (Xu *et al.*, 2006). Sans sa coiffe et sa queue poly-adénylée, l'ARN messager est moins stable et est susceptible d'être dégradé par des nucléases. Aucune évidence de ce procédé n'a encore été démontrée chez les plantes mais des analyses du dégradome ont montré que pour certains ARN messagers cibles, aucun produit de clivage n'était présent (German *et al.*, 2008). Il est donc possible que la grande prépondérance du clivage chez les plantes masque cette voie de régulation. De plus, la déstabilisation de l'ARN messager cible est généralement précédée d'une inhibition de sa traduction, un autre mode de régulation des microARNs commun chez les animaux et dont certaines évidences laissent penser qu'il serait également présent chez les plantes.

Cette troisième voie de régulation est celle utilisée par la majorité des microARNs chez les animaux et est généralement associée avec un plus faible niveau de complémentarité avec l'ARN messager cible. L'évidence majeure de cette voie chez les plantes est que l'expression de certains ARN messagers cibles ne diminue pas avec la surexpression de leur microARN alors que l'expression de la protéine est diminuée (Chen, 2004; Brodersen *et al.*, 2008). L'association entre AGO1, des microARNs et des polysomes a également été détectée (Lanet *et al.*, 2009). On sait

que la séquence source doit être parfaitement homologue avec la cible mais aucune donnée ne montre le niveau d'homologie requis entre le microARN complet et sa cible pour que celle-ci soit clivée plutôt que sa traduction inhibée. Les protéines AGO1 et AGO10 ont été associées avec l'inhibition de la traduction mais peuvent également induire le clivage. La protéine à domaine GW SUO interagit avec le domaine PIWI de AGO pour faciliter la répression de la traduction. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'inhibition de la traduction par les microARNs. Certaines évidences laissent penser que les microARNs inhibent l'initiation de la traduction. Le complexe RISC interfère avec le recrutement de eIF4E (eukaryotic Initiation Factor4E) à la coiffe de l'ARN messager cible (Mathonnet *et al.*, 2007). D'autres données montrent une répression de la traduction par une inhibition de la formation du complexe ribosomal mature (Thermann et Hentze, 2007). L'inhibition de la traduction peut également survenir après l'étape d'initiation par une dissociation prématurée de l'ARN messager et du ribosome (Petersen *et al.*, 2006).

Très récemment, des études ont démontré que certains microARNs étaient également impliqués dans une activation de la traduction. Une interaction entre *miR10a* et la région 5'-UTR de plusieurs ARN messagers codants pour des protéines ribosomales provoquerait une augmentation de leur traduction en réponse à certains stress abiotiques (Orom *et al.*, 2008). Dans une autre étude, un microARN spécifique au foie, *miR122*, active la traduction de son ARN messager cible, *HCV*, lorsqu'il se lie à la région 5'-UTR, mais en inhibe la traduction s'il se lie à la région 3'-UTR (Henke *et al.*, 2008; Jopling, 2008). Des analyses additionnelles seront requises afin de mieux comprendre pourquoi certains microARNs induisent le clivage de leur cible alors que d'autres la déstabilisent et d'autres encore agissent au niveau de sa traduction en l'inhibant ou l'activant.

En plus de leur rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes, certains microARNs sont capables de déclencher la méthylation de l'ADN et sont donc impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Chez le riz, certains microARNs de 24 nucléotides produits par DCL3 et associés à AGO4 induisent la méthylation de gènes MIR (Wu *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis*, une mutation du gène *ago6* a permis de l'associer aux méthylations de type CpG alors que le mutant *ago4* produit significativement moins de méthylations non-CpG (Zheng *et al.*, 2007). La méthylation de l'ADN impliquant AGO n'est cependant pas spécifique aux microARNs. Les siARNs et hc-siARNs peuvent également servir de brin guide pour déterminer le locus à méthyler.

1.9 Le rôle des microARNs chez les plantes

Chez *Arabidopsis*, de nombreuses études ont été faites pour identifier les gènes cible des microARNs. On a constaté qu'ils étaient impliqués dans une diversité de voies de signalisation chez les cellules végétales. Les microARNs tiennent des rôles importants dans la régulation de la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Lors de stress tel que la sécheresse et la salinité, des études ont détecté une augmentation de l'expression de *miR393*, *miR160* et *miR167*. Ces derniers ciblent les facteurs de transcription de type bHLH (*miR393*) et les facteurs de réponse aux auxines (*ARF*, *miR160* et *miR167*) respectivement. Une diminution de l'expression de *miR169* ciblant le facteur de transcription nucléaire NFYA5 est également associée à ces stress. La sécheresse induit également l'expression de *miR166*, *miR156*, *miR171* et *miR408* dans les feuilles sans affecter leur expression dans le reste de la plante, à l'exception de *miR166* qui est réprimé dans les racines. Les stress au froid et à la chaleur modifient également les niveaux d'expression de *miR156*, *miR168*, *miR169* et *miR172* pour ne nommer que les mieux connus. *miR156* cible les facteurs de transcription Squamosa Promoter binding protein-Like (SPL) impliqués dans la

transition entre les phases végétatives et reproductives, *miR172* cible *Apetala2* et ses homologues, impliqués dans la floraison, alors que *miR168* cible *AGO1* dont nous avons traité précédemment. *miR398* est impliqué dans la réponse à la privation de cuivre et réduit l'expression de deux superoxydes dismutase, *CSD1* et *CSD2*. *miR395* et *miR399* ciblent le transporteur de sulfate *AST68* et le transporteur de phosphate *PHO1* respectivement (Xie *et al.*, 2005a; Sunkar *et al.*, 2012). Plusieurs microARNs sont également impliqués dans la défense contre les agents pathogènes et dans la signalisation des auxines (Navarro *et al.*, 2006). Parmi les 23 facteurs de transcription ARF connus chez *Arabidopsis*, 8 sont ciblés par des microARNs. De plus, *miR393* cible *TIR1*, un récepteur des auxines. Des études récentes montrent également que le brin passager *miR393** s'accumule dans les feuilles de plantes soumises à une attaque par le pathogène bactérien *P. syringae* et régule l'expression du gène *SNARE* (Sunkar *et al.*, 2012). Ces exemples ne sont qu'une fraction des gènes ciblés par les microARNs mais ils montrent bien leur implication dans la régulation de plusieurs mécanismes majeurs de la plante.

Tableau 1.1: Influence de divers stress abiotiques sur l'expression de microARNs.

stress	microARN	Cible
sécheresse, salinité	↑ miR393	bHLH
sécheresse, salinité	↑ miR160	ARF
sécheresse, salinité	↑ miR167	ARF
sécheresse, salinité	↓ miR169	NFYA5
sécheresse	↑ miR166	
sécheresse, froid	↑ miR156	SPL
sécheresse	↑ miR171	
sécheresse	↑ miR408	
température	miR168	AGO1
température	miR169	
température	miR172	AP2

1.10 L'identification des microARNs

Les avancées récentes au niveau de la bio-informatique et du séquençage à haut débit ont permis de multiplier les programmes de recherche sur les microARNs. Le problème majeur de cette approche est la quantité astronomique de données générées par le séquençage et le travail considérable nécessaire pour analyser les résultats. Au cours des années 2000, des bases de données ont été établies pour plusieurs organismes modèles autant chez les animaux que chez les végétaux. En 2007, une équipe de chercheurs chinois a tenté de caractériser les microARNs du blé par séquençage à haut débit (Solexa) (Yao *et al.*, 2007). Par des méthodes bio-informatiques, ils ont identifié 58 microARNs ainsi que leurs précurseurs.

Outre le séquençage à haut débit, des microarrays sont disponibles pour les organismes les plus étudiés. Cette méthode permet l'analyse rapide d'échantillons contenant des microARNs dont la séquence est connue. Elle permet d'identifier la population de microARNs exprimés en fonction d'une pathologie ou d'un stress donné. De manière semblable aux microarrays traditionnels, des oligonucléotides synthétiques sont immobilisés et sont utilisés comme sondes. À cause de leur petite taille, le design des sondes est limité à la séquence du microARN. Il est donc souvent impossible d'uniformiser les températures de fusion (T_m ; melting temperature) pour toutes les sondes. Il en résulte que les T_m plus faibles auront des signaux plus faibles alors que les T_m plus hautes auront une spécificité moins forte. La comparaison entre le niveau d'expression de deux microARNs est donc impossible. Un autre désavantage de cette méthode est que la séquence des microARNs doit être connue et donc qu'elle rend impossible la détection de nouveaux candidats. Cette méthode est cependant rapide et permet de tester un échantillon biologique pour plusieurs microARNs simultanément. Elle est de plus en plus utilisée pour identifier des microARNs pouvant servir de biomarqueurs pour certaines pathologies comme l'hypertrophie cardiaque, la

cardiomyopathie et d'autres troubles cardiaques (Tijsen *et al.*, 2010). À ce jour, les analyses par microarrays ne que très peu utilisées chez les plantes.

1.11 La détermination de leur profil d'expression

La technique traditionnelle pour visualiser l'expression des ARNs, le buvardage de type northern, a été adapté aux microARNs. Cette méthode nécessite de purifier une fraction de petits ARN, de la séparer par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant et de la transférer sur une membrane. On utilise ensuite une sonde radiomarquée pour détecter la présence d'un microARN sur la membrane. La sensibilité de cette méthode est directement liée à l'affinité entre la sonde et le microARN ciblé. Plusieurs types de marquages et de sondes ont été développés. Des sondes ADN sont couramment utilisées puisqu'elles sont plus simples et moins coûteuses mais elles ont une affinité plus faible pour la cible que des sondes ARN. Les sondes incorporant des acide nucléiques barrés (LNA: Locked Nucleic Acid) dans leur séquence sont théoriquement les plus efficaces. Une autre méthode ayant été développée est d'incorporer une plus grande quantité d'isotopes radioactifs dans la sonde, produisant ainsi un signal plus fort. Alternativement, il est également possible de remplacer la radioactivité par une étiquette fluorescente quel que soit le type d'acide nucléique employé. Le buvardage northern est utilisé systématiquement pour confirmer les résultats obtenus par séquençage à haut débit. Il est cependant plus long à effectuer (2 jours pour l'hybridation) et nécessite une quantité considérable d'ARN (10 à 15 μg) ou de petits ARN (2 à 5 μg) (van Rooij, 2011). Il est également possible d'appliquer ces principes et d'utiliser une sonde non-radioactive pour effectuer une hybridation *in situ*. Cette approche permet de visualiser le type cellulaire où est présent le microARN étudié.

Une autre méthode utilise la PCR quantitative en temps réel pour établir un profil d'expression des microARNs. Plusieurs approches différentes sont utilisées pour y arriver. Le principal obstacle est la taille des microARNs et la limitation technique qu'elle engendre. La plupart des protocoles emploient une amorce universelle à laquelle est lié le microARN. Cette méthode permet d'allonger l'ensemble de la population d'ARN présents dans l'échantillon et fournit une séquence permettant sa transcription inverse en ADNc. À cause de la présence d'une séquence commune, la spécificité et la sensibilité de cette méthode sont hautement dépendantes du design de l'amorce spécifique au micro ARN. De plus, la très forte homologie entre les microARNs d'une même famille, ne variant généralement que d'un ou deux nucléotides, rend leur identification précise plus ardue. Cette méthode est cependant plus sensible et nécessite moins de matériel biologique que le buvardage de type northern. La spécificité de la liaison avec l'amorce étant dépendante du contenu en GC du microARN, il est très difficile de comparer l'abondance relative de plusieurs microARNs par la PCR quantitative en temps réel. Pour ce faire, le séquençage à haut débit est beaucoup plus efficace (van Rooij, 2011).

1.12 L'identification de leur cibles

Afin de déterminer la cible d'un microARN donné, la bio-informatique est la méthode de choix. Plusieurs programmes gratuits tels que miRanda (<http://www.microRNA.org>), microCosm (<http://www.mirbase.org>), targetscan (<http://www.targetscan.org>) et PicTar (<http://www.pictart.mde-berlin.de>) sont disponibles chez les animaux mais aucun ne l'est encore chez les plantes. Ces logiciels utilisent les bases de données publiques d'ARN messenger pour identifier une séquence complémentaire à la séquence source d'un microARN. Certains vérifient également la présence de structures secondaires complexes dans la région cible pouvant empêcher la liaison du microARN. Les cibles potentielles déterminées par

ordinateur sont généralement confirmées en laboratoire. Pour ce faire, le clonage de la région ciblée par le microARN avec un rapporteur, comme la luciférase, est généralement employé. On transfecte ensuite ce vecteur dans des cellules exprimant le microARN. Un changement dans l'activité enzymatique du rapporteur confirmera la cible du microARN (van Rooij, 2011).

1.13 Applications pratiques de la recherche sur les microARNs

Comme nous l'avons vu précédemment avec l'utilisation des microARNs comme biomarqueurs de pathologies cardiaques, la recherche sur les microARNs a également des applications pratiques. Traditionnellement, l'amélioration de la résistance aux stress chez les plantes a toujours été réalisée par des croisements et une sélection des meilleurs plants. Cette méthode est très lente et a été relativement peu efficace. Par exemple, les variétés de blé résistantes au froid cultivées de nos jours ne sont que légèrement meilleures que celles utilisées au début du siècle (Thomashow, 1999). Par l'identification de nouveaux microARN et une meilleure compréhension de leur biogénèse, les chercheurs ont développé des stratégies permettant de modifier et d'améliorer les variétés céréalières présentement utilisées. Par exemple, sachant qu'une mutation du gène *ARF2* était responsable d'une augmentation de la taille et du poids des grains de riz, des chercheurs ont transformé des plantes pour qu'elles surexpriment *miR167*, qui cible *ARF2*, en réponse aux auxines. Ils peuvent ainsi induire l'expression de *miR167* et réduire l'expression de *ARF2* (Macovei *et al.*, 2012). D'autres méthodes utilisent des microARNs artificiels. Des séquences de microARN artificiels ont été introduites dans la séquence endogène de pré-microARN d'*Arabidopsis* permettant de modifier leur cible et d'en réguler artificiellement l'expression. Récemment chez *Arabidopsis*, le précurseur de *miR159* a été modifié pour exprimer un microARN artificiel ciblant l'ARN viral des protéines P69 du virus mosaïque du tabac et HCPro du virus mosaïque du radis produisant ainsi

une lignée de plante résistante à ces deux virus. Cette technique a été adaptée au riz dans les variétés Nipponbare et IR64 (Macovei *et al.*, 2012). Une autre équipe a découvert que la surexpression de *OsmiR397*, un microARN naturellement produit dans les grains de riz, avait pour effet d'augmenter le rendement en grain de près de 25% (Zhang *et al.*, 2013).

1.14 L'étude présente

Ce travail s'inscrit dans un programme de recherche visant à identifier les différents microARNs impliqués dans la réponse aux stress abiotiques chez le blé *Triticum aestivum*. Notre équipe a construit plusieurs bibliothèques de petits ARN exprimés en réponse à divers traitements (vernalisation, sécheresse, salinité, métaux tel que l'aluminium). Ces dernières ont ensuite été séquencées par la plateforme de séquençage à haut débit SOLiD (Applied Biosystems). Grâce à des analyses bio-informatiques, les séquences appartenant potentiellement à des microARNs ainsi que leur précurseurs et cibles ont été identifiées. La plupart montrent des profils d'expression variant en fonction du traitement. Certains microARNs prédits ciblent des gènes associés à l'acclimatation au froid et à la transition entre les phases végétative et reproductive. De plus, leur expression est modifiée lors d'un traitement au froid. J'ai fait des analyses bio-informatiques pour identifier les candidats les plus intéressants. J'ai ensuite utilisé et optimisé la technique du buvardage northern pour confirmer l'expression des microARNs détectés au séquençage. J'ai établi le profil d'expression d'un d'entre eux, *miR156*, et de sa cible potentielle, la famille de gène *SPL*, lors de la vernalisation du blé d'hiver. Par la suite, j'ai analysé les promoteurs de *TaSPL3* et *TaSPL13* ciblés par *miR156* dans le but d'identifier les éléments de régulation *cis* impliqués dans leur transcription et de mieux comprendre leur fonction.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel végétal et conditions de croissance

Des graines de blé (*Triticum aestivum*, cultivar CDC Clair) ont été semées dans un mélange de terre noire, de ProMix et de vermiculite (1 : 1 : 1) et placées dans une chambre de croissance pour 14 jours à 22°C, à une photopériode de 16h, un flux photonique de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ et arrosées tous les 2 jours avec de l'eau du robinet. Les plantes ont ensuite subi un traitement au froid à une température de 4°C, une photopériode de 8h et un flux photonique de 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Des échantillons de parties aériennes (feuilles et tiges) ont été récoltés aux temps 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 7j, 14j, 21j, 28j, 35j, 42j et 49j. D'autres plantes traitées 49 jours à 4°C ont été remises à 22°C et à une photopériode de 16h jusqu'à leur floraison. Des échantillons de parties aériennes ont été prélevés tous les 7 jours jusqu'à 35 jours de déacclimatation.

2.2 Extraction de l'ARN total

L'ARN total a été extrait de chaque échantillon en utilisant le protocole pour l'ARN total de la trousse *mirVana*[™] (Ambion[®]) selon les recommandations du fabricant avec quelques modifications. En bref, 200 mg de tissus ont été broyés dans l'azote liquide puis en présence de thiocyanate de guanidine (tampon de lyse *mirVana*[™]). L'échantillon a ensuite été extrait avec du phénol (tampon citrate 50 mM, pH 4.5, 0,1% hydroxyquinoline) : Chloroforme : alcool isoamylique (125 : 24 : 1). Après centrifugation, la phase aqueuse a été récupérée et extraite deux fois au chloroforme pour éliminer toute trace de phénol. La dernière phase aqueuse a été ajustée à 55%

d'éthanol pour précipiter tous les acides nucléiques et l'échantillon a été filtré sur un filtre de fibre de verre (*mirVana*[™]). Les filtres ont ensuite été lavés avec la solution de lavage 1 (Ambion[®]) et deux fois avec la solution de lavage 2 (Ambion[®]) pour en retirer toute trace de phénol et de thiocyanate de guanidine. L'ARN a ensuite été élué dans l'eau. La concentration et la pureté des échantillons ont été évaluées par spectrophotométrie ultra-violet selon la formule pour déterminer la concentration des acides nucléiques ($C (\mu\text{g/mL}) = 40 \times A_{260}$). La méthode a permis d'obtenir un rendement de 50 à 80 μg d'ARN pour 200 mg de tissus ayant un rapport A_{260}/A_{280} variant de 1,90 à 2,1. Le rendement et la pureté ont ensuite été confirmés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant.

2.3 Extraction et purification des petits ARN

Comme pour l'ARN total, les petits ARN ont été extraits en utilisant la trousse *mirVana*[™] pour l'isolation des microARNs (Ambion[®]) selon les recommandations du fabricant avec quelques modifications. Le broyage et l'extraction ont été effectués de manière identique aux ARNs totaux. Après les deux extractions successives au chloroforme, la concentration de la phase aqueuse a été ajustée à 25% d'éthanol pour précipiter uniquement les acides nucléiques de plus de 200 bases et l'échantillon a été filtré sur un filtre de fibre de verre. L'éluat a ensuite été ajusté à 55% d'éthanol permettant ainsi aux acides nucléiques de moins de 200 bases de précipiter. Ce dernier a ensuite été passé sur un nouveau filtre de fibre de verre et l'éluat a été jeté. Les filtres ont ensuite été lavés avec la solution de lavage 1 (Ambion[®]) et deux fois avec la solution de lavage 2 (Ambion[®]) pour en retirer toute trace de phénol et de thiocyanate de guanidine. Les petits ARNs ont ensuite été élués dans l'eau. La concentration et la pureté des échantillons ont été évaluées par spectrophotométrie ultra-violet selon la formule modifiée pour les acides nucléiques de faible taille ($C (\mu\text{g/mL}) = 33 \times A_{260}$). La méthode a permis d'obtenir un rendement de 10 à 12 μg de

petits ARN pour 200 mg de tissus ayant un rapport A_{260}/A_{280} variant de 1,95 à 2,05. Ces résultats ont ensuite été confirmés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant (Figure 3,1).

2.4 Buvardage northern pour l'ARN total

10 µg d'ARN total de chaque échantillon ont été séparés sur un gel d'agarose 1,2%, MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, pH 7,0) contenant 6% de formaldéhyde. L'ARN a ensuite été transféré sur une membrane de nylon chargé positivement Hybond N+ (Amersham) par capillarité en utilisant un tampon SSC 10X (1,5 M chlorure de sodium, 150 mM citrate de sodium, pH 7,0). La membrane a été traitée aux ultra-violets à 0,07 j/cm² avec l'appareil UVC 500 UV Crosslinker (Hoefer) pour lier de manière covalente les échantillons d'ARN à la membrane.

2.5 Préparation et radiomarquage des sondes pour l'ARN messenger cible

Les séquences pour les gènes *SPL* cible proviennent d'un assemblage d'EST Expressed Sequence Tag) du blé ayant une forte homologie pour les gènes *SPL* connus chez le riz. Les transcrits *TaSPL3* et *TaSPL13* ont été amplifiés par PCR à partir des bibliothèques d'ADNc du projet "Functional Genomics of Abiotic Stress" (FGAS) (Houde *et al.*, 2006) à l'aide des amorces 4144-F1, 4144-R1, 2m07-F2 et 2m07-R2, respectivement (Tableau 2.1). Ces transcrits ont ensuite été utilisés comme brin matrice pour produire des sondes spécifiques aux ARNs messagers ciblés. 35 ng de transcrit et 0,5 µL d'amorces aléatoires (pdN₆, 50 µM, Roche) ont été dénaturés 6 minutes à 95°C puis refroidis sur glace 10 minutes. Le mélange a ensuite été incubé avec 2 µL de tampon de marquage aléatoire d'ATP 10X (250 mM Tris-HCl pH 6,9, 50 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 0,6 mM dCTP, 0,6 mM dGTP, 0,6 mM TTP), 3 µL de

radio-isotope α -P³² dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, PerkinElmer) et 2,5 U d'enzyme Klenow (New England Biolabs) 45 minutes à 22°C puis 45 minutes à 37°C. La réaction de marquage a été arrêtée par précipitation à -80°C pendant 30 minutes avec 15 mM EDTA, 0,3 μ g/ μ L d'ARNt, 100 mM d'acétate de sodium pH 5,2 et 130 μ L d'éthanol 100%. Les sondes ont été centrifugées à 14 000g et solubilisées dans 100 μ L de NaOH 0,1 M.

Tableau 2.1 : Amorces utilisées pour amplifier RFL_Contig4144 (*TaSPL3*) et tplb0002m07 (*TaSPL13*)

Amorce	Séquence 5' - 3'
4144-F1	ATGGGCTCGTTCGGGATGGAGTGGAA
4144-R1	TCAGTGCATCCGGTCGAAGTCCGAGG
2m07-F2	TCCTTCCACTCATCAGCTAGCTCCAC
2m07-R1	AGGTTTTTGGCAGACAGCAGCAAAT

2.6 Hybridation pour l'ARN messenger cible

Les membranes ont été préhybridées une heure dans un tampon Church's (250 mM tampon phosphate de sodium pH 7,4, 1 mM EDTA, 7% SDS) à 65°C. Le tampon a ensuite été remplacé par du tampon frais et la sonde radiomarquée y a été ajoutée pour effectuer une hybridation pendant 16 heures à 65°C. Les membranes hybridées ont été lavées deux fois pendant 10 minutes avec du SSC 2X, 0,1% SDS, puis 2 autres fois 15 minutes avec du SSC 0,5X, 0,1% SDS à la température de la pièce. Elles ont été exposées 24 heures sur un écran au phosphore (K-screen, Kodak) et révélées avec le Molecular Imager Fx (Bio-Rad). Après leur exposition, les membranes ont été déhybridées en les lavant trois fois avec du SDS 0,1% à 95°C pendant 20 minutes et réhybridées jusqu'à 5 fois avec une autre sonde.

2.7 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les échantillons d'ARN ont été séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant de 15% (acrylamide : bis-acrylamide, 19 : 1), 8 M Urée, 1X TBE (90 mM Tris, 90 mM acide Borique, 2 mM EDTA, pH 8) en utilisant le montage Bio-rad Mini-PROTEAN 3. Les gels ont subi une pré-migration de 15 minutes à 35 mA. Ensuite 2 µg de petits ARN, mélangés dans un tampon de charge pour ARN (concentration finale : 49% formamide, 5 mM EDTA pH 8,0, 0,0125% xylène de cyanol, 0,0125% bleu de bromophénol) et dénaturés 2 minutes à 95°C, ont été chargés pour chaque piste. Les gels ont migré pour 225 V/h, à 35 mA. Les échantillons ayant subi un court traitement au froid (0, 2h, 4h, 6h, 8h, 10, 12h, 24h, 7j; cinétique courte) ont été regroupés sur le même gel pour pouvoir visualiser le niveau d'expression des microARNs ciblant les facteurs de transcription CBF, connus pour avoir une expression rapide lors du traitement au froid. Similairement, les échantillons provenant du traitement plus long (0j, 7j 14j, 21j, 28j, 35j, 42j, 49j et floraison; cinétique longue) ont également été regroupés sur un même gel. De cette manière, nous obtenons une vue d'ensemble des changements d'expression des microARNs lors de la vernalisation. Les gels ont été colorés au bromure d'éthidium et la qualité de l'ARN a été visualisée aux ultra-violets.

2.8 Buvardage northern pour les petits ARN

Après leur séparation sur gel de polyacrylamide, les petits ARN ont été transférés sur une membrane de nylon selon la méthode du buvardage de type northern. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour lier les ARN à la membrane de nylon. Dans la première, les petits ARN ont été transférés sur une membrane de nylon chargé positivement Hybond N+ (Amersham) par capillarité en utilisant un tampon

SSC 20X (3 M chlorure de sodium, 300 mM citrate de sodium, pH 7,0). L'ARN a été lié de manière covalente à la membrane en la traitant aux ultra-violetts à 0.12 j/cm² avec l'appareil UVC 500 UV Crosslinker (Hofer). Dans la seconde méthode, les ARN sont transférés de la même manière mais sur une membrane de nylon neutre Hybond NX (Amersham). Ces membranes sont ensuite traitées en l'incubant 2h à 55°C, sur un papier Whatman imbibé de 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), 0,16 M dans du 1-methylimidazole et emballées dans une pellicule plastique pour lier de manière covalente les molécules d'ARN à la membrane de nylon. Cette dernière méthode permet d'obtenir un signal beaucoup plus fort que la méthode classique pour les buvardages de type northern visant la détection des petits ARNs (Pall *et al.*, 2007).

2.9 Radiomarquage des sondes pour les petits ARN

Des oligo-nucléotides d'ADN complémentaire aux séquences des microARNs (commandés chez IDT) ont été marqués au γ -³²P-ATP (Tableau 2.2). Le phosphate γ en 5' de l'oligo-nucléotide a été échangé avec un phosphate radioactif en incubant 1 μ L d'oligo (10 μ M), 5 μ L de γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, PerkinElmer), 10 U de T4 poly-nucléotide kinase (Invitrogen) dans le tampon d'échange 10X (250 mM Imidazole-HCl pH 6,4, 60 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, 350 μ M ADP) 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par précipitation à -80°C pendant 30 minutes avec 15 mM EDTA, 0,3 μ g/ μ L d'ARNt, 100 mM d'acétate de sodium pH 5,2 et 130 μ L d'éthanol 100%. Les sondes ont été centrifugées à 14 000g et solubilisées dans 100 μ L de NaOH 0,1 M. La trousse de détection StarFire[®] miRNA Detection Kit de IDT[®] a également été testée, selon les recommandations du fabricant.

Tableau 2.2 : MicroARNs prédits et sondes spécifiques utilisées pour leur détection au buvardage northern

microARN	Séquence 5' - 3'	sonde
apMir_87826	CGCCCCGAUGAUUUG	CAAATCATCGGGGGCG
apMir_19532	UCCAUAAUAUAAGAGCGUUU	AAACGCTCTTATATTATGGA
apMir_51346	UUUGUCUCAACUCCA	TGGAAGTTGAGACAAA
apMir_20539	UCCGUCCGAAAUACUUGUCA	TGACAGTATTTCCGGACGGA
apMir_42496	UCCUCCGUCCGAAUACUUGUC	GACAAGTATTTCCGGACGGAGGGA
apMir_43510	UCCUCCGUCCGAAUACUUGUC	GACAAGTAATTCCGAACGGAGGGA
apMir_43634	GUAUGGAUGUAUCUAGAUGUAUUU	AAATACATCTAGATACATCCATAC
apMir_27254	CUCCUCCGUCCGAAUACUUGU	ACAAGTAATTCCGAACGGAGGGAG
apMir_39358	AUUUUGGGACGGAGGGAGUAA	TTACTCCCTCCGTCCCAAAAT
apMir_20451	UCCGUCCCAAAUAGUGACU	AGTCACTTATTTTGGGACGGA
apMir_21008	AGUCACUUAUUUUGGGACGGA	TCCGTCCCAAAATAAGTGACT
apMir_39427	AUUUUGGGACGGAGGGAGUAU	ATACTCCCTCCGTCCCAAAAT
apMir_49482	UAUUGGUUGUGGGGG	CCCCACAAGCCAATA
apMir_636	CUCGUGUUGCCAGAAA	TTTCTGGCAACACGAG
miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC	GTGCTCACTCTCTTCTGTCA
miR156k	UGACAGAAGAGAGAGACACA	TGTGCTCTCTCTTCTGTCA

2.10 Hybridation pour les petits ARN

Deux méthodes ont été testées pour l'hybridation des petits ARN. En premier lieu, nous avons testé la méthode fournie avec la trousse d'isolation des petits ARN (Patterson et Guthrie, 1987). Les membranes ont été pré-hybridées une heure à 65°C dans une solution de pré-hybridation (6X SSC, 10X Denhardt (50X : 10g/L Ficoll 400, 10g/L BSA, 10g/L polyvinylpyrrolidone (PVP-10)), 0,2% SDS). Le tampon a été remplacé par du tampon frais, additionné de sondes spécifiques radiomarquées et l'hybridation a été effectuée 16 heures à la température de la pièce. Les membranes ont ensuite été lavées trois fois 5 minutes, à 42°C ou 10 degrés sous la T_m, dans une solution contenant 6X SSC et 0,2% SDS, puis exposées 48 heures sur un écran au phosphore (K-screen, Kodak) et révélées avec le Molecular Imager Fx (Bio-Rad). Pour la seconde méthode, les membranes ont été pré-hybridées une heure dans un tampon de pré-hybridation (50% formamide, 0,5% SDS, 70 µg/mL sperme de saumon dénaturé, solution de Denhardt 5X, SSPE 5X (750 mM chlorure de sodium,

25 mM sodium phosphate monobasique, 2.5 mM EDTA)) une heure à 10°C sous la T_m de la sonde (Ausubel, 1994). Le tampon a été remplacé par du tampon frais et la sonde radio-marquée y a été ajoutée pour effectuer une hybridation pendant 16 heures à 10°C sous la T_m de la sonde. Les membranes ont ensuite été lavées deux fois pendant 5 minutes à 30°C avec du SSC 2X, 0,1% SDS, puis 2 autres fois 5 minutes à 30°C avec du SSC 0,2X, 0,1% SDS. Elles ont été lavées une dernière fois 15 minutes, à 42°C ou 10 degrés sous la T_m , avec du SSC 0,2X, 0,1% SDS. Elles ont été exposées 48 heures sur un écran au phosphore (K-screen, Kodak) et révélées avec le Molecular Imager Fx (Bio-Rad). Après leur exposition, les membranes ont été dé-hybridées en les lavant trois fois avec du SDS 0,1% à 95°C pendant 20 minutes et ré-hybridées jusqu'à 5 fois avec une sonde différente.

2.11 Bioinformatique

La traduction des ANDc des gènes *SPL* en séquence peptidique a été effectuée avec expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). L'analyse de motifs des protéines *SPL* a été réalisée avec Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan). La complémentarité entre les séquences des microARNs potentiels et leurs cibles prédites a été vérifiée grâce à l'outil clustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) en utilisant les paramètres de base. L'analyse des promoteurs des gènes *SPL* a été réalisée avec les outils PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) et PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Identification de miARNs ciblant des gènes associés à la tolérance au froid

Les analyses préliminaires effectuées par notre groupe ont mis en évidence que plusieurs facteurs de transcription et des gènes codants pour les protéines associés au processus d'acclimatation au froid étaient potentiellement la cible de microARNs (Tableau 3.1). Ce tableau montre également le signal obtenu lors du séquençage à haut débit, pour chaque micro ARN potentiel, normalisé en signature par million (reads by million). Nous avons effectué des analyses bio-informatiques, à l'aide du programme clustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), pour identifier la région complémentaire entre les microARNs et leur gène cible (Annexe, Figures 5.1 à 5.18). Une complémentarité a été confirmée pour tous les microARNs potentiels à l'exception de apMir_5978 et apMir_31366 ciblant respectivement trois séquences codant pour des déhydrines (CK152705; CK152518; CK152617) et une LEA (CJ530023). Pour ces deux microARNs, clustalW et l'outil BLAST de NCBI ont été incapables d'identifier une région complémentaire aux gènes prédits par nos études préliminaires. Nous avons confirmé ces résultats en tentant de trouver une région complémentaire manuellement, sans succès. De plus, apMir_19532 et CBFIVb-B20 (EF028773), apMir_51346 et CBFIVc-14.3 (CK212360), apMir43634 et COR413 (CK166841.1; CK164699.1), apMir_20451 et la séquence (DR740502.1), apMir21008 et la séquence (DR740502.1), apMir49482 et déhydrine 8 (CV772291.1; CV767188.1) ont tous un nucléotide non-complémentaire parmi les 8 premiers nucléotides du microARN, soit la séquence de nucléation (seed sequence). La présence de ce nucléotide non-apparié rend peu probable leur spécificité pour les cibles mentionnées ci-haut. Les microARNs apMir_87826, apMir_20539,

apMir_42496, apMir_43510, apMir_27254, apMir_39358, apMir_39427 et apMir_636 sont donc les meilleurs candidats puisqu'ils ne présentent qu'un maximum de trois nucléotides non-appariés, à l'extérieur de la séquence de nucléation, avec leur cible potentielle. Nous avons cependant testé tous les microARNs pour lesquels nous avons confirmé une région complémentaire chez leur cible prédite.

Tableau 3.1 : Liste des microARNs potentiels et leurs cibles prédites par bioinformatique. La signature représente le nombre de fois que la séquence du microARN a été détectée lors du séquençage à haut débit, exprimé en lecture par million (reads per million), dans la librairie contrôle non-acclimatée au froid (NA; non-acclimated) et acclimatée au froid (CA; cold-acclimated). En gris, les microARN pour lesquels nous n'avons pas détecté manuellement de séquence complémentaire chez les cibles proposées par le programme bio-informatique.

microARN	Séquence 5' - 3'	taille	Signatures		Gène cible	no. Accession
			NA	CA		
apMir_87826	CGCCCCGAUGAUUUG	16	0	0	CBF II-5.1	CK163819
apMir_19532	UCCAUAUAUAAGAGCGUUU	20	87	111	CBF IVb-B20	EF028773
apMir_51346	UUUGUCUCAACUCCA	16	16	7	CBF IVc-14.3	CK212360
apMir_20539	UCCGUCCGAAAUAUCUUGUCA	21	11	15	CBF IVd-B22	EF028786
apMir_42496	UCCCUCCGUCCGAAAUAUCUUGUC	24	22	7	CBF IVd-B22	EF028786
apMir_43510	UCCCUCCGUCCGAAAUAUCUUGUC	24	24	9	CBF IVd-B22	EF028786
					COR413	CK164699
apMir_43634	GUAUGGAUGUAUCUAGAUGUAUUU	24	7	5	COR413	CK167127
						CK166841
						CK164699
apMir_27254	CUCCUCCGUCCGAAUUAUCUUGU	24	4	8	COR413	CK164699
apMir_39358	AUUUUGGGACGGAGGAGUAA	21	0	57	dehydrine	DR740502
apMir_20451	UCCGUCCCAAAUAAGUGACU	21	10	13	dehydrine	DR740502
apMir_21008	AGUCACUUAUUUUGGGACGGA	21	10	13	dehydrine	DR740502
apMir_39427	AUUUUGGGACGGAGGAGUAU	21	0	57	dehydrine	DR740502
apMir_5978	UGGUGCGGAUAUCUUU	16	11	1	dehydrine 8	CK152705
						CK152518
						CK152617
apMir_49482	UAUUGGCUUGUGGGG	16	6	7	dehydrine 8	CV772291
						CV767188
apMir_31366	UAAGUGGAAAGGGAGG	16	6	7	LEA	CJ530023
apMir_636	CUCGUGUUGCCAGAAA	16	176	105	WCS19	CV774057

3.2 Extraction et purification des petits ARN

Pour pouvoir confirmer les signaux obtenus au séquençage pour chaque microARN, nous avons extrait les petits ARNs provenant d'échantillons de blé d'hiver traité au froid. La trousse *mirVana*[™] pour l'isolation des microARNs (Ambion[®]) n'a pas permis d'obtenir des extractions de qualité régulière avec nos échantillons de blé. Ceci nous a obligé à en modifier quelques étapes. En premier lieu, le broyage dans la glace sèche n'étant pas toujours optimal, nous l'avons remplacé par un broyage dans l'azote liquide avant l'homogénéisation avec le tampon d'extraction. Suite à l'extraction au phénol chloroforme, l'unique étape d'extraction au chloroforme prescrite par le fabricant ne semblait pas éliminer tout le phénol et laissait des traces d'hydroxyquinoline. Les trois lavages sur filtre recommandés dans la procédure ne parvenaient pas non plus à éliminer ces impuretés. De plus, les traces de phénol et d'hydroxyquinoline interféraient avec la détermination de la concentration en petits ARN au spectrophotomètre. En effet, leurs structures aromatiques absorbent également les ultra-violets et fait varier les absorbances à 260nm et 280nm, valeurs utilisées pour déterminer la quantité d'ARN et sa pureté. La qualité des échantillons sur gel était également mauvaise et les échantillons semblaient dégradés. Nous avons donc ajouté une deuxième étape d'extraction au chloroforme. Celle-ci a permis d'améliorer la qualité de la purification des petits ARN et d'obtenir un rendement d'environ 10 à 12 µg de petits ARNs pour 200 mg de poids frais, pour un rapport d'absorbance 260nm/280nm de 1,95 à 2,05. La figure 3.1 est un exemple de la qualité des extractions d'ARN obtenus avec cette méthode. Sur ce gel dénaturant de polyacrylamide on peut voir 6 échantillons d'ARN de 200 nucléotides et moins. On peut remarquer que malgré qu'un échantillon semble légèrement contaminé avec de l'ARN total, tous ont la même qualité et intensité pour les bandes associées aux ARNs de transfert et aux petits ARNs ribosomiaux 5S et 5.8S. Nous avons donc utilisé cette

méthode optimisée pour extraire les petits ARNs d'échantillons de blés acclimatés au froid pour une période variant de quelques heures à 49 jours.

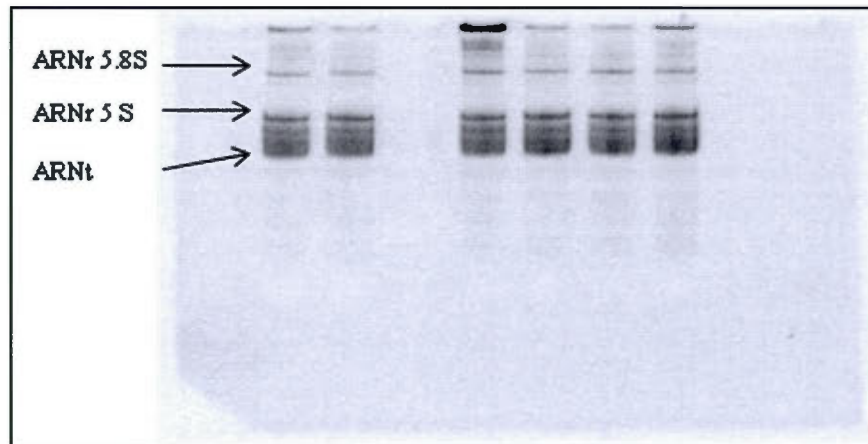


Figure 3.1 : Contrôle de la qualité des extractions et purifications de petits ARN de blé. Les 6 échantillons présentés sont représentatifs de la qualité de toutes les extractions de petits ARN effectuées. Les bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 5.8S, 5S et à l'ARN de transfert ont été utilisées pour ajuster la quantité de petits ARNs sur gel dans les étapes subséquentes.

3.3 Optimisation de la détection des microARNs par buvardage northern

Dans le but de détecter les microARNs associés à la réponse au froid, nous avons regroupé sur le même gel les petits ARNs extraits de plantes ayant subi un court traitement au froid (cinétique courte : NA, 2h, 4h, 6h, 8h, 10, 12h, 24h, 7j) et sur un autre les extractions d'ARN de plantes traitées au froid jusqu'à une vernalisation complète (cinétique longue : NA, 7j, 14j, 21j, 28j, 35j, 42j, 49j et 49j plus déacclimatation). La cinétique courte a été utilisée pour tenter de détecter les microARNs ciblant des gènes reconnus pour être exprimés rapidement suite au traitement au froid, soit les gènes *CBF II-5.1*, *CBF IVb-B20*, *CBF IVc-14.3* et *CBF IVd-B22*; alors que la cinétique longue a été utilisée pour les microARNs associés à

des protéines ayant une expression plus tardive suite au traitement au froid tel que les déhydrines, LEA, *COR413* et *WCS19*. En premier lieu, nous avons utilisé le protocole pour la détection des petits ARNs par buvardage northern fourni avec la trousse *mirVana*[™] (Patterson et Guthrie, 1987). Cette méthode recommandait une fixation des petits ARNs par exposition aux ultra-violets ainsi qu'une hybridation dans une solution de Denhardt, SSC et SDS. Bien que nous ayons fait varier les conditions de lavage, en les rendant moins stringentes aucun signal n'a pu être détecté pour tous les microARNs testés. Nous avons voulu confirmer la méthode en tentant de détecter un microARN que nous avons identifiés dans nos études préliminaires comme étant fortement abondant dans les échantillons contrôles et traités au froid. La famille *miR156* avait été détectée avec près de 4200 signatures par million (reads per million) chez le contrôle et plus de 8800 pour les échantillons traités au froid. De plus des études chez le riz et *Arabidopsis* ont montré que *miR156* était fortement abondant et qu'il était impliqué dans la réponse à plusieurs stress abiotiques et dans la transition entre les phases végétative et reproductrice (Usami *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Yamasaki *et al.*, 2009). Encore une fois, aucun signal n'a pu être détecté avec cette méthode. Nous avons donc convenu de tester une méthode alternative pour fixer les ARN sur la membrane de nylon (Pall *et al.*, 2007). Cette méthode promettait une plus grande sensibilité pour la détection des petits ARNs, en rendant disponible une plus grande proportion de nucléotides pour l'hybridation. Nous avons utilisé *miR156* comme contrôle positif pour tester cette méthode. On peut voir à la figure 3.2 que la détection de *miR156* est possible avec la méthode de Pall *et al.* (à droite) alors qu'elle était impossible avec la méthode de Patterson and Guthrie (à gauche) (Patterson et Guthrie, 1987; Pall *et al.*, 2007).

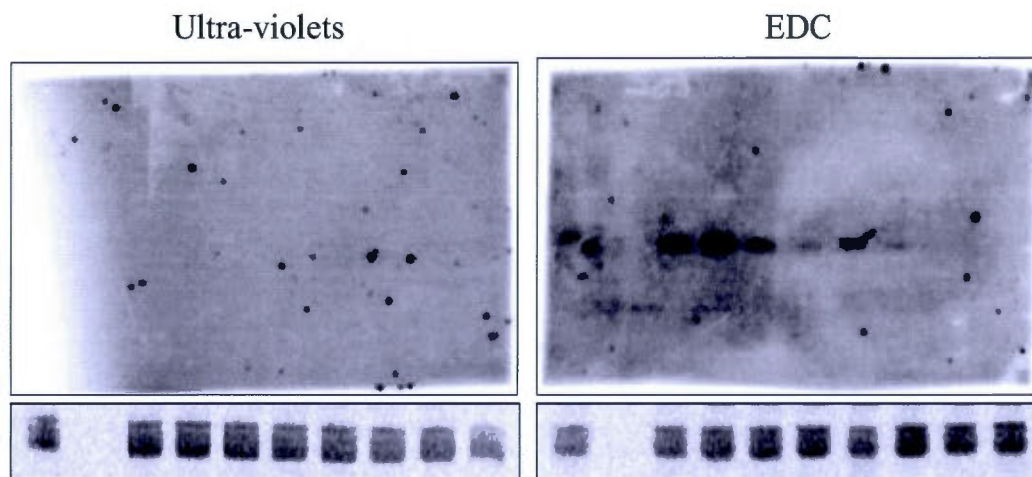


Figure 3.2 : Comparaison entre les deux méthodes de fixation de l'ARN aux membranes de nylon. Deux gels dénaturants de polyacrylamide ont été produit de manière identique en utilisant les même échantillons et été après avoir été transféré selon deux protocoles différent, les membranes ont été hybridées dans la même bouteille, avec une sonde spécifique pour *mir156a*. Le gel de gauche a été transféré sur une membrane de nylon chargé, les ARNs ont été fixé aux U.V. alors que celui de droite a été transféré sur nylon neutre et les petits ARNs ont été fixés avec le protocole EDC. Les deux transferts ont été effectués par capillarité et la quantité de petits ARN est de 2 μg par piste. Dans les deux cas, la détection a été effectuée par exposition sur un écran au phosphore pendant 24 heures et révéler avec le Molecular Imager Fx (Bio-Rad).

Nous avons également utilisé *miR156* comme contrôle positif pour comparer le protocole d'hybridation de la trousse mirVana™ avec un autre protocole recommandé par Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1994), effectué dans une solution contenant 50% de formamide, 5X SSPE, 0,5% SDS, 5X Denhardt et 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Le protocole de Current Protocols in Molecular Biology s'est avéré plus constants et produisait un signal plus fort. Nous l'avons donc utilisé avec la fixation à l'EDC pour tenter de détecter les microARNs associés à l'acclimatation au froid. Encore une fois, malgré l'essai de conditions de lavage moins stringentes et une réduction de la température d'hybridation, aucun test

n'a permis la détection des microARNs. Dans une ultime tentative pour détecter les microARNs associés à l'acclimatation au froid, nous avons testé la trousse StarFire[®] d'IDT[®] (Integrated DNA Technologies). Cette dernière n'a pas fonctionné et même la détection de *miR156* a été impossible. Puisque *miR156* fournissait des résultats intéressants avec la méthode de fixation des petits ARNs sur membrane de nylon de Pall *et al.* et que ce microARN avait été associé à la floraison chez *Arabidopsis*, nous avons décidé de modifier les objectifs de mon projet pour les recentrer sur *miR156* et sa cible, les gènes *SPL*. Bien que la présence de *miR156* a été confirmée chez le blé (Yin et Shen, 2010), aucune séquence complète et annotée n'était répertoriée dans GenBank pour les gènes *TaSPL*. Il était donc intéressant d'étudier ces gènes pour pouvoir les comparer aux autres membres mieux caractérisés de cette famille, chez le riz et *Arabidopsis*.

3.4 Identification des gènes SPL chez le blé

Bien qu'ils ont fait l'objet de plusieurs études chez le riz et *Arabidopsis* (Yamasaki *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Preston et Hileman, 2013; Zhang et Li, 2013), les gènes *SPL* n'ont jamais été identifiés chez le blé. Dans le cadre d'études préliminaires à ce projet, une chercheuse de notre groupe, la Dre. Zahra Agharbaoui, avait entrepris de comparer les bases de données EST du blé avec les séquences connues pour les gènes *SPL* du riz (*OsSPL*) et d'*Arabidopsis* (*AtSPL*). Un assemblage de ces ESTs a ensuite permis d'obtenir au moins sept séquences appartenant potentiellement à la famille *SPL* (donné non-montrées). À partir de bibliothèques d'ADNc, regroupant des populations d'ARN messagers du blé (*Triticum aestivum*) exprimés lors du traitement au froid construites dans le cadre du programme "Functional Genomics of Abiotic Stress in plants" (FGAS) (Houde *et al.*, 2006), nous avons réussi à amplifier deux séquences codant pour les gènes *SPL* du blé, *tplb0002m07* et *RFL_Contig4144*. *RFL_Contig4144* avait déjà été répertoriée dans Genbank, sous le numéro d'accession

AK333630.1, mais n'avait pas été annotée comme faisant parti de la famille SPL (Kawaura *et al.*, 2009). Nous avons analysé la séquence protéique de ces deux séquences pour confirmer la présence du domaine SBP conservé chez les SPL. La séquence AK333630.1 comporte un cadre de lecture de 1422 nucléotides codant pour une protéine de 473 acides aminés (Figure 3.3). Sa masse moléculaire est estimée à 51,2 kDa avec un point isoélectrique théorique de 9,19. Les acides aminés les plus représentés dans sa séquence sont la sérine avec 62/473 (13,1%), suivi de l'alanine et de la glycine avec 42/473 (8,9%) et 40/473 (8,5%). Elle présente 99% d'homologie et couvre 100% de la séquence de SPL3 d'*Aegilops tauschii* (EMT31299.1), 96% avec SPL3 de *Triticum urartu* (EMS53488.1) et 79% avec SPL3 de *Brachypodium distachyon* (XP_003574437.1). Nous y référerons donc sous le nom de TaSPL3 puisqu'elle porte ce nom chez ces autres espèces. De plus, le logiciel MotifScan a identifié le domaine conservé SBP à doigts de zinc avec une valeur E de $5,1e^{-26}$ (en surligné à la Figure 3,3).

```

1  gggggggcgggtgaaagatcttgattggggcgagtgagaccgggggtggttgtcatgatgcg
61  gcgtaggggtccagcgcgggggtggttgcctgatgccgtgattggggttgggttcttctcaa
121 ggtgataactagatctcatctcatcggccagggatgagatttgagggggaggcagacct
181 tgtgcggagggcctgaggcagcagagcttctctcgggttgatggggccgctgctccgcc
241 gacgtcgtcgccggcagggctcgccggggagctcggttgttctctggcgcgctgctgact
301 ggggaggcaggtgctccgggctgcccgggagggaagagttctgctggttgctgttatt
361 ttcttggggaggaggagaaagaagtgaaggaagatacaacttgatctttggtccctc
421 atcaagtggcagcagctttgacgtgagtaggagcagcggcaccggagatctcgggctc
481 tggcatgggctcgttcgggatggagtggaaaccagaggagctcggtgctgtgggactggga
1      M G S F G M E W N Q R S S V L W D W E
541 gaatttcccgcgataggcgagaaccccaagaacgcgatgcaggccgatccaagatttgc
20  N F P P I G E N P K N A M Q A D P R F A
601 cgccgttgcggtaccatggggaatgaaccgctccattcttctggcggtagcggcacctt
40  A V A A T M G N E P L H S S G G S G T F
661 ctcttccagctcagagatggggtatggctcttccaagagctccatgtccgcgtcgatcga
60  S S S S E M G Y G S S K S S M S A S I D
721 ttcttgaacagggtcgggaacaacatggagttcagatttgcgctgtcaaaaaacctga
80  S S N R A G N N M E F R F A P V K N P D
781 taggaacacgagcaagaacaccgagctgggtaaagttgataaacacgagaactggaacatc
100 R N T S K N T E L G K V D N T R T G T S
841 tccgtcgctgtggtggcagtgagcagtgaggagccgggtgatcggcctgaagcttggcaa
120 P S P V V A V S S G E P V I G L K L G K
901 gagaacttacttcaggatgtctgtggagggcagaatgtcaagagctcgccatcgggtgc
140 R T Y F E D V C G G Q N V K S S P S G A
961 tgcgagcgcgccaacaaatctcctgctttgggcaagaaggcaaggcggaaacaacagaa
160 A S A P N K S P A L G K K A K A E Q Q K

```

```

1021 gccacataactcgtactgtcaggttgaaggctgcaaagtcgacctctcttctgttaaaga
180 P H N S Y C Q V E G C K V D L S S V K D
1081 ttaccatcgaagcacagagtctgtgaacttcaacttaaggctccgaaagtgtgtcgc
200 Y H R K H R V C E L H S K A P K V V V A
1141 tggctcggagcgcagcgttttccaacagtgacgcccgtttcatgcttttagctgagttga
220 G L E R R F C Q Q C S R F H A L A E F D
1201 ccagaaaaagcgaagctgcccgtaggcgtctcaatgatcataattcccgcaggcggaaagcc
240 Q K K R S C R R R L N D H N S R R R K P
1261 acagccagaagcaatttctttcagttcatcaaggatgtctacgatgttttatgatgcaag
260 Q P E A I S F S S S R M S T M F Y D A R
1321 gcaacagccaaatttcttatttggtcaggctccttatgttcaaatagagaagctgtggaag
280 Q Q P N F L F G Q A P Y V Q M R S C G S
1381 ttcttcattgggatgaccaggaggttcaaagttacacacacaaaagctccttggtaaa
300 S S W D D P G G F K V T H T K A P W L K
1441 accaacaactgctgcaggtgttcatgggatacatttatctagtcagcagatgtcggacaa
320 P T T A A G V H G I H L S S Q Q M S D N
1501 tattatgccacatggtgcacatcatggtttcagatgggttcattgacgggaacttg
340 I M P H G A H H G F D G F M A F K G T C
1561 tacaagttccctaatcaaggtgtccaagcttctgctgttgccttcgactccagtgagc
360 T K F P N Q G V Q A S A V A S D S S G A
1621 cccggatcttcagcatgctctctcttctgtcaagcaaccagtggtgctgccaacct
380 P D L Q H A L S L L S S N P V G A A N L
1681 ccagccaagtcaccagatgcactctgggggtggcagccattgccggcgccccaacccgc
400 Q P S P Q M H S G V A A I A G A P N P A
1741 gatgcacgcgctgggatcatcgacggggctctggctagacggcagccagcccctcgatga
420 M H A L G S S T G L W L D G S Q P L D D
1801 tcaccgcgggtccaggctcttcagcgcgttgggggaccatgacagcagctccagctccc
440 H P R F Q V F E R L G D H D S E L Q L P
1861 aaagccttcctacgaccatgcctcgcacttcgaccggatgactgatgatggctccggtc
460 K P S Y D H A S H F D R M H *
1921 cactgggtgctgatgtttgtcagcgcgatcaacgcggtttcttcggcctgaaaatcgtaat
1981 gctgaatttactttgctttgacgcggttgcctgtctagaggcctatggttttgcaatgc
2041 ctagaataaaggcgcacacgaacagacttaggatcaaatcgaccagttgtgttgccatg
2101 gagaaaagtatttggatccatcattagccatttgtctgaataattctgaacttgctatggtt
2161 ctgaaaaaaaaaaaaaaaaaacga

```

Figure 3.3 : Séquence nucléotidique du gène *T. aestivum Squamosa Promoter binding protein-Like 3 (TaSPL3, AK333630.1)* et sa séquence d'acides aminés prédite avec l'outil Translate présent sur le site Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Les nucléotides soulignés ont été utilisés pour la conception d'amorces (Tableau 2,1) pour amplification PCR dans le but de produire des sondes pour la détection par buvardage northern. Le cadre de lecture (ORF) est d'une longueur de 1422 nucléotides et la séquence prédite comprend 473 acides aminés. La masse moléculaire est estimée à 51,2 kDa avec un point isoélectrique théorique de 9,19. En surligné dans la séquence d'acides aminés, le motif SBP (Squamosa Binding Protein) identifié avec l'outil MotifScan (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin>) avec un score de 3562 et une E value de 5,1e-26.

L'analyse de la deuxième séquence SPL que nous avons identifiés, tplb0002m07, a quant-à-elle montré un cadre de lecture complet de 579 nucléotides codant pour 192 acides aminés (Figure 3.4). La protéine aurait une masse moléculaire théorique de 20,1 kDa et un point isoélectrique de 9,87. Les acides aminés les plus représentés dans la séquence de cette protéine sont l'alanine avec 34/192 (17,7%), l'arginine avec 22/192 (11,5%) la glycine avec 20/192 (10,4%) et la sérine avec 20/192 (10,4%). MotifScan a ici aussi identifié un domaine SBP à doigts de zinc avec une valeur E de $1.8e^{-25}$ (en surligné à la Figure 3.4). Une analyse BLASTP a permis de déterminer qu'elle partage 98% d'homologie avec SPL13 de *Triticum urartu* (EMS67887.1) et 77% d'homologie avec SPL13 de *Brachypodium distachyon* (XP_003560169.1); nous la nommerons donc TaSPL13 pour la suite de cette étude.

Il est à noter que TaSPL3 et TaSPL13 montraient également une forte homologie avec SPL2, SPL4, SPL5, SPL8, SPL11 et SPL12 d'*Arabidopsis thaliana* du principalement au domaine SBP fortement conservé chez cette famille et que la taille des protéines de cette famille varie fortement, avec des extrêmes tel que 1035 acides aminés pour AtSPL14 et seulement 174 acides aminés pour AtSPL4.

```

1 ggctccgcttctcttctccttctccttccactcatcagctagctccacagtccacttccgc
61 gacagctcccagagaagagccctaactagcttcatcttcatcgcgcctcaccggaaggca
1 M
121 tggaccgcaaggacaagtcccgcaagtcctcctcggcagcgtccatggccgcgctcggcg
2 D R K D K S R K S S S A A S M A A L A A
181 ccgagctgcgccggcgagcgtggcccgagccgacgggatgtccggcgaggaggaccaga
22 A A A A G D V A R A D G M S G E E D Q K
241 agctgaagctcgtgaacgttcccgtggtctcctcggcggtcgcgagctcctctgcccggg
42 L K L V N V P V V S V G G S S S S A A A
301 cgggtggcgggtgaggaggggagtggtgctgctggcgccgtggcgacggcgcggtgggg
62 V A V R R G S G A A G A V A T G A A G A
361 caggcgggcccagctgccaggctgagaggtgcggcgcgcacctcagcgaggcgaagcggg
82 G G P S C Q A E R C G A D L S E A K R Y
421 accaccgcaggcacaaggtgtgagggcgactccaaggctgctgtcgtggtcgtcgccg
102 H R R H K V C E A H S K A A V V V V A G
481 gcctccgcccagcgttctgcccagcaatgcagccggttccacgagcttttggagttcgagc
122 L R Q R F C Q Q C S R F H E L L E F D D
541 accagaagcgcagctgcccggcgccctggccggggcacaacgagcggcgagggaagagct
142 Q K R S C R R R L A G H N M K A K K S S
601 cggcggaggccaacggcggcgacgggtgcccacgcgcgaccaggacggccgtagccacc

```

```

162  A E A N G G D G C R H A D Q D G R S H P
661  cggggaacccgccgctgaaccatttccagatcagataaacctacctaagcatgctccctc
182  G N P P L N H F Q I R *
721  tcttctgtcatgcagccatgctactagctacatatgtatccaccgacctatgtacgtacc
781  tgcctacctacgtctccactatccggtgtaactggcagtatatgtggtctcctgtac
841  tgctatatattttgctgctgtctgccaaaaaactaagctaagctaattgtaacctgggaac
901  tggtcagggtgtagagtgattgtgtgtgtgatgtgtaattgtatggcctgtgcagccgag
961  acttctgcaggctgtgtaatatgtgctgtgtgctgggataattgtggcaatatatgcta
1021 tctattcgagtaactactaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaacga

```

Figure 3.4 : Séquence nucléotidique du gène *T. aestivum Squamosa Promoter binding protein-Like 13 (TaSPL13)* prédit par un assemblage d'EST (tp1b0002m07) et sa séquence d'acides aminés prédite avec l'outil Translate présent sur le site Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Les nucléotides soulignés ont été utilisés pour la conception d'amorces (Tableau 2,1) pour amplification PCR dans le but de produire des sondes pour la détection par buvardage northern. Le cadre de lecture (ORF) est d'une longueur de 579 nucléotides et la séquence prédite comprend 192 acides aminés. La masse moléculaire est estimée à 20,1 kDa avec un point isoélectrique théorique de 9,87. En surligné, le motif SBP (Squamosa Binding Protein) identifié avec l'outil MotifScan (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin>) avec un score de 3497 et une E value de 1,8e-25.

3.5 Analyse du promoteur de *TaSPL3*

Le blé *Triticum aestivum* est hexaploïde (AA BB DD). Il est le résultat de deux hybridations ayant survécu il y a approximativement 10 000 et 8 000 ans. Une première hybridation entre *Triticum urartu*, le donneur du génome A, et *Triticum speltoides*, le donneur du génome B, a produit le blé tétraploïde *Triticum turgidum* (AA BB). Une seconde hybridation entre ce dernier et *Aegilops tauschii*, donneur du génome D, a produit le blé hexaploïde moderne. Bien que le génome du blé moderne ne soit pas complètement séquencé, les génomes de *T. urartu* (Ling *et al.*, 2013) et de *Ae. tauschii* (Jia *et al.*, 2013) ont récemment été publiés. Ceux-ci étant les ancêtres du blé moderne, leur analyse permet d'étudier deux des trois génomes de *T. aestivum*. En comparant la séquence de *SPL3* d'*Ae. tauschii* (*AetSPL3*; EMT31299.1) et celle de *TaSPL3* (AK333630.1), nous pouvons supposer que cette dernière provient du

génomique D puisque leur homologie est pratiquement parfaite. La séquence génomique de *AetSPL3* étant connue (KD503715.1), nous l'avons donc analysé dans le but d'étudier le promoteur de *TaSPL3*. Nous avons effectué un alignement avec la séquence AK333630.1 (Figure 3.5).

```

GENOMIQUE -2500 TCGTGAGCGATGGCGGCTTCTCTTCATCCCGTCTCCAAGTAGCGGTGTCG
GENOMIQUE -2450 GCTACACCCCAACTCAAGCAAGCCAGCCACCATGTGAGAGCAACCTCTC
GENOMIQUE -2400 TTCATCCCATCTCCAAATAGCGGTGTGGCCCTCATTCATTTTCGCCCCG
GENOMIQUE -2350 AGTCCCATCCTTGCAAATTAGGGAAGCCTTGAATTTTGTGATATATTTG
GENOMIQUE -2300 ACATGTTTATGCAAAACGCAATTTTCAAATATAGCACGCTATAACTTCTA
GENOMIQUE -2250 GAGCATTGCTATGCCAACGATACATCTGGACGATTTTGGCACGCCGTCA
GENOMIQUE -2200 CATACCAGCCTTTGATGTACCAGGCCAAATCATCAGACTCCGCTCGATAT
GENOMIQUE -2150 AGCGTCGTACTGGGATCGTAATCTATAGCATCGTGTGCACAACACTTCCA
GENOMIQUE -2100 TAACTTCTATAGGATCTAGAGAAGGACGGCGCTAAATCTTGTAGCGCGCT
GENOMIQUE -2050 ACCTTTTTCAATGGTTCAAATGTTTGTGCTTTGTCAATCTCGGAGGTGAT
GENOMIQUE -2000 GACAATCTGTGAGGAACTTAAGGCATGGCCAATGCATAGCCACAGG
GENOMIQUE -1950 GTGATGTCTCGCACGCCATGTAGGATCGAATATCAAGTAAAGTAGGTTTG
GENOMIQUE -1900 GATAGGGAAGCGGGATCCTCTGCAGGAGCGAGTGTGGAGAGAGAAAG
GENOMIQUE -1850 TGTGGTCCCGTATAAAAGCCGAAAACATTGGAGTGAAGAGTAGAGATGC
GENOMIQUE -1800 ATATGTACTAGAGTCTTTATTTCTATTTCTTGTAGAGGCCACTAGTGA
GENOMIQUE -1750 TAGCTTACATTTGGGAAGAAAAAAACTGTAGATGCTTCAAACATATCTT
GENOMIQUE -1700 TTGTTATGGGACATCTGTATCCATATGCCACCATTGTACATGCCCTAATG
GENOMIQUE -1650 AGTCCTGAACCACAGCACACCCGAAAAGGTTGCTGCTTTTCTACTGGAG
GENOMIQUE -1600 ATTTTGCTGTACAGTAGATACCTACAAGTAGCACTATTGGTAGTAGAAGA
GENOMIQUE -1550 GGTAACAGTAAACAGGTGGCGAGGTTAGTAGCTTAAGAAGCTAGCTGTC
GENOMIQUE -1500 TTTCTTGACCCCTGAGCCCTCTTGGGGATGGTGTGAGGGAGGCATGTGC
GENOMIQUE -1450 CTGGTTGTGTCTGTGCGAAGATGCAC TAGCAGACTAGCAGTAGAGGCATC
GENOMIQUE -1400 CAAATCCATCCCCTGTTCACTTTCTGTTTCAATCCAGGCCACTCAGGT
GENOMIQUE -1350 GGGGCATGACATGAAAAAAGTTAGCTCATTGTGTGTGTGGTGTGGT
GENOMIQUE -1300 GTGCAC TGGGTTATTGTGAGTCTTGTCTTCTTATCTGGTTGCCCTCCTT
GENOMIQUE -1250 TGCTGATTTCTGAGGCCCTCATCCTCTCTCCCAAGTGCCTGCCAGGCAG
GENOMIQUE -1200 AGGGAGGAGACAAAGATTCTTGAGCAAAAAGGAGGAGGCCAGTAAGAT
GENOMIQUE -1150 TCTTGATTGATCTCCCTTTCCATTACACACAGTACACAGTACACCATGGG
GENOMIQUE -1100 TGGCATGAGCAGTTCTTTCCCTCTAGTAGACTGTA AAAAGGGGTCCTC
GENOMIQUE -1050 TTCCCCCAGAAAAAGCAGCTGACTTGATGTGGTATAGGTTCTCCCCCT
GENOMIQUE -1000 CCTCCCTCACTCCCTCAGGCCTGTCCCTCCGCCGTCCCATCCCAAAGGG
GENOMIQUE -950 GTTTGATTTGATTTGATCCGTGTGGAGGGTGGCGCAGAGGCAACGTGGAG
GENOMIQUE -900 CAAATAATGCAGCCCTGAGGTACAGTACCAGTACTCCAGTAGTGGTAGT
GENOMIQUE -850 TTTTCTCTGGCCGGTTGGGGGGGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TaSPL3 GGGGGGG
*****

GENOMIQUE -800 CGGTGAAAGATCTTGATTGGGGCGAGTGAGACCGGGGTGGTTGTCATGAT
TaSPL3 CGGTGAAAGATCTTGATTGGGGCGAGTGAGACCGGGGTGGTTGTCATGAT
*****

GENOMIQUE -750 GCGGCGTAGGGTCCAGCGCCGGGGTGGTTGCTGATGCCGTGATTGGGTTT
TaSPL3 GCGGCGTAGGGTCCAGCGCCGGGGTGGTTGCTGATGCCGTGATTGGGTTT
*****

GENOMIQUE -700 GGGTTTCTTTCAAGGTGATATACTAGATCTCATCTCATCGGCCAGGGATG
TaSPL3 GGGTTTCTTTCAAGGTGATATACTAGATCTCATCTCATCGGCCAGGGATG
*****

GENOMIQUE -650 AGATTTGAGGGGAGGCAGACCTTGTGCGGAGGGCTGAGGCAGCAGAGC

```

```

TaSPL3          AGATTTGAGGGGAGGCAGACCTTGTGCGGAGGGCCTGAGGCAGCAGAGC
*****
GENOMIQUE      -600 TTCTCTCCGTTGATGGGGCCGCTGCTCCGCCGACGTCGTCGCCGGCAC
TaSPL3         TTCTCTCCGTTGATGGGGCCGCTGCTCCGCCGACGTCGTCGCCGGCAC
*****
GENOMIQUE      -550 GGCTCGCCGGGAGCTCCGTTGTTCTCTGGCGCGCTGCTGACTGGGGAGG
TaSPL3         GGCTCGCCGGGAGCTCCGTTGTTCTCTGGCGCGCTGCTGACTGGGGAGG
*****
GENOMIQUE      -500 CAGGTGCTCCGGGCTGCGGGAGGAGGAAGAGTTCTGCTGGTTCCTGTT
TaSPL3         CAGGTGCTCCGGGCTGCGGGAGGAGGAAGAGTTCTGCTGGTTCCTGTT
*****
GENOMIQUE      -450 ATTTTCTTGGGGAGGGAGGAGAAAGAAGTGAAGGGAAGATATCAACTTGA
TaSPL3         ATTTTCTTGGGGAGGGAGGAGAAAGAAGTGAAGGGAAGATATCAACTTGA
*****
GENOMIQUE      -400 TCTTTGGTCCCTCATCAAGGTACTTGTGTGTTCTCCTTTTTTGTCTCTCT
TaSPL3         TCTTTGGTCCCTCATCA-----
*****
GENOMIQUE      -350 TGCTGCTGGGAAATGGAATCATGAATTCATGATGTTCTTGCCATAACTG
TaSPL3         -----
GENOMIQUE      -300 ACGATTCCACTTGTGAAGAAGGTACTCTGCATACTCTCTGTTGCGCAGTA
TaSPL3         -----
GENOMIQUE      -250 GTACACGGCATTCACTCATTCATCTGATGATACTAGCATCTTTGTGTACC
TaSPL3         -----
GENOMIQUE      -200 TCTTCTCTTACTCTCAGTGCTCATATGTGTTCTAAGCTGTTTCATCATC
TaSPL3         -----
GENOMIQUE      -150 ATTGACTTTTCCAAGTGCAAAAAAATGGTCTGATTTGCAAGCTTGCTA
TaSPL3         -----
GENOMIQUE      -100 ATTCTGCTCCTCACCTCTTGTGTTCCATTCTGTTGCTTCAGTGGCAGCA
TaSPL3         -----AGTGGCAGCA
*****
GENOMIQUE      -50  GCTTTGACGTGCGAGTAGGAGCAGCGGCACCGGAGATCTCGGGCTCTGGC
TaSPL3         GCTTTGACGTGCGAGTAGGAGCAGCGGCACCGGAGATCTCGGGCTCTGGC
*****
GENOMIQUE      1  ATG
TaSPL3         ATG
                ***

```

Figure 3.5 : Alignement entre la partie 5' UTR de *TaSPL3* (AK333630.1) et la séquence génomique sur *Aegilops tauschii* (KD503715.1). L'intron présent dans la région 5' UTR est souligné. Les astérisques représentent un alignement parfait entre la séquence génomique et la séquence de *TaSPL3*. Les éléments de régulation *cis* présents dans l'intron 5' UTR et dans la région promotrice de *TaSPL3* sont surligné.

Ce faisant, nous avons identifié un intron de 324 nucléotides situé 60 nucléotide en amont de l'ATG, dans la région 5' UTR de l'ARNm de *TaSPL3*. La région -384 à -807 faisant également partie de l'ARN messager, nous avons pu déduire que la séquence promotrice de *TaSPL3* est probablement située entre -807 et -2500 nucléotides en amont de l'ATG. Dans le but de mieux comprendre la fonction de *SPL3* chez le blé,

nous avons fait l'analyse des éléments de régulation *cis* présent dans la région promotrice. Puisqu'on ne peut exclure la possibilité qu'il y ait également des éléments de régulation dans l'intron, nous en avons également fait l'analyse. Nous avons utilisé les outils bio-informatique PLACE (Database of plant cis-acting regulatory DNA elements; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) et plantCARE (plant *cis*-acting regulatory elements; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) pour identifier les éléments de régulation *cis* présentés au Tableau 3.2 et mis en évidence sur la séquence génomique de *TaSPL3* à la Figure 3.5.

Parmi les plus intéressants, notons les éléments de réponse suivant : ARR1 (NGATT ; *Arabidopsis* response element) (Sakai *et al.*, 2000), un activateur de la transcription chez *Arabidopsis* et le riz, localisés à -118, -299, -942, -947, -1147, -1154, -1187, -1247, -1602 et -2219 et CURECORE (GTAC ; Copper-response element) (Quinn et Merchant, 1995) à -205, -250, -279, -381, -869, -875, -881, -1112, -1119, -1592, -1665, -1796 et -2184. De plus, nous avons détecté plusieurs éléments de régulation *cis* ciblés par des facteurs de transcription associés à la réponse au froid tel que : MYC (CANNTG ; Myelocitomatosis) (Abe *et al.*, 2003) localisés à -139, -177, -230, -293, -1032, -1218, -1323, -1355, -1457, -1538, -1679, -1689, -1801, -1996, -2034, -2419, WRKY (TGAC) (Eulgem *et al.*, 1999) localisés à -148, -302, -1029, -1344, -1495, -2001, -2302, LTRE (CCGAAA ; Low Temperature Responsive Element) (Dunn *et al.*, 1998) localisés à -1630 et -1831, MYB (CNGTTR; Myeloblastosis) (Luscher et Eisenman, 1990) à -70, -263, -839, -1901 et à MYB2 (YAACKG, Myeloblastosis2) (Abe *et al.*, 2003) à -306 et -1033.

Tableau 3.2 : Liste des éléments de régulation *cis* dans l'intron 5' UTR et la région promotrice de *TaSPL3*. La position est relative à l'ATG.

nom du motif	séquence	position
ABRELATERD1	ACGTG	-908
ABRERATCAL	MACGYGB	-909
ACGTATERD1	ACGT	-908
AMYBOX2	TATCCAT	-1683
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	-1035
ARFAT	TGTCTC	-359, -1946
ARR1AT	NGATT	-118, -299, -942, -947, -1147, -1154, -1187 -1247 -1602 -2219
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	-302
BIHD1OS	TGTCA	-1469, -2019
BP5OSWX	CAACGTG	-910
BS1EGCCR	AGCGGG	-1892
CAATBOX1	CAAT	-1967, -2042, -2282
CACTFTPPCAL	YACT	-190, -220, -238, -269, -278, -293, -380, -868 -992, -1297, -1359, -1381, -1388, -1427, -1569 -1608, -1795, -2108, -2143
CAREOSREP1	CAACTC	-2440
CATATGGMSAUR	CATATG	-177, -1679, -1801
CCAATBOX1	CCAAT	-1968
CDA1ATCAB2	CAAACGC	-2289
CGCGBOXAT	VCGGB	-2057
CIACADIANLELHC	CAANNNNATC	-1400
CURECORECR	GTAC	-205, -250, -279, -381, -869, -875, -881, -1112 -1119, -1592, -1665, -1796, -2184
DOFCOREZM	AAAG	-956, -1037, -1062, -1173, -1189, -1333, -1625 -1835, -1854, -1912
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	-1634
E2FCONSENSUS	WTSSCSS	-2360
EBOXBNNAPA	CANNTG	-139, -177, -230, -293, -1033, -1218, -1323 -1355, -1457, -1538, -1679, -1689, -1801, -1996 -2034, -2419

nom du motif	séquence	position
ECCRCAH1	GANTTNC	-117, -1246
ELRECOREPCRFP1	TTGACC	-1496
GATABOX	GATA	-222, -1584, -1752, -1900, -2232, -2310
GT1CONSENSUS	GRWAAW	-341, -1040, -1066, -1338, -1628, -1734
GT1GMSCAM4	GAAAAA	-1040, -1338, -1628, -1734
GTGANTG10	GTGA	-288, -1285, -1754, -1817, -1950, -2005, -2312 -2416, -2498
INRNTPSADB	YTCANTYY	-994, -1372, -2370
INTRONLOWER	TGCAGG	-1880
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	-1630, -1831
MYB2AT	TAACTG	-306
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	-306, -1033
MYBCORE	CNGTTR	-70, -263, -839
MYBST1	GGATA	-1901
MYCATERD1	CATGTG	-1457, -2419
MYCCONSUSAT	CANNTG	-139, -177, -230, -293, -1032, -1218, -1323 -1355, -1457, -1538, -1679, -1689, -1801, -1996 -2034, -2419
NODCON1GM	AAAGAT	-1189
NODCON2GM	CTCTT	-86, -194, -201, -354, -1053, -1482, -2403, -2481
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	-1189
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	-86, -194, -201, -354, -1053, -1482, -2403, -2481
PALBOXAPC	CCGTCC	-968
POLASIG3	AATAAT	-898
POLLEN1LELAT52	AGAAA	-1041, -1735
PREATPRODH	ACTCAT	-237
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	-366, -2049
RAV1AAT	CAACA	-2111
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	-2307
SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	-360
SORLIPIAT	GCCAC	-1674, -1958, -2424
SURECOREATSULTR11	GAGAC	-1194
T/GBOXATPIN2	AACGTG	-909
TAAAGSTKST1	TAAAG	-1913
TATABOX5	TTATTT	-1784
TATCCAOSAMY	TATCCA	-1682
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY	-1682
WBOXATNPR1	TTGAC	-149, -1496, -2303
WBOXHVIS01	TGACT	-148, -1029
WBOXNTCHN48	CTGACY	-1030
WBOXNTERF3	TGACY	-148, -1029, -1495
WRKY71OS	TGAC	-148, -302, -1029, -1344, -1495, -2001, -2302

3.6 Analyse du promoteur de *TaSPL13*

Nous avons analysé le promoteur de *TaSPL13* de manière similaire. L'analyse de la séquence protéique codée par ce gène avait révélé une forte homologie avec la protéine hypothétique SPL13 déduite du génome de *Triticum urartu* (EMS67887.1). En comparant la séquence génomique dont elle provient et notre assemblage d'EST, nous pouvons supposer que *TaSPL13* provient du génome A puisque leur homologie est pratiquement parfaite. On peut donc analyser la région en amont de l'ATG sur la séquence génomique de *Triticum urartu* (KD013686.1) dans le but d'étudier le promoteur de *TaSPL13*.

```

GENOMIQUE -2000 ACTTGAGATCGGCCACAAGTTGCTAACACTTTGTCTTGCCATTCAATATG
GENOMIQUE -1950 ACCCAACAAATGGCTAAACGCAAATGGCTTCTTCTCCACCTCATGATACAA
GENOMIQUE -1900 AGTGGCTGCCACCGTCTAGCAAACAACATATGTATGAGCAGGAAAAT
GENOMIQUE -1850 GCAAACACAAGAATCATATGCAAATGGCGACAAGATGAAGCAATTGAGCT
GENOMIQUE -1800 TACATGAGTTGCGACTCCCATCCCACCTTTGAGGGGCTTTGGTCACTTGTG
GENOMIQUE -1750 AGTAGTAGCCGACGTACTTATTCACCTCCCTTGAATGACCCCAATAA
GENOMIQUE -1700 TGTGGAGAGATGCCACATTGCGGGTGGTCACGATAGGATGCGGTTCCAC
GENOMIQUE -1650 AACTTCTTTGTTGCTGATACTCCTTCCAAATCTTCATCCAATATGTGT
GENOMIQUE -1600 TCCCCTTTTGTGTTGGTGCCGCATATTGGATCCATCGTTGTGGCAAACCAA
GENOMIQUE -1550 GCTTTGACAAAACAAGATGTCCTCAAATCTTGAGAATGCTGAACCTCTTGC
GENOMIQUE -1500 CTTGAGCGTCTTGGTCTTCTTCTTCTGCTCAGATTGGGATTGAATGTTA
GENOMIQUE -1450 TCCCAACTTCAAATGCGGTGGTGGCTCCAATTCATATTCCATTCGGTTC
GENOMIQUE -1400 GGATCTTCATTTGTCATTTGATCATGTTCGAAAAGAACGCCTCTACATGAT
GENOMIQUE -1350 TATGGTTTGCAAGCATTCATCATGTGCGAAATGAACTAGTGGTTTATGCA
GENOMIQUE -1300 AAAATCTGATCAGACAGGAGCAAATAAAATGCACTGACTATTGTTGAGCC
GENOMIQUE -1250 ATTCCGTTGAACATGTGAGGGCAGCTCGGGCAGCTTTTGTATGCCCGTGT
GENOMIQUE -1200 CATCTGTGCCGAACGAGCTGCGGTGAGTCACATACGTCGACCGTCCGGCA
GENOMIQUE -1150 TATGTGTGGGTAGAAAGTTGTCCAGAAATGGCCAGTAGGCAGTCCAATCA
GENOMIQUE -1100 TCCTCTGTCCCAACGGGGTCAAACAGCGTAATCTGCATCGGCACTCGGAT
GENOMIQUE -1050 GGAAGGGGTGCGGGGATCCGAGCGCGGGGAGGAGATAGCTGTTCCACCA
GENOMIQUE -1000 TGTCCGAACCTCCCTGCGGCCCCACCTCCCTTCTCGCTGCCGGCGTA
GENOMIQUE -950 GCCGCAACTCCCATGCGACGTTCTCCGCTTTGCAAGTCGACGCCACGAA
GENOMIQUE -900 GTGACCCGCTGACGGACGAGGCGGATTGTGTCTCCGCTGCAACTCCAGG
GENOMIQUE -850 CGACGTTCTCCACCTTGCAAGTCGACGCCGACGAAAGTGACCCGCCGACGG
GENOMIQUE -800 AAGAGGCGGACTGCGTCTGCCATGGCGGTCTGGGTGCGGCTGGACGAC
GENOMIQUE -750 ATCTCCGATGATGGATCGGGACCGTGGTTAGGATTGGGAGCAAGGGTGG
GENOMIQUE -700 AGGATGGCGAGGGTCCGGGCGCGGAAAGTTGGGGGGCGACGGGATGAG
GENOMIQUE -650 GGGAAAGGGTTTGGTGGATTGTTGCAATTTGAGGTGGGGTGGGCTGTCT
GENOMIQUE -600 GGGTCCGACCTGGCGGGTATGCCCGGCCCTTATATCCGCCCATATT
GENOMIQUE -550 TAAGCTGGATATGAGGGGTGCCGGTTAGCCTGGGCGTCTGAGGCTTATTT
GENOMIQUE -500 AAGGAGCCCATCTGGTCAAAAATCGTGATCAATCAGTGACCGGATGGCC
GENOMIQUE -450 CGCTCGAACGTATGAGGCGGGTTTGGAGCGCCCGTTATAGATGCTCTTA
GENOMIQUE -400 CATCTAAAATCGTTTTAATGGCGGTTGGGGCTATATGACGACTTTGTTAG
GENOMIQUE -350 AGTTGCTAGATGGCATATCCATTTTATGTCCTTGGGTGCTTGGGTCAGCG
GENOMIQUE -300 GTGTTACCATGTGACTTAACATGTCAGTATGTTTACCCGTGCCACGTAC

```

```

GENOMIQUE      -250 TAGTACGTGCGTACTCTACAGTATATACAAAGACCAGGACCGTATTGTGT
GENOMIQUE      -200 GTAGCAGCGCGCCACATGTGCGCCCTGCCTCCACACATACGGCACCCGC
GENOMIQUE      -150 CTTTATATCCCTTTTCGACCTTTCCTCCACCCCTCCGCTTCTTCTCCTT
TaSPL13                               GGCTCCGCTTCTTCTCCTT
                                         *****

GENOMIQUE      -100 CTCCTTCCACTCATCAGCTAGCTCCACAGTTCCTTCCGCGACAGCTTC
TaSPL13        CTCCTTCCACTCATCAGCTAGCTCCACAGTTCCTTCCGCGACAGCTCC
                                         *****

GENOMIQUE      -50  CCGAGAAGAGCCCTAACTAGCTTCATCTTCATCGCGCCTCACCGGAAGGC
TaSPL13        CAGAGAAGAGCCCTAACTAGCTTCATCTTCATCGCGCCTCACCGGAAGGC
                                         *

GENOMIQUE      1   ATG
TaSPL13        ATG
                                         ***

```

Figure 3.6 : Alignement entre la partie 5' UTR de *TaSPL13* et la séquence génomique sur *Triticum urartu* (KD013686.1). Les astérisques représentent un alignement entre la séquence génomique et celle de *TaSPL13*. En surligné, les éléments de régulation *cis* présents dans la région promotrice de *TaSPL13*.

Nous avons donc une fois de plus utilisé les outils bioinformatiques PLACE et plantCARE pour analyser la séquence en amont de l'UTR de *TaSPL13*. Nous les avons répertoriés au Tableau 3.3 et mis en évidence sur la séquence génomique de *TaSPL13* à la Figure 3.6.

On retrouve une fois de plus des séquences de réponse à MYC (CANNTG ; Myelocitomatosis) (Abe *et al.*, 2003) à -185, -187, -293, -492, -1152, -1200, -1330, -1441, -1810, -1830, -1836, -1871 et -1931, à MYB (CNGTTR; Myeloblastosis) (Luscher et Eisenman, 1990; Abe *et al.*, 2003) à -379, -418, -529,-544, -1089, -1247 et -1557 et WRKY (TGAC) (Eulgem *et al.*, 1999) à -289, -365, -463, -814, -891, -899, -1266, -1546, -1714 et -1952. Les éléments de régulation ARR1 (NGATT ; *Arabidopsis* response element) (Sakai *et al.*, 2000), à -635, -719, -878, -1354, -1463 et -1469 et les éléments de réponse au cuivre CURECORE (GTAC ; Copper-response element) (Quinn et Merchant, 1995), à -240, -248, -254 et -1737, sont également présent. Notons cependant qu'ils sont en nombre moins important que chez *TaSPL3*. Par contre, la séquence promotrice de *TaSPL13* contient des éléments de réponse au

froid connus tel que CRT/DRE/CBF2 (GTCGAC) (Xue, 2003) à -1165, DRE/CRT (RCCGAC) (Xue, 2002) à -808, -824 et -1743 et LTRE/COR15 (CCGAC) (Baker *et al.*, 1994) à -596, -807, -823 et -1742. De plus, elle contient également deux motifs CARG (CW₈G) à -507 et -556, connus pour interagir avec les facteurs de transcription de la famille MADS, dont TaVRN1 et TaVRT2 font partie.

Tableau 3.3 : Liste des éléments de régulation *cis* du promoteur de *TaSPL13*. La position est relative à l'ATG.

nom du motif	séquence	position
2SSEEDPROTBANAPA	CAAACAC	-1849
ABRELATERD1	ACGTG	-246
ACGTABOX	TACGTA	-257
ACGTATERD1	ACGT	-246, -256, -443, -848, -933, -1166, -1739
ACGTOSGLUB1	GTACGTG	-248
AMYBOX2	TATCCAT	-335
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	-198
ARFAT	TGTCTC	-872
ARR1AT	NGATT	-635, -719, -878, -1354, -1463, -1469
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	-365, -891
BIHD1OS	TGTCA	-279, -1390
CAATBOX1	CAAT	-470, -625, -1422, -1610, -1706, -1810, -1944
CACTFTPPCA1	YACT	-239, -253, -1059, -1219, -1269, -1631, -1649 -1728, -1736, -1758, -1777
CANBNNAPA	CNAACAC	-1849
CAREOSREPI	CAACTC	-861, -946
CATATGMSAUR	CATATG	-1152, -1836, -1871
CARGCW8GAT	CWWWWWWWG	-507, -556
CBFHV	RYCGAC	-808, -824, -1165, -1743
CCA1ATLHCB1	AAMAATCT	-1301
CCAATBOX1	CCAAT	-1423, -1611, -1707
CELLCYCLESC	CACGAAAA	-1859
CGACGOSAMY3	CGACG	-664, -806, -822, -850, -935, -1741
CGCGBOXAT	VCGCGB	-194, -682, -1029
CRTDREHVCBF2	GTCGAC	-1165
CURECORECR	GTAC	-240, -248, -254, -1737
DOFCOREZM	AAAG	-222, -647, -675, -1137, -1371, -1902
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	-1846
DRECRTCOREAT	RCCGAC	-808, -824, -1743
E2F1OSPCNA	GCGGAAAA	-680
EBOXBNNAPA	CANNTG	-185, -187, -293, -492, -1152, -1200, -1330 -1441, -1758, -1810, -1830, -1836, -1871, -1931

nom du motif	séquence	position
EECCRCAH1	GANTTNC	-351, -1795
GATABOX	GATA	-544, -1016, -1633, -1668, -1907
GCCCORE	GCCGCC	-575, -984
GCN4OSGLUB1	TGAGTCA	-1176
GT1CONSENSUS	GRWAAW	-1856
GTGANTG10	GTGA	-290, -464, -475, -814, -900, -1177, -1635, -1753
HEXAMERATH4	CCGTCG	-1159, -1889
INRNTPSADB	YTCANTYY	-1730
L'TRECOREATCOR15	CCGAC	-596, -807, -823, -1742
MYB1A'T	WAACCA	-1557
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	-1090
MYBCORE	CNGTTR	-379, -418, -529, -1247
MYBCOREATCYCB1	AACGG	-1089
MYBST1	GGATA	-544
MYCATERD1	CATGTG	-185, -187, -293, -1330
MYCCONSUSAT	CANNTG	-185, -187, -293, -492, -1152, -1200, -1330 -1441, -1810, -1830, -1836, -1871, -1931
NODCON2GM	CTCTT	-406, -1507
PIBS	GNATATNC	-230, -338
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	-406, -1507
POLASIG1	AATAAA	-1278
POLASIG3	AATAAT	-1705
POLLEN1LELAT52	AGAAA	-1139
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	-1597
RAV1AAT	CAACA	-1874, -1947
REALPHALGLHCB21	AACCAA	-1556
RHERPATEXPA7	KCACGW	-1672, -1860
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	-554, -1416, -1579
SORLIP1AT	GCCAC	-1688, -1893
SREATMSD	TTATCC	-1453
SURECOREATSULTR11	GAGAC	-426
SV40COREENHAN	GTGGWWHG	-726
TBOXATGAPB	ACTTTG	-360, -1776
TATABOXOSPAL	TATTTAA	-505, -554
TATABOX5	TTATTT	-506
TATCCAOSAMY	TATCCA	-335
TATCCAYMOTIFOSRAMY3D	TATCCAY	-335
WBOXATNPR1	TTGAC	-1547
WBOXHVIS01	TGACT	-289, -1266
WBOXNTCHN48	CTGACY	-1267
WBOXNTERF3	TGACY	-289, -463, -814, -899, -1266, -1714, -1952
WRKY71OS	TGAC	-289, -365, -463, -814, -891, -899, -1266, -1546 -1714, -1952
WUSATg	TTAATGG	-386

3.7 Complémentarité entre *miR156* et ses cibles

Nous avons ensuite vérifié si les ARN messagers de *TaSPL3* et *TaSPL13* avaient effectivement une région complémentaire avec les deux membres de la famille *miR156* ayant été détectés le plus fortement dans nos analyses préliminaires. La Figure 3.7 montre la structure en épingle à cheveux des précurseurs de *miR156a* et *miR156k* ainsi que la séquence des microARNs matures. Elle montre également la région complémentaire entre les ARN messagers de *TaSPL3* et *TaSPL13* avec ces deux microARNs. L'alignement complet est également disponible en Annexe aux Figures 5.19 et 5.20. On peut voir que la séquence de nucléation (seed sequence) est parfaitement complémentaire et que le reste de l'appariement est complété avec un maximum de trois nucléotides non-complémentaires. *miR156* est complémentaire à *TaSPL13* dans sa région 3' UTR alors qu'il s'aligne à *TaSPL3* à la fin de sa région codante. La région de l'ARN messenger ciblé par un microARN aurait une influence sur la voie d'inhibition que suivra l'ARN messenger, soit une dégradation ou une inhibition de la traduction (Brodersen *et al.*, 2008).

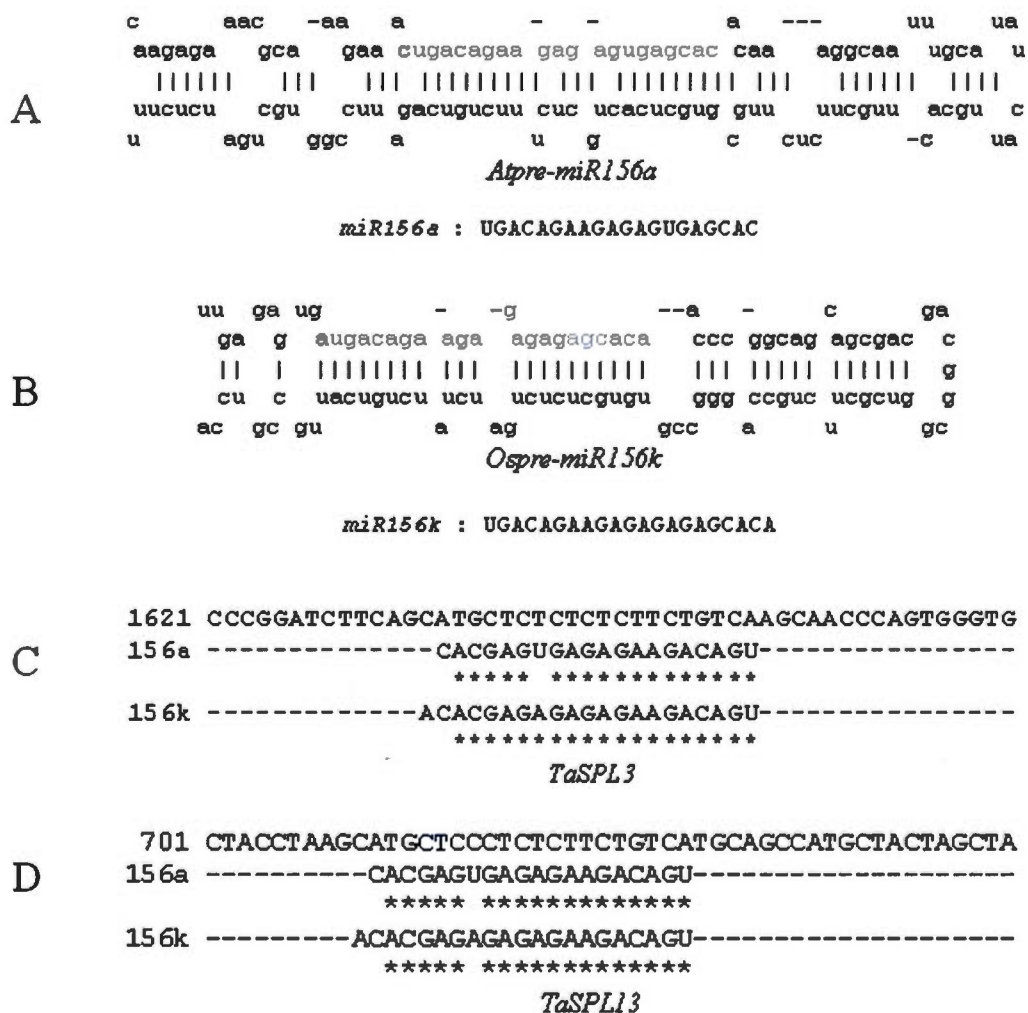


Figure 3.7 : miR156 est complémentaire aux gènes *TaSPL*. (A) Précurseurs de *AtmiR156a* et sa séquence mature. (B) Précurseur de *OsmiR156k* et sa séquence mature. (C) Complémentarité entre *miR156a*, *miR156k* et *TaSPL3*. (D) Complémentarité entre *miR156a*, *miR156k* et *TaSPL13*.

3.8 Expression de *miR156* et des gènes *SPL* lors du traitement au froid

Puisque les cibles connues de *miR156* étaient également présentes chez le blé et qu'elles avaient une région complémentaire au microARN, nous avons entrepris de vérifier si l'expression de *miR156* était inversement proportionnelle à celle de ces deux cibles potentielles. Ces analyses sont disponibles à la Figure 3.8. On peut voir, en 3.8A, que *miR156* (nous avons utilisé un mélange des sondes *miR156a* et *miR156k* dans un rapport 1:1) est fortement exprimé à 20°C mais que son expression diminue à un niveau très faible sept jours après le transfert à 4°C. Son expression n'augmente pas lorsque le traitement au froid est prolongé ni lors de la dé-acclimatation des plantes. À la Figure 3.8B, on peut voir le contrôle de charge du gel ayant servi à produire la membrane de la Figure 3.8A. Il s'agit du contrôle généralement accepté pour les buvardages de petits ARN, soit les ARN ribosomiaux 5.8S et 5S ainsi que les ARN de transfert. On peut voir que les bandes de chaque piste ont une intensité similaire et donc que nous pouvons comparer de manière quantitative les intensités obtenue en 3.8A.

Les Figures 3.8C et 3.8D montrent respectivement les cinétiques d'expression de *TaSPL13* et *TaSPL3* lors du traitement au froid. Ces buvardages sont une fois de plus accompagnés du contrôle de charge du gel ayant servi pour obtenir la membrane (3.8E). On peut voir sur ce dernier que les quantités d'ARN chargé dans chaque piste sont comparables puisque les bandes pour les ARN ribosomiaux 28S et 18S ont une intensité comparable dans chaque piste. Ainsi, nous pouvons également comparer les pistes des Figures 3.8C et 3.8D. On peut voir que l'expression de *TaSPL13* (3.8C) est faible à 20°C et augmente graduellement jusqu'à atteindre son niveau le plus fort après 21 jours de traitement au froid. Son expression diminue ensuite lentement mais semble ré-augmenter à 49 jours d'acclimatation. La dé-acclimatation ne semble pas modifier son expression. L'expression de *TaSPL3* (3.8D) semble suivre la même

tendance, soit un niveau faible à 20°C et une augmentation graduelle pour être à son maximum à 21 jours de traitement au froid et une diminution pour le reste de l'acclimatation.

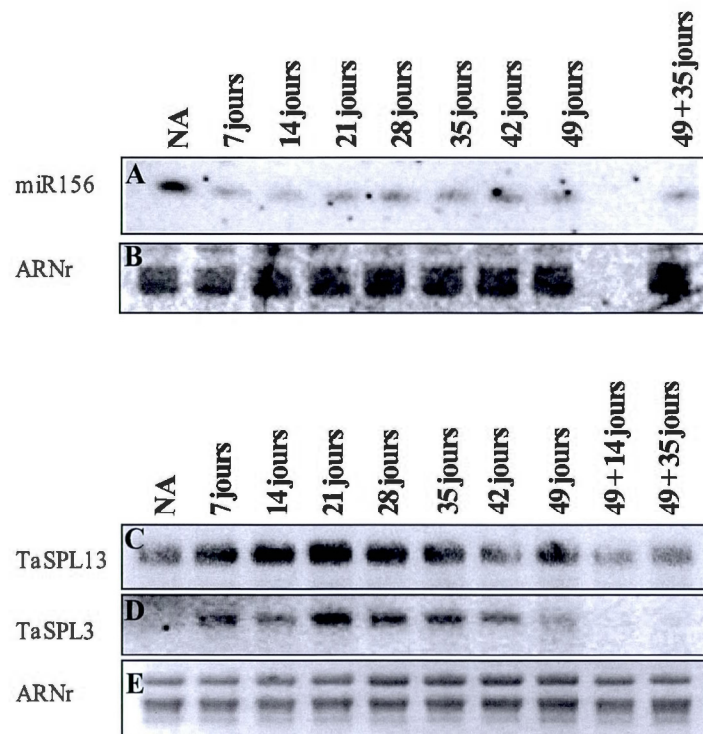


Figure 3.8 : Cinétique d'expression de *miR156* et de deux cibles potentielles chez le blé non-acclimaté ou ayant subi un traitement au froid de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 jours et 49 jours de traitement additionnés de 35 jours à 20°C pour permettre la floraison. (A) Cinétique d'expression de *mir156a/k*. (B) Contrôles de charge ARN ribosomaux 5.8S, 5S pour les échantillons présentés en A. (C) Cinétique d'expression de *TaSPL13*. (D) Cinétique d'expression de *TaSPL3* (AK333630.1). (E) Contrôles de charge ARN ribosomaux 28S et 18S pour les échantillons présentés en C et D.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Détection des microARNs

Les microARNs sont, depuis quelques années, le sujet de plusieurs programmes de recherche. Ils sont au centre d'une voie de régulation post-transcriptionnelle qui n'avait pas encore été explorée et semblent cibler des gènes majeurs autant chez les animaux que chez les végétaux. À cause de l'intérêt grandissant pour ceux-ci, de nouvelles approches de détection et d'analyses ont dû être développées. La technique du buvardage northern demeure l'analyse la plus convaincante pour visualiser l'expression de ces petits ARN et elle est donc bien souvent la première méthode utilisée pour en confirmer l'existence. La méthode traditionnelle, fixant les ARN à une membrane de nylon en utilisant un rayonnement U.V., est basée sur une réaction photochimique modifiant les uraciles présents dans la séquence de l'ARN, produisant des espèces réactives qui formeront un lien covalent avec les groupements amines disponibles à la surface de la membrane de nylon. Ce faisant, la structure de ces nucléotides est modifiée de telle sorte qu'ils sont incapables de former un lien avec leur nucléotide complémentaire. Cette méthode a été développée dans le but de fixer, rapidement et à moindre coût, des acides nucléiques de taille beaucoup plus grande que les microARNs et n'est donc pas adaptée à ceux-ci. Elle a le désavantage, en modifiant les uraciles, de réduire la taille des séquences ininterrompues de nucléotides pouvant servir à l'hybridation, réduisant ainsi grandement l'efficacité de la méthode pour la détection des ARNs de petite taille. De plus, la composition en acides nucléiques des microARNs varie énormément d'une famille à une autre. La séquence de *miR159a*, par exemple, comporte sept uraciles alors que *miR156a* n'en

contient que deux. Il est néanmoins possible que l'hybridation de certains microARNs soit moins affectée par la fixation aux ultra-violets, selon qu'ils aient un plus grand nombre d'uracile, en fonction de leur position et du nombre de nucléotides consécutifs disponibles pour l'hybridation. Les études de Pall *et al.* ont fourni une alternative fiable en offrant la possibilité de fixer les petits ARNs via leur extrémité 5' et rendant donc disponible la totalité de la séquence du petit ARN pour l'hybridation avec une sonde spécifique (Pall *et al.*, 2007). Ils estiment que cette méthode permet d'augmenter la sensibilité du buvardage northern, pour les ARNs de 20 à 40 nucléotides, d'un facteur de 25 à 50 fois. Ces données ont été confirmées par un groupe tentant de détecter une modification de l'expression de plusieurs microARNs en réponse à la température. Dans leurs études préliminaires, Lee *et al.*, ont observé une augmentation de la sensibilité de détection de *miR156* de plus de 100 fois en utilisant la méthode de fixation de l'ARN avec de l'1-ethyl-3-(2-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), selon les recommandations de Pall *et al.*, plutôt que la fixation des ARN conventionnelle aux U.V. (Lee *et al.*, 2010). Nos études confirment en quelque sorte leurs résultats puisque nous avons effectivement obtenu une augmentation de la sensibilité de la détection de *miR156* en utilisant la méthode EDC. Cependant, le signal obtenu demeurerait relativement faible puisqu'il nécessitait près de 2 jours d'exposition sur un écran au phosphore pour être visible.

Parmi les microARNs associés au froid que nous avons tenté de détecter, apMir_636 (WCS19) et apMir_19532 (CBFIVb-B20) étaient des candidats intéressants pour la détection au buvardage northern. Ils étaient les plus abondants lors du séquençage à haut débit. Leur signal étant néanmoins de 25 à 30 fois inférieur à celui produit par les microARNs de la famille *miR156*, leur détection aurait nécessité d'augmenter la quantité d'ARN sur la membrane ainsi que d'augmenter le temps d'exposition. En supposant que la force du signal soit directement dépendante et proportionnelle à la quantité d'ARN sur le gel, il aurait été nécessaire d'utiliser de 50 à 60 µg de petits

ARNs purifiés pour avoir une chance de détecter les deux microARNs les plus abondants parmi ceux associés au froid. Il semble donc évident que nous avons atteint la limite de détection de la méthode.

Malgré le fait que nous n'ayons pu détecter par buvardages northern les microARNs de gènes associés à la réponse au froid, ils ont pu être détectés par séquençage. Une technique plus sensible, tel que la PCR en temps réel, pourrait probablement permettre d'obtenir plus d'information quant à l'expression de ces microARNs lors du traitement au froid. De plus, bien que nous ayons confirmé que certains ARNm *CBFs*, *LEAs*, *WCS19* ou *COR413* avaient effectivement une région complémentaire à ces microARNs, nous ne pouvons qu'émettre l'hypothèse qu'ils pourraient être régulés par des microARNs. Des analyses tel que a) l'hybridation *in situ*, pour détecter si les microARNs et leur cibles se retrouvent dans les mêmes types cellulaires, b) la recherche et la détection des produits de la dégradation des ARNm cibles, pour confirmer que l'ARNm cible est effectivement clivé par le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex), ainsi que c) l'analyse des profils d'expression des microARNs et de leurs cibles seront nécessaires pour confirmer la régulation qu'exercent ces microARNs sur la régulation de la réponse au froid. De plus, des analyses impliquant des plants transgéniques déficients pour ces microARNs, générés à l'aide d'ARN interférants complémentaires aux microARNs par exemple, sont généralement effectués pour préciser le rôle de ces microARNs.

4.2 Les gènes "*Squamosa Promoter binding protein-Like*"

Les gènes *SPL* (*Squamosa Promoter binding protein-Like*) ont été identifiés chez *Antirrhinum majus* en 1997 et caractérisés chez la plante-modèle *Arabidopsis thaliana* en 1999 (Cardon *et al.*, 1999). Les protéines AmSBP1 et AmSBP2

(Squamosa Binding Protein) ont été nommées ainsi en vertu de leur capacité à interagir avec des éléments du promoteur du gène d'identité floral *Squamosa*. Elles sont caractérisées par leur domaine de liaison à l'ADN, le domaine SBP. Cardon *et al.* ont identifié 12 protéines d'*Arabidopsis* ayant une forte homologie avec le domaine SBP, donnant ainsi le nom de SPL à toute la famille.

La famille SPL regroupe des facteurs de transcription spécifiques aux plantes. Bien que les différents membres ne présentent qu'une faible homologie au niveau de leur structure primaire, ces protéines ont comme point commun le domaine de liaison à l'ADN SBP (consensus : CQVEGCKADL SSAKH_YHRR HKVCEFHSKA PKV_CCAGLE QRFCQQCSRF HVLSEFDEGK RSCRRLAGA NERRRKPS). Ce domaine comporte le domaine SBP, spécifique aux SPL, et deux sites de liaison à doigt de zinc: Cys₃-His-Cys₂-His-Cys et Cys₆-His-Cys (Yamasaki *et al.*, 2004). Comme on peut le voir aux Figures 3.3 et 3.4, les SPL que nous avons identifiés présentent le domaine SBP ainsi que les deux motifs à doigt de zinc. Un autre point commun à tous les gènes *SPL* est qu'ils présentent un intron dans la séquence du domaine SBP, entre les acides aminés QQCSR et FHVLS. La taille de cet intron est cependant variable, de 74 paires de bases (*AtSPL1*) à 646 paires de bases (*AtSPL9*). La taille de cet intron est une particularité étonnante de cette famille protéique puisque la taille moyenne des intron chez les plantes est d'environ 150 nucléotides. Un domaine de signalisation nucléaire bipartite est également compris dans la séquence SBP (Cardon *et al.*, 1999). Outre le domaine SBP, la séquence des protéines SPL est peu conservée. Elles varient en taille, de 174 acides aminés (*AtSPL4*) à 1035 acides aminés (*AtSPL14*), et leur organisation génomique n'est pas conservée dans toute la famille. Certaines protéines SPL présentent des motifs caractéristiques impliqués dans les interactions protéines/protéines. *AtSPL6* et *AtSPL8* ont un domaine de dimérisation de type MYC hélice-boucle-hélice alors que *AtSPL7* a un "leucine zipper" (Cardon *et al.*, 1999). La famille SPL a été divisée en 9 clades phylogéniques

selon l'homologie de leurs séquences en acides aminés, ainsi que par le nombre d'introns compris dans leur séquence codante (Xie *et al.*, 2006; Preston et Hileman, 2013). Seuls les gènes des clades IV, V, VI, VII, VIII et IX ont une région complémentaire aux microARNs *miR156* et *miR157* permettant leur régulation post-transcriptionnelle. Cette région est généralement comprise dans la séquence codante des gènes de la famille SPL, à l'exception de *AtSPL3*, *AtSPL4* et *AtSPL5* où elle serait située dans la région 3' UTR (Xie *et al.*, 2006; Gandikota *et al.*, 2007). Dans le cas de *TaSPL3* et *TaSPL13* présentés dans cette étude, la région ciblée par *miR156* est située dans la région codante et dans la région 3' UTR respectivement. De plus, ils présentent tous deux un nucléotide non-apparié à la position 14 du microARN. Ce nucléotide non-apparié est une caractéristique conservée dans la plupart des cas de régulation de gènes *SPL* par *miR156* (Chuck *et al.*, 2007). Ensemble, la taille des *SPL* ainsi que l'emplacement de la région complémentaire à *miR156* nous forcent à mettre en doute la nomenclature que nous avons acceptée pour nos deux gènes. En premier lieu, *AtSPL3* est considéré comme un des plus petits *SPL* avec 131 acides aminés, ce qui est contraire avec la taille de 473 acides aminés prédite pour *TaSPL3*. En second lieu, *AtSPL3/miR156* est, avec *APETALA2/miR172*, l'un des rares exemples chez les plantes de la régulation d'un ARN messager par inhibition de la traduction. L'hybridation d'un microARN dans la région 3' UTR est également peu fréquente chez les plantes (Chen, 2004; Brodersen *et al.*, 2008).

4.3 Régulation post-transcriptionnelle de *TaSPL3* et *TaSPL13*

La position de la région ciblée, sur l'ARN messager, par les microARNs est importante pour déterminer la voie de régulation post-transcriptionnelle qui suivra. Chez les plantes, la régulation par les microARNs implique généralement une homologie presque parfaite avec l'ARN messager cible, dans la région codante, ce qui induit son clivage par le complexe RISC suivi de sa dégradation par le nucléosome.

Des évidences grandissantes montrent cependant que tout comme chez les animaux, plusieurs microARNs de plantes peuvent tolérer des nucléotides non-appariés (3 pour *CSD1/miR398*, 6 pour *CSD2/miR398*, 2 pour *CIP4/miR834*) et s'hybrider sur l'ARN messager dans des régions non-codantes. Il est supposé qu'un plus grand nombre de nucléotides non-appariés (plus de trois) dirigerait par défaut la régulation par un microARN vers une inhibition de la traduction de l'ARNm, puisque la condition première pour le clivage est une complémentarité parfaite, ou presque parfaite, entre le microARN et sa cible. Au moins deux exemples d'inhibition de la traduction par un microARN ont été démontrés chez les plantes, soit pour *miR156/AtSPL3* et *miR172/AtAP2* (Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007). De plus, comme chez les animaux, il a été démontré que l'inhibition de la traduction par les microARNs nécessite l'implication des protéines Varicose et Decapping, catalysant le retrait de la coiffe de l'ARNm (Brodersen *et al.*, 2008; Lanet *et al.*, 2009).

Il est donc possible que les voies de régulation de *TaSPL3* et *TaSPL13* soient différentes puisque les deux ARN messagers sont ciblés par *miR156* respectivement dans la région codante et dans la région 3' UTR. Il aurait donc été intéressant, en plus de déterminer le profil d'expression des ARN messagers de *TaSPL3* et *TaSPL13*, de détecter l'expression de leur protéine. C'est particulièrement vrai dans le cas de *TaSPL13*. On remarque à la Figure 3.8C que l'ARN messager de *TaSPL13* est présent malgré la forte expression de *miR156* chez les plantes non-acclimatés au froid. Ce résultat et le fait que *miR156* s'hybride dans la région 3' UTR de cet ARN messager suggèrent une régulation par inhibition de la traduction.

Le domaine SBP se lie *in vitro* à la séquence d'ADN consensus TNCGTACAA (Cardon *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2004). Ainsi, *AtSPL3* interagit avec le promoteur de *APETALA1* (AP1), l'homologue de *SQUA* chez *Arabidopsis* (Cardon *et al.*, 1999). Des évidences récentes suggèrent cependant qu'une partie plus petite de ce

motif, GTAC, serait suffisante pour la régulation de certains gènes ciblés par les protéines SPL (Birkenbihl *et al.*, 2005; Yamasaki *et al.*, 2009).

4.4 Éléments de régulation *cis* des régions promotrice de *TaSPL3* et *TaSPL13*

L'intérêt pour les gènes *SPL* est demeurée très faible jusqu'à l'émergence des études sur les microARNs chez les plantes. De fait, la très grande majorité de l'information sur ces gènes découle de leur relation avec *miR156/157*, dont ils sont les seules cibles connues. À notre connaissance, aucune analyse n'a été publiée sur les éléments de régulation *cis* du promoteur des gènes *SPL*. Nous avons identifié un intron dans la région 5'UTR de *TaSPL3*. Cette information est intéressante puisque *AtSPL2* possède également un intron dans la région 5'UTR (Cardon *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que des éléments de régulation étaient situés dans le premier intron de *TaVRN1* (Fu *et al.*, 2005). Nous avons donc inclus l'analyse de l'intron localisé dans la région 5'UTR lors de l'analyse des éléments *cis* possiblement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de *TaSPL3*.

Parmi les éléments de régulation *cis* que nous avons identifiés dans le promoteur de *TaSPL3* et *TaSPL13*, nous avons été étonnés de voir un grand nombre de motif GTAC CURECORE (13 pour *SPL3*, 4 pour *SPL13*). Bien qu'aucun d'entre eux ne comprend la totalité du motif consensus SBP, la présence du motif GTAC suggère que *TaSPL3* et *TaSPL13* pourraient être eux-mêmes régulés par des gènes SPL. Nous avons également détecté plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription connus pour leur implication dans la réponse aux stress abiotiques. Les motifs MYB, MYC et WRKY sont tous fortement représentés dans les régions promotrices de *TaSPL3* et *TasPL13*, suggérant qu'ils pourraient être exprimés en réponse à des stress abiotiques. Plus encore, nous avons détecté des motifs associés à une régulation par certains CBF chez *TaSPL13* mais non chez *TaSPL3*. Cela laisse penser que *TaSPL13*

pourrait être régulé en réponse au froid alors que *TaSPL3* répondrait à d'autres stress abiotiques. Il est également possible que l'expression de *TaSPL3* soit induite par *TaSPL13*, puisque son promoteur contient un grand nombre de motif GTAC. Nous avons également identifié deux motifs CArG à -507 et -556 par rapport à l'ATG de *TaSPL13*. Cela laisse supposer que son expression pourrait être régulée par des facteurs de transcription MADS. Cette hypothèse est intéressante puisque les MADS sont, entre autres, impliqués dans la floraison et la vernalisation.

4.5 Effet du froid sur l'expression de *miR156* et des gènes *SPL*

Le stress au froid engendre chez la plante plusieurs changements métaboliques et génétiques. Dans cette étude, nous avons détecté que l'expression de *miR156* diminue lors du traitement au froid. Plus particulièrement, on voit à la Figure 3.8 une diminution de l'expression de *miR156* après une semaine de traitement au froid. Ce résultat est étonnant puisque le séquençage à haut débit des microARNs du blé, en condition de stress abiotique, a montré une augmentation de l'expression de plusieurs membres de la famille *miR156* lors du traitement au froid. Notons cependant que l'échantillonnage de cette étude a été fait de manière différente au nôtre. Plusieurs études chez la plante-modèle *Arabidopsis thaliana* ont également démontré que l'expression de *miR156* augmentait lors du traitement au froid (Sunkar et Zhu, 2004; Zhou *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Cependant, ces études portaient sur un stress au froid de 16°C comparativement à 4°C pour nos expériences chez le blé. En contrepartie, des études sur l'effet de la sécheresse chez le riz, un stress abiotique ayant certains effets similaires au froid, ont montré une inhibition de l'expression de *miR156* (Sunkar *et al.*, 2008). Plusieurs études ont également montré qu'une diminution de l'expression de *miR156* était essentielle à la transition entre les phases de croissance végétative et reproductive (Chuck *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). De fait, la surexpression

de *miR156* chez *Arabidopsis* retarde la floraison (Wang *et al.*, 2009). Nos résultats montrent le caractère particulier du blé d'hiver. Bien que le traitement au froid impliquerait une augmentation de l'expression de *miR156*, ce traitement est également un prérequis obligatoire (la vernalisation) à la transition entre les états végétatif et reproductif.

Nous devons cependant analyser le profil d'expression des microARNs avec une certaine réserve. Une faiblesse de notre étude est que nous avons utilisé le buvardage northern pour établir un profil d'expression de microARN. Or, il a été rapporté que les résultats de cette analyse sont souvent peu reproductibles et montrent un faible niveau de corrélation avec les résultats du séquençage à haut débit (Lee *et al.*, 2010). L'expression des microARNs est fortement tissu-dépendante. *miR156*, par exemple, est majoritairement exprimé dans la feuille étendard (flag leaf) (Yao *et al.*, 2007). Notre avons utilisé des échantillons provenant de feuilles et tiges. Afin de déterminer le profil d'expression de *miR156*, il aurait été préférable d'utiliser des échantillons provenant uniquement des feuilles et d'utiliser une technique de détection plus sensible, tel que la PCR en temps réel. Une seconde faiblesse de notre étude est que nous ne pouvons différencier les changements résultants du traitement au froid de ceux observés lors du vieillissement des plantes. Pour ce faire, nous avons tenté de vérifier l'expression de *miR156* chez le blé d'hiver contrôle non-acclimaté au froid, ainsi que chez le blé de printemps, traités ou non au froid. Toutefois, les résultats ont été difficilement reproductibles et impossibles à comparer entre eux. Bien que nos données quant à l'expression de *miR156* chez le blé d'hiver lors du traitement au froid montrent une faible corrélation avec les résultats du séquençage, nous les avons reproduit plusieurs fois et ceux-ci ont toujours montré le même résultat; l'expression de *miR156* est fortement diminuée après 7 jours de traitement au froid.

Le niveau d'expression de *TaSPL3* et *TaSPL13* pourrait concorder avec leur régulation par *miR156*. En effet, on peut voir à la Figure 3.8 que leur ARN messager est faiblement abondant lorsque *miR156* est fortement exprimé. De plus, on remarque que l'expression des *SPLs* diminue après 28 jours de traitement au froid. Cela suggère qu'ils ne sont pas uniquement régulés par *miR156*. Contrairement à *TaSPL3*, *TaSPL13* continue d'être exprimé même après une vernalisation complète (après 49 jours) et à un niveau faible durant la dé-acclimatation à 20°C ainsi que lors de la floraison, suggérant des rôles différents. Encore une fois, il est impossible de déterminer, avec nos résultats, si la variation de l'expression de *TaSPL3* et *TaSPL13* est due à *miR156*, au traitement au froid ou au simple vieillissement de la plante ou à une combinaison de ces facteurs.

4.6 Les facteurs de transcription SPL activent la floraison

Grâce à l'étude de *miR156*, il a été déterminé que plusieurs facteurs de transcription SPL étaient impliqués dans la transition entre les phases végétative et reproductive. SPL3, SPL4, SPL5 et SPL15 sont impliqués dans la régulation de la morphologie des feuilles adultes chez *Arabidopsis*. Ils accélèrent l'hétéroblastie, augmentant le nombre de cellules constituant chaque feuille et diminuant leur taille, une caractéristique des feuilles adultes (Usami *et al.*, 2009). SPL9 se lie directement au promoteur de *Trichomeless1* et *Triptychon*, deux facteurs de transcription de la famille MYB impliqués dans la régulation négative de la distribution des trichomes. Lors de la floraison, une augmentation de l'expression de SPL9 dans les organes floraux réduit le nombre de trichomes sur la surface abaxiale des sépales (Yu *et al.*, 2010). SPL9 et SPL15 diminuent également le nombre de trichomes sur les feuilles un autre trait morphologique des feuilles adultes. AtSPL9 se lie au promoteur de *miR172* et active son expression. Ce dernier est un régulateur négatif de deux facteurs de transcription

de type AP2, Target Of Eat1 (TOE1) et Target Of Eat2 (TOE2), qui répriment la différenciation des feuilles adultes (Usami *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

Outre leur implication dans le développement des feuilles matures, *miR156* et les gènes *SPL* sont également impliqués dans la régulation du développement du méristème floral. Il a été démontré que la surexpression de *miR156* provoquait un retard de floraison chez *Arabidopsis* (Schwarz *et al.*, 2008). Dans cette même étude, des mutants déficients pour *SPL9* et *SPL15* montraient le même phénotype. Ces derniers, ainsi que *SPL2*, *SPL3*, *SPL10* et *SPL11* sont des régulateurs de plusieurs gènes MADS-box impliqués dans la floraison tel que *Apetala1* (AP1), *Suppressor of Overexpression of Constans 1* (SOC1), *Fruitful* (FUL) et *Agamous-Like 42* (AGL42) (Wang *et al.*, 2009). De plus, *SPL3* et *SPL9* activent l'expression de *miR172* ce qui a pour effet de réduire l'expression des gènes *Schlafmutze* (SMZ) et *Schlafnutze* (SNZ), deux répresseurs de *Flowering Locus T* (FT) (Benlloch *et al.*, 2007). Il a également été démontré que *miR156* et *SPL3* pouvaient réguler directement les gènes identitaires du méristème floral *Leafy* (LFY), *Fruitful* (FUL), *Apetala1* (AP1) et *Sepalata3* (SEP3) sans passer par la voie de régulation de FT (Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Hwan Lee *et al.*, 2012). Il a été proposé que les *SPL* agiraient autant en amont qu'en aval de FT dans la régulation de la floraison (Hwan Lee *et al.*, 2012). Les voies de régulations impliquant *miR156*, *SPL* et *miR172* semblent conservées chez les plantes ainsi que chez les arbres (Chuck *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Les résultats de notre étude nous permettent de spéculer sur le rôle des *SPL* chez le blé. Par exemple, étant donné que certains *SPL* d'*Arabidopsis* activent la transcription de *FUL* et *AP1*, il est possible que les *SPL* du blé d'hiver aient un rôle similaire sur l'homologue de *AP1* et *FUL*, le MADS-box *TaVRN1*. *TaSPL3* et *TaSPL13* sont exprimés dès le début du traitement au froid et présentent des éléments de régulation

cis associés à la régulation de la tolérance au froid comme les motifs LTR et CRT/DRE. Le promoteur du gène *TaSPL13* présente un motif CArG, permettant une régulation par la famille de facteurs de transcription MADS, impliqués dans la floraison. Ensemble, ces données suggèrent l'implication des facteurs de transcription SPL dans la régulation de la vernalisation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

En conclusion, nous avons déterminé que le buvardage northern des microARNs nécessite des modifications par rapport au buvardage northern des ARNs de plus grande taille. Nous avons montré que le protocole de fixation des microARNs utilisant l'EDC fournissait une plus grande sensibilité que la méthode traditionnelle utilisant les radiations ultra-violettes. D'autre part, l'impossibilité de détecter des microARNs très faiblement exprimés avec le protocole optimisé montre bien la nécessité d'utiliser une méthode plus sensible pour leur détection, tel que la PCR en temps réel. Nous avons identifié, par bio-informatique, plusieurs microARNs associés aux gènes COR et il sera intéressant de confirmer expérimentalement leur existence et d'établir leur profil d'expression pour compléter nos connaissances et notre compréhension des gènes de résistance au froid du blé.

Nous avons également identifié deux gènes *Squamosa Promoter binding protein-Like* présents chez le blé, soit *TaSPL3* et *TaSPL13*. Dans les deux cas, nous avons analysé leurs régions promotrices et identifié plusieurs éléments de régulation *cis* laissant supposer qu'ils pourraient être régulés par des facteurs de transcription MYB, MYC et WRKY. Le promoteur de *TaSPL13* a également des motifs C-repeat et CArG indiquant leur possible régulation par le froid. De plus, de nombreuses séquences de régulation par les gènes *SPL* ont été découvertes dans leur promoteur, suggérant que certains facteurs de transcription *SPL* pourraient réguler l'expression d'autres gènes *SPL*. Nous avons également identifié des éléments de régulation par *miR156* sur les ARN messagers de *TaSPL3* et *TaSPL13*. Dans le cas de *TaSPL3* la région homologue est située dans la région codante, suggérant que sa régulation par *miR156* entraîne le clivage et la dégradation subséquente de l'ARN messager. Dans le cas de *TaSPL13*, la région complémentaire à *miR156* est située dans la région 3' UTR, laissant penser qu'une interaction avec *miR156* entraînerait plutôt l'inhibition de sa traduction. Nous

avons observé que l'expression de *miR156* diminue lors du traitement au froid du blé d'hiver alors que l'expression de *TaSPL3* et *TaSPL13* est au plus fort après 28 jours de traitement au froid. Nos résultats suggèrent que l'expression et les fonctions de *TaSPL3* et *TaSPL13* pourraient être différents.

En perspective, il serait intéressant d'effectuer une étude pour identifier, classifier et déterminer la fonction de la famille de facteur de transcription SPL du blé. Cette dernière est peu connue, même chez les plantes-modèles, mais semble être importante dans le processus de floraison. Cela permettra entre autre de distinguer la fonction de *TaSPL3* de celle de *TaSPL13*.

CHAPITRE V

ANNEXES

```
1 GGTACCGCNATACCGGCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTAACTAATAAAGCAG
51 AGCCGCTCTCTAATTTTTCTACTCCAACAGATGGGACAAAATCCCAACC
101 AACCAAAAAATACCAAGAAATTTCAAGAAAAAATAAGGAGGGAAACAAA
151 CAGGCTGATGCAATTCGCATTCCCGTTCCTCTCTGCTTTACGGCCACAT
201 AAATAATAACACTACTACTAGTACTACTTGAGAACTCTGCTTCTTCTTCT
251 TTATCCTACGCTGATGTTGTACAGCAGGCCCATCGGGGAAGCCATTCGG
301 GCTAGAGACTAGCTCAATCGAGCGGCTCGATCAGTAGCTCCAGAGCGGGA
351 CCTCGCCGGCGCCGTACCCACCGCTGTCGTTGCAGTCGTCGTCGGCTCCG
401 TCCATGTGCGAGCCGCTCTGCCAGTCGCCGCCGGCGGCGCTCATCCCGTC
451 GTAGTAGTAGGAATCCTGGTCCAAGTCCCAATGCCGCCGTACCCGTA
501 GCATCGGGTAGTCGTCGTAGTGCACCGCCGCGGACTCGTGCATCATCGTC
-----GUU

551 ATCATCGGGGGCGCCGGCGCGGACGCCACGGCGGCCACGGCCGACGACGA
UAGUAGCCCCCGC-----
*****

601 GGCCGGCGCGGCGGGGCAGGCAGTCTCGGCGAGCGCGATGGCCGCCGCGC
651 GGATGTCGTCGGGGGTGCGGAGCGTGGCGGGGTCAACGGCGAGCAGGGCC
701 GCCGAGTCGGCGAAGTTGAGGCACGCGGCGCGGCCGCCAGGGCCAGCGC
751 GGCAACGTCGTGGGCGCGGGCCGTGGGCCTTCGGGGGAGGGGAAGGGTCC
801 CGACCCACAATTCGGGAACCTTCTTGGTTGGGGCTGGGGCACCCCTCCCAA
851 AACCCACCGTCCGGGGCGGGTCCGCTCCCCGTGGCAAGCCCCGGGTAAA
901 ACCGGGTTGCTCCCTTTTTCCCGGAAAATTGGGTGCGACCCCTCGGAC
951 CGGCTTCTGGTGGGGGGCCGGATTTTACGCGTCGGCTTTACCGCGCCCC
1001 TGGCCAATTTGTTTTTCCCGCGACCGGCCTGGGGGCCCCCATGGACCTTG
1051 GTTCCAGT
```

Figure 5.1 : Complémentarité entre apMir_87826 et CK163819.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.


```

1  ACTCAAACCAACCTGCAACTCTCAACGCAGCGACTTTCCTAGTTTTTG
51  ACGCTGCAACTGATGGACACCGCCGCCCCGGCTCCCCGCGTGAGGGGCA
101 CAGGACGGTGTGCTCCGAGCCGCCAAGAGGCCGGCAGGGCGGACCAAGT
151 TTAAGGAGACGCGCCACCCGCTGTACCGCGGCGTGCGGGCGGCGGGCCGG
201 CTCGGGCAGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGTGCGCGGCGCGCAAGGGTACAG
251 GCTCTGGCTCGGCACCTTCACCACCGCCGAGATGGCGGGCGCGCGCTCACG
301 ACTCCGCCGTGCTCGCGCTCCTCGACCGCGCCGCTGCCTCAACTTCGCC
351 GACTCCGCTGGCGGATGCTGCCCGTCTCGCGGCTGGCTCGTCCCGCTT
401 CAGCAGCGCGCGGGAGATCAAGGACGCGGTCCGCATCGCCATCGTGGAGT
451 TCCAGCGGCAGCGCCCCGTCGTGTCCACGTCGGAGACGCACGACGGCGAG
501 AAGGACGTCCAAGGCTCGCCGACGCCGAGCGAGCTGTCCATGTCCAGCGA
551 CTTGTTGGACGAGCACTGGTTTGGCGGCATGGACGCCGGCTCGTACTACG
601 CGAGCTTGGCGCAGGGGATGCTCATGGAGCCGCCGTCCGCCAGAACGTGG
651 AGCGAGGATGGCGGCGAATACAGCGGCGTCTACACGCCGCTTTGGAATA
701 ATTATCCGACTAATTAAGGCATGTACAGTTTTAGAACTATTCTCATTAT
751 ATAAGAGCGTCTTTTACACTAATGTAATGTCAAAAACGCTTTTATATTAT
-----UUUGCGAGAAUAAUA
***** *****
801 GAGACAAAAGGAGTAGACTACTAGTGGTTGTGTTCTTCCAAATATGGGAA
CCCU-----
* **
851 GATACAGAGTAAGCATCAGGAGCAATTTTTTTCCCGT

```

Figure 5.2 : Complémentarité entre apMir_19532 et EF028773.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 AAGTGGCCGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGAGAGAAGATGGCCCCCTTCAA
51 ATATTTAAAAAATCGTGTGGTACGGTAGTAGAGAAAAATATCCCCATCTG
101 TTTCCCTCGCGTATTTGGTGGAAACAGAAGAGAGAAACCATCTACAAACTTT
151 TAACTACTTTTAGTTCGAACAAGTAGCTCCATGGCGGTGTCTCGACGCCACC
201 GAGCTCGAGGTCTTCCCGCCACGGTCTGGTGTCCGGCGACTCCATGAACA
251 GGCCCTCCGAGTAGCACGATCCGGGGTTCGATGCCGACAAACCAGTGCTCA
301 TTCAACAGCTCGCTGGACATGAACAGGGCGCTCGGCGCCGGCGAGCCATC
351 GATTTCTTCTCGTCATCGGTTGTCCGCGCAGGGGACAATGGTGCCATGG
401 ACGCGACCGGGTGCTGCCTTTGGAACGCCAGGACGGCGACGGCGACGGCG
451 TCCTTGATCTCCTTGGCGGTGCTGAACGGGCCGGCGAGGACGGGGAGCAT
501 CCGCCAGGCGGAGTCGGCGAAGTTGAGACAAGCGGCGCGGCCGGAGAGCG
-----ACCUUCAACUCUGUUU-----
*****

551 CGAGAACGGCGGGCGTTCGTGCGCGCGCTGCCATCTCGGCGGTGGTGAAG
601 GTGCCGAGCCAGAGCCTGGAGCCCCTCATCCCGAGCACGCGCACCTCGCA
651 CACCCACCGGCCGGAGGGGCCCGTTCGCCGCACGCCGCGGTACAGCGGGT
701 GCGCGTCTCCTTGAACCTGGTCCGGCCGGGCGGGCCGCTTTGGAGGGCT
751 CCGACCACACGGTCCTGTGCCCATCACACGGGGAGGGGGCGGTCAAAGGG
801 GTTCATCGATTGATCGCAGTGTCCCCGGGAGCCTGTCAACTGTGGAGTAA
851 TTAAGCAGCGAGTTTTACCGCCTGGGTTGAGAGATTTGAGAGAAAATGAA
901 TTCTGGAAAAGAGGGGGCGGTAGGGCTTTTCTACCCCTTTCAGCCAGGTT
951 CAGGGTCCTGCTGCTCCAGTCGGCCCAAACCGTTCGGGGGATCGTTGGGT
1001 CGCCAATATCCCGCGGAATTCTGGACCGGGCCCAACCGGTTTTTTGGTGA
1051 CAGACTGGTCCTCTAGGGGCACCCAAAAAGGGCCAAAGGGGAACAGCTGG
1101 TCCCGGTGGGAAAATGGGAACCCCC

```

Figure 5.3 : Complémentarité entre apMir_51346 et CK212360.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 CTCAGTTCTCACCCACCCAAACACCGCCGCTGAAACCTCCAGTTCTCAGC
51 ACACATCGACCTGCTCGACCGTCTCCACTAGCGCTCGTCCAAGATGGACG
101 TCGCCGACGCCGCCTCCCCGTCTGGCCAGGAGCAGCAGGGGGCACAGGACG
151 GTGTCGTCTGAGCCGCCGAAGCGACCCGCGGGGCGGACCAAGGTACATGA
201 GACGCGCCACCCGCTGTACCGCGGCGTGCGGCAGCGGGGCCGGGTCCGGGC
251 AGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGTGGCCGGGGTGAAGGGCTCCAGGCTCTGG
301 CTCGGCACCTTACCACCGCCGAGATGGCGGCGCGCGCACGACGCCGC
351 CGTGCTCGCGCTCTCCGGCCGGGCTGCCTGCCTCAACTTCGCCGACTCCG
401 CCTGGCGCATGCTGCCCCTGCTCGCGGCCGGGTCTTTTCGGCTTCGGCAGC
451 GCGCGCGAGATCAAGGCCGCCGTCGCCGTCGCCGTCGTGGCTTTCCAGAA
501 GGAGCAGATTATCCCAGTCGCCGTCGCCGTTGGTGGCGATCCAGAAGCAGC
551 AGATTATCCCAGTCGCTGTGCGCGTGTGGCGATCCAGAAGCAGCAGATT
601 ATCCCGTCGCCGTCGTGGCGCTCCAGAAGCAGCAGATTCCAGTGGCCGTC
651 GCCCTCGTGGCGCTCCAGGAACAGCAGGTCCCAGTCGCCGTCGCCGTCGT
701 GGCGCTTCATCGGCAGCAGGTTCCAGTCGCGTGGCCGGGAACCTCCGGCC
751 CGGGCAGCGCTCTGTTTTACATGTCGTCCAGCGACTTGTTGGAGCTCGAC
801 GAGGAGCAGTGGTTTGGCGGCATGGAGGCCGGGTCTACTACGCGAGCTT
851 GGCGCAGGGGATGCTCGTGGCACCGCCGGACGAAAGAGCGAGGACGGAGG
901 ACGGCAGCAGAGCGGCGTCCAGACGCCGCTATGGAGCCACTTGTTACC
951 TAATCTAGCAGTGTAAAGTTGTA CTCCCTCTGTCCGGAATTACTTGTGCC
1001 GAAATGGATTAAAATGAATGTATTTAGAACTAAAATACGTCTAGATACAT
1051 CAATTTCTCAGACAAGTATTTTCGGACGGAGGGAGTACCATTATTAGATA
-----ACUGUUCAUAAAGGCCUGCCU-----
*****
1101 GTTGTGTTCTTTTCAATTTGAGGAGAAACAAAGTAGCATCTTGTTCCCTT
1151 GTTGTACTCATTGTA CTATAAGCTCCCGGTTTGAGTATTTGTGAGGAAGG
1201 GGATTGCCTATTACACCAATTATTATTGGTCAAATTGATCGCCTTCTTCC
1251 TG

```

Figure 5.4 : Complémentarité entre apMir_20539 et EF028786.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 CTCAGTTCTCACCCACCCAAACACCGCCGCTGAAACCTCCAGTTCTCAGC
51 ACACATCGACCTGCTCGACCGTCTCCACTAGCGCTCGTCCAAGATGGACG
101 TCGCCGACGCCGCCTCCCCGTCTGGCCAGGAGCAGCAGGGGACACAGGACG
151 GTGTCGTCTGAGCCGCCGAAGCGACCCGCGGGGCGGACCAAGGTACATGA
201 GACGCGCCACCCGCTGTACCGCGGCGTGCGGCAGCGGGGCGGGTCCGGGC
251 AGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGTGGCCGGGGTGAAGGGCTCCAGGCTCTGG
301 CTCGGCACCTTCACCACCGCCGAGATGGCGGCGCGCGCACGACGCCGC
351 CGTGTCTCGCGCTCTCCGGCCGGGCTGCCTGCCTCAACTTCGCCGACTCCG
401 CCTGGCGCATGCTGCCCCGTGCTCGCGGCCGGGTCTTTCGGCTTCGGCAGC
451 GCGCGCGAGATCAAGGCCGCCGTCGCCGTCGCCGTCGTGGCTTTCAGAA
501 GGAGCAGATTATCCCAGTCGCCGTCGCCGTTGGTGGCGATCCAGAAGCAGC
551 AGATTATCCCAGTCGCTGTGCGCGTCTGTGGCGATCCAGAAGCAGCAGATT
601 ATCCCGTCGCCGTCGTGGCGCTCCAGAAGCAGCAGATTCCAGTGGCCGTC
651 GCCCTCGTGGCGCTCCAGGAACAGCAGGTCCCAGTCGCCGTCGCCGTCGT
701 GGCGCTTCATCGGCAGCAGGTTCCAGTCGCGTGCCCGGGAACCTCCGGCC
751 CGGGCAGCGCTCTGTTTTACATGTCGTCCAGCGACTTGTTGGAGCTCGAC
801 GAGGAGCAGTGGTTTGGCGGCATGGAGGCCGGGTCGTACTACGCGAGCTT
851 GGCGCAGGGGATGCTCGTGGCACCGCCGGACGAAAGAGCGAGGACGGAGG
901 ACGGCGAGCAGAGCGGCGTCCAGACGCCGCTATGGAGCCACTTGTTACC
951 TAATCTAGCAGTGTAAAGTTGTACTCCCTCTGTCCGGAATTACTTGTGCC
1001 GAAATGGATTAAAATGAATGTATTTAGAACTAAAATACGTCTAGATACAT
1051 CAATTTCTCAGACAAGTATTTTCGGACGGAGGGAGTACCATTATTAGATA
-----CUGUUCAUAAAGGCCUGCCUCCU-----
*****
1101 GTTGTGTTCTTTCAATTTGAGGAGAAACAAAGTAGCATCTTGTTCCCTC
1151 GTTGTACTCATTGTACTATAAGCTCCCGGTTTGAGTATTTGTGAGGAAGG
1201 GGATTGCCTATTACACCAATTATTATTGGTCAAATTGATCGCCTTCTTCC
1251 TG

```

Figure 5.5 : Complémentarité entre apMir_42496 et EF028786.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.


```

1 AGCAGCTATGTAGNTGATTACGCCAACCTATTTAGTGTGAGACTATAGAA
51 TACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACC
101 TGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGAG
151 GTCATACATACTCCCTCCGTTTCAAATTACTCGTCTCAGAAATGGATGTA
201 TCTAGAACTAAAATACATCTAGATACATCCATTTTTGCGACGAGTAATTC
-----CUGUUCAUUAAG
*** *****

251 GGAACGGAGGGAGTACATATATACGAAACAAATTCCTGATTGCTCAACAT
GCUUGCCUCCCU-----
*****

301 CAAAATTGCAGGGGGGAGATTGGTAGCTGGGTTGCGTTCGTTTTTGTTCGT
351 CCTGCGGCTGTTCTTTCCGCGCCACTTCCCTGATTGGCTGGAGCTGCCTG
401 GGTCTCTGATCCTCCTCACGGTGGTCGCCCCGCCATCTTCGCCGACACC
451 TTCCGGGGCTCCTGGCTCATCATCGGCGTCGGCGTGTGCCTGGTCATCGG
501 GTGCTACCTGCTCCACGAGCACATCAAGGCGTCGGGTGGCCTCAAGGAGG
551 CCTTCAAGAAGCCCAATGGCTGGTCCAACACCATCGGCATCCTCCTCCTC
601 TTCATCTACCCGGTCTGGGCCGTCGTCATGTGGTTCCTGTAGACCGTTCN
651 NGCGCTGTTTTGGGGTTCATCATGTGATGTTTTTCTCCGGCGATTTGGTG
701 TCGATGAACCATGCGCTCTTGTACCTGTTGAATGTCTCGGCCATGTTTCG
751 ATTTGGTGTACAGTCTTAATTGGTTTCCTTGATCTGTGGGTCATAGCCAT
801 CAAACCTCGGGCGCGACCACGCTAATCCNCGCNCATGNCNGGCGGGAGC
851 ATGCGACGTCNGGCCCCCAATCGCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACT
901 GGCCGTCGNTTTACACGTCGTGACTGGGA

```

Figure 5.6 : Complémentarité entre apMir_43510 et CK164699.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.


```

1 CTCAGTTCTCACCCACCCAAACACCGCCGCTGAAACCTCCAGTTCTCAGC
51 ACACATCGACCTGCTCGACCGTCTCCACTAGCGCTCGTCCAAGATGGACG
101 TCGCCGACGCCGCCTCCCCGTCTGGCCAGGAGCAGCAGGGGCACAGGACG
151 GTGTCGTCTGAGCCGCCGAAGCGACCCGCGGGGCGGACCAAGGTACATGA
201 GACGCGCCACCCGCTGTACCGCGGCGTGCGGCAGCGGGGCCGGGTCTGGGC
251 AGTGGGTGTGCGAGGTGCGCGTGGCCGGGGTGAAGGGCTCCAGGCTCTGG
301 CTCGGCACCTTCACCACCGCCGAGATGGCGGCGCGCGCACGACGCCGC
351 CGTGTCTCGCGCTCTCCGGCCGGGCTGCCTGCCTCAACTTCGCCGACTCCG
401 CCTGGCGCATGCTGCCCCTGCTCGCGGCCGGGTCTTTTCGGCTTCGGCAGC
451 GCGCGCGAGATCAAGGCCGCCGTCGCCGTCGCCGTCGTGGCTTTCCAGAA
501 GGAGCAGATTATCCCAGTCGCCGTCGCCGTTGGTGGCGATCCAGAAGCAGC
551 AGATTATCCCAGTCGCTGTGCGCGTCTGTGGCGATCCAGAAGCAGCAGATT
601 ATCCCGTCGCCGTCGTGGCGCTCCAGAAGCAGCAGATTCCAGTGGCCGTC
651 GCCCTCGTGGCGCTCCAGGAACAGCAGGTCCCAGTCGCCGTCGCCGTCGT
701 GGCGCTTCATCGGCAGCAGGTTCCAGTCGCGTCCCCGGGAACCTCCGGCC
751 CGGGCAGCGCTCTGTTTTACATGTCGTCCAGCGACTTGTTGGAGCTCGAC
801 GAGGAGCAGTGGTTTGGCGGCATGGAGGCCGGGTCGTACTACGCGAGCTT
851 GGCGCAGGGGATGCTCGTGGCACCGCCGGACGAAAGAGCGAGGACGGAGG
901 ACGGCGAGCAGAGCGGCGTCCAGACGCCGCTATGGAGCCACTTGTTACC
951 TAATCTAGCAGTGTAAGTTGTACTCCCTCTGTCCGGAATTACTTGTGCC
1001 GAAATGGATTAAAATGAATGTATTTAGAACTAAAATACGTCTAGATACAT
1051 CAATTTCTCAGACAAGTATTTTCGGACGGAGGGAGTACCATTATTAGATA
-----CUGUUCAUUAAGGCUUGCCUCCU-----
***** ** ** *****
1101 GTTGTGTTCTTTTCAATTTGAGGAGAAACAAAGTAGCATCTTGTTCCCTT
1151 GTTGTACTCATTGTACTATAAGCTCCCGGTTTGAGTATTTGTGAGGAAGG
1201 GGATTGCCTATTACACCAATTATTATTGGTCAAATTGATCGCCTTCTTCC
1251 TG

```

Figure 5.7 : Complémentarité entre apMir_43510 et EF028786.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GAGACAACGCGTCGCCGATCTCTCTTTTCATGGGCGACCGGATGGCGCGCC
51 GGCCTAGTGATACTAATAACGAATCACTATAGGGCCCCGAAGTCATACATAC
101 TCCCTCCGAGTCAAATGACTCGTCTCAGAAATGGATGTATCTCAGAACTA
151 AAATACATCTAGATACATCCATACTAGCGAGGAGTAATGCGGAACGGAGG
UUUAUGUAGAUCUAUGUAGGUAUG-----
*****

201 GATTACATATATACGAAACAGATGCCTGATTGCTCAACATCAAAATTGCA
251 GGGGGGAGATTGGTAGCTGGGTTGCGTGCGCATAGGTCGTCCTGGGGCTG
301 AACTTCCGCCCAATTCCCTGATTGGCTGGAGCTGCCTGGGTCTCTGAT
351 CCTCCTCACGGTGGTCGCCCCCGCCATCTTCGCCGACACCTTCCGGGGCT
401 CCTGGCTCATCATCGGCGTCCGGCGTGTGCCTGGTCATCGGGTGTACCTG
451 CTCCACGAGCACATCAAGGCGTCCGGTGGCCTCAAGGAGGCCTTCAAGAA
501 GCCCAATGGCTGGTCCAACACCATCGGCATCCTCCTCCTTTCATCTACC
551 CGGTCTGGGCCGTCGTCATGTGGTTCCTGTAGACCGTTCGCCGCTGTTTT
601 TGGGGTTCATCATGTGATGTTTTTCTCCGGCGATTTGGTGTGATGAACC
651 ATGCGCTCTTGTACCTGTTGAATGTCTCGGCCATGTTTCGATTTGGTGTG
701 ACGTCTTAATTTGTTTCTTGTATCTGTGGGTACATAGCCATCAAACCTCG
751 GCCGCGACCACGCTAATCCCGCGGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT
801 CGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTACAATTCCTGGGCGTCCG
851 TTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGGTACCCACTTAATCGCC
901 TGCAGCACATCCCCTTTCGCCCGCTGGCGTATAGCGAAAAGCCCCGCACGA
951 TCGCCTTCCCCACAGTGCACACCTGAATGGCGATGGACCCCCCTGTACGG
1001 CCATAAGCGCGCGGGTGTGGGTTCCCCCAGGTGACCGTAAATTGCAGGCC
1051 TAAGCCCGTCTTCGCTTCTCCCTTCTTCCCCAGTCGCGGTTTCCCGAAG
1101 CTTAAATGGGGCCCCTAGGGTCCGATAAGGTTAGGCCCCGACCCCAAAT
1151 TTTAGGGGAGGTCCA

```

Figure 5.8 : Complémentarité entre apMir_43634 et CK167127.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1  GGCATCGGTACAACGCGTCGGCCAGCTCTGTATAATGGGCGACCGGCAGG
51  CGGTCCGACTAGTGATACTAATACGACTCACTATAGGGCCCCGAGGTCATA
101 CATACTCCCTCCGTTTCAAATTACTCGTCTCAGAAATGGATGTATCTAGA
151 ACTAAAATACATCTAGATACATCCATATTAGCGAGGAGTAATGCGGAACG
    ----UUUAUGUAGAUCUAUGUAGGUAUG-----
          *****
201 GAGGGAGTACATATATACGAAACAGATGCCTGATTGCTCAGCATCAAAT
251 TGCAGGGGGGAGATTGGTAGCTGGGTTGCGTGCGTATAGGTCGTCTGGG
301 GCTGAACTGTCCGCGCCAATTCCTGATTGGCTGGAGCTGCCTGGGTCTC
351 TGATCCTCCTCACGGTGGTCGCCCCCGCCATCTTCGCCGACACCTTCCGG
401 GGCTCCTGGCTCATCATCGGCGTCGGCGTGTGCCTGGTTCATCGGGTGCTA
451 CCTGCTCCACGAGCACATCAAGGCGTCGGGTGGCCTCAAGGAGGCCTTCA
501 AGAAGCCCAATGGCTGGTCCAACACCATCGGCATCCTCCTCCTCTTCATC
551 TACCCGGTCTGGGCCGTCGTATGTGGTTCCTGTAGACCGTTCGCCGCTG
601 TTTTTGGGGTTCATCATGTGATGTTTTTCTCCGGCGATTTGGTGTGCGATG
651 AACCATGCGCTCTTGTACCTGTTGAATGTCTCGGCCATGTTTCGATTTGG
701 TGTACAGTCTTAATTTGTTTCCTTGATCTGTGGGTACATAGCCATCAAAC
751 CTCGGCCGCGACCACGCTAATCCCGCGGCCATGGCGGNCGGGAGCATGCG
801 ACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACANTTCACTGGCC
851 GTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACTTGGCGTTACCAAATAAA
901 TCGGCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCGTGCGTAATAGCGAAAAGG
951 CCGCACCGATCGCCCTTCCCACAGTTGCCAGCCTGAATGGCAAATGGAC
1001 CGCCCTGTAACGCCCATTAAGCCGGCGGGTGTGTGGTTCGCCAAGGGGAC
1051 CGTAAATGCCAGGCCTTACGCCGTCCTTTGTTTCTCCCTTCCTTCCCC
1101 AGGTGGCGGGTTCCCGGAAACCTAAAATGGGGCCCTTAGGGTCA

```

Figure 5.9 : Complémentarité entre apMir_43634 et CK166841.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 AGCAGCTATGTAGNTGATTACGCCAACCTATTTAGTGTGAGACTATAGAA
51 TACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACC
101 TGCAGGGCGGCCGCACTAGTGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGAG
151 GTCATACATACTCCCTCCGTTTCAAATTACTCGTCTCAGAAATGGATGTA
201 TCTAGAACTAAAATACATCTAGATACATCCATTTTGGCGACGAGTAATTC
-----UUUAUGUAGAUCUAUGUAGGUAUG-----
*****
251 GGAACGGAGGGAGTACATATATACGAAACAAATTCCTGATTGCTCAACAT
301 CAAAATTGCAGGGGGGAGATTGGTAGCTGGGTTGCGTTCGTTTTTGTTCGT
351 CCTGCGGCTGTTCTTTCCGCGCCACTTCCCTGATTGGCTGGAGCTGCCTG
401 GGTCTCTGATCCTCCTCACGGTGGTTCGCCCCGCCATCTTCGCCGACACC
451 TTCCGGGGCTCCTGGCTCATCATCGGCGTTCGGCGTGTGCCTGGTCATCGG
501 GTGCTACCTGCTCCACGAGCACATCAAGGCGTTCGGGTGGCCTCAAGGAGG
551 CCTTCAAGAAGCCCAATGGCTGGTCCAACACCATCGGCATCCTCCTCCTC
601 TTCATCTACCCGGTCTGGGCCGTCGTATGTGGTTCCTGTAGACCGTTCN
651 NGCGCTGTTTTGGGGTTCATCATGTGATGTTTTTCTCCGGCGATTTGGTG
701 TCGATGAACCATGCGCTCTTGTACCTGTTGAATGTCTCGGCCATGTTTCG
751 ATTTGGTGTCACGTCTTAATTGGTTTCCTTGATCTGTGGGTCATAGCCAT
801 CAAACCTCGGGCGCGACCACGCTAATCCNCGCNCATGNCNGGCGGGAGC
851 ATGCGACGTCNGGCCCCCAATCGCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACT
901 GGCCGTCGNTTTACACGTCGTGACTGGGA

```

Figure 5.10 : Complémentarité entre apMir_43634 et CK164699.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 AGCAGCTATGTAGNTGATTACGCCAACCTATTTAGTGTGAGACTATAGAA
51 TACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACC
101 TGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGAG
151 GTCATACATACTCCCTCCGTTTCAAATTACTCGTCTCAGAAATGGATGTA
201 TCTAGAACTAAAATACATCTAGATACATCCATTTTTGCGACGAGTAATTC
-----UGUUCAUUAAG
** *****

251 GGAACGGAGGGAGTACATATATACGAAACAAATTCCTGATTGCTCAACAT
GCUUGCCUCCCUC-----
*****

301 CAAAATTGCAGGGGGGAGATTGGTAGCTGGGTTGCGTTCGTTTTTGTTCGT
351 CCTGCGGCTGTTCTTTCCGCGCCACTTCCCTGATTGGCTGGAGCTGCCTG
401 GGTCTCTGATCCTCCTCACGGTGGTCGCCCCGCCATCTTCGCCGACACC
451 TTCCGGGGCTCCTGGCTCATCATCGGCGTCGGCGTGTGCCTGGTCATCGG
501 GTGCTACCTGCTCCACGAGCACATCAAGGCGTCGGGTGGCCTCAAGGAGG
551 CCTTCAAGAAGCCCAATGGCTGGTCCAACACCATCGGCATCCTCCTCCTC
601 TTCATCTACCCGGTCTGGGCCGTCGTCATGTGGTTCCTGTAGACCGTTCN
651 NGCGCTGTTTTGGGGTTCATCATGTGATGTTTTTCTCCGGCGATTTGGTG
701 TCGATGAACCATGCGCTCTTGTACCTGTTGAATGTCTCGGCCATGTTTCG
751 ATTTGGTGTCACGTCTTAATTGGTTTCCTTGATCTGTGGGTCATAGCCAT
801 CAAACCTCGGGCGCGACCACGCTAATCCNCGNCATGNCNGGCGGGAGC
851 ATGCGACGTCNGGCCCCCAATCGCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACT
901 GGCCGTCGNTTTACACGTCGTGACTGGGA

```

Figure 5.11 : Complémentarité entre apMir_27254 et CK164699.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.


```

1 GCGACCCACGCTGCCGTCCNCACACAACCAGGACAAGCAAGCAGCAGAAC
51 CAGTGT CAGATTTCCCGAGGCACAAGTTGAGCGCAAGATGGAGCACCAGG
101 GGCGCGGGCGCAGGGCAGAGAAGAAGGGCGTCGTGGAGAGCATCACGGAGAAG
151 CTCCCCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGG
201 TCAGCAGGGACACGCCGGAGTTACCGGCGAGAACATCAAGGAGAAGCTCC
251 CCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGACCACTGGAATGACCGGCTCGGAG
301 ACGCATGCCACCACGGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACA
351 CACCGGCACTGACGGCACCGGTGAGAACAAGAGTATCATGGACAAGATCA
401 AGGACAAGCTGCCTGGACAGCACTAAGCCCAACCGGTCTGCCCGCTACCT
451 TTGCAGAATAATAATAAGATGGCCAACTTCCACCGTGTATACATGAAT
501 CGAGTCTAGTTCAACTAGCTCACTTGGTCGTACATCTGGGTTTTAAGCTTT
551 CATGGACAACAGTGTGTGCGAGGGTTTTTTGTTTTGTTTACAATTTGCATACT
601 TTGATGTGGAAATTTCCCTTTGGTTCAACCGGTGCATGGTATGCTATGGCA
651 TCTAATATACATACTCCCTCTGTCCCAAATAAGTGTCTCAACTTTGCAC
-----AAUGAGGGAGGCAGGGUUUUA-----
*****
701 TAACTTTAGTACAAAAATGTAATAAAGTTAAGACACTTATTTTGGGACAG
751 AGGAAGTATAAGCAAATGTTAAGTTTGCACTCTGTTCTAACCGACTCATA
801 TGATGCATCACCCACTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGC
851 CCTAGAGTTTCCCTCGAGGGGCCAACCTTACGCGTCCCAGGCTTTTTGT
901 CCAAGGGGCCCCATTGGTAGTCCTATTATAAGCTAAGGACTGGCCGTTG
951 TTTACAAGGTTTCGGGACGGGAAAACCGCTAACTTGGGATTTTGGTAAAGG
1001 AACCTACTTTGGTGGGGACATAGTGGGACAACCTCCCTCAGGAATTTAA
1051 GGCTAAGGGAAATATAAAATTTTAAGGGGTAAAGGGTGTAACTACCGCA
1101 TTTTCTGCCGCCTGAAATTTCTGCTTCCGGCGTTGTTTTGGAAATTTCTAC
1151 ACGGCGGCCG

```

Figure 5.12 : Complémentarité entre apMir_39358 et DR740502.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GCGACCCACGCTGCCGTCCNCACACAACCAGGACAAGCAAGCAGCAGAAC
51 CAGTGT CAGATTTCCCGAGGCACAAGTTGAGCGCAAGATGGAGCACCAGG
101 GGCGCGGCGCAGGCGAGAAGAAGGGCGTCGTGGAGAGCATCACGGAGAAG
151 CTCCCCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGG
201 TCAGCAGGGACACGCCGGAGTTACCGGCGAGAACATCAAGGAGAAGCTCC
251 CCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGACCACTGGAATGACCGGCTCGGAG
301 ACGCATGCCACCACGGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACA
351 CACCGGCACTGACGGCACCGGTGAGAACAAGAGTATCATGGACAAGATCA
401 AGGACAAGCTGCCTGGACAGCACTAAGCCCAACCGGTCTGCCCGCTACCT
451 TTGCAGAATAATATAATAAGATGGCCAACTTCCACCGTGTATACATGAAT
501 CGAGTCTAGTTCAACTAGCTCACTTGGTTCGTACATCTGGGTTTAAAGCTTT
551 CATGGACAACAGTGTGTCGAGGGTTTTTGTGTTTACAATTTGCATACT
601 TTGATGTGGAAATTTCCTTTGGTTCAACCGGTGCATGGTATGCTATGGCA
651 TCTAATATACATACTCCCTCTGTCCCAAATAAGTGTCTCAACTTTGCAC
701 TAACTTTAGTACAAAAATGTAATAAAGTTAAGACACTTATTTTGGGACAG
-----UCAGUGAAUAAAACCCUGCC
                ** ***** **
751 AGGAAGTATAAGCAAATGTTAAGTTTGCAGTCTGTTCTAACCGACTCATA
U-----
*
801 TGATGCATCACCCACTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGC
851 CCTAGAGTTTCCCTCGAGGGGCCCAACCTTACGCGTCCCAGGCTTTTTGT
901 CCAAGGGGCCCCCATTTGGTAGTCCTATTATAAGCTAAGGACTGGCCGTTG
951 TTTACAAGGTTTCGGGACGGGAAAACCGCTAACTTGGGATTTTGGTAAAGG
1001 AACCTACTTTGGTGGGGGACATAGTGGGACAACCTCCCTCAGGAATTTAA
1051 GGCTAAGGGAAATATAAAATTTTAAGGGGTAAAGGGTGTAAACTACCGCA
1101 TTTTCTGCCGCCTGAAATTCTGCTTCCGGCGTTGTTTTGGAAATTTCTAC
1151 ACGGCGGCCG

```

Figure 5.13 : Complémentarité entre apMir_20451 et DR740502.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GCGACCCACGCTGCCGTCCNCACACAACCAGGACAAGCAAGCAGCAGAAC
51 CAGTGT CAGATTTCCCGAGGCACAAGTTGAGCGCAAGATGGAGCACCAGG
101 GGCGCGGCGCAGGCGAGAAGAAGGGCGTCGTGGAGAGCATCACGGAGAAG
151 CTCCCCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGG
201 TCAGCAGGGACACGCCGGAGTTACCGGCGAGAACATCAAGGAGAAGCTCC
251 CCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGACCACTGGAATGACCGGCTCGGAG
301 ACGCATGCCACCACGGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACA
351 CACCGGCACTGACGGCACCGGTGAGAACAAGAGTATCATGGACAAGATCA
401 AGGACAAGCTGCCTGGACAGCACTAAGCCCAACCGGTCTGCCCGCTACCT
451 TTGCAGAATAATAATAAGATGGCCAACTTCCACCGTGTATACATGAAT
501 CGAGTCTAGTTCAACTAGCTCACTTGGTTCGTACATCTGGGTTTAAAGCTTT
551 CATGGACAACAGTGTGTGCGAGGGTTTTTGTGTTTACAATTTGCATACT
601 TTGATGTGGAAATTTCCCTTGGTTCAACCGGTGCATGGTATGCTATGGCA
651 TCTAATATACATACTCCCTCTGTCCCAAATAAGTGTCTCAACTTTGCAC
-----AGGCAGGGUUUUUUAUUCACUGA-----
          ** ***** **
701 TAACTTTAGTACAAAAATGTAATAAAGTTAAGACACTTATTTTGGGACAG
751 AGGAAGTATAAGCAAATGTTAAGTTTGCAGTCTGTTCTAACCGACTCATA
801 TGATGCATCACCCACTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGC
851 CCTAGAGTTTCCCTCGAGGGGCCAACCTTACGCGTCCCAGGCTTTTTGT
901 CCAAGGGGCCCCATTGGTAGTCCTATTATAAGCTAAGGACTGGCCGTTG
951 TTTACAAGGTTTCGGGACGGGAAAACCGCTAACTTGGGATTTTGGTAAAGG
1001 AACCCTACTTTGGTGGGGACATAGTGGGACAACCTCCCTCAGGAATTTAA
1051 GGCTAAGGGAAATATAAAATTTAAGGGGTAAAGGGTGTAAACTACCGCA
1101 TTTTCTGCCGCTGAAATTCTGCTTCCGGCGTTGTTTTGGAAATTTCTAC
1151 ACGGCGGCCG

```

Figure 5.14 : Complémentarité entre apMir_21008 et DR740502.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GCGACCCACGCTGCCGTCCNCACACAACCAGGACAAGCAAGCAGCAGAAC
51 CAGTGTTCAGATTTCCCGAGGCACAAGTTGAGCGCAAGATGGAGCACCAGG
101 GGCGCGGCGCAGGCGAGAAGAAGGGCGTCGTGGAGAGCATCACGGAGAAG
151 CTCCCCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGG
201 TCAGCAGGGACACGCCGGAGTTACCGGCGAGAACATCAAGGAGAAGCTCC
251 CCGGTGGCCACGGTGATCACCAGCAGACCACTGGAATGACCGGCTCGGAG
301 ACGCATGCCACCACGGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACA
351 CACCGGCACTGACGGCACCGGTGAGAACAAGAGTATCATGGACAAGATCA
401 AGGACAAGCTGCCTGGACAGCACTAAGCCCAACCGGTCTGCCCGCTACCT
451 TTGCAGAATAATAATAAGATGGCCAACTTCCACCGTGTATACATGAAT
501 CGAGTCTAGTTCAACTAGCTCACTTGGTTCGTACATCTGGGTTTAAAGCTTT
551 CATGGACAACAGTGTGTCGAGGGTTTTTGTGTTTACAATTTGCATACT
601 TTGATGTGGAAATTTCCCTTGGTTCAACCGGTGCATGGTATGCTATGGCA
651 TCTAATATACATACTCCCTCTGTCCCAAATAAGTGTCTCAACTTTGCAC
-----UAUGAGGGAGGCAGGGUUUUA-----
*****
701 TAACTTTAGTACAAAAATGTAATAAAGTTAAGACACTTATTTTGGGACAG
751 AGGAAGTATAAGCAAATGTTAAGTTTGCAGTCTGTTCTAACCGACTCATA
801 TGATGCATCACCCACTTCTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGCCGC
851 CCTAGAGTTTCCCTCGAGGGGCCAACCTTACGCGTCCCAGGCTTTTTGT
901 CCAAGGGGCCCCATTGGTAGTCCTATTATAAGCTAAGGACTGGCCGTTG
951 TTTACAAGGTTTCGGGACGGGAAAACCGCTAACTTGGGATTTTGGTAAAGG
1001 AACCTACTTTGGTGGGGGACATAGTGGGACAACCTCCCTCAGGAATTTAA
1051 GGCTAAGGGAAATATAAAATTTAAGGGGTAAAGGGTGTAACCTACCGCA
1101 TTTTCTGCCGCTGAAATTTCTGCTTCCGGCGTTGTTTTGGAAATTTCTAC
1151 ACGGCGGCCG

```

Figure 5.15 : Complémentarité entre apMir_39427 et DR740502.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GAGCTATGACATTAGGCCTATTTAGGTGACCTCCAGAACAAGTTTGTACA
51 AAAAAGCAGGTTGCTACCGGTCCGGAATTCCTGGGATATCGTCGACCCAC
101 GCGTCCGCCACAAGCCAAGAACCAATACTTGATCTGTTGTTTCCTTTAGC
    ----GGGGGUGUUCGGUUAU-----
        ** ***** *
151 TCCCGGAAGACTTTTCGCTGCACCGACCGATCTCGATCATGGAGGATGAG
201 AGGAGCACCCAGTCGTACCAGGGAGGTGAGGCCGCCGAGCAGGTGGAGGT
251 GACGGACAGGGCCTCCTCGGCAACCTCCTCGGCAAGAAGAAGGCGGAGG
301 AGGACAAGGAGAAGAAGGAGGAGGAGCTGGTCACCGGCATGGAGAAGGTC
351 TCCGTGGAAGAGCCCCGAGGTCAAGAAGGAGGAGCACGTGGATGGCGAGAA
401 GAAGGAGACCCTCTTCTCCAAGCTGCACCGATCCAGCTCCAGCTCCAGCT
451 CGTCTAGTGACGAGGAAGAGGAGGAGGTGATCGACGACAACGGCGAGGTG
501 ATCAAGAGGAAGAAGAAGAAGGGTCTCAAGGAGAAGCTCCAGGAGAAGCT
551 GCCCCGCCACAAGGACACCGAGGGTGAGCACGTGACGGGCCTACCCGCAC
601 CGGCGGCCCCCGCGTCCGTGCAGACCCACCATGACACCGACGTCGTCGTC
651 GAGAAGATCGACGGTGACGTGAAGACAGAGGCGACACCGGCAGTGCCCGA
701 GGAGGAGAAAAAGCTTCTTGAAAAGATCAAGGAAAACCTGCCCGGCCG
751 GCACAAGAAAGCCGGAGGACGCTGCTGCGGTGCCCGTCACGCACGCTGGC
801 TCCGGCGCCCGGTGAGCAACGCTGCTCCCAGCCCCGGTGCCACGCG

```

Figure 5.16 : Complémentarité entre apMir_49482 et CV772291.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.


```

1  ACGCTTGACCTTAGGCCTATTTAGGTGACCTTCAGAACAAGGTGTAAAAA
51  AAGCAGGTTGCACCGGTCCGGAATTCCTGGGATATCGTCGACCCACGCGT
101 CCGCAAAGCCAAAGCAACCGCCACAAGCCAAGAACCAATACTTGATCTGT
    -----GGGGGUGUUCGGUUAU-----
          ** ***** **
151 TGTTTTCTTTAGCTCCCGGAAGACCTTTTAGCTGCACCGATCGATCTCGA
201 TCATGGAGGATGAGAGGAGCACCCAGTCATACCAGGGAGGTGAGGCCGCC
251 GAGCAGGTGGAGGTGACAGACAGGGGCCTCCTCGGCAACCTCCTCGGCAA
301 GAAGAAGGCGGAGGAGGACAAGGAGAAGCAGGAGGAGCTGGTCACCGGCA
351 TGGAGAAGGTCTCCGTGGAAGAGCCCAGGTTAAGAAGGAGGAGCACGAG
401 GATGGCGAGAAGAAGGAGACCTCTTCTCCAAGCTGCACCGATCCAGCTC
451 CAGCTCCAGCTCGTCTAGTGACGAGGAAGAGGAGGAGGTGATCGATGACA
501 ACGGTGAGGTGATCAAGAGGAAGAAGAAGAAGGGTCTCAAGGAGAAGCTC
551 AAGGAGAAGCTGCCCCGCCACAAGGACACCGAGGGTGAGCACGTGACGGG
601 CCTACCCGCACCGGCGGCCCCCGCGTCTGTGCAGACCACCATGACACCGA
651 CGTCGTCGTCGAAAGATCGACGGGGACGTGAAGACAGAGGCGGCACCGGG
701 CATGGCCCAGAGGGAGAAAAGGCTTCTTGGGAAAGATCAGGGAAAACC
751 TGCCGGGCCGCCCAAGAAACCGGAGGACGCTGGTTCCGGGTGCCCGTCA
801 CGCAGGCTGCTCCAGAACCAAGGGAACGCGCCGGGGGCCAACCGCCCCAG
851 GAAG

```

Figure 5.17 : Complémentarité entre apMir_49482 et CV767188.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1  ACGCTATGACATTAGGCCTATTTAGGTGACACTATAGAACAAGTTTGTAC
51  AAAAAAGCAGGCTGGTACCGGTCCGGAATCCCAGGATATCGTCGACCCA
101 CGCGTCCGGCAAGTGAAGCTCACACAACCTACCCTACCCACCCATCCATC
151 AGCAGTTTTTCTATCGACCAATGGCTTCTTCTTCCGTGCTGCTCGGAGCC
201 TCGGCCACGGCCGCGCTCACCGGCACCCCGGCAGGCAAGGCCCTTCCCCG
251 GCCTTGCTTCCCTCGCCGCTCGCCCGCGCACCGTGAGCGGTGGCCGTCTCT
301 GCCTGCAGAACGCTCCAAGGGCGACTCCGGCGTACAACGACGCTGCGGAT
351 GCCACCGACAAGGCCATCGACGGCGTGAAGGGGGTGGCCGACGAGTTGAA
401 AAAGGGCGTGGCGGAGGCTGCGGAGGCCGTCTCGGGCAACACGAGAGGCC
-----AAAGACCGUUGUGCUC-----
* ** *****

451 GCGGAGGAACCCGGCAGGGCGCGAGCGAGGTGGACNCAAGGCCAAGGACT
501 TCGGCGAGCAGGCGAAAAAGGCNACGGAGGAGGCGTGGGAACGCGCCCAG
551 GACGCCGCACAGGCCAATCACGGACAAAGTCGCCGCCGCGGCCAAAAGGG
601 AAGCTAGCTAAGCTAACACTACGTTGACTAAGCCCAATCTGGAATCGTTC
651 AATTCCTTTTCCATTGGAAGGGAATGCATATACGTTATTCCGGGAACAGG
701 AAAAAAAAAAAGCTGTATTTTTTTTTTCGGGGGAAAAAGAAATAACCGGC
751 CTGTGTTAATGTCAAACGCCATAAAAGAAAAAGAATTTTTTCAATAAAA
801 AAAAAAAAAAAAAAAGGGGCGCCCGCTTCATAAGATATCCCCCAGGG

```

Figure 5.18 : Complémentarité entre apMir_636 et CV774057.1. Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

1 GGGGGGGCGGTGAAAGATCTTGATTGGGGCGAGTGAGACCGGGGTGGTTG
 51 TCATGATGCGGCGTAGGGTCCAGCGCCGGGGTGGTTGCTGATGCCGTGAT
 101 TGGGTTTGGGTTTCTTTCAAGGTGATATACTAGATCTCATCTCATCGGCC
 151 AGGGATGAGATTTGAGGGGGAGGCAGACCTTGTGCGGAGGGCCTGAGGCA
 201 GCAGAGCTTCTCTCCGGTTGATGGGGCCGCCTGCTCCGCCGACGTCGTG
 251 CCGGCACGGCTCGCCGGGGAGCTCCGTTGTTCTCTGGCGCGCTGCTGACT
 301 GGGGAGGCAGGTGCTCCGGGCCTGCGGGAGGAGGAAGAGTTCTGCTGGTT
 351 GCCTGTTATTTTCTTGGGGAGGGAGGAGAAAGAAGTGAAGGGAAGATATC
 401 AACTTGATCTTTGGTCCCTCATCAAGTGGCAGCAGCTTTGACGTGCGAGT
 451 AGGAGCAGCGGCACCGGAGATCTCGGGCTCTGGCATGGGCTCGTTCCGGA
 501 TGGAGTGGAACCAGAGGAGCTCGGTGCTGTGGGACTGGGAGAATTTCCCG
 551 CCGATAGGCGAGAACCCCAAGAACGCGATGCAGGCCGATCCAAGATTTGC
 601 CGCCGTTGCGGCTACCATGGGGAATGAACCGCTCCATTCTTCTGGCGGTA
 651 GCGGCACCTTCTCTTCCAGCTCAGAGATGGGGTATGGCTCTTCCAAGAGC
 701 TCCATGTCCGCGTCGATCGATTCTTCAACAGGGCTGGGAACAACATGGA
 751 GTTCAGATTTGCGCCTGTCAAAAACCTGATAGGAACACGAGCAAGAACA
 801 CCGAGCTGGGTAAAGTTGATAACACGAGAACTGGAACATCTCCGTGCGCT
 851 GTGGTGGCAGTGAGCAGTGGAGAGCCGGTGATCGGCCTGAAGCTTGGCAA
 901 GAGAACTTACTTCGAGGATGTCTGTGGAGGGCAGAATGTCAAGAGCTCGC
 951 CATCGGGTGTGCGAGCGCGCAAACAAATCTCTGCTTTGGGCAAGAAG
 1001 GCAAAGGCGGAACAACAGAAGCCACATAACTCGTACTGTCAGGTTGAAGG
 1051 CTGCAAAGTCGACCTCTCTTCTGTTAAAGATTACCATCGAAAGCACAGAG
 1101 TCTGTGAACTTCACTCTAAGGCTCCGAAAGTTGTTGTGCGCTGGTCTGGAG
 1151 CGACGCTTTTGCCAACAGTGCAGCCGGTTTCATGCTTTAGCTGAGTTTGA
 1201 CCAGAAAAAGCGAAGCTGCCGTAGGCGTCTCAATGATCATAATTCCCGCA
 1251 GGCGGAAGCCACAGCCAGAAGCAATTTCTTTCAGTTCATCAAGGATGTCT
 1301 ACGATGTTTTATGATGCAAGGCAACAGCCAAATTTCCCTATTTGGTCAGGC
 1351 TCCTTATGTTCAAATGAGAAGCTGTGGAAGTTCTTCATGGGATGACCCAG
 1401 GAGGCTTCAAAGTTACACACACAAAAGCTCCTTGGTTAAAACCAACAAC
 1451 GCTGCAGGTGTTTCATGGGATACATTTATCTAGTCAGCAGATGTCGGACAA
 1501 TATTATGCCACATGGTGCACATCATGGTTTCGATGGGTTTCATGGCATTCA
 1551 AGGGAACCTGTACAAAGTTCCCTAATCAAGGTGTCCAAGCTTCTGCTGTT
 1601 GCTTCCGACTCCAGTGGAGCCCCGGATCTTCAGCATGCTCTCTCTTCT
 156a -----CACGAGUGAGAGAAGA

 156k -----ACACGAGAGAGAGAAGA

 1651 GTCAAGCAACCCAGTGGGTGCTGCCAACCTCCAGCCAAGTCCCAGATGC
 156a CAGU-----

 156k CAGU-----

```

1701 ACTCTGGGGTGGCAGCCATTGCCGGCGCCCCAACCCCGCGATGCACGCG
1751 CTGGGATCATCGACGGGGCTCTGGCTAGACGGCAGCCAGCCCCTCGATGA
1801 TCACCCGCGGTTCCAGGTCTTCGAGCGCTTGGGGGACCATGACAGCGAGC
1851 TCCAGCTCCCAAAGCCTTCCCTACGACCATGCCTCGCACTTCGACCGGATG
1901 CACTGATGATGGCTCCGGTCCACTGGGTGCGTGATTTTGTACGCGATCA
1951 ACGCCGTTTCTTCGGCCTGAAAATCGTAATGCTGAATTTACTTTGCTTTG
2001 ACGCCGTTGCCTGTCTAGAGGCCTATGGTTTTTGGCAATGCCTAGAATAAA
2051 GCGGCACACGAACAGACTTAGGATCAAATCGACCCAGTTGTGTTGCCATG
2101 GAGAAAGATTTTGTATCCATCATTAGCCATTTGTCTGAATAATTCTGAACT
2151 TGCTATGTTTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAACGA

```

Figure 5.19: Complémentarité entre *miR156a*, *miR156k* et *TaSPL3* (RFL_Contig4144; AK333630.1). Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

```

1 GGCTCCGCTTCTTCTCCTTCTCCTTCCACTCATCAGCTAGCTCCACAGTT
51 CCACTTCCGCGACAGCTCCCAGAGAAGAGCCCTAACTAGCTTCATCTTCA
101 TCGCGCCTCACCGGAAGGCATGGACCGCAAGGACAAGTCCCGCAAGTCCT
151 CCTCGGCAGCGTCCATGGCCGCGCTCGCCGCCGAGCTGCGGCCGCGGAC
201 GTGGCCCGAGCCGACGGGATGTCCGGCGAGGAGGACCAGAAGCTGAAGCT
251 CGTGAACGTTCCCGTGGTCTCCGTCGGCGGCTCGAGCTCCTCTGCCGCGG
301 CGGTGGCGGTGAGGAGGGGCAGTGGTGCTGCTGGCGCCGTGGCGACGGGC
351 GCGGCTGGGGCAGGCGGGCCGAGCTGCCAGGCTGAGAGGTGCGGGCGCCGA
401 CCTCAGCGAGGCGAAGCGGTACCACCGCAGGCACAAGGTGTGCGAGGCGC
451 ACTCCAAGGCTGCTGTGCTGGTCTGTCGCCGGCCTCCGCCAGCGCTTCTGC
501 CAGCAATGCAGCCGGTTCACGAGCTTTTGGAGTTCGACGACCAGAAGCG
551 CAGCTGCCGCCGGCGCCTGGCCGGGCACAACGAGCGGCGGAGGAAGAGCT
601 CGGCGGAGGCCAACGGCGGCGACGGGTGCCGCCACGCCGACCAGGACGGC
651 CGTAGCCACCCGGGAACCCGCCGCTGAACCATTTCAGATCAGATAAAC
701 CTACCTAAGCATGCTCCCTCTCTTCTGTCATGCAGCCATGCTACTAGCTA
156a -----CACGAGUGAGAGAAGACAGU-----
          *****
156k -----ACACGAGAGAGAGAAGACAGU-----
          *****
751 CATATGTATCCACCGACCTATGTACGTACCTGCCTACCTACGTCTCCACT
801 ATCCGGTGTACTAACTGGCAGTATATGTGGTCTCCTGTACTGCTATATAT
851 TTGCTGCTGTCTGCCAAAACCTAAGCTAAGCTAATTGTAACCTGGGAAC
901 TGGTCAGGTGTTAGAGTGATTGTGTGTGATGTGTAATTGTATGGCCTG
951 TGCAGCCGAGACTTCTGCAGGCTGTGTAATATTGCTGCTGTGCTGGGATA
1001 ATTTGTGGCAATATATGCTATCTATTTCGAGTAACTACTAAGGAAAAAAAA
1051 AAAAAACGA

```

Figure 5.20 : Complémentarité entre *miR156a*, *miR156k* et *TaSPL13* (tp1b0002m07). Les astérisques mettent en évidence les bases complémentaires.

RÉFÉRENCES

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K et Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. «*Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling». *Plant Cell* 15: 63-78.
- Badawi M, Danyluk J, Boucho B, Houde M et Sarhan F. 2007. «The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs». *Mol Genet Genomics* 277: 533-54.
- 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 Cell Physiol* 49: 1237-49.
- 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 Mol Biol* 24: 701-13.
- Benlloch R, Berbel A, Serrano-Mislata A et Madueno F. 2007. «Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view». *Ann Bot* 100: 659-76.
- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H et Huijser P. 2005. «Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains». *J Mol Biol* 352: 585-96.
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L et Voinnet O. 2008. «Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs». *Science* 320: 1185-90.
- Cardon G, Hohmann S, Klein J, Nettessheim K, Saedler H et Huijser P. 1999. «Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes». *Gene* 237: 91-104.
- Chen X. 2004. «A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development». *Science* 303: 2022-5.
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A et Mao L. 2010. «SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development». *J Integr Plant Biol* 52: 946-51.

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 Dev* 17: 1043-54.

Chinnusamy V, Zhu JK et Sunkar R. 2010. «Gene regulation during cold stress acclimation in plants». *Methods Mol Biol* 639: 39-55.

Cho HJ, Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung JH, Park CM et Ahn JH. 2012. «SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in Arabidopsis». *FEBS Lett* 586: 2332-7.

Chuck G, Cigan AM, Saeteurn K et Hake S. 2007. «The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA». *Nat Genet* 39: 544-9.

Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA et Carrington JC. 2010. «Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in Arabidopsis». *Nat Struct Mol Biol* 17: 997-1003.

Danyluk J, Houde M, Rassart E et Sarhan F. 1994. «Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species». *FEBS Lett* 344: 20-4.

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 Physiol* 132: 1849-60.

Diallo AO, Ali-Benali MA, Badawi M, Houde M et Sarhan F. 2012. «Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation». *Mol Genet Genomics* 287: 575-90.

Dong Z, Han MH et Fedoroff N. 2008. «The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate *in vitro* processing of pri-miRNA by DCL1». *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9970-5.

Dowgert MF et Steponkus PL. 1984. «Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle». *Plant Physiol* 75: 1139-51.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C et Lepiniec L. 2010. «MYB transcription factors in Arabidopsis». *Trends Plant Sci* 15: 573-81.

Dunn MA, White AJ, Vural S et Hughes MA. 1998. «Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.)». *Plant Mol Biol* 38: 551-64.

Dure L, 3rd, Greenway SC et Galau GA. 1981. «Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis». *Biochemistry* 20: 4162-8.

Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K et Somssich IE. 1999. «Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors». *EMBO J* 18: 4689-99.

Fang Y et Spector DL. 2007. «Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants». *Curr Biol* 17: 818-23.

Fei Q, Xia R et Meyers BC. 2013. «Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks». *Plant Cell* 25: 2400-15.

Fu D, Szucs P, Yan L, Helguera M, Skinner JS, von Zitzewitz J, Hayes PM et Dubcovsky J. 2005. «Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat». *Mol Genet Genomics* 273: 54-65.

Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morounov A et Snape JW. 1995. «RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat». *Theor Appl Genet* 90: 1174-79.

Gandikota M, Birkenbihl RP, Hohmann S, Cardon GH, Saedler H et Huijser P. 2007. «The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings». *Plant J* 49: 683-93.

German MA, Pillay M, Jeong DH, Hetawal A, Luo S, Janardhanan P, Kannan V, Rymarquis LA, Nobuta K, German R, De Paoli E, Lu C, Schroth G, Meyers BC et Green PJ. 2008. «Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends». *Nat Biotechnol* 26: 941-6.

Gill SS et Tuteja N. 2010. «Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants». *Plant Physiol Biochem* 48: 909-30.

Gordon-Kamm WJ et Steponkus PL. 1984. «Lamellar-to-hexagonal II phase transitions in the plasma membrane of isolated protoplasts after freeze-induced dehydration». *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6373-7.

Greenup A, Peacock WJ, Dennis ES et Trevaskis B. 2009. «The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals». *Ann Bot* 103: 1165-72.

Griffith M et Yaish MW. 2004. «Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities». *Trends Plant Sci* 9: 399-405.

Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S et Masmoudi K. 2011. «Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms». *Plant Signal Behavior* 6: 1503-9.

Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK et Kjems J. 2013. «Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges». *Nature* 495: 384-8.

Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junemann C et Niepmann M. 2008. «microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA». *EMBO J* 27: 3300-10.

Houde M, Belcaid M, Ouellet F, Danyluk J, Monroy AF, Dryanova A, Gulick P, Bergeron A, Laroche A, Links MG, MacCarthy L, Crosby WL et Sarhan F. 2006. «Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress». *BMC Genomics* 7: 149.

Houde M, Dhindsa RS et Sarhan F. 1992. «A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae». *Mol Gen Genet* 234: 43-8.

Hussain M. 2012. «Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action». *Cell Tissue Res* 349: 405-13.

Hwan Lee J, Joon Kim J et Ahn JH. 2012. «Role of SEPALLATA3 (SEP3) as a downstream gene of miR156-SPL3-FT circuitry in ambient temperature-responsive flowering». *Plant Signal Behav* 7: 1151-4.

Ibrahim F, Rohr J, Jeong WJ, Hesson J et Cerutti H. 2006. «Untemplated oligoadenylation promotes degradation of RISC-cleaved transcripts». *Science* 314: 1893.

Ingram J et Bartels D. 1996. «The molecular basis of dehydration tolerance in plants». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.

Jack T. 2001. «Relearning our ABCs: new twists on an old model». *Trends Plant Sci* 6: 310-6.

Jaglo KR, Kleff S, Amundsen KL, Zhang X, Haake V, Zhang JZ, Deits T et Thomashow MF. 2001. «Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species». *Plant Physiol* 127: 910-7.

Jia J, Zhao S, Kong X, Li Y, Zhao G, He W, Appels R, Pfeifer M, Tao Y, Zhang X, Jing R, Zhang C, Ma Y, Gao L, Gao C, Spannagl M, Mayer KF, Li D, Pan S, Zheng F, Hu Q, Xia X, Li J, Liang Q, Chen J, Wicker T, Gou C, Kuang H, He G, Luo Y, Keller B, Xia Q, Lu P, Wang J, Zou H, Zhang R, Xu J, Gao J, Middleton C, Quan Z, Liu G, Wang J, Yang H, Liu X, He Z, Mao L et Wang J. 2013. «*Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation». *Nature* 496: 91-5.

Jopling CL. 2008. «Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122». *Biochem Soc Trans* 36: 1220-3.

Kane NA, Agharbaoui Z, Diallo AO, Adam H, Tominaga Y, Ouellet F et Sarhan F. 2007. «TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene TaVRN1». *Plant J* 51: 670-80.

Kawaura K, Mochida K, Enju A, Totoki Y, Toyoda A, Sakaki Y, Kai C, Kawai J, Hayashizaki Y, Seki M, Shinozaki K et Ogihara Y. 2009. «Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from full-length common wheat cDNA sequence data and expression patterns». *BMC Genomics* 10: 271.

Kim YJ, Zheng B, Yu Y, Won SY, Mo B et Chen X. 2011. «The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*». *EMBO J* 30: 814-22.

Kurihara Y, Takashi Y et Watanabe Y. 2006. «The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis». *RNA* 12: 206-12.

Kurihara Y et Watanabe Y. 2004. «Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions». *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12753-8.

Lanet E, Delannoy E, Sormani R, Floris M, Brodersen P, Crete P, Voinnet O et Robaglia C. 2009. «Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs». *Plant Cell* 21: 1762-8.

Lee H, Yoo SJ, Lee JH, Kim W, Yoo SK, Fitzgerald H, Carrington JC et Ahn JH. 2010. «Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis». *Nucleic Acids Res* 38: 3081-93.

Lee RC, Feinbaum RL et Ambros V. 1993. «The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*». *Cell* 75: 843-54.

Ling HQ, Zhao S, Liu D, Wang J, Sun H, Zhang C, Fan H, Li D, Dong L, Tao Y, Gao C, Wu H, Li Y, Cui Y, Guo X, Zheng S, Wang B, Yu K, Liang Q, Yang W, Lou X, Chen J, Feng M, Jian J, Zhang X, Luo G, Jiang Y, Liu J, Wang Z, Sha Y, Zhang B, Wu H, Tang D, Shen Q, Xue P, Zou S, Wang X, Liu X, Wang F, Yang Y, An X, Dong Z, Zhang K, Zhang X, Luo MC, Dvorak J, Tong Y, Wang J, Yang H, Li Z, Wang D, Zhang A et Wang J. 2013. «Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*». *Nature* 496: 87-90.

Luscher B et Eisenman RN. 1990. «New light on Myc and Myb. Part II. Myb». *Genes & Development* 4: 2235-41.

Macovei A, Gill SS et Tuteja N. 2012. «microRNAs as promising tools for improving stress tolerance in rice». *Plant Signal Behav* 7: 1296-301.

Mathieu J, Warthmann N, Kuttner F et Schmid M. 2007. «Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis». *Curr Biol* 17: 1055-60.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF et Sonenberg N. 2007. «MicroRNA inhibition of translation initiation *in vitro* by targeting the cap-binding complex eIF4F». *Science* 317: 1764-7.

Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, Loewer A, Ziebold U, Landthaler M, Kocks C, Le Noble F et Rajewsky N. 2013. «Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency». *Nature* 495: 333-8.

Meyer C, Grey F, Kreklywich CN, Andoh TF, Tirabassi RS, Orloff SL et Streblow DN. 2011. «Cytomegalovirus microRNA expression is tissue specific and is associated with persistence». *J Virol* 85: 378-89.

- Monroy AF, Labbe E et Dhindsa RS. 1997. «Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts». *FEBS Lett* 410: 206-9.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O et Jones JD. 2006. «A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling». *Science* 312: 436-9.
- Ohno R, Takumi S et Nakamura C. 2001. «Expression of a cold-responsive Lt-Cor gene and development of freezing tolerance during cold acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.)». *J Exp Bot* 52: 2367-74.
- Orom UA, Nielsen FC et Lund AH. 2008. «MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation». *Mol Cell* 30: 460-71.
- Orvar BL, Sangwan V, Omann F et Dhindsa RS. 2000. «Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity». *Plant J* 23: 785-94.
- Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L et Hamilton A. 2007. «Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot». *Nucleic Acids Res* 35: e60.
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H et Poethig RS. 2005. «Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis». *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3691-6.
- Patterson B et Guthrie C. 1987. «An essential yeast snRNA with a U5-like domain is required for splicing *in vivo*». *Cell* 49: 613-24.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J et Sharp PA. 2006. «Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells». *Mol Cell* 21: 533-42.
- Preston JC et Hileman LC. 2013. «Functional evolution in the plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family». *Front Plant Sci* 4: 80.
- Quinn JM et Merchant S. 1995. «Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators». *Plant Cell* 7: 623-8.

- Ramachandran V et Chen X. 2008. «Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis». *Science* 321: 1490-2.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B et Bartel DP. 2002. «MicroRNAs in plants». *Genes Dev* 16: 1616-26.
- Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C et Yu B. 2012. «Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis». *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 12817-21.
- Rogers K et Chen X. 2013. «Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs». *Plant Cell* 25: 2383-99.
- Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, Chen X, Finer JJ, Shen QJ et Rushton PJ. 2012. «WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling». *Plant Biotechnol J* 10: 2-11.
- Sakai H, Aoyama T et Oka A. 2000. «Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators». *Plant J* 24: 703-11.
- Sarhan F, Ouellet F et Vazquez-Tello A. 1997. «The wheat Wcs120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals». *Physiol Plant* 101: 439-445.
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H et Huijser P. 2008. «The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis». *Plant Mol Biol* 67: 183-95.
- Simpson GG, Gendall AR et Dean C. 1999. «When to switch to flowering». *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 519-50.
- Skinner JS, von Zitzewitz J, Szucs P, Marquez-Cedillo L, Filichkin T, Amundsen K, Stockinger EJ, Thomashow MF, Chen TH et Hayes PM. 2005. «Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley». *Plant Mol Biol* 59: 533-51.
- Sunkar R, Li YF et Jagadeeswaran G. 2012. «Functions of microRNAs in plant stress responses». *Trends Plant Sci* 17: 196-203.
- Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W et Zhu JK. 2008. «Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing». *BMC Plant Biol* 8: 25.

- Sunkar R et Zhu JK. 2004. «Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis». *Plant Cell* 16: 2001-19.
- Theocharis A, Clement C et Barka EA. 2012. «Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures». *Planta* 235: 1091-105.
- Thermann R et Hentze MW. 2007. «Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation». *Nature* 447: 875-8.
- Thomashow MF. 1999. «PLANT COLD ACCLIMATION: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 571-599.
- Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE et Pinto YM. 2010. «MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure». *Circ Res* 106: 1035-9.
- Tremblay K, Ouellet F, Fournier J, Danyluk J et Sarhan F. 2005. «Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals». *Plant Cell Physiol* 46: 884-91.
- Uemura M, Joseph RA et Steponkus PL. 1995. «Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions)». *Plant Physiol* 109: 15-30.
- Usami T, Horiguchi G, Yano S et Tsukaya H. 2009. «The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty». *Development* 136: 955-64.
- Valen E, Preker P, Andersen PR, Zhao X, Chen Y, Ender C, Dueck A, Meister G, Sandelin A et Jensen TH. 2011. «Biogenic mechanisms and utilization of small RNAs derived from human protein-coding genes». *Nat Struct Mol Biol* 18: 1075-82.
- van Rooij E. 2011. «The art of microRNA research». *Circ Res* 108: 219-34.
- Vitamvas P et Prasil IT. 2008. «WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat». *Plant Physiol Biochem* 46: 970-6.
- Wang F et Perry SE. 2013. «Identification of direct targets of FUSCA3, a key regulator of Arabidopsis seed development». *Plant Physiol* 161: 1251-64.

- Wang JW, Czech B et Weigel D. 2009. «miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*». *Cell* 138: 738-49.
- Wang JW, Park MY, Wang LJ, Koo Y, Chen XY, Weigel D et Poethig RS. 2011. «miRNA control of vegetative phase change in trees». *PLoS Genet* 7: e1002012.
- Wightman B, Ha I et Ruvkun G. 1993. «Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*». *Cell* 75: 855-62.
- Winfield MO, Lu C, Wilson ID, Coghill JA et Edwards KJ. 2010. «Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat». *Plant Biotechnol J* 8: 749-71.
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D et Poethig RS. 2009. «The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*». *Cell* 138: 750-9.
- Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C et Qi Y. 2010. «DNA methylation mediated by a microRNA pathway». *Mol Cell* 38: 465-75.
- Xie K, Wu C et Xiong L. 2006. «Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice». *Plant Physiol* 142: 280-93.
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA et Carrington JC. 2005a. «Expression of *Arabidopsis* miRNA genes». *Plant Physiol* 138: 2145-54.
- Xie Z, Allen E, Wilken A et Carrington JC. 2005b. «DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*». *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12984-9.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE et Carrington JC. 2004. «Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants». *PLoS Biol* 2: E104.
- Xu J, Yang JY, Niu QW et Chua NH. 2006. «*Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development». *Plant Cell* 18: 3386-98.

Xue GP. 2002. «Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity». *Nucleic Acids Res* 30: 77.

Xue GP. 2003. «The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature». *Plant J* 33: 373-83.

Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS et Wagner D. 2009. «The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1». *Dev Cell* 17: 268-78.

Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y et Shikanai T. 2009. «SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 is a central regulator for copper homeostasis in Arabidopsis». *Plant Cell* 21: 347-61.

Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K et Yokoyama S. 2004. «A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors». *J Mol Biol* 337: 49-63.

Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X et Schmid M. 2010. «Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2». *Plant Cell* 22: 2156-70.

Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du J, Zhu JK et Sun Q. 2007. «Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.)». *Genome Biol* 8: R96.

Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DS, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A et Lajoie G. 2000. «Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals». *Plant Physiol* 124: 1251-64.

Yin ZJ et Shen FF. 2010. «Identification and characterization of conserved microRNAs and their target genes in wheat (*Triticum aestivum*)». *Genet Mol Res* 9: 1186-96.

Yu N, Cai WJ, Wang S, Shan CM, Wang LJ et Chen XY. 2010. «Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Cell* 22: 2322-35.

Zhang H et Li L. 2013. «SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in Arabidopsis». *Plant J* 74: 98-109.

Zhang YC, Yu Y, Wang CY, Li ZY, Liu Q, Xu J, Liao JY, Wang XJ, Qu LH, Chen F, Xin P, Yan C, Chu J, Li HQ et Chen YQ. 2013. «Overexpression of microRNA OsmiR397 improves rice yield by increasing grain size and promoting panicle branching». *Nat Biotechnol* 31: 848-52.

Zheng X, Zhu J, Kapoor A et Zhu JK. 2007. «Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing». *EMBO J* 26: 1691-701.

Zhou X, Wang G, Sutoh K, Zhu JK et Zhang W. 2008. «Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis». *Biochim Biophys Acta* 1779: 780-8.