

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ CYTOCHROME C OXYDASE
DE BLÉ (*Triticum aestivum* L.) PAR LE FROID ET LE CO₂

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

YÉRO SEYDI BA

JUN 2011

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

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche le Dr. Fathey Sarhan qui m'a accueilli dans son laboratoire avec confiance et sans hésitation. Vous m'avez guidé par vos conseils. Vos immenses qualités humaines et intellectuelles, votre amour du métier, votre rigueur scientifique sont le reflet de vos grandes qualités professionnelles. Vous resterez pour moi un exemple par votre honnêteté, votre grande disponibilité, votre générosité et votre sens élevé des grandes responsabilités. Soyez assuré d'une reconnaissance infaillible.

Merci également aux professeurs Jean Danyluk et Normand Chevrier. Vous avez accepté d'être membres du comité de mon projet de recherche et vos conseils et vos jugements pour ce travail m'ont beaucoup honoré. Merci aussi au Pr François Ouellet pour son laboratoire dont l'équipement m'a souvent servi. Votre présence parmi les membres du comité de mon mémoire de maîtrise me rassure et me reconforte. J'aimerais remercier mes collaborateurs Khalil Kane et toute l'équipe du Pr Normand Huner de l'université Western Ontario. Vos collaborations ont permis la réalisation de ce travail. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance.

J'aimerais remercier spécialement Dre Zahra Agharbaoui et Amadou O. Diallo. Votre spontanéité à rendre service, votre disponibilité constante font l'admiration de toute personne qui a le privilège de vous approcher. Toute ma gratitude.

Mes remerciements vont également à l'endroit de:

Dr Mohamed Ali Ali Ben Ali, Dre Mélanie Grondin, Dr Badawi, Dr Joseph Nankeu, Wilfried Saron ainsi que tout le personnel du groupe de recherche sur les plantes, en particulier Zakia et Sara. Vous m'avez enrichi en expérience au cours du temps que j'ai passé à vos côtés. Par votre belle humeur quotidienne, vous m'avez aussi encouragé et appuyé dans différents moments. Je vous en serais toujours reconnaissant. Je remercie également toute ma famille et tous mes amis, en particulier mon épouse pour leur compréhension et leur soutien indéfectibles.

Merci à tous pour les souvenirs inoubliables.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	vi
Liste des tableaux	vii
Résumé.....	viii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE	1
1.1 Dommages causés par le gel	2
1.2 Réponse des plantes aux basses températures et au gel.....	2
1.2.1 La perception du stimulus de froid.....	3
1.2.2 Effets de l'acclimatation au froid sur la conductance stomatique.....	9
1.2.3 Effets de l'acclimatation au froid sur l'assimilation du CO ₂	10
1.2.4 La synthèse d'osmoprotectants en réponse aux basses températures	12
1.2.5 Les modifications génétiques liées à l'acclimatation au froid	14
1.3 Réponse des plantes à des concentrations élevées de CO ₂	16
1.3.1 Effets des concentrations élevées de CO ₂ sur la tolérance au gel.....	17
1.3.2 Effets des concentrations élevées de CO ₂ sur la conductance stomatique	18
1.3.3 Effets des fortes concentrations de CO ₂ sur les enzymes	19
1.3.4 Effets des concentrations élevées de CO ₂ sur la biomasse	20
1.3.5 Effets des concentrations élevées de CO ₂ sur l'assimilation de l'azote	21

1.4 La photosynthèse et la photorespiration chez les plantes	23
1.5 La cytochrome c oxydase : rôle et fonction	26
1.6 Problématique	30
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
2.1 Matériel biologique et conditions de croissance	33
2.2 Méthodes	34
2.2.1 Extraction et dosage des protéines	34
2.2.2 Accumulation des protéines en réponse au froid: western blot	35
2.2.3 Optimisation de la méthode du dosage de l'activité cytochrome c oxydase	35
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	39
3.1 Contenu en protéines	39
3.1.1 Effet du froid sur la teneur en protéines solubles totales	39
3.1.2 Effet de l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO ₂	40
3.2 Accumulation des protéines spécifiques en réponse au froid	41
3.2.1 Expression d'un gène marqueur de l'acclimatation au froid	41
3.2.2 Accumulation de la protéine COX II en réponse au froid	42
3.3 Effet du pH et de la température sur l'activité de l'enzyme	43
3.3.1 Effet du pH	43
3.3.2 Effet de la température sur l'activité cytochrome oxydase	44
3.4 Détermination du Vmax et du Km	45
3.5 Activité cytochrome c oxydase en réponse au froid	45

3.6 Effet d'une exposition au CO ₂ (courte durée) sur l'activité cytochrome c oxydase ..	46
3.7 Effet d'une exposition chronique de CO ₂ sur l'activité cytochrome c oxydase	47
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	60
CONCLUSION	68
RÉFÉRENCES	

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 La photorespiration	25
1.2 Transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne	28
3.1 Accumulation d'un marqueur de l'acclimatation au froid chez Norstar	53
3.2 Accumulation des protéines COX II en réponse au froid	54
3.3 Effet de la température sur l'activité cytochrome c oxydase chez Norstar et Katepwa ..	55
3.4. Stabilité thermique de la cytochrome c oxydase chez Norstar et Katepwa	56
3.5 Activité cytochrome c oxydase en réponse au froid	57
3.6 Activité cytochrome c oxydase en réponse à l'exposition des plantes à une concentration élevée de chez Norstar	58
3.7 Activité cytochrome c oxydase en réponse à l'exposition chronique au CO ₂ (700 ppm) chez Katepwa et chez Norstar	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 Teneur en protéines solubles totales chez Norstar et Katepwa acclimatées au froid	48
3.2 Teneur en protéines solubles totales chez Norstar non-acclimaté et acclimaté exposés durant 80 heures à une concentration élevée de CO ₂	49
3.3 Teneur en protéines solubles totales chez Norstar et Katepwa non-acclimatés et acclimatés et exposés à une concentration élevée de CO ₂ de longue durée	50
3.4 Activité cytochrome c oxydase exprimée en fonction du pH chez des plantes de Norstar et Katepwa	51
3.5 Paramètres cinétiques de la cytochrome c oxydase chez Norstar et Katepwa non acclimatés et acclimatés au froid:	52

RÉSUMÉ

L'acclimatation au froid chez les plantes est un processus dynamique qui nécessite un apport énergétique indispensable à l'induction de la tolérance au gel. Cette énergie est fournie par l'augmentation de la capacité photosynthétique durant l'acclimatation au froid à la suite d'une reprogrammation globale des enzymes photosynthétiques et respiratoires. Par ailleurs, des études ont déjà démontré une augmentation de biomasse chez les variétés de blé d'hiver et de printemps, en réponse au froid et à une concentration élevée de CO₂. Afin d'élucider le mécanisme impliqué dans la régulation énergétique durant l'acclimatation au froid et le rôle d'une concentration élevée de CO₂, nous avons entrepris d'étudier l'implication de plusieurs enzymes clés de la photosynthèse et de la respiration, en réponse aux basses températures durant la croissance chez deux variétés de blé: Norstar, une variété d'hiver et Katepwa, une variété de printemps. Parmi les enzymes régulées à la hausse, on a identifié la cytochrome c oxydase (COX II), une enzyme clé impliquée dans la synthèse d'ATP au niveau de la mitochondrie. Nos résultats ont révélé qu'en réponse au froid, la teneur en protéines solubles totales a augmenté de 39% et 83% respectivement chez Katepwa et Norstar après 30 jours. Au cours de l'acclimatation au froid (4°C), on observe une forte accumulation des protéines COX II chez Norstar (très tolérant au gel) et une faible accumulation de ces protéines chez Katepwa (sensible au gel). Nos résultats ont aussi montré une augmentation de l'activité cytochrome c oxydase chez les 2 variétés. En effet, on observe une hausse de 1,5 fois chez les plantes Norstar acclimatées au froid comparativement à leur témoin (20°C), alors que cette hausse est de 40% chez Katepwa. Ces données montrent qu'il existe une corrélation entre la tolérance au froid et l'accumulation des protéines COX II. Par ailleurs, une exposition des plantes de Norstar à une concentration élevée de CO₂ (770 ppm) durant 80 heures entraîne une réduction de l'activité cytochrome c oxydase de 20% chez les plantes non acclimatées et de 50% chez les plantes acclimatées au froid. Cependant, une exposition chronique des plantes de Norstar à une concentration élevée de CO₂ entraîne une hausse de l'activité cytochrome c oxydase de 40% chez les non acclimatées et 50% chez les acclimatées. Chez Katepwa, cette hausse est de 30% aussi bien chez les plantes acclimatées au froid que chez les plantes non acclimatées. En réponse à une concentration élevée de CO₂, la cytochrome c oxydase s'exprime de manière différentielle entre les deux variétés de blés étudiées. En conclusion, la cytochrome c oxydase est régulée par le CO₂ et le froid chez le blé et intervient probablement dans la tolérance au CO₂.

Mots clés: cytochrome c oxydase, acclimatation, CO₂, froid, *Triticum aestivum* L

CHAPITRE I

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

Dans les pays nordiques comme le Canada, le froid est un facteur climatique d'une importance particulière car il constitue un facteur limitant de la production agricole. Du point de vue économique, les effets des basses températures sont considérables. Ces basses températures limitent non seulement la production agricole mais peuvent causer aussi des dommages importants, surtout à la suite de l'arrivée précoce d'un gel. Le froid peut entraîner des pertes agricoles importantes estimées à des millions de dollars. Dans les limites de basses températures où la vie est possible, certaines plantes ont la capacité de s'acclimater au froid et au gel afin de s'adapter aux conditions défavorables. Par exemple, on distingue deux types de blé: le blé d'hiver très tolérant au froid et au gel et le blé de printemps tolérant au froid mais sensible au gel. Dans notre laboratoire, plusieurs études menées chez le blé ont démontré une corrélation entre le niveau de tolérance au froid et au gel et le niveau d'expression de certains gènes régulés par le froid.

L'augmentation de la teneur en dioxyde de carbone dans l'atmosphère ainsi que le froid pourraient affecter des processus biologiques vitaux de la plante tels que la photosynthèse et la respiration. Certaines plantes pourraient développer des mécanismes pour survivre face à cette nouvelle situation.

Le froid et le gel ainsi que les concentrations élevées de CO₂ auront un impact économique important sur la production agricole. Ils méritent donc d'être étudiés en vue de mieux comprendre leur impact sur les processus importants tels que la photosynthèse, la respiration et la synthèse protéique chez les plantes en général et les céréales en particulier. Cette approche permettra de comprendre les mécanismes moléculaires qui seront affectés par les changements liés à l'environnement. Dans ce cadre, les effets des basses températures et de l'augmentation de la concentration de CO₂ dans l'atmosphère ont fait l'objet de beaucoup d'études au cours des dernières années.

1.1 Dommages causés par le gel

La survie des plantes dans leur milieu dépend très étroitement des conditions de température. Les basses températures, et le gel en particulier, causent des dommages en agissant au niveau des structures cellulaires des plantes. Parmi les structures affectées, les membranes constituent les principaux sites de dommages (Browse et Xin, 2001). Lors d'un gel, il se forme des cristaux de glace extracellulaires. La diminution de la tension de vapeur à la surface des cristaux de glace provoque une migration de l'eau de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Ainsi, la concentration en solutés augmente dans le protoplasme entraînant un affaiblissement de la membrane plasmique (Guy, 1990). Le gel induit donc une déshydratation de la membrane plasmique qui dans certains cas perd à quelques endroits sa bicouche lipidique et par conséquent son intégrité (Guy, 1990). Le gel extracellulaire peut donc entraîner des modifications ultra-structurales de la membrane plasmique. La réponse des plantes au froid et au gel varie d'une espèce à une autre. Ainsi, on trouve des espèces tolérantes au froid et au gel; sensibles au froid et au gel; ainsi que des espèces tolérantes au froid mais sensibles au gel. Face aux basses températures et au gel, certaines plantes mettent en place des mécanismes d'adaptation. Ces mécanismes passent nécessairement par le processus d'acclimatation au froid menant à la tolérance au gel.

1.2 Réponses des plantes aux basses températures et au gel

Les plantes sont exposées de façon permanente à différents stress environnementaux, parmi lesquels les basses températures. Dans la nature, le gel est toujours précédé par le froid qui induit de nombreux changements physiologiques et biochimiques dans les cellules des espèces de plantes tolérantes au gel (Winfield *et al.*, 2010). Ces changements sont indispensables afin de permettre la survie des plantes dans des conditions difficiles. Les basses températures affectent l'absorption des nutriments, la fluidité des membranes et la conformation des acides nucléiques

(Winfield *et al.*, 2010). Plusieurs études ont démontré que les basses températures influencent aussi de façon considérable le métabolisme cellulaire, soit directement en causant une baisse de la vitesse des réactions biochimiques ou indirectement par le biais de la reprogrammation à grande échelle de l'expression des gènes (Winfield *et al.*, 2010). Certaines plantes s'adaptent par acclimatation afin de survivre et de se développer dans des conditions de stress. L'acclimatation au froid est un processus par lequel les plantes s'adaptent aux basses températures pour mieux tolérer le gel (Guy, 1990). Elle permet aux plantes acclimatées de supporter des températures plus basses que le point de congélation. L'acquisition de la tolérance optimale au gel n'est pas un phénomène instantané; elle se met en place à la suite d'une période d'exposition aux basses températures situées au dessus du point de congélation. Cette période est très variable d'une espèce à une autre. Elle est de 10 à 15 jours chez la pomme de terre, chez *Arabidopsis* et chez l'épinard, tandis qu'elle est environ de 50 jours chez le blé (Perras et Sarhan, 1984). Par ailleurs, l'acclimatation des plantes au froid est nécessairement précédée par un mécanisme important, notamment la perception du stimulus de froid.

1.2.1 La perception du stimulus de froid

L'induction des modifications liées au froid dépend essentiellement de la capacité des plantes à percevoir le signal des basses températures (Xin et Browse, 2000). Le processus de perception du signal de froid chez les plantes n'est pas encore identifié avec certitude (Penfield, 2008). Plusieurs hypothèses ont été formulées à ce sujet. Ces mécanismes de perception du signal semblent intervenir à plusieurs niveaux, en particulier au niveau des membranes, des photosystèmes et du noyau.

1.2.1.1 Au niveau de la membrane plasmique

La membrane plasmique constitue naturellement l'une des premières barrières physiques qui délimitent la cellule du milieu extracellulaire. Elle joue également un

rôle dans la perception des stimuli du milieu extérieur. Plusieurs études ont été rapportées concernant son implication dans la perception du signal de froid chez les plantes. Cette perception du froid a été reliée à l'état de la membrane lors des basses températures. En effet, il a été démontré qu'une baisse de température provoque une diminution de la fluidité membranaire alors qu'une augmentation de la température entraîne une plus grande fluidité (Ainsworth et Long, 2004 ; Alonso *et al.*, 1997). Des études ont montré que le premier événement dans la perception du signal de froid est la modification de la membrane plasmique suite à une baisse de température (Orvar *et al.*, 2000). Ces études basées sur l'induction de gènes impliqués dans la réponse au froid ont montré que l'application de composés pharmacologiques modifie la fluidité membranaire. L'alcool benzylique augmente la fluidité membranaire tandis que le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé pour rendre les membranes plus rigides. Chez *Medicago sativa*, l'utilisation de l'alcool benzylique a bloqué l'expression des gènes impliqués dans la tolérance au froid et a réduit ainsi la capacité des plantes à tolérer le froid et le gel (Orvar *et al.*, 2000). L'acclimatation au froid induit des modifications de la composition chimique des phospholipides et protéines dans la membrane plasmique. Chez le seigle, une étude a révélé une différence entre les plantes acclimatées et les plantes non-acclimatées. Les résultats ont démontré que les plantes acclimatées au froid ont une plus grande teneur en stérols et en phospholipides (Steponkus et Lynch, 1989). Chez *Brassica napus*, des études ont montré que l'acclimatation au froid modifie la composition en polysaccharides chez la variété d'hiver (Marzanna *et al.*, 1999). Après acclimatation de cette variété durant 3 semaines à 2°C, suivie d'une courte exposition au gel (-5°C durant 18h), les feuilles de la plante subissent une augmentation de la composition polysaccharidique au niveau de leurs parois cellulaires. Cette même étude a rapporté une augmentation du contenu en galactose, arabinose et en glucose dans les pectines ainsi qu'en galactose et arabinose dans les hémicelluloses. Au cours de l'acclimatation au froid, l'augmentation des polypeptides a été spécifiquement détectée dans les membranes plasmiques isolées de feuilles d'un blé d'hiver (Zhou *et al.*, 1994). Des études

réalisées chez deux cultivars de blé (Norstar et Chinese Spring) possédant des capacités différentes d'acclimatation au froid démontrent que certains changements structuraux sont associés au développement de la tolérance au gel (Zhou *et al.*, 1994). Les modifications de l'état de la membrane en fonction de la température ne sont pas les seules qui interviennent dans la perception du signal de froid. En effet, d'autres études ont montré également que l'acide abscissique (ABA) intervient dans la réponse primaire au niveau de la membrane (Hughes et Dunn 1996). L'acide abscissique est une phytohormone qui régule la croissance et le développement des plantes notamment la germination, le développement des racines, la croissance des plantules, la dormance des graines et la transition du stade végétatif au stade reproductif (Chinnusamy *et al.*, 2008). L'ABA intervient également dans la régulation liée aux stress abiotiques, en particulier le froid. Des tests chez *Arabidopsis* ont révélé une augmentation du niveau de l'ABA de 2 à 3 fois au cours de l'acclimatation au froid (Lang *et al.*, 1994). En période de basses températures, les plantes synthétisent l'acide abscissique qui est associée au processus menant à la tolérance au gel (Thomashow, 1999; Pearce, 1999; Breton *et al.*, 2000). Des études plus récentes ont démontré que l'acide abscissique a un impact important sur la tolérance au gel chez divers variétés de blé (Hou *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude rapportent que l'acide abscissique induit, à faible concentration, une plus grande tolérance au gel chez les plantes de deux variétés de blé d'hiver (Minorskaya 808 et DN1) que chez les plantes de la variété de blé de printemps (Chinese Spring). Cette «phytohormone» a possiblement un rôle à jouer dans le processus d'acclimatation au froid chez les plantes.

1.2.1.2 Au niveau des canaux à Ca^{2+}

Plusieurs études s'accordent pour démontrer que les canaux de Ca^{2+} sont impliqués dans la perception du signal de froid. Des expériences ont démontré que lors de la perception du signal de froid, on note une augmentation du gradient de potentiel électrique lié au calcium (Minorsky et Spanswick, 1989; Miroslavov et

Kravkina, 1991). D'autres études ont montré que le calcium est le second messager impliqué dans la tolérance au gel chez les plantes (Monroy et Dhindsa, 1995). Ces auteurs ont testé le rôle du Ca^{2+} dans la perception du signal de froid en utilisant une luzerne tolérante au gel, en présence de chélateurs et d'inhibiteurs de canaux calciques. Leurs résultats ont démontré que ces plantes perdent complètement la tolérance au gel en présence d'inhibiteurs calciques. L'influx de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à 4°C chez les protoplastes de luzerne est 15 fois plus élevé qu'à 25°C (Monroy et Dhindsa, 1995). Des études ont démontré que le calcium est le messager qui induit l'accumulation de l'acide abscissique lors du stress hydrique causé par le froid (Xiong *et al.*, 2002). Les résultats ont montré qu'il est possible que la perception même du stress du froid provoque un pic du calcium qui serait responsable en particulier de l'accumulation de l'acide abscissique. D'un point de vue temporelle, la signalisation du froid commence par sa perception, puis des changements de concentration en Ca^{2+} et l'accumulation de l'acide abscissique induisent des cascades de phosphorylation/déphosphorylation qui modulent l'action de facteurs de transcription pour aboutir à des changements d'expression des gènes de réponse au stress (Xiong *et al.*, 2002). Des études plus récentes ont confirmé que quel que soit le mécanisme réel de la perception du signal, l'une des premières conséquences de la détection des changements de température pourrait être l'influx du Ca^{2+} dans le cytosol (Chinnusamy et Zhu, 2006; Kaplan *et al.*, 2006a). Il semblerait que des données importantes du signal véhiculé par le Ca^{2+} soient «codées» par ce que l'on appelle «signature du calcium», et doivent être traduites par les effecteurs qui peuvent être plusieurs types de protéines, en particulier les protéines kinases calcium dépendantes: CDPK, calmodulines (Hong-Bo *et al.*, 2008)

Par ailleurs, les divers rôles de l'ABA chez les plantes suggèrent l'existence de multiples récepteurs de cette hormone ainsi que plusieurs voies de signalisation (Chinnusamy *et al.*, 2008). Cette multiplicité a été confirmée grâce à des tests utilisant des analogues de l'ABA (Huang *et al.*, 2007).

1.2.1.3 Au niveau du noyau

Récemment, il a été rapporté que la perception du signal de froid n'est pas associée seulement à la membrane plasmique et aux chloroplastes mais également au noyau. Des études menées par Kumar et Wigge (2010) chez *Arabidopsis* ont permis de comprendre la perception du signal de froid. Leurs résultats ont montré qu'une variante de protéine histone appelée H2A.Z joue un rôle clé dans la perception de la température et peut être responsable de l'expression coordonnée de nombreux gènes sensibles à la température. Ils ont suggéré que H2A.Z est présente dans la chromatine immédiatement en aval des promoteurs de gènes sensibles à la température et que cela crée une barrière physique à l'ARN polymérase II, ce qui peut affecter l'expression des gènes. Quand la température augmente, H2A.Z se retire de ces sites, permettant ainsi l'expression des gènes impliqués. Par contre, quand la température baisse, H2A.Z occupe les sites du promoteur pour empêcher la fixation des répresseurs.

Par ailleurs, les protéines kinases sont aussi connues pour leur rôle dans la perception du signal de froid (Monroy *et al.*, 1993). En effet, une étude a démontré que deux protéines kinases calcium-dépendantes (CPK4 et CPK11) régulent le signal de transduction chez *Arabidopsis* (Zhu *et al.*, 2007). Les résultats de cette étude rapportent que la perte de fonction de CPK4 et CPK11 a entraîné des phénotypes mutants qui ont perdu toute sensibilité à l'acide abscissique. Ceci a eu pour conséquence une baisse de la tolérance au stress hydrique dû au froid et à la salinité.

1.2.1.4 Au niveau des chloroplastes

Les plantes peuvent percevoir les variations dans la longueur du jour, la qualité de la lumière ainsi que l'intensité lumineuse (Winfield *et al.*, 2010). Généralement, la réduction de la longueur de la journée est associée à l'arrivée progressive de l'hiver et par conséquent aux basses températures. Les plantes utilisent la durée de la

photopériode pour la perception de la baisse de température. La lumière est d'une importance particulière parce que le processus de photosynthèse est généralement le premier à être influencé par des changements de température (Ensminger *et al.*, 2006; Kocova *et al.*, 2009). Il a été montré que la capacité des plantes à développer la résistance au gel est associée à la présence de la lumière et de l'activité photosynthétique au cours de l'acclimatation au froid (Svensson *et al.*, 2006). Une étude menée chez *Arabidopsis* par Wanner et Junttila, (1999) a démontré que le déroulement de la photosynthèse est nécessaire à l'acclimatation au froid. En effet, des plantes d'*Arabidopsis* traitées avec du dichlorophenyl-diméthyle urée (DCMU, un inhibiteur de l'activité photosystème II) ne montrent aucune acclimatation au froid. Cette incapacité d'acclimatation au froid demeure la même si les plantes sont maintenues à l'obscurité. La photosynthèse est très sensible aux changements des conditions de l'environnement car elle a besoin de maintenir un équilibre entre l'énergie absorbée par les photosystèmes I et II (PSI et PSII) et celle utilisée par les réactions métaboliques de la plante (Winfield *et al.*, 2010). La première réaction de la photosynthèse réalisée par les PSI et PSII est le piégeage de l'énergie lumineuse et sa transformation en énergie potentielle. Les réactions photochimiques des PSI et PSII sont très rapides et indépendantes de la température alors que les réactions biochimiques sont plus lentes et très sensibles à la température, et sont ralenties lorsque celle-ci baisse. Cela conduit à un découplage des deux photosystèmes et les électrons du PSI sont transférés sur l'oxygène pour donner des dérivés oxygénés comme le peroxyde d'hydrogène (Winfield *et al.*, 2010). Ces dérivés oxygénés pourraient jouer un rôle central dans la perception du signal de froid (Suzuki et Mittler, 2006). Par ailleurs, les chloroplastes utilisent la lumière comme source d'énergie et réagissent aux variations de l'intensité lumineuse en adaptant le métabolisme à l'état de la chaîne de transport d'électrons (Pfannschmidt *et al.*, 1999). L'augmentation de la pression d'excitation du PSII est l'un des premiers stimuli favorisant l'expression des gènes régulés par le froid (Gray *et al.*, 1997; N'Dong *et al.*, 2001). Les plantes ont donc la capacité d'utiliser les chloroplastes pour percevoir le

signal de baisse de température. La perception du signal de froid est suivie par un ensemble de modifications permettant aux plantes d'acquérir une tolérance afin de survivre dans des conditions difficiles. L'une des catégories de modifications les plus importantes est celle regroupant les modifications physiologiques qui englobent entre autres la conductance stomatique, l'assimilation du CO₂ et la respiration.

1.2.2 Effets de l'acclimatation au froid sur la conductance stomatique

L'ouverture ou la fermeture des stomates est sous la dépendance de plusieurs facteurs dont la température. Des études ont été menées sur les effets des basses températures sur la conductance des stomates. Les résultats de ces études ont démontré globalement que le froid réduit la conductance stomatique. Chez le blé, des expériences ont démontré une réduction de la conductance stomatique chez une variété d'hiver (Monopol) et chez une variété de printemps (Katepwa) acclimatées au froid (Savitch *et al.*, 1997). Il convient de signaler que le blé d'hiver est une catégorie de blé très tolérant au froid et au gel en comparaison au blé de printemps plus sensible au froid et au gel. Chez l'épinard, une acclimatation au froid à 10°C entraîne une légère baisse de la conductance stomatique (Martindale et Leegood, 1997). D'autres études menées chez *Poncirus trifoliata* et *Citrus unshiu* ont montré aussi la réduction de conductance stomatique en réponse à l'acclimatation au froid (Dansereau, 2007). Une étude plus récente a montré que lors de l'acclimatation du blé au froid la conductance stomatique a diminué de 55% chez Norstar et de 30% chez Katepwa (K. Dahal, communication personnelle). Les résultats de cette même étude effectuée chez le seigle ont montré que la conductance stomatique a diminué de 65% chez la variété d'hiver (Musqueteer) et de 40% chez la variété de printemps (SR4A). Lors de l'acclimatation au froid, la conductance stomatique est réduite mais pas forcément l'assimilation du carbone car chez certaines espèces on a enregistré une augmentation de la biomasse en réponse au froid.

1.2.3 Effets de l'acclimatation au froid sur l'assimilation du CO₂

La fixation du CO₂ et l'incorporation du carbone dans les composés organiques dépendent, entre autres, des conditions de température. Ainsi, les plantes acclimatées au froid et les plantes témoins non-acclimatées présentent parfois des différences notables en matière d'assimilation du CO₂. Plusieurs études ont été menées sur les effets des basses températures sur l'assimilation du carbone (Strand *et al.*, 1997; Martindale et Leegood, 1997; Savitch *et al.*, 1997). Ces effets sont fondamentalement ressentis en premier lieu sur l'activité des enzymes. Des études ont montré qu'une exposition des plantes de blé de printemps au froid de courte durée (12 heures) réduit l'assimilation du CO₂ de 50% à 60%, tandis que la variété d'hiver acclimatée ajuste son assimilation du CO₂ au même niveau que les plantes contrôles (Savitch *et al.*, 1997). Lors de l'acclimatation au froid, l'activité de la ribulose biphosphate carboxylase-oxygénase (Rubisco) augmente. Cette enzyme est responsable de la fixation du CO₂ chez les plantes C₃ au cours de la photosynthèse. En effet, les études menées sur le blé d'hiver et de printemps ont montré une augmentation de 15% de l'activité de la Rubisco et de 43% des protéines de la Rubisco chez les deux variétés acclimatées au froid durant 12 heures (Savitch *et al.*, 1997). L'assimilation du CO₂ a été également étudiée chez l'épinard dans une atmosphère où la concentration du CO₂ est maintenue à 5% (en comparaison à l'atmosphère normale où la concentration de CO₂ est de 0,038%) (Martindale et Leegood, 1997). Les résultats ont montré que le taux d'assimilation du CO₂ est nettement plus élevé chez les feuilles de plantes d'épinards acclimatées à 10°C en comparaison aux feuilles de plantes non-acclimatées (25°C). Dans leur expérience, l'assimilation a été également étudiée en fonction de la concentration intracellulaire de CO₂. Les résultats ont montré que l'acclimatation au froid induit une augmentation de 50% de la capacité d'assimilation du CO₂ pour des concentrations intracellulaires supérieures à 200 ppm. D'autres études ont rapporté que lorsqu'une plante C₃ cultivée à la température de 23°C subit brusquement une baisse de température (5°C), la

diminution de la photosynthèse s'accompagne à la fois d'une inhibition d'activité des enzymes participant au cycle photosynthétique de réduction du carbone (CPRC) et d'un ralentissement de la synthèse de saccharose (Cornic *et al.*, 1999). Lorsqu'*Arabidopsis* est cultivé à 23°C puis placé à 5°C, la photosynthèse est rapidement inhibée de 75% (Strand *et al.*, 1997). Parallèlement, il y a une réduction des activités de quelques enzymes du CPRC (exemples : la Rubisco, la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, les aldolases, la phosphoribulokinase) et de la voie de synthèse du saccharose (saccharose-phosphate synthétase: SPS et fructose-1,6-bisphosphatase cytosolique: F-2,6-BPase). Cette étude a démontré que l'acclimatation d'*Arabidopsis* à 5°C pendant 10 jours entraîne chez les jeunes feuilles développées au froid une forte augmentation de la photosynthèse et de l'activité des enzymes du CPRC par rapport au moment du passage au froid : 10 fois pour la SPS, 6 fois pour la F-2,6-BPase cytosolique, et de 2 à 3 fois pour les enzymes du CPRC. D'autres études portant sur les effets de l'acclimatation au froid sur l'assimilation du carbone ont été réalisées chez le chou (Sasaki *et al.*, 2001). Les résultats ont démontré une augmentation de la teneur en saccharose, en glucose et en fructose au niveau des feuilles en réponse à une acclimatation au froid durant 7 jours. L'acclimatation des plantes pourrait orienter le métabolisme du carbone vers la synthèse de composés particuliers. En effet, des expériences sur le blé ont montré l'accumulation de composés phénoliques solubles, notamment les flavonoïdes, dans les feuilles au cours de l'acclimatation au froid (Zagoskina *et al.*, 2005). Cette accumulation peut être considérée comme l'une des nombreuses réponses cellulaires d'adaptation aux stress dus au froid. Ils pourraient servir d'antioxydants endogènes nécessaires à la survie de la plante lors des conditions défavorables (Zagoskina *et al.*, 2005). Au cours de l'acclimatation au froid, les plantes subissent donc diverses modifications qui vont leur permettre de mieux tolérer le gel pour assurer leur survie durant l'hiver. Il convient de noter qu'après l'hiver, les plantes perdent leur capacité de tolérance au froid et au gel pour continuer leur croissance normale. On parle alors de dé-acclimatation au froid, un processus beaucoup plus rapide que l'acclimatation.

1.2.4 La synthèse d'osmoprotectants en réponse aux basses températures

Durant l'acclimatation, les modifications physiologiques sont associées aussi à des modifications métaboliques notamment la synthèse de divers osmoprotectants. Les osmoprotectants sont des substances hautement solubles, sans charge nette. Ces composés permettent aux plantes et aux autres organismes qui les renferment de s'adapter à des conditions environnementales hostiles. Comme leur nom l'indique, ils contribuent au maintien de la pression osmotique indispensable à la vie des cellules. On en distingue deux principaux groupes: ceux qui dérivent des sucres et ceux qui dérivent des acides aminés.

1.2.4.1 Les sucres

Durant l'acclimatation au froid, les plantes doivent nécessairement maintenir leur pression osmotique à un niveau compatible avec leur vie. On attribue plusieurs rôles aux sucres osmoprotectants. Ils participent à la stabilisation des membranes et des protéines suite à une déshydratation causée par les basses températures et la sécheresse (Guy, 1990). En effet, lorsque les conditions sont défavorables suite à une baisse de la température, ils abaissent le potentiel osmotique du cytoplasme et stabilisent les membranes en produisant des interactions avec les groupements polaires des phospholipides (McNeil *et al.*, 1999). Plusieurs expériences ont été menées pour démontrer l'accumulation des sucres au cours de l'acclimatation au froid. Ainsi l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des osmoprotectants a été observée chez la luzerne au cours de l'acclimatation au froid (Cardoso *et al.*, 2004). Des études menées chez l'avoine et le seigle ont confirmé le rôle important des sucres dans la tolérance au gel (Livingston *et al.*, 2006) et l'accumulation des sucres tels que le tréhalose, raffinose et le saccharose a été corrélée avec l'amélioration de la tolérance au gel (Kaplan *et al.*, 2006b). Des expériences récentes ont démontré également une augmentation significative de la

galactitol-synthase, la première enzyme de la voie de synthèse du raffinose (Winfield *et al.*, 2010).

1.2.4.2 Les dérivés des acides aminés

D'autres osmoprotectants, dérivant des acides aminés, sont également connus pour leur rôle dans la tolérance au froid et au gel. Il s'agit principalement de la bétaine et de la proline. Chez les plantes supérieures, la bétaine est synthétisée à partir de la choline par l'intermédiaire de la bétaine aldéhyde. Les deux étapes de la biosynthèse de la bétaine sont catalysées respectivement par la choline monooxygénase et la bétaine aldéhyde déshydrogénase (Rhodes et Hanson, 1993). Plusieurs études ont été menées pour démontrer l'implication et le rôle de la bétaine au cours de l'acclimatation au froid. La bétaine est une substance remarquable en terme de tolérance au froid et au gel. Des études menées sur la cryoprotection ont montré que la bétaine peut protéger les liposomes, les bactéries et les tissus des plantes pendant la congélation (Lloyd *et al.*, 1994). Les cyanobactéries exprimant le gène *codA* (gène de choline oxydase isolé chez *Escherichia coli*) sont résistantes à la photoinhibition causée par les basses températures (Deshnium *et al.*, 1997). Des études similaires ont été également menées chez le riz. En effet, des plantes de riz transgéniques exprimant le gène *codA* ont accumulé la bétaine et développé une tolérance accrue au froid et à la salinité (Sakamoto *et al.*, 1998). Chez le blé acclimaté ou non, l'application exogène de la bétaine peut augmenter la tolérance au gel de 5°C (Ainsworth et Long, 2004 ; Allard *et al.*, 1998).

La proline est également un composé associé à la tolérance au gel. Elle s'accumule au cours de l'acclimatation au froid et peut agir pour stabiliser les membranes cellulaires contre la déshydratation (Winfield *et al.*, 2010). Des études récentes ont montré que le contenu en proline chez deux variétés de blé d'hiver (Minorovskaya 808 et DN1) acclimatées au froid est nettement supérieur à celui de la variété de blé de printemps Chinese Spring (Hou *et al.*, 2010) acclimatée dans les mêmes conditions.

1.2.5 Les modifications génétiques liées à l'acclimatation au froid

En plus des modifications physiologiques et métaboliques, l'acclimatation au froid induit également des modifications moléculaires notamment au niveau génétique. Plusieurs études ont confirmé une relation entre l'acquisition de la tolérance au gel et l'induction de certains gènes (Hou *et al.*, 2010; Danyluk *et al.*, 1994; Badawi *et al.*, 2008). Une corrélation positive existe entre le niveau d'expression de gènes *CORs* (Cold Regulated) et le niveau de tolérance au gel (Knight *et al.*, 1999; Thomashow, 1999; Grossi *et al.*, 1998; Vagujfalvi *et al.*, 2003; Vagujfalvi *et al.*, 1999). Par exemple, la surexpression des protéines WCS19 (wheat cold specific) du blé chez *Arabidopsis* améliore la tolérance au gel chez des feuilles acclimatées au froid (N'Dong *et al.*, 2002). Parmi ces gènes *CORs* exprimés, on note aussi les gènes de la famille WCS120, WCOR410 (wheat cold regulated) et WCOR518 qui sont corrélés positivement avec la capacité des espèces à développer la tolérance au gel. Les membres de la famille de protéines WCS120 semblent jouer un rôle important dans la tolérance au gel en raison de leur plus forte induction chez les plantes de blé d'hiver que chez celles de blé de printemps (Vitamvas et Prasil 2008; Vitamvas *et al.*, 2007). En effet, il a été suggéré que les protéines WCS120 pourraient servir de marqueurs moléculaires de l'acclimatation au froid. Cette famille de gènes est spécifique aux *Poaceae* (Sarhan *et al.*, 1997). Ils codent pour un groupe de protéines très abondantes dont le poids moléculaire (PM) varie de 12 à 200 kDa; Parmi celles-ci, on note les cinq membres principaux, WCS200 (200 kDa), WCS180 (180 kDa), WCS66 (66 kDa), WCS120 (50 kDa) et WCS40 (40 kDa). La protéine WCOR410 améliore grandement la tolérance au gel des feuilles de fraisiers transgéniques (Houde *et al.*, 2004). Parmi les gènes *CORs*, beaucoup codent pour des protéines de structure qui sont directement impliquées dans la protection des plantes contre le stress (par exemple, les protéines chaperones, les osmoprotectants, des protéines de liaison), tandis que d'autres sont des gènes de régulation codant par

exemple pour des protéines kinases, des facteurs de transcription et des enzymes impliquées dans la synthèse des hormones végétales (Winfield *et al.*, 2010).

Les produits des gènes *CORs* sont jugés nécessaires pour la protection des plantes contre le gel (Thomashow, 1999). Par ailleurs, l'expression des gènes *CORs* est très étroitement associée aux gènes *CBFs* (C-repeat Binding Factors) qui ont été identifiés et subdivisés en dix groupes différents (Badawi *et al.*, 2008). En effet, les *CBFs* régulent l'expression des gènes *CORs*. Plusieurs *CBFs* ont été amplifiés chez les *Pooideae* et sont exprimés chez un cultivar tolérant le gel (Badawi *et al.*, 2008). Cette régulation est différentielle entre le blé d'hiver et le blé de printemps. Les transcrits codants pour les *CBFs* augmentent corrélativement avec le niveau d'expression des gènes *CORs* nécessaires pour l'acclimatation du blé (Badawi *et al.*, 2008). La caractéristique la plus commune de l'acclimatation au froid est l'induction rapide des gènes codant des activateurs de la transcription appartenant à la famille des *CBFs* (Jaglo *et al.*, 2001; Thomashow *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, ces gènes sont nommés *CBF1*, *CBF2* et *CBF3*. Le rôle des gènes de *CBFs* dans l'amélioration de la tolérance au gel a été établi grâce à des expériences de surexpression de ces gènes. L'expression constitutive des gènes *CBFs* chez *Arabidopsis* entraîne l'induction de l'expression des gènes *CORs* et une augmentation de la tolérance au gel (Jaglo *et al.*, 1998; Gilmour *et al.*, 2000). Les changements biochimiques multiples qui sont associés à l'acclimatation au froid et qui pourraient augmenter la tolérance au gel se produisent chez les plantes transgéniques non-acclimatées d'*Arabidopsis* exprimant constitutivement *CBF3* (Gilmour *et al.*, 2000). Ainsi, les gènes *CBFs* peuvent agir pour intégrer l'activation des multiples composants de la réponse d'acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000). L'ensemble forme alors ce qu'on appelle le régulon *CBF*. Même les espèces végétales qui subissent des dommages lors des basses températures et qui sont totalement incapables de tolérer le gel, comme la tomate, le maïs et le riz, possèdent également des composants de *CBF* associés à la voie de réponse au froid (Jaglo *et al.*, 2001; Nakashima et Yamaguchi-Shinozaki, 2006). Le froid excessif et le

gel peuvent aussi conduire à un stress osmotique (Winfield *et al.*, 2010). L'induction et l'accumulation de déhydrines (famille dont font partie les protéines WCS120) prennent une part importante dans l'acclimatation au froid des cultivars de céréales d'hiver (Stupnikova *et al.*, 2004; Borovskii *et al.*, 2005). Les déhydrines peuvent agir soit comme des émulsifiants ou des chaperones dans les cellules en protégeant les protéines et les membranes contre des modifications structurales défavorables causées par la déshydratation (Stupnikova *et al.*, 2004; Borovskii *et al.*, 2005). Il a été démontré que ces déhydrines sont liées aux membranes mitochondriales. Cette liaison est dépendante de la saison: pendant l'hiver elles s'accumulent alors que pendant le printemps, elles diminuent (Borovskii *et al.*, 2005). Des expériences récentes ont montré une forte induction de certaines déhydrines (jusqu'à 40 fois) dans les feuilles de deux variétés de blé d'hiver (Harnesk et Solstice) au cours de l'acclimatation au froid (Winfield *et al.*, 2010).

1.3 Réponse des plantes à des concentrations élevées de CO₂

La concentration de CO₂ dans l'atmosphère ne cesse d'augmenter et pourrait atteindre le double de la concentration actuelle durant ce siècle (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2001). Selon cet organisme, la concentration de CO₂ a augmenté d'environ 280 à 390 ppm dans l'atmosphère depuis 1850 et atteindront entre 530 et 970 ppm au courant du 21^e siècle. Plusieurs études portant sur les impacts physiologiques et morphologiques des concentrations élevées de CO₂ ont été menées chez plusieurs espèces de plantes. Certaines de ces études ont montré que l'augmentation du CO₂ atmosphérique pourrait donner des effets bénéfiques importants pour les plantes en améliorant l'assimilation du CO₂ (Fukayama *et al.*, 2009). Les plantes pourraient atténuer cette augmentation par conversion photosynthétique du CO₂ en glucides et autres composés organiques (Bloom *et al.*, 2010). Cependant, ce potentiel d'atténuation demeure incertain et la réponse des plantes à ces concentrations varie largement d'une espèce à une autre (Bloom *et al.*,

2010). Les concentrations élevées de CO₂ vont affecter plusieurs mécanismes physiologiques des plantes.

1.3.1 Effets des concentrations élevées de CO₂ sur la tolérance au gel

Dans les pays tempérés comme le Canada, les plantes survivent pendant les périodes de froid et de gel intenses. Les mécanismes mis en place par ces plantes en réponse au froid et au gel ne seront probablement pas les mêmes dans des conditions de concentrations élevées de CO₂. Les résultats des études sur les effets du CO₂ sur les plantes sont très contrastés. En effet, les concentrations élevées de CO₂ causent des dommages importants chez les feuilles d'*Eucalyptus pauciflora* (Barker *et al.*, 2005) et chez *Ginkgo biloba* (Terry *et al.*, 2000). Par contre, ces concentrations permettent une augmentation de la résistance au gel chez *Betula allaghanaensis* (Wayne *et al.*, 1998) mais n'ont aucun effet sur la tolérance au gel chez *Picea abies* (Dalen *et al.*, 2001). D'autres expériences ont été menées sur les effets des concentrations élevées de CO₂ sur la tolérance au gel chez *Medicago sativa* (Bertrand *et al.*, 2007). Au cours de cette étude, des plantes ont été poussées sous des concentrations élevées de CO₂ (800 ± 30 ppm) et exposées en même temps à de basses températures pour les acclimater au froid. Par la suite, la tolérance des plantes a été testée pour des températures comprises entre -2°C et -18°C. Les résultats ont montré que les plantes cultivées et acclimatées au froid sous des concentrations élevées de CO₂ étaient significativement moins tolérantes au gel que celles acclimatées dans les conditions de CO₂ ambiant. Par ailleurs, ces expériences ont démontré que dans des conditions identiques de CO₂, les plantes inoculées avec la souche de *Rhizobium* A2 (une souche de bactérie adaptée à survivre au gel) tolèrent beaucoup plus le gel que celles inoculées avec la souche NRG34 (une autre souche de bactérie adaptée à la formation de nodules fixateurs d'azote à basse température). Ces études montrent donc globalement que les concentrations élevées de CO₂ altèrent la tolérance au gel chez *Medicago sativa*.

Les concentrations élevées de CO₂ ont également des effets sur d'autres mécanismes physiologiques, notamment sur la conductance stomatique.

1.3.2. Effets des concentrations élevées de CO₂ sur la conductance stomatique

Le CO₂ est absorbé par les stomates des feuilles avant d'être réduit et fixé par la photosynthèse. Sa pénétration dans les feuilles des plantes dépend certainement de sa concentration atmosphérique. Plusieurs études ont été consacrées à l'effet des concentrations élevées de CO₂ sur la conductance stomatique. Les résultats obtenus à ce sujet varient en fonction des espèces étudiées. Chez la patate douce, des études ont montré que les concentrations élevées de CO₂ n'ont pas un effet significatif sur la conductance stomatique (Mortley *et al.*, 1996). Chez le soja et la pomme de terre, les concentrations de CO₂ de 10000 ppm augmentent la conductance stomatique (Wheeler *et al.*, 1999). Cette même étude a été menée par les mêmes auteurs chez le blé. Les résultats rapportent que la conductance stomatique est plus élevée à des concentrations de CO₂ de 400 ppm qu'à celles variant de 1000 à 10000 ppm. Les concentrations très élevées diminuent donc la conductance stomatique chez le blé (Wheeler *et al.*, 1999). D'autres études étendues à plusieurs autres espèces ont abouti aux mêmes résultats. La conductance stomatique a diminué en moyenne de 20% chez les plantes C₃ cultivées en concentration élevée de CO₂ en air libre (free-air CO₂ enrichment [FACE]) (Long *et al.*, 2004). Cette étude englobait plus de 200 mesures indépendantes concernant 28 espèces cultivées (dont le blé) en présence de concentrations élevées de CO₂. Chez *Arabidopsis*, une concentration élevée de CO₂ en air libre (FACE) entraîne une réduction de la conductance stomatique de 22% sans modification majeure au niveau de la densité des stomates (Ainstworth et Rogers, 2007b). Des études plus récentes ont rapporté qu'une exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ de courte durée réduit la conductance stomatique de 40 à 50% (K. Dahal, communication personnelle) chez Norstar, une variété de blé d'hiver et chez Katepwa, une variété de blé de printemps, sans acclimatation au froid. Par

contre, chez les mêmes variétés acclimatées au froid, une concentration élevée de CO₂ n'induit qu'un changement minime dans la conductance stomatique. L'augmentation de la capacité photosynthétique associée à l'élévation du CO₂ n'est donc pas attribuable à une augmentation de la conductance stomatique.

En général, les données montrent que les concentrations élevées de CO₂ entraînent une réduction de la conductance stomatique chez la plupart des plantes.

1.3.3 Effets des concentrations élevées de CO₂ sur les enzymes

Les enzymes sont des biocatalyseurs dont le fonctionnement exige des conditions spécifiques très précises. Les variations qui affectent l'environnement pourraient avoir des effets significatifs sur leur fonctionnement. Plusieurs enzymes sont impliquées dans la fixation du carbone dans les molécules organiques alors que d'autres interviennent dans le transport des électrons. Certaines d'entre elles peuvent être influencées ou régulées par le CO₂. Des études menées à ce sujet ont démontré que les concentrations élevées de CO₂ peuvent avoir des effets sur la chaîne de transport des électrons au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (González-Meler, 1995; Drake *et al.*, 1997). Les résultats de ces études ont montré une diminution de l'activité des enzymes de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons chez *Dianthus caryophyllus* et chez le soja (González-Meler, 1995; Hughes et Dunn et 1996; Drake *et al.* 1997; Reuveni et Gale, 1995). Des expériences ont également démontré qu'une concentration élevée de CO₂ a un effet sur l'activité de la Rubisco. Les résultats de ces expériences ont rapporté qu'une concentration de CO₂ de 700 ppm entraînerait une augmentation d'activité de la Rubisco et du contenu en Ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) respectivement de 63% et de 18% chez le tabac (Bernacchi *et al.*, 2003). L'augmentation de la concentration de CO₂ pourrait donc entraîner une hausse de la photosynthèse. L'augmentation de la teneur en CO₂ affecte l'expression de certains gènes. En effet, chez le riz, des études ont démontré qu'en concentration élevée de CO₂, les enzymes impliquées dans la fixation du carbone comme la Rubisco sont régulées à la baisse alors que celles

impliquées dans la régénération du RuBP (fructose biphosphate phosphatase, fructose biphosphate aldolase, phosphoribulokinase) et dans la synthèse d'amidon (ADP-glucose pyrophosphorylase) au niveau des chloroplastes sont régulées à la hausse par le CO₂ (Fukayama *et al.*, 2009).

Les effets des concentrations élevées de CO₂ sur les enzymes ont une répercussion sur la production de matières organiques au cours de la photosynthèse.

1.3.4 Effet des concentrations élevées de CO₂ sur la biomasse

L'augmentation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère pourrait contribuer à une amélioration de la production de matières organiques par les plantes. En prédiction de cette augmentation, plusieurs études ont été menées sur les impacts des concentrations élevées de CO₂ sur les mécanismes physiologiques des plantes. Ces études ont montré que la photosynthèse augmente généralement en atmosphère enrichie en CO₂ et que cela stimule la croissance et la productivité chez la plupart des plantes C₃ (Ainsworth et Long, 2004; Fukayama *et al.*, 2009). Rappelons que chez les plantes C₃, la fixation du CO₂ s'effectue sur le RuBP et que cette réaction est catalysée par la Rubisco pour donner deux molécules d'un composé à 3 atomes de carbone (acide 3-phosphoglycérique, APG). Une grande majorité des plantes y compris le blé fonctionnent selon ce mécanisme de fixation du CO₂. En réponse à une concentration élevée de CO₂, les plantes augmentent généralement leur teneur en sucres solubles (Drake *et al.*, 1997; Roland *et al.*, 2006). Chez le bouleau, la croissance des plantes a été étudiée en fonction de la teneur en CO₂ et de la température (Wayne *et al.*, 1998). Les résultats de cette étude ont montré que pour de faibles teneurs en CO₂ (400 ppm), une augmentation de la température de 5°C (de 26°C à 31°C) entraîne une réduction de la croissance des plantules de 73%. Par contre, pour des teneurs élevées de CO₂ (800 ppm) la même élévation de température entraîne seulement une réduction de la biomasse de 43%. Chez le blé et la pomme de terre, des concentrations de CO₂ de 1000 et 10000 ppm ont entraîné une augmentation de la

biomasse (Wheeler *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, les concentrations élevées de CO₂ en air libre (FACE) augmentent la photosynthèse d'environ 31% (Ainstworth et Rogers, 2007a). D'autres études menées sur la croissance de *Medicago sativa* confirment que les concentrations élevées de CO₂ stimulent la production de matières organiques chez les légumineuses fixatrices d'azote (Bertrand *et al.*, 2007). Cette étude a démontré aussi qu'une concentration élevée de CO₂ peut non seulement augmenter la teneur en sucres totaux non structurels mais aussi réduit les réserves en azote. Chez le riz, des études plus récentes ont montré que les concentrations élevées de CO₂ induisent une augmentation de la biomasse avec des modifications morphologiques notamment une augmentation du diamètre de la tige, de la ramification et du nombre de feuilles (Fukayama *et al.*, 2009).

1.3.5 Effets des concentrations élevées de CO₂ sur l'assimilation de l'azote

Les synthèses des matières organiques azotées par les plantes exigent l'absorption de l'azote disponible sous diverses sources (NH₃, N₂ et NO₃⁻) selon les organismes. Au cours de cette synthèse, l'azote gazeux (N₂) et le NO₃⁻ sont réduits en ammoniac (NH₃) qui sera incorporé dans les composés organiques azotés. L'assimilation de l'azote pourrait être influencée par les concentrations élevées de CO₂ dans l'atmosphère. Les études les plus récentes ont démontré que les concentrations élevées de CO₂ ou les concentrations basses d'oxygène inhibent l'assimilation de l'azote chez *Arabidopsis* et chez le blé (Bloom *et al.*, 2010). En utilisant cinq méthodes différentes, ces auteurs sont arrivés à la même conclusion qu'une concentration élevée de CO₂ et les concentrations basses d'oxygène inhibent la synthèse des composés organiques azotés. Des études réalisées par la même équipe avaient montré que les concentrations élevées de CO₂ ne stimulent pas les plantes de blé recevant les nitrates de la même façon que celles recevant de l'ammoniac. Le mécanisme physiologique qui pourrait expliquer la relation entre les concentrations élevées de CO₂ ou les concentrations basses d'oxygène et l'assimilation des nitrates

implique la conversion des nitrates en nitrites dans le cytoplasme des cellules du mésophile (Bloom *et al.*, 2010); l'inhibition de l'assimilation des nitrates est donc due à une inhibition de la nitrate réductase. Notons que les concentrations élevées de CO₂ affectent même la composition organique de certains organes de la plante. En effet, la principale source d'approvisionnement des plantes en azote disponible se trouve dans la plupart des environnements sous forme de NO₃⁻; par conséquent, une baisse de l'assimilation de l'azote, suite à des concentrations élevées de CO₂, entraînerait une baisse de production d'azote organique (Bloom *et al.*, 2010). Ceci peut expliquer la baisse de 7,4% à 11% en protéines des graines de blé (Högy *et al.*, 2009) et la diminution de 20% de la teneur en protéines totales chez *Arabidopsis* observées sous des concentrations élevées de CO₂ (Bloom *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006). L'utilisation des nitrates ou de l'ammoniac par des plantes varie en fonction des saisons, de l'année, des lieux et des espèces et cette dépendance en nitrates pourrait expliquer la variation observée dans l'acclimatation des plantes au CO₂ dans des conditions de concentrations élevées de CO₂ (Stott et Kettleborough, 2002). Les effets des concentrations élevées de CO₂ sur les plantes dépendent étroitement des formes de sources d'azote présentes dans les milieux environnants (Bloom *et al.*, 2010). Des études ont montré que la productivité primaire nette diminue en présence d'une concentration élevée de CO₂ dans une prairie de la Californie où les nitrates constituent la principale source d'azote (Dukes *et al.*, 2005). Cette diminution est probablement due à l'inhibition de l'assimilation des nitrates qui sont indispensables dans la synthèse des composés organiques. En revanche, dans la baie de Chesapeake, qui est un écosystème dont le NH₄⁺ est prédominant, *Scirpus olneyi* a montré peu d'acclimatation au CO₂ (Dukes *et al.*, 2005). Même après une décennie de traitement à une concentration élevée de CO₂, la photosynthèse et la croissance de cette espèce sont restées environ 35% plus élevées sans modification du contenu en azote (Rasse *et al.*, 2005) Il convient de signaler que les concentrations élevées de CO₂ ou les concentrations basses d'oxygène correspondent à des conditions qui diminuent la

photorespiration (Bloom *et al.*, 2010) et par conséquent pourraient augmenter la photosynthèse.

1.4 La photosynthèse et la photorespiration chez les plantes

Les teneurs élevées de CO₂ dans l'atmosphère peuvent également affecter la respiration, un processus essentiel à la croissance et au maintien des cellules végétales. La fixation du carbone par les plantes dépend très étroitement des concentrations de CO₂ et de l'oxygène dans le milieu. Dans les conditions normales la Rubisco fonctionne en carboxylase et en oxygénase. Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'un dégagement de CO₂ survient en présence de la lumière, en particulier chez les plantes C₃. Il s'agit de la photorespiration qui est une voie biochimique par laquelle la Rubisco catalyse l'oxydation du RuBP plutôt que la réaction de carboxylation du RuBP (Bloom *et al.*, 2010). On estime que chez les plantes C₃, la photorespiration diminue l'efficacité de la photosynthèse (Drake *et al.*, 1997). Cependant, elle joue un rôle très important. On admet qu'elle participe à la photoprotection des végétaux en protégeant l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition (Han et Mukai, 1999). Elle permet le fonctionnement des réactions de transferts d'électrons et d'éviter les processus de photoinhibition lorsque les plantes sont soumises à une haute intensité lumineuse. Dans ce cas, les réactions d'assimilation du CO₂ se déroulent à vitesse maximale, la chaîne de transport d'électrons est saturée et l'excès de lumière absorbée par les photosystèmes produit une surexcitation des molécules de chlorophylle avec le risque de production de formes actives de l'oxygène (exemple : H₂O₂), néfastes pour le chloroplaste et la cellule (Han et Mukai, 1999). Dans ce cas, on peut noter un blocage du transport des électrons au niveau des chloroplastes. La photorespiration participe justement au déblocage de la chaîne de transporteurs d'électrons en libérant les formes actives de l'oxygène. De plus en consommant de l'oxygène, la photorespiration protège les cellules contre la photoinhibition. Elle contribue à la consommation de l'excès d'énergie sous forme d'ATP et de NADPH.

Elle joue également un rôle important dans la synthèse de certains acides aminés comme la sérine. Chez les plantes de type C_4 (par exemple la canne à sucre et le maïs), on trouve au niveau des feuilles deux types de cellules, mésophylliennes et périvasculaires, avec deux équipements enzymatiques différents, impliqués dans la carboxylation. L'accepteur primaire du CO_2 dans le mésophylle est le phosphoénolpyruvate (PEP). L'enzyme permettant cette fixation est la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCase) avec la formation de l'oxaloacétate qui est une molécule à 4 atomes de carbone, immédiatement réduit en acide malique. Cet acide est transporté dans les cellules de la gaine périvasculaire qui contiennent la Rubisco. L'acide malique est ensuite décarboxylé en CO_2 et en pyruvate. Le CO_2 entre dans le cycle de Calvin comme chez les plantes C_3 . Il s'ensuit une série de réactions qui conduisent à la libération du CO_2 au niveau des cellules périvasculaires et la régénération du PEP. Le CO_2 libéré est piégé par la PEPCase au niveau des cellules mésophylliennes avant sa sortie. Il est alors réincorporé dans le cycle de Calvin. Les plantes C_4 possèdent un meilleur rendement énergétique que les plantes dites C_3 car elles ont une photorespiration très faible. La photorespiration fait intervenir trois compartiments cellulaires : le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie (Fig. 1).

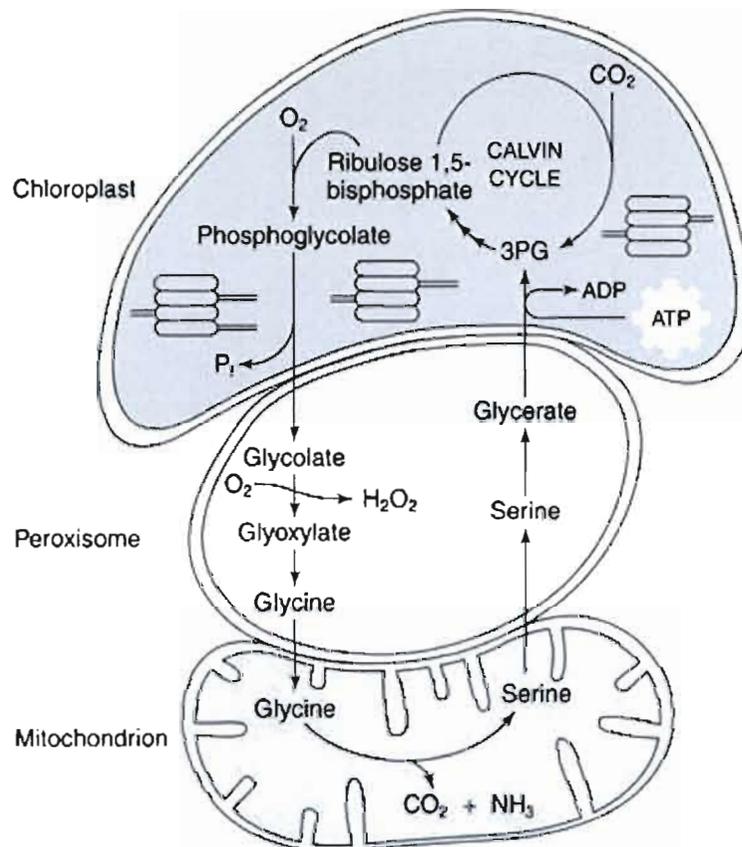


Figure 1.1: La photorespiration. (Cette figure a été tirée du site [<http://www.cliffsnotes.com>]) (Mai, 2011). Ce métabolisme implique trois compartiments cellulaires, le chloroplaste, le peroxyosome et la mitochondrie, et de nombreux échanges de métabolites entre ces compartiments.

En outre, les plantes possèdent des mitochondries qui constituent le siège de la respiration et de la phosphorylation oxydative. Les métabolites utilisés au cours de ce processus proviennent de la photosynthèse. Ce processus est responsable de l'émission de CO_2 indépendante de la lumière. La respiration mitochondriale représente une perte importante pour la photosynthèse journalière. Ce mécanisme responsable de la production énergétique est indispensable aux organismes vivants. Il comporte une série de réactions biochimiques dont la finalité est de produire des

intermédiaires énergétiques qui serviront à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire mitochondriale. La respiration chez les plantes dépend très étroitement des conditions du milieu extérieur notamment les concentrations de dioxyde de carbone. Des études ont démontré que les concentrations élevées de CO₂ ont un effet sur la photorespiration et par conséquent sur la photosynthèse (Long *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 2010). L'augmentation de la teneur en CO₂ inhibe de façon compétitive la réaction d'oxygénation qui produit du glycolate nécessaire à la photorespiration (Long *et al.*, 2004). Cet effet particulièrement important augmente l'efficacité nette de la photosynthèse en réduisant la perte de CO₂ due à la photorespiration. Des études récentes ont rapporté que les concentrations élevées de CO₂ ou les concentrations basses en oxygène améliorent la photosynthèse et la croissance chez la plupart des plantes C₃ (Bloom *et al.*, 2010). L'amélioration de la photosynthèse dans les conditions de concentration élevée de CO₂ pourrait augmenter la capacité nette d'absorption des écosystèmes de 3 à 4 Gt de carbone par an (Drake, 1999). Les concentrations élevées de CO₂ dans l'atmosphère pourraient avoir divers effets sur le fonctionnement des mécanismes importants des plantes tels que la photosynthèse et la respiration.

1.5 La cytochrome c oxydase: rôle et fonction

La cytochrome c oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire de transport d'électrons dans la mitochondrie (Hinkle *et al.*, 1991). Elle catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau couplée à une translocation vectorielle de protons dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La cytochrome c oxydase permet d'approvisionner le gradient de protons indispensable à la synthèse d'ATP lors de la phase suivante de la chaîne respiratoire, assurée par le complexe V, l'ATP synthase (Hinkle *et al.*, 1991). Elle collecte les électrons du cytochrome c et les transfère sur l'oxygène pour donner de l'eau. Le transfert d'électrons le long de la membrane interne est assuré par quatre complexes numérotés I à IV (Fig. 2). Ces

complexes sont composés de protomères protéiques qui se réduisent et s'oxydent alternativement. Le complexe I, la NADH-ubiquinone réductase, aussi appelé NADH-déshydrogénase catalyse le transfert de deux électrons du NADH au Coenzyme Q. Il catalyse la réduction de Q en QH₂ (Cross *et al.*, 1984). Le complexe II, la succinate réductase, aussi appelé succinate déshydrogénase, accepte les électrons du succinate. Comme le complexe I, il catalyse la réduction du Q en QH₂. Le complexe II n'intervient pas dans la concentration de protons mais intervient comme fournisseur auxiliaire de la chaîne respiratoire. Q est un transporteur liposoluble capable d'accepter des électrons du complexe I ou II et de les céder au complexe III (Cross *et al.*, 1984). Le complexe III, l'ubiquinol-cytochrome c réductase, cède les électrons au cytochrome c, petite protéine de la membrane interne qui amène les électrons au complexe IV. Le complexe IV est appelé cytochrome c oxydase. Le complexe V correspond à l'ATP synthase qui utilise l'énergie potentielle du gradient électrochimique de protons à travers la membrane mitochondriale interne pour synthétiser de l'ATP. Lorsque la demande en ATP de la cellule est élevée, le rapport entre l'ADP et ATP augmente et le complexe de l'ATP synthase est stimulé. Cela augmente le flux de protons dans la matrice qui sera compensée par une plus grande activité des complexes I, II, III et IV (van Dongen *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la particularité de la mitochondrie végétale est la présence de l'alternative oxydative (AOX), une protéine ancrée dans la membrane mitochondriale interne. L'AOX est fondamentalement reconnue pour son rôle d'amortisseur de fluctuations des voies respiratoires qui conduiraient au stress oxydatif (Rasmusson *et al.*, 2009). En effet, elle oxyde rapidement les substrats lorsque le niveau d'ATP est élevé et réduit la production de radicaux libres (Juszczuk et Rychter, 2003). Dans les conditions normales, l'AOX est faiblement accumulée dans les mitochondries des végétaux mais son expression augmente en conditions de stress notamment pendant le froid (Juszczuk et Rychter, 2003). Cette enzyme joue un rôle important dans la coordination de la respiration des plantes (van Dongen *et al.*, 2010). Dans la chaîne

mitochondriale, l'AOX peut transférer des électrons de la quinone vers l'oxygène pour donner de l'eau, jouant ainsi le rôle d'un accepteur final d'électrons. La chaîne mitochondriale de transport d'électrons possède donc deux oxydases terminales chez les plantes (alternative oxydase et la cytochrome c oxydase).

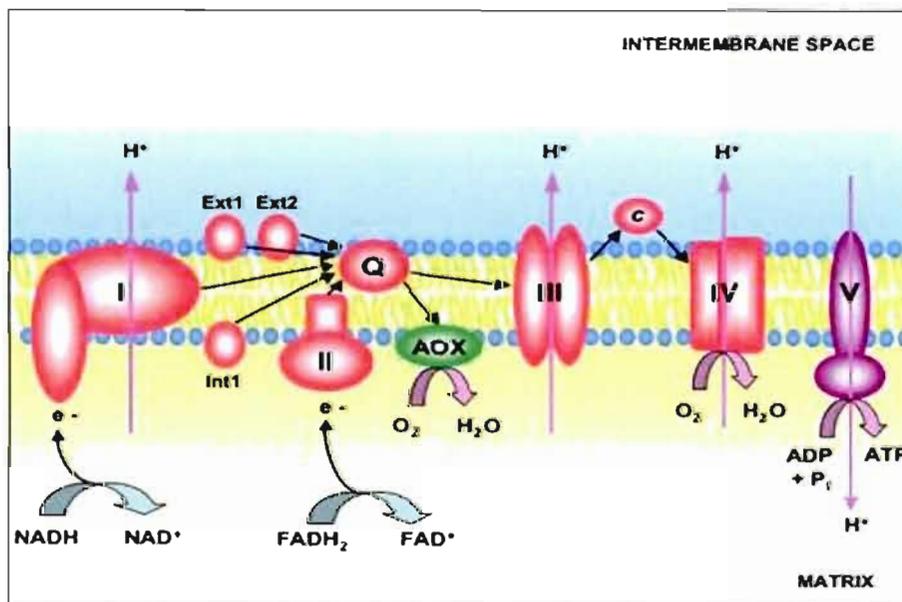


Figure 1.2: Transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne au cours de la production d'ATP. (Cette figure a été tirée du site [<http://www.maprepaphysique.fr>] (Mai, 2011). Dans cette figure, I, II, III, IV, et V désignent respectivement la NADH-déshydrogénase, la succinate déshydrogénase, la cytochrome c réductase, la cytochrome c oxydase et l'ATP synthase qui sont les différents complexes de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons. Q désigne la quinone et c le cytochrome.

Chacun des complexes se charge d'une partie du processus de transduction d'énergie. La cytochrome c oxydase est constituée chez les mammifères de 10 sous-unités polypeptidiques codées par le génome nucléaire et de 3 sous-unités polypeptidiques codées par l'ADN mitochondrial (Kadenbach *et al.*, 1983). Le gène mitochondrial

COX II code pour l'une des sous-unités polypeptidiques mitochondriales. Chez les humains, un déficit de l'activité cytochrome c oxydase entraîne plusieurs maladies qui affectent souvent plusieurs tissus dont le cœur et le cerveau. En effet, des études ont montré qu'une baisse de l'activité de la cytochrome c oxydase au niveau du cerveau est associée à la maladie d'Alzheimer (Parker *et al.*, 1990; Cardoso *et al.*, 2004). Ce déficit entraîne également la cardioencéphalomyopathie mortelle chez certains enfants (Papadopoulo *et al.*, 1999). La plupart des maladies conséquentes à un déficit en cytochrome c oxydase sont causées par des mutations au niveau du génome mitochondrial. Le gène *COX II* présente une grande variabilité à cause de nombreuses mutations. En effet, des délétions ont été enregistrées chez de nombreux asiatiques, polynésiens et amérindiens (Ballinger *et al.*, 1992; Cann et Wilson, 1983; Hirihara *et al.*, 1992). Les mutations enregistrées au niveau de *COX II*, comme d'ailleurs celles notées sur le patrimoine génétique mitochondrial en général, sont souvent responsables de maladies graves comme des cardiocéphalomyopathies et parfois le cancer colorectal (Ballinger *et al.*, 1992).

1.6 Problématique

Le blé est l'une des céréales les plus répandues au monde. Il forme avec le riz et le maïs plus de 80% de la production céréalière mondiale et occupe plus de 50% des terres agricoles (FAO, 2001). Le Canada exporte plus de 70% de sa production de blé. Cette céréale possède donc un impact socio-économique considérable au Canada.

Outre leur importance économique, les céréales possèdent une variabilité génétique ayant trait à la tolérance au gel. Le blé étant un membre important des plantes céréalières possède cette variabilité. Il existe chez le blé deux variétés : le blé d'hiver tolérant au gel et le blé de printemps sensible au gel. La variabilité génétique du blé et la différence dans les niveaux de tolérance au froid et au gel entre les variétés font du blé un excellent modèle d'étude. La production du blé est parfois affectée par les conditions climatiques difficiles dans les pays nordiques comme le Canada. En effet, l'arrivée précoce du froid intense et du gel peut causer des dommages parfois irréparables chiffrés en millions de dollars. Le froid est donc un facteur limitant non négligeable auquel les plantes agricoles, en particulier le blé, doivent faire face. Ainsi, l'acclimatation au froid est un processus nécessaire à la survie des plantes dans le climat nordique. Il est donc important de comprendre les mécanismes liés à l'acclimatation des plantes au froid.

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de CO₂ dans l'atmosphère suite aux changements climatiques va affecter les mécanismes importants des plantes tels que la photosynthèse et la production d'énergie. En effet, selon le NOAA (US National Oceanic and Atmospheric Administration), le niveau de CO₂ dans l'atmosphère a augmenté en moyenne de 1,5 ppm par année durant la période 1970-2000. En 2007, les scientifiques de la NOAA ont enregistré une augmentation de 2.14 ppm. Les dernières études de cet observatoire ont montré que le niveau de CO₂ dans l'atmosphère est désormais de 387 ppm, en hausse de près de 40% depuis le début de

la révolution industrielle de 1850. Il est donc important d'étudier les effets d'une concentration élevée de CO₂ sur les plantes.

Notre projet s'inscrivait dans le vaste programme Green Crop (réseau de plusieurs chercheurs canadiens) qui visait à étudier l'impact des changements climatiques sur le fonctionnement de certaines enzymes chez certaines céréales d'hiver et de printemps dont le blé. Dans ce cadre, l'équipe du Professeur Huner, notre collaborateur de l'université Western Ontario, avait démontré une augmentation de biomasse en réponse à une concentration élevée de CO₂ chez le blé. Pour élucider le mécanisme impliqué dans la régulation de l'énergie au cours de l'acclimatation au froid et le rôle d'une concentration élevée de CO₂, nous avons testé au laboratoire les effets du froid et des concentrations élevées de CO₂ sur une dizaine de protéines dont certaines enzymatiques, impliquées dans les processus de la photosynthèse et de la respiration : la ribulose biphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco, une enzyme impliquée dans la fixation du CO₂ et de l'oxygène), l'isocitrate déshydrogénase (IDH), une enzyme qui participe au cycle de l'acide citrique et qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate), la HSP70 (heat shock protein = protéine de choc thermique, impliquée dans la régulation du stress dû à la chaleur), la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase, qui intervient dans la synthèse du saccharose), la LHC II (Light-harvesting complex, des protéines impliquées dans la collection primaire de l'énergie lumineuse dans les antennes collectrices), la cytochrome c oxydase (COX II, impliquée dans la production d'ATP), l'ascorbate oxydase (AO, enzyme impliquée dans l'oxydation de l'ascorbate), l'UDP-Glucose Pyrophosphorylase (UGPase, une enzyme clé dans la synthèse du saccharose, de la cellulose et d'autres saccharides) et la ferroxidase (FOX I, impliquée dans l'assimilation du fer et le transport du cuivre). Parmi ces protéines testées, nous avons remarqué une augmentation de l'accumulation de la protéine COX II en réponse au froid chez le blé. La protéine COX II est une sous unité polypeptidique de la cytochrome c oxydase, une enzyme localisée dans la membrane mitochondriale interne au dernier maillon de la chaîne

chaîne respiratoire et elle est impliquée dans l'oxydation du cytochrome c avec réduction concomitante de l'oxygène.

Dans ce travail, nos objectifs étaient d'étudier la régulation de la cytochrome c oxydase par le froid et par une concentration élevée de CO₂ et l'implication de cette enzyme sur le processus associé à l'acclimatation au froid chez le blé. Pour parvenir à ces objectifs, nous avons étudié l'accumulation des protéines COX II au cours de l'acclimatation au froid, déterminé les conditions optimales de l'activité cytochrome c oxydase en réponse au froid et aux concentrations élevées de CO₂.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel biologique et conditions de croissance

Deux variétés de blé (*Triticum aestivum* L. cv Norstar) et (*Triticum aestivum* L. cv Katepwa) ont été utilisées pour toutes nos expériences. Elles ont été choisies à cause de la différence dans leur niveau de tolérance au froid. Norstar est une variété d'hiver très tolérante au froid et au gel et Katepwa est une variété de printemps moins tolérante. A l'exception des échantillons de plantes utilisées pour l'étude de l'acclimatation au froid, tous les autres échantillons issus de ces deux variétés ont été fournis par l'équipe du professeur Huner (Université Western Ontario, London Ontario). Les graines ont été germées dans des pots contenant de la vermiculite, placés dans des chambres de croissance (Modèle: GCW15 Environmental Growth Chambers, Chargin Falls, Ohio, USA), à une atmosphère de CO₂ ambiant (380 ppm), à une intensité lumineuse de 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sous une photopériode de 16 heures et sous un régime de température diurne/nocturne de 20°C/16°C pour les plantes non-acclimatées et de 4°C/4°C lors du traitement au froid pour acclimater les plantes. L'humidité relative était fixée à 70%.

Pour étudier les effets d'une concentration élevée de CO₂ durant une courte durée, les plantes âgées de 25 jours (poussées à 20°C) et de 75 jours (plantes acclimatées au froid depuis la germination) ont été transférées dans une atmosphère d'une concentration élevée de CO₂ (700 ppm), pendant 80 heures. Toutes les autres conditions de croissance ont été maintenues identiques. Ceci permet d'étudier les effets du CO₂ sur les plantes acclimatées et sur les plantes non-acclimatées. La concentration élevée de CO₂ (700 ppm) a été fixée en rapport aux prédictions de l'I.P.C.C (Intergovernmental Panel on Climate change). En effet, selon cet organisme, une telle concentration pourrait survenir dans l'atmosphère dans les futures décennies. Ces plantes ont été maintenues dans des chambres de croissance

GCW15 équipées d'un ordinateur muni d'un analyseur d'air (Model: WMA-4 CO₂ Analyzer, PP Systems International, Inc. Amesbury, MA 01913 USA) qui contrôle en continu les concentrations de CO₂ de manière à ce qu'elles soient maintenues à 700 ± 20 ppm. De plus, la température, l'humidité relative, la luminosité et la photopériode ont été contrôlées par ordinateur et continuellement surveillées. L'effet d'une concentration élevée de CO₂ de longue durée a été également étudié (stade végétatif et stade reproductif) dans les mêmes conditions de croissance que celles des plantes exposées pour une courte durée à l'exception qu'une exposition chronique au CO₂ (700 ppm) a été maintenue. Notons par ailleurs que la cinétique de croissance comparative a été effectuée pour s'assurer que toutes les comparaisons entre les plantes non-acclimatées et les plantes acclimatées ont été faites à un même stade de développement physiologique. A chaque récolte des échantillons, une masse constante de matière fraîche (feuilles) est partiellement pesée et séchée à l'étuve à 80°C. Les poids secs ont été déterminés en pourcentage de poids frais.

2.2 Méthodes

2.2.1 Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines a été réalisée sur la glace ou dans une chambre froide à 4°C, pour éviter toute dégradation. Les protéines solubles des différents échantillons de tissus végétaux (feuilles et autres parties aériennes) ont été extraites en broyant 200 mg de tissus dans un mortier contenant 1,2 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7,50 et l'inhibiteur de protéase, le PMSF 1 mM (phenylmethylsulphonylfluoride). Immédiatement après, les broyats ont été centrifugés à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants des différents échantillons ont été mélangés à volume égal avec le tampon d'échantillon de Laemmli. Pour le dosage des protéines, 6 µl de chaque échantillon et différentes quantités de BSA (albumine de sérum bovin) allant de 1 µg à 8 µg ont été séparés sur SDS-PAGE dans un gel de 12%. La durée de migration a été d'une heure à 170 volts constants. Les gels ont été colorés pendant une heure dans

une solution contenant 40% de méthanol, 10% d'acide acétique et 0,25% de bleu de Coomassie. Par la suite, ils ont été décolorés dans une solution contenant 30% de méthanol et 7% d'acide acétique. Les gels ont été scannés et suite à l'établissement d'une courbe d'étalonnage effectuée à partir des différentes quantités de BSA, les contenus en protéines ont été déterminés grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad).

2.2.2 Accumulation des protéines en réponse au froid : western blot

Dans le but d'étudier l'accumulation des protéines COX II et WCS120 en réponse au froid et à une concentration élevée de CO₂, les protéines solubles des différents échantillons ont été utilisées dans des analyses de type western. Les protéines solubles totales ont été séparées sur gel SDS-PAGE et transférées sur des membranes PVDF (0,45 µm; Pall Corporation) comme décrit par (Gray *et al.*, 1996). Les membranes ont été incubées pendant 1 heure dans une solution de phosphate buffer saline (PBS 1X)-Tween-20 0,2% contenant 2% de lait en poudre écrémé. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution de PBS-Tween contenant l'anticorps primaire (anti-COX II à une dilution de 1/1000 ou anti-WCS120 à une dilution de 1/10000). A la suite de 3 lavages de 10 minutes dans du PBS-Tween, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase a été utilisé, à une dilution de 1/25000, pour révéler les protéines COX II ou WCS120 sur des films autoradiographiques (Hyblot CL, Denville Scientific) en utilisant un révélateur de Chimiluminescence (Denville Scientific). Signalons que la méthode de western blot a également été utilisée au cours d'une étude préliminaire pour vérifier l'abondance d'une dizaine d'autres protéines impliquées dans la photosynthèse et la respiration (cf problématique) en utilisant divers anticorps: anti-HSP70, anti-FBPase, anti-FOX I, anti-IDH, anti-AO, anti-LHC et anti-UGPase.

2.2.3 Optimisation de la méthode du dosage de l'activité cytochrome c oxydase

La cytochrome c oxydase est une enzyme qui intervient dans le transport d'électrons au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Pour doser son

activité, nous avons initialement essayé différents substrats qui servent d'accepteurs d'électrons. Parmi ces substrats, nous avons choisi le dichloro-phénol indophenol (DCPIP) notamment utilisé pour évaluer le transport d'électrons selon le principe de la réaction de Hill (qui démontre que la photolyse de l'eau nécessite un accepteur d'électrons au cours de la photosynthèse). Ce choix se justifiait par le fait que ce substrat est facile à doser puisqu'il change de couleur selon qu'il accepte ou libère un électron (bleu à l'état oxydé et incolore à l'état réduit). Cependant, le DCPIP s'est révélé très sensible à plusieurs paramètres notamment la lumière, le pH et les moindres variations de concentrations. Ainsi, à la suite de plusieurs tentatives infructueuses, nous avons utilisé le ferrocyclochrome c, le substrat naturel de la cytochrome c oxydase. D'autre part, la cytochrome c oxydase est une enzyme ancrée dans la membrane mitochondriale interne; son contact avec le substrat exige donc un traitement particulier au niveau des mitochondries pour déloger l'enzyme afin de permettre son contact avec le substrat. Ainsi, plusieurs détergents (Tween-20, Triton X-100, le déoxycholate de sodium) ont été utilisés à diverses concentrations dans le but d'obtenir une activité enzymatique maximale. De multiples essais ont permis de sélectionner le déoxycholate de sodium qui s'est révélé comme étant le détergent le plus efficace. L'utilisation de ce détergent à une concentration finale de 0,01% a amélioré considérablement l'efficacité du dosage de l'activité enzymatique. En effet, ce détergent a la propriété de dissoudre les phospholipides, ce qui désorganise les membranes sans altérer les propriétés biochimiques des enzymes. Signalons aussi que l'amélioration de la centrifugation par l'augmentation de la vitesse (9850 g) a permis d'obtenir de meilleurs résultats.

L'activité cytochrome c oxydase a été dosée par une méthode spectrophotométrique en utilisant le ferrocyclochrome comme substrat. Il s'agit de la méthode décrite dans la trousse CYTOCOX 1 de SIGMA que nous avons adaptée aux plaques de 96 puits. Cette méthode consiste à déterminer la décroissance des densités optiques suite à l'oxydation du substrat. Pour doser l'activité de l'enzyme, un volume d'extrait enzymatique équivalent à une quantité de 50 µg de protéines a été mélangé avec 300 µl d'une solution de ferrocyclochrome réduite (0,66 mM). La densité optique a été lue à 550 nm

toutes les 20 secondes pendant 10 minutes avec un lecteur Gen5 (Biotek). Cette méthode a permis de déterminer la quantité de ferrocytochrome oxydée par unité de temps et par unité de volume puis finalement exprimée en $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ poids sec.

L'utilisation du ferrocytochrome et du déoxycholate de sodium ainsi que l'amélioration des centrifugations ont amélioré le dosage de l'activité enzymatique. Il convient de signaler que cette partie du projet de recherche a nécessité un temps considérable pour la mise au point d'une méthode de dosage optimale.

2.2.3.1 Préparation de l'extrait enzymatique

L'extrait enzymatique a été obtenu par centrifugation différentielle selon la méthode de Quail, (1979) modifiée. Cette modification a consisté en une centrifugation supplémentaire à une vitesse supérieure. L'extrait a été préparé en broyant 200 mg de tissus dans 1,2 ml de Tris-HCl 100 mM pH 7,50. Ce broyat a été centrifugé dans un microtube, à 4500 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été recueilli dans un second tube pour une deuxième centrifugation à 9800g pendant 20 minutes. Le deuxième surnageant a été traité avec le déoxycholate de sodium à une concentration finale de 0.01%.

2.2.3.2 Caractérisation de quelques paramètres de la cytochrome c oxydase

L'objectif fondamental dans cette partie de notre étude était de déterminer certains paramètres comme le pH, la température et les concentrations de substrat et d'enzyme qui permettent une activité optimale de l'enzyme. La détermination du pH optimal de l'activité enzymatique a été réalisée dans une gamme de pH comprise entre 6 et 8 (à chaque moitié d'unité de pH c'est à dire par 0,5) en utilisant le tampon Tris-HCl 50 mM contenant 600 mM KCl. Ensuite, un volume correspondant à une quantité de 50 μg de protéines de chaque solution enzymatique a été prélevé et mélangé avec un milieu réactionnel composé de 300 μl de la solution de substrat (ferrocytochrome 0,66 mM) dont le pH correspondait à celui du tampon d'incubation

de l'enzyme. Pour chaque valeur de pH donné, l'activité enzymatique a été dosée grâce au spectrophotomètre à 550 nm. L'activité enzymatique a été exprimée par la suite en μmoles de ferrocyclochrome oxydé/ min/g poids sec.

La température optimale pour l'activité enzymatique a été déterminée en utilisant le tampon Tris-HCl 50 mM contenant 600 mM KCl pH 7,50 (pH optimal trouvé à l'expérience précédente). Elle a été étudiée dans un intervalle allant de 26°C à 36°C (à chaque 2°C) chez tous les tous les échantillons. Les tampons de dosage ont été maintenus aux différentes températures.

La stabilité thermique a été étudiée en pré-incubant chaque solution enzymatique à une température supérieure de 10°C à sa température optimale. Au terme de cette pré-incubation, l'activité enzymatique a été mesurée à la température optimale de l'enzyme. Toutes les deux minutes et pour chaque température de pré-incubation, un volume correspondant à une quantité de 50 μg de protéines de chaque solution enzymatique a été prélevée et mélangée avec un milieu réactionnel contenant 300 μl de la solution de substrat (ferrocyclochrome 0,66 mM) maintenue aussi à la température optimale de l'enzyme. L'activité a été dosée puis exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale. La détermination de la vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis-Menten (K_m) a été réalisée avec des concentrations de substrat (ferrocyclochrome) allant de 0,16 mM à 1,32 mM selon la méthode de Lineweaver et Burk, (1934). Ces concentrations ont été choisies en référence à la trousse CYTOCOX 1 (SIGMA). Les paramètres cinétiques ont été déterminés dans les conditions optimales de température. Les différentes méthodes utilisées ont permis non seulement une caractérisation partielle de la cytochrome c oxydase mais aussi d'obtenir des résultats sur les effets du froid et d'une concentration élevée de CO_2 sur l'activité de cette enzyme.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Contenu en protéines

La synthèse de composés organiques, en particulier celle des protéines est souvent affectée par les facteurs du milieu, surtout par les stress environnementaux. Au cours de notre étude, les plantes ont été exposées à divers stress, notamment le froid et les concentrations élevées de CO₂ (700 ppm). Pour étudier les effets du froid, les plantes des deux variétés de blé (Norstar et Katepwa) ont été exposées à 4°C pendant 30 jours. Les effets du CO₂ ont été étudiés pour une courte durée et pour une longue durée (chronique).

3.1.1 Effet du froid sur la teneur en protéines solubles totales

Pour étudier l'effet de l'acclimatation au froid sur le contenu en protéines solubles totales, des extraits protéiques de plantes de Norstar et de Katepwa acclimatées à 4°C durant une période allant de 1 à 30 jours ainsi que leurs contrôles non-acclimatés ont été analysés.

Chez Katepwa, nos résultats ont montré que la teneur en protéines solubles totales chez les plantes contrôles est pratiquement constante et oscille autour de 1 mg/g de poids sec (Tableau 3.1). Par contre chez les plantes acclimatées au froid, le contenu en protéines augmente en réponse au froid en fonction du nombre de jours d'acclimatation. Il passe de $1,13 \pm 0,08$ mg à $1,57 \pm 0,13$ mg/g de poids sec entre le 1^{er} jour et le 30^e jour d'acclimatation, soit une augmentation de 39%. En comparant les plantes acclimatées au froid durant 30 jours avec leurs contrôles poussés à 20°C, on a constaté une augmentation du contenu en protéines de plus de 58% (Tableau 3.1). Chez Norstar, la teneur en protéines totales solubles présente des différences peu significatives entre les différents échantillons de plantes-contrôles, comme dans le cas de Katepwa. La teneur en protéines totales chez les plantes contrôles a variée dans un intervalle allant de $1,47 \pm 0,12$ mg à $1,61 \pm 0,15$ mg/g de poids sec selon la durée

d'acclimatation (Tableau 3.1). Par contre, chez les plantes acclimatées au froid, le contenu en protéines augmente considérablement. Il passe de $1,59 \pm 0,13$ mg/g poids sec avant le début de l'acclimatation à $2,91 \pm 0,32$ mg/g poids sec après 30 jours d'acclimatation soit une augmentation de 83% (Tableau 3.1). En comparant les plantes acclimatées au froid durant 30 jours avec leurs contrôles, on a constaté une augmentation du contenu en protéines de 94% chez Norstar. En réponse à l'acclimatation au froid, les deux variétés de blé présentent une accumulation différentielle en rapport au contenu en protéines. La réponse de Norstar à l'acclimatation au froid en terme de contenu en protéines est plus importante que celle de Katepwa. En effet après 30 jours d'acclimatation au froid, Norstar présente un contenu en protéines presque le double de celui de Katepwa. Cette différence pourrait s'expliquer par l'existence de prédispositions génétiques chez Norstar qui permettraient à cette variété d'accumuler des protéines de froid pour mieux tolérer le gel par rapport à Katepwa.

3.1.2 Effets de l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂

Pour étudier les effets d'une concentration élevée de CO₂ sur la teneur en protéines, les plantes de Norstar acclimatées au froid durant 75 jours et non-acclimatées ont été transférées dans une atmosphère où la concentration de CO₂ a été fixée à 700 ppm et traitées pendant 80 heures. Le contenu en protéines des plantes exposées et non exposées a été déterminé par dosage des protéines solubles. Les résultats démontrent que l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm) de courte durée affecte très légèrement (augmentation d'environ 5%) la teneur en protéines chez les plantes non-acclimatées (Tableau 3.2). Par contre, chez les plantes acclimatées, l'exposition à une concentration élevée de CO₂ entraîne une augmentation de la teneur en protéines de presque 20% (Tableau 3.2). Cette augmentation pourrait en partie être attribuée à l'accumulation de protéines spécifiques associées à l'acclimatation au froid. Par ailleurs, l'analyse du tableau 3.2 confirme également que durant l'acclimatation au froid, la teneur en protéines

augmente considérablement. En effet, on observe une hausse du contenu en protéines de 2,75 fois chez les plantes acclimatées au froid (CO₂ ambiant) en comparaison aux plantes qui ont poussé à 20°C; un résultat similaire est observé si on compare les plantes acclimatées et non-acclimatées dans une atmosphère d'une concentration élevée de CO₂.

L'effet de l'exposition chronique des plantes à une concentration élevée de CO₂ sur le contenu en protéines a été étudié. Nos résultats montrent que l'exposition des plantes acclimatées au froid et non-acclimatées à une concentration élevée de CO₂ n'entraîne pas de différences majeures de la teneur en protéines (Tableau 3.3) en comparaison aux plantes cultivées dans les conditions normales de CO₂. Sans être significative, la tendance globale montre une faible baisse de la teneur en protéines chez les plantes exposées à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm) en comparaison à celles cultivées dans les conditions ambiantes de CO₂. Ce résultat concerne non seulement les plantes acclimatées au froid mais aussi les plantes non-acclimatées. La baisse du contenu en protéines est en accord avec les résultats obtenus chez le blé et chez *Arabidopsis* (Bloom *et al.*, 2010). En effet, des études sur les effets des concentrations élevées de CO₂ ont montré une inhibition de l'assimilation des nitrates chez le blé (Bloom *et al.*, 2010). Cette inhibition va avoir un impact négatif sur la synthèse protéique, ce qui provoque une baisse du contenu des protéines.

3.2 Accumulation des protéines spécifiques en réponse au froid

3.2.1 Expression d'un gène marqueur de l'acclimatation au froid

En réponse au froid, les plantes peuvent accumuler plusieurs substances en particulier des protéines qui leur permettent de s'acclimater afin de tolérer le froid et le gel. Par ailleurs, ces plantes n'ont pas toutes le même niveau de tolérance au gel. La variété de blé d'hiver est naturellement connue pour son niveau de tolérance qui dépasse de loin celui de blé de printemps. Cette différence dans le niveau de tolérance au froid et au gel est le résultat de l'expression de plusieurs gènes codant pour des

protéines spécifiques, dont entre autres celles de la famille de protéines WCS120. Dans notre laboratoire, il a été démontré par plusieurs études menées chez le blé une corrélation entre le niveau d'expression des protéines WCS120 et la tolérance au froid (Houde *et al.*, 2004; Houde *et al.*, 1992; Sarhan *et al.*, 1997; Ouellet, 1998; N'Dong *et al.*, 2002). Les résultats de ces études ont montré que la variété de blé d'hiver exprime beaucoup plus les protéines WCS120 que la variété de blé de printemps, et cette variété d'hiver est plus tolérante au froid et au gel que celle de printemps. Cette différence d'accumulation des protéines WCS120 entre les deux variétés de blé en réponse au froid fait de ces protéines d'excellents marqueurs d'acclimatation au froid. Dans le but de vérifier le niveau d'acclimatation chez les variétés d'hiver et de printemps, nous avons étudié l'accumulation des protéines WCS120. Ces protéines sont utilisées comme marqueurs de l'acclimatation au froid. Nos résultats ont montré que Norstar, la variété de blé d'hiver, acclimatée au froid, comme prévu, a accumulé des protéines de la famille WCS120 (Fig 3.1). Par contre, aucune accumulation de ces protéines n'a été détectée chez les plantes non-acclimatées. On note aussi une différence significative de l'accumulation de ces protéines par les variétés d'hiver et de printemps acclimatées au froid. En effet, Katepwa, la variété de printemps acclimatée a montré une faible accumulation des protéines WCS120. L'accumulation des protéines WCS120 indique que les plantes ont été bien acclimatées au froid.

3.2.2 Accumulation de la protéine de COX II en réponse au froid

Pour élucider le mécanisme impliqué dans la régulation de la production d'énergie en réponse à l'acclimatation au froid et au CO₂, nous avons testé les effets du froid et d'une concentration élevée de CO₂ sur une dizaine d'enzymes impliquées dans les processus de la photosynthèse et de la respiration (cf problématique). Nos résultats préliminaires ont montré une augmentation significative de l'accumulation de la protéine de COX II en réponse au froid chez le blé. Afin de confirmer ce

résultat, les extraits de protéines solubles de plantes acclimatées et non-acclimatées ont été testés par western blot en utilisant l'anticorps anti-COX II. Nos résultats ont montré que la protéine COX II s'accumule chez les plantes de Norstar acclimatées au froid contrairement aux plantes non-acclimatées (Fig 3.2). Cependant, aucune accumulation de protéines COX II n'a été observée chez les plantes de Katepwa. Les résultats démontrent aussi une absence d'accumulation de COX II en réponse à une concentration élevée de CO₂. On note donc une accumulation différentielle de la protéine COX II en réponse au froid entre les deux variétés. Puisque la variété de blé d'hiver est plus tolérante au froid et au gel que la variété de blé de printemps, cette différence d'accumulation de la protéine COX II suggère que l'expression du gène qui code pour cette protéine serait associée à la tolérance au froid et au gel. Des résultats similaires ont été rapportés par une étude menée chez *Arabidopsis*. La cytochrome c oxydase est une enzyme constituée d'un assemblage de plusieurs polypeptides dont l'un est codé par le gène *COX II*. Nos résultats suggèrent que cette enzyme jouerait un rôle dans le processus d'acclimatation au froid.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons d'abord caractérisé certains paramètres de l'enzyme afin d'étudier son activité en réponse au froid et à une concentration élevée de CO₂.

3.3 Effet du pH et de la température sur l'activité de l'enzyme

Une étude de l'activité d'une enzyme nécessite au préalable la détermination de certains paramètres. Les conditions de dosage de la cytochrome c oxydase initialement utilisées au cours de cette étude étaient celles définies dans la trousse CYTOCOX 1 (SIGMA). Dans le but de déterminer l'activité cytochrome c oxydase du blé, dans des conditions optimales, nous avons d'abord étudié certains paramètres liés au fonctionnement de l'enzyme, notamment le pH et la température.

3.3.1 Effet du pH

Le pH est l'un des paramètres auxquels les enzymes sont le plus sensibles. Certaines d'entre elles ne sont actives que dans des milieux acides ou neutres alors que d'autres présentent leur activité maximale dans des milieux basiques. L'étude de l'activité enzymatique en fonction du pH est donc primordiale.

La détermination du pH optimal de l'activité cytochrome c oxydase a été réalisée dans une gamme de pH comprise entre 6 et 8 (cf 2.2.3.2). Le Tris-HCl 50 mM contenant 600 mM KCl a servi de tampon d'incubation de l'enzyme. Le dosage a été effectué à la température de 25°C chez la variété Norstar. Nos résultats ont montré que l'activité cytochrome c oxydase est maximale à un pH de 7,50 (Tableau 3.4) chez les deux variétés de blé (Norstar et Katepwa) aussi bien chez les plantes acclimatées que chez les plantes non-acclimatées. Cette valeur de pH a donc été utilisée pour effectuer les dosages subséquents de l'activité enzymatique.

3.3.2 Effet de la température sur l'activité cytochrome c oxydase

Le fonctionnement des enzymes exige des conditions précises de températures. Dans un intervalle de températures compatibles à la vie, les basses températures ralentissent ou inhibent l'activité des enzymes alors les températures élevées dénaturent progressivement les enzymes. Ainsi, au cours de notre étude, la température optimale de la cytochrome c oxydase a été déterminée dans le but de doser l'activité de cette enzyme dans les conditions optimales. L'activité enzymatique a été étudiée dans un intervalle allant de 26°C à 36°C à tous les deux degrés chez les plantes acclimatées et chez leurs contrôles non-acclimatés des deux variétés. Nos résultats ont démontré que la température optimale est identique chez la même variété qu'elle soit acclimatée ou non mais elle diffère entre les variétés. Chez la variété d'hiver, Norstar, la température optimale est de 30°C alors que chez la variété de printemps, Katepwa, elle se situe à 32°C (Fig 3.3). Pour des valeurs de température supérieures à la température optimale, l'activité enzymatique diminue à cause de la dénaturation de l'enzyme.

Les résultats de l'analyse de la dénaturation thermique ont montré que la cytochrome c oxydase est beaucoup plus thermostable chez la variété d'hiver que chez la variété de printemps. En effet, à 40°C, on a observé une perte de 50% d'activité au bout de 11 minutes à la température de dénaturation chez Norstar. Par contre, chez Katepwa le même pourcentage de perte d'activité a été observé au bout de 5 minutes seulement (Fig 3.4). L'acclimatation au froid semble induire la synthèse de protéines spécifiques qui permettraient de procurer une meilleure protection de l'enzyme chez le blé d'hiver.

3.4 Détermination de V_{max} et de K_m

La détermination de la vitesse maximale (V_{max}) de l'enzyme et de la constante de Michaelis-Menten (K_m) a été réalisée pour des concentrations variables de substrat (ferrocytochrome c) en utilisant la méthode de Lineweaver-Burk. Nos résultats ont montré que les plantes acclimatées au froid ont une V_{max} légèrement supérieure à celle des plantes contrôles non-acclimatées (Tableau 3.5). Ainsi, la variété d'hiver (Norstar) acclimatée a une V_{max} de $18,48 \pm 0,73$ $\mu\text{moles/min/mg}$ de protéines alors que le témoin non-acclimaté a une V_{max} de $17,35 \pm 0,64$ $\mu\text{moles/min/mg}$ de protéines. Chez les plantes de Katepwa acclimatées au froid, la V_{max} est de $19,90 \pm 0,85$ $\mu\text{moles/min/mg}$ de protéines alors que chez les plantes non-acclimatées la V_{max} est de $18,29 \pm 0,67$ $\mu\text{moles/min/mg}$ de protéines. Par ailleurs, pour chaque variété, les valeurs de K_m sont pratiquement identiques entre les plantes acclimatées et non-acclimatées mais sont plus faibles chez la variété d'hiver que chez celle de printemps. Les rapports entre V_{max} et K_m sont significativement supérieurs chez la variété Norstar (Tableau 3.5). Ces résultats semblent montrer une plus grande performance de l'enzyme chez Norstar, la variété d'hiver.

3.5 Activité cytochrome c oxydase en réponse au froid

Pour chaque variété, l'activité enzymatique a été dosée chez les plantes acclimatées au froid durant 30 jours ainsi que chez les plantes contrôles non-

acclimatées. Nos résultats ont montré que chez la variété de printemps, Katepwa, l'activité cytochrome c oxydase reste pratiquement constante chez les plantes contrôles (Fig 3.5) avec des valeurs oscillant entre $25,35 \pm 1,10$ et $26,79 \pm 1,25$ $\mu\text{moles/min/g}$ poids sec. Par contre, chez les plantes acclimatées, l'activité enzymatique est supérieure en comparaison aux plantes non-acclimatées. Chez Katepwa, l'activité cytochrome c oxydase augmente donc en réponse au froid et atteint un maximum au 24^e jour d'acclimatation qui est environ 40% plus élevé que l'activité au début de la période d'acclimatation. Signalons par ailleurs une exception au premier jour d'acclimatation où une baisse d'activité d'environ 7 % a été observée. Chez la variété d'hiver (Norstar), la même tendance a été observée. En effet l'activité cytochrome c oxydase est restée pratiquement stable, entre $35,7 \pm 1,74$ et $37,45 \pm 1,84$ $\mu\text{moles/min/g}$ poids sec chez les plantes contrôles alors que chez les plantes acclimatées au froid elle varie après le 6^e jour entre $50,51 \pm 2,16$ et $95,14 \pm 2,83$ $\mu\text{moles/min/g}$ poids sec. L'activité maximale a été atteinte au 12^e jour d'acclimatation avec une augmentation de 1,5 fois par rapport au contrôle non-acclimaté. Après un jour d'acclimatation on a observé une baisse d'activité qui dépasse les 25%. La baisse de l'activité enzymatique au premier jour d'acclimatation chez Norstar est probablement due à un ajustement métabolique. En effet, le transfert des plantes de 20°C à 4°C (au premier jour de l'acclimatation) affecte la sensibilité des enzymes à la température. L'augmentation de l'activité de la cytochrome c oxydase est beaucoup plus importante chez la variété d'hiver que chez celle de printemps. Nos résultats semblent montrer que la cytochrome c oxydase est une enzyme impliquée dans le processus d'acclimatation au froid.

3.6 Effet d'une exposition au CO₂ (courte durée) sur l'activité cytochrome c oxydase

Dans l'atmosphère, la concentration moyenne en CO₂ est estimée à 350 ppm. Dans notre travail, nous avons entrepris d'étudier l'effet d'une concentration élevée de CO₂ (700 ppm) chez les plantes acclimatées et non-acclimatées de Norstar. Cette

valeur de CO₂ a été choisie en prédiction des changements climatiques (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2001). Pour étudier les effets d'une concentration élevée de CO₂ de courte durée, les plantes non-acclimatées au froid âgées de 25 jours et des plantes acclimatées au froid (4°C) âgées de 75 jours ont été transférées dans une atmosphère avec une concentration élevée de CO₂ (700 ppm), pendant 80 heures. Les extraits enzymatiques provenant de ces plantes ont été utilisés pour doser l'activité cytochrome c oxydase. Nos résultats ont montré qu'une exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ de courte durée (80 heures) a entraîné une baisse de l'activité enzymatique de près de 20 % chez les plantes non-acclimatées et une baisse de plus de 50% chez les plantes acclimatées au froid (Fig 3. 6). Rappelons que la cytochrome c oxydase est une enzyme localisée dans la membrane mitochondriale et qui participe au processus de transduction d'énergie dans la mitochondrie; la diminution de l'activité de cette enzyme pourrait réduire la production d'ATP.

3.7 Effet d'une exposition chronique de CO₂ sur l'activité cytochrome c oxydase

L'exposition chronique des plantes à une concentration élevée de CO₂ a donné des résultats à contre sens de ceux obtenus pour une exposition de courte durée. En effet, chez la variété de printemps Katepwa, cette exposition entraîne une hausse de l'activité cytochrome c oxydase de 30% aussi bien chez les plantes acclimatées que chez les plantes non-acclimatées (Fig 3.7). Cette tendance est également observée chez la variété d'hiver. En effet, chez Norstar une exposition chronique des plantes à une concentration élevée de CO₂ entraîne une hausse de l'activité cytochrome c oxydase de 48% chez les plantes non-acclimatées et de 42% chez les plantes acclimatées (Fig 3.7). Puisque cette enzyme intervient au dernier maillon de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie lors de la production d'ATP, la hausse de son activité pourrait traduire une augmentation de la production énergétique chez les plantes en réponse à une concentration élevée de CO₂.

Tableau 3.1. Teneur en protéines solubles totales chez Norstar (variété d'hiver) et Katepwa (variété de printemps) acclimatés au froid (4°C) ainsi que chez leur témoin (20°C). Les plantes ont été cultivées à 20°C pendant 7 jours puis celles à acclimater ont été transférées à 4°C et récoltées à différents jours. Les protéines ont été extraites dans du Tris-HCl 100 mM pH 7,50. Les valeurs dans le tableau sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

Cultivar	Contenu en protéines (mg /g poids sec)			
	Acclimatées (4°C)		Contrôles (20°C)	
	Nombre de jours d'acclimatation	mg de protéines/g poids sec	Nombre de jours à 20°C	mg de protéines/g poids sec
Katepwa	1	1,13 ± 0,08	J ₀ (**)	0,98 ± 0,09
	6	1,24 ± 0,17	1	0,96 ± 0,10
	12	1,50 ± 0,12	2	0,99 ± 0,09
	18	1,54 ± 0,15	3	0,97 ± 0,11
	24	1,53 ± 0,08	4	0,95 ± 0,08
	30	1,57 ± 0,13	5	0,99 ± 0,11
	Norstar	Acclimatées		Contrôles
1		1,2 ± 0,08	J ₀ (**)	1,59 ± 0,13
6		1,43 ± 0,05	1	1,57 ± 0,11
12		1,69 ± 0,08	2	1,61 ± 0,15
18		2,75 ± 0,19	3	1,49 ± 0,16
24		2,87 ± 0,25	4	1,47 ± 0,12
30		2,91 ± 0,32	5	1,52 ± 0,17

** Les plantes récoltées au dernier jour de la période de germination initiale

Tableau 3.2. Teneur en protéines solubles totales chez Norstar non-acclimaté (20°C) et acclimaté (4°C) exposés durant 80 heures à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm). Au moment de leur exposition au CO₂, les plantes non-acclimatées étaient âgées de 25 jours et celles acclimatées de 75 jours. Les échantillons ont été extraits dans du Tris-HCl 100 mM pH 7,50. Les valeurs dans le tableau sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

	Contenu en protéines solubles (mg/g poids sec)	
	380 ppm CO ₂	700 ppm CO ₂
non-acclimatées (témoins)	1,84 ± 0,04	1,93 ± 0,08
acclimatées au froid	5,06 ± 0,42	6,06 ± 0,41

Tableau 3.3. Teneur en protéines solubles totales chez Norstar et Katepwa non-acclimatés (20°C) et acclimatés (4°C) et exposés de façon chronique à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm). Les plantes ont été soumises à une exposition au CO₂. Le stade reproductif de Norstar (20°C) a été obtenu après la période de vernalisation à 4°C. Les échantillons ont été extraits dans du Tris-HCl 100 mM pH 7,50. Les valeurs dans le tableau sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

Cultivars	Température de croissance	Stade développemental	CO ₂ ambiant	Concentration élevée de CO ₂
			protéines mg/g poids sec	protéines mg/g poids sec
Katepwa	20°C	Végétatif	1,97 ± 0,17	1,87 ± 0,21
		Reproductif	2,47 ± 0,29	2,16 ± 0,19
	4°C	Végétatif	2,83 ± 0,33	3,24 ± 0,35
		Reproductif	3,18 ± 0,36	3,32 ± 0,29
Norstar	20°C	Végétatif	1,4 ± 0,11	1,67 ± 0,15
		Reproductif	1,61 ± 0,13	1,49 ± 0,12
	4°C	Végétatif	5,11 ± 0,57	4,51 ± 0,58
		Reproductif	4,70 ± 0,51	4,48 ± 0,35

Tableau 3.4. Activité cytochrome c oxydase exprimée en fonction du pH, chez des plantes de Norstar et Katepwa acclimatées au froid (4°C) durant 30 jours ainsi que chez leurs témoins (20°C). Les échantillons ont été extraits dans du Tris-HCl 100 mM. L'activité enzymatique a été dosée à 25°C grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les valeurs (μ moles de ferrocytochrome oxydé /min/g de poids sec) sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

pH	6	6,5	7	7,5	8
Norstar non-acclimaté (témoin)	5,42 \pm 0,75	7,25 \pm 0,87	12,71 \pm 0,56	18,82 \pm 1,10	14,65 \pm 0,89
Norstar acclimaté	10,45 \pm 0,87	17,14 \pm 1,21	30,54 \pm 1,54	36,63 \pm 1,83	25,4 \pm 0,79
Katepwa non-acclimaté (témoin)	3,29 \pm 0,24	5,47 \pm 0,35	6,75 \pm 0,11	9,89 \pm 0,42	7,55 \pm 0,36
Katepwa acclimaté	6,54 \pm 0,21	8,87 \pm 0,54	11,32 \pm 0,76	15,67 \pm 0,81	12,87 \pm 0,44

Tableau 3.5. Paramètres cinétiques de la cytochrome c oxydase chez deux variétés de blé non-acclimatées et acclimatées : Norstar (variété d'hiver) et Katepwa (variété de printemps). Ces paramètres ont été déterminés dans des conditions optimales de température et de pH de l'enzyme. L'activité enzymatique a été dosée grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,50 contenant 600 mM KCl. Les constantes de Michaelis-Menten (K_m) et les vitesses maximales (V_{max}) sont respectivement exprimées en mM et $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Les valeurs dans le tableau sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques ($N = 6$).

Cultivar		Paramètres cinétiques		
		K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
Norstar	non-acclimaté	$0,351 \pm 0,03$	$17,35 \pm 0,64$	$49,43 \pm 1,65$
	acclimaté	$0,300 \pm 0,02$	$18,48 \pm 0,73$	$61,60 \pm 2,06$
Katepwa	non-acclimaté	$0,408 \pm 0,04$	$18,29 \pm 0,67$	$44,82 \pm 1,11$
	acclimaté	$0,380 \pm 0,03$	$19,90 \pm 0,85$	$52,36 \pm 1,47$

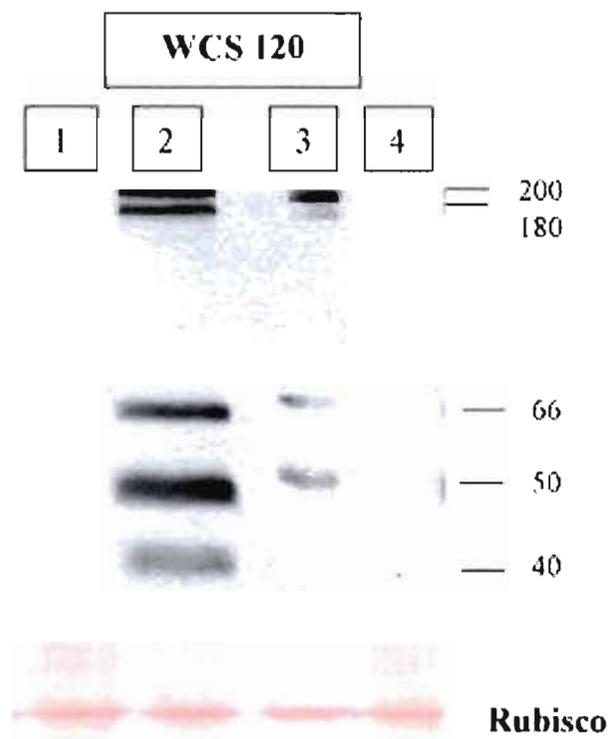


Figure 3.1: Accumulation d'un marqueur de l'acclimatation au froid chez Norstar: Wheat cold specific (WCS120). Une quantité de 10 μ g a été utilisée pour chacun des échantillons. La migration des protéines dans le gel a été effectuée pendant 1 h à 170 volts constants. (1 et 2 représentent Norstar respectivement à 20°C et à 4°C; 3 et 4 représentent Katepwa respectivement à 4°C et 20°C). La détection des protéines par immunobuvardage a été faite avec l'anticorps anti-WCS120. Les chiffres à droite représentent les poids moléculaires en kD des différentes protéines de la famille de WCS120. La bande de Rubisco qui apparait sur le gel coloré au Ponceau (50 k D) a servi de contrôle de charge.

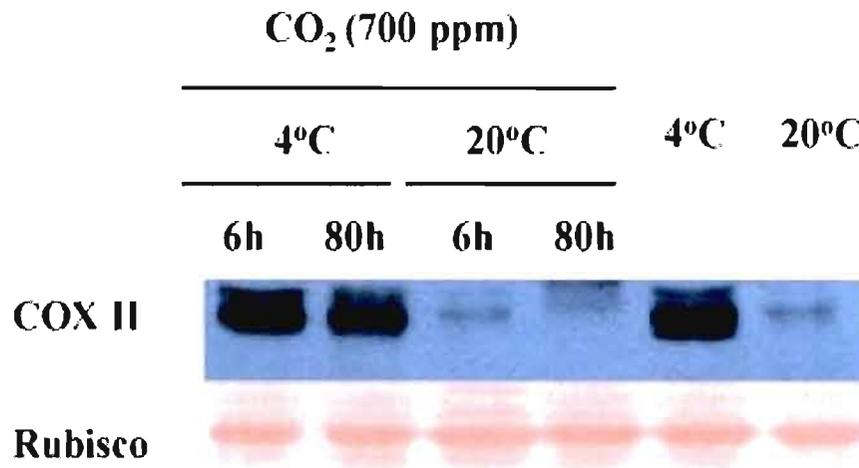


Figure 3.2: Accumulation des protéines COX II en réponse au froid chez Norstar. Les protéines ont été détectées par immunobuvardage avec l'anticorps anti-COXII (dilution : 1/1000). Une quantité de 10 µg a été utilisée pour chacun des échantillons issus de plantes acclimatées (4°C) ou non-acclimatées (20°C) exposées en atmosphère de CO₂ ambiant ou élevé (700 ppm) durant 6 ou 80 heures. La protéine COX II possède un poids moléculaire de 31 kD. La bande de Rubisco qui apparaît (50 kD) a été utilisée comme contrôle de charge.

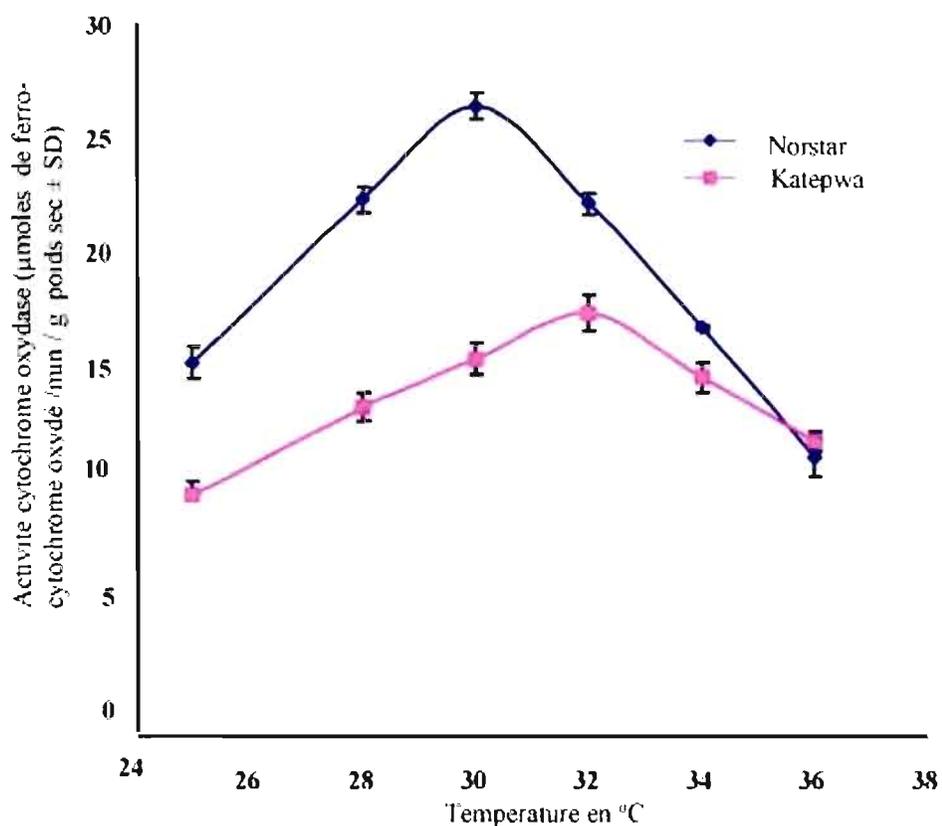


Figure 3.3: Effet de la température sur l'activité cytochrome c oxydase chez Norstar et Katepwa acclimatées au froid. L'activité enzymatique a été dosée avec le ferrocyclochrome comme substrat grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7 contenant 600 mM KCl. Les valeurs utilisées sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

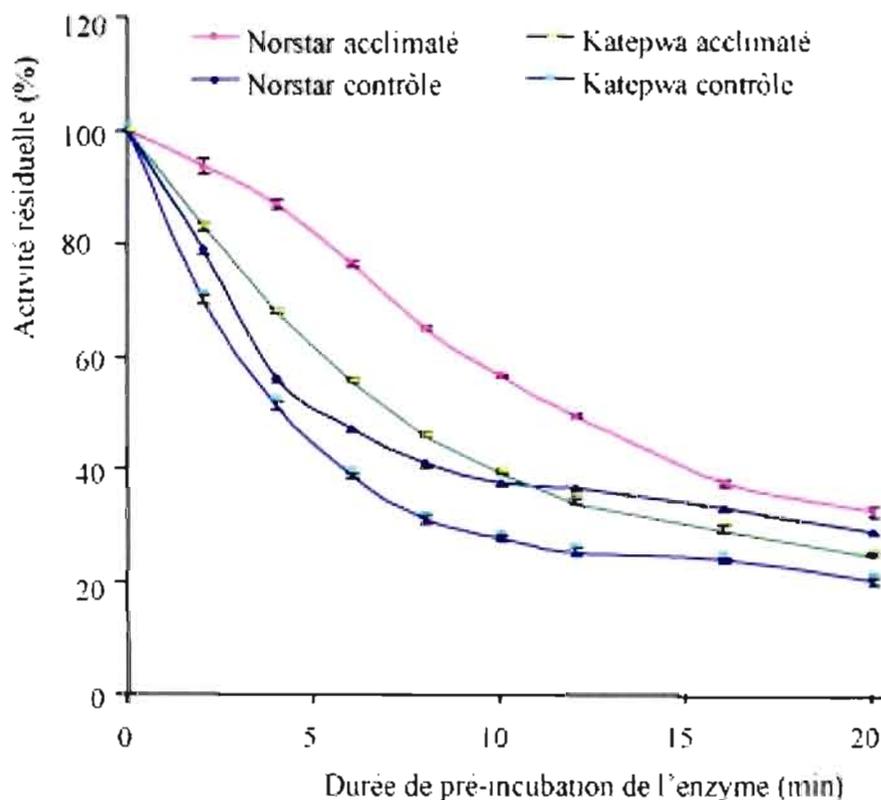


Figure 3.4: Stabilité thermique de la cytochrome c oxydase chez deux variétés de blé (Norstar, une variété d'hiver et Katepwa, une variété de printemps) acclimatées au froid ainsi que chez leurs témoins non-acclimatés. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,50 contenant 600 mM KCl. L'activité enzymatique a été dosée grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. L'activité résiduelle exprimée en % a été calculée à partir des quantités de ferrocytochrome oxydé/min/g poids sec, rapportée à la valeur maximale obtenue avec l'enzyme non-dénaturée. Pour chaque variété, la dénaturation thermique a été réalisée en plaçant l'enzyme à une température supérieure de 10°C à la température optimale. Une quantité équivalente à 50 µg de protéines a été utilisée à chaque test pour chacune des deux variétés. Les valeurs sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats expérimentaux de 2 réplicats biologiques (N = 6).

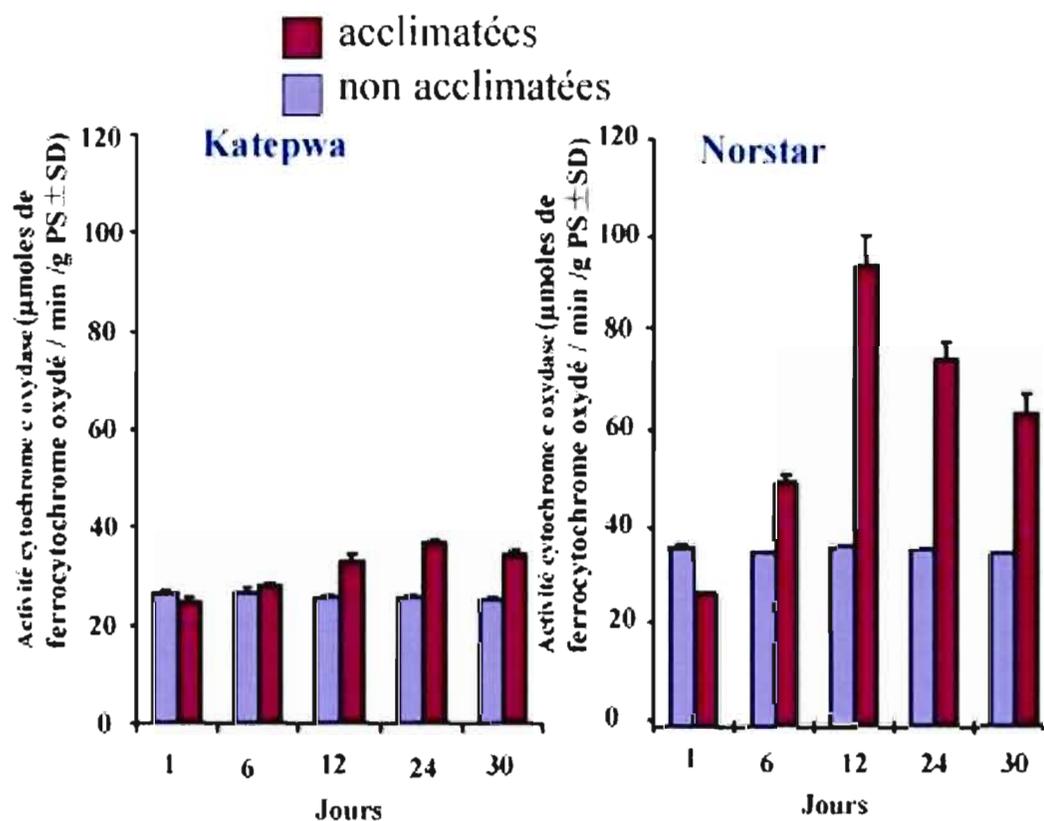


Figure 3.5: Activité cytochrome c oxydase en réponse au froid chez Katepwa (blé de printemps) et Norstar (blé d'hiver). Toutes les plantes ont été cultivées à 20°C pendant 7 jours puis celles à acclimater ont été transférées à 4°C et récoltées à différents jours. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,50 contenant 600 mM KCl à la température optimale de chaque variété. Le ferrocyanochrome a servi de substrat lors du dosage. L'activité enzymatique a été dosée grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les valeurs sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats techniques effectuées sur chacun des 2 réplicats biologiques (N = 6).

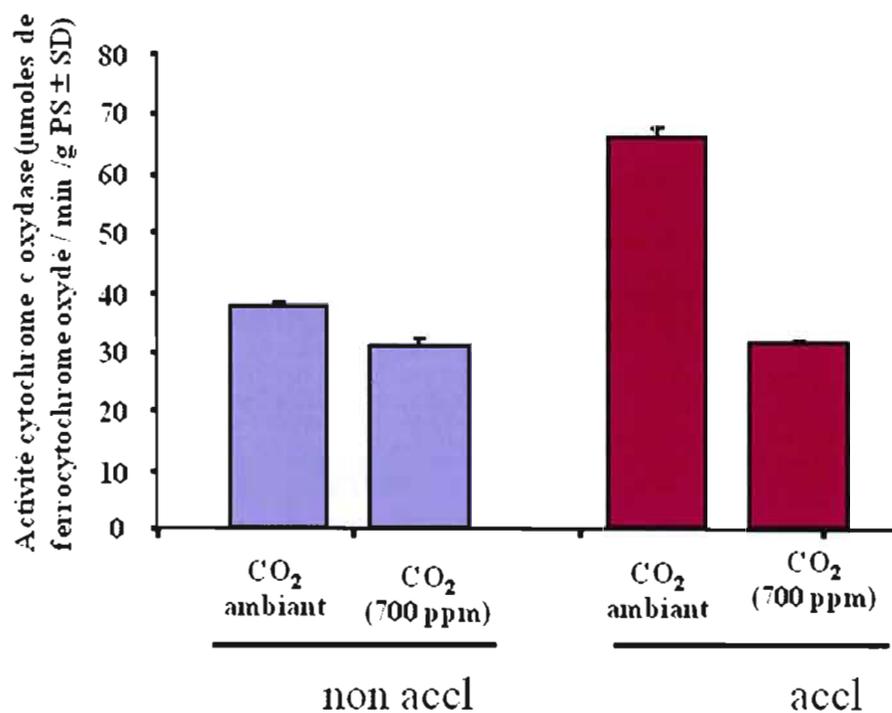


Figure 3.6: Activité cytochrome c oxydase en réponse à l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm) chez Norstar (blé d'hiver). Les plantes acclimatées (4°C) âgées de 75 jours et non-acclimatées (20°C) âgées de 25 jours ont été exposées à une concentration élevée de CO₂ pendant 80 heures. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,50 contenant 600 mM KCl à la température optimale (30°C) de l'enzyme. Le ferrocyanure a servi de substrat lors du dosage. L'activité enzymatique a été dosée grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les valeurs utilisées pour les représentations graphiques sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats techniques effectuées sur chacun des 2 réplicats biologiques (N = 6).

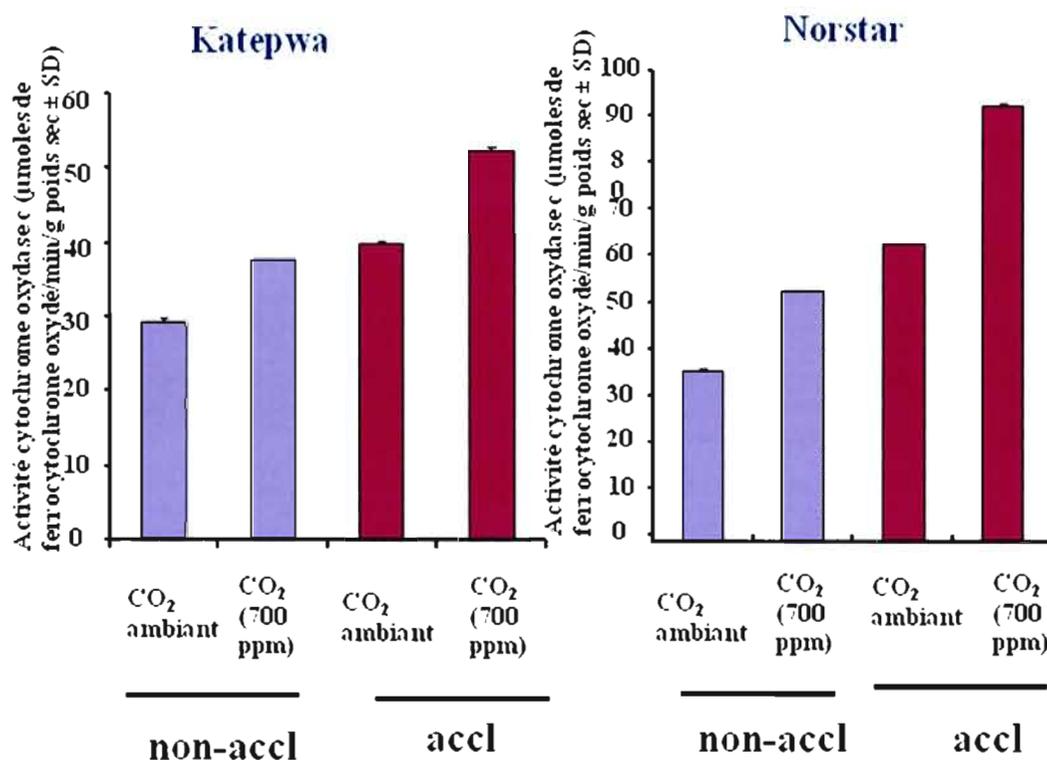


Figure 3.7: Activité cytochrome c oxydase en réponse à l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ (700 ppm) chez Katepwa et Norstar. Les plantes acclimatées (4°C) âgées de 75 jours et non-acclimatées (20°C) âgées de 25 jours ont été soumises de façon chronique au CO₂. Les dosages ont été effectués dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,50 contenant 600 mM KCl à la température optimale de chaque variété. Le ferrocyanure a servi de substrat lors du dosage. L'activité enzymatique a été dosée grâce à une méthode spectrophotométrique à 550 nm. Les valeurs sont des moyennes obtenues sur 3 réplicats techniques effectuées sur chacun des 2 réplicats biologiques (N = 6).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'acclimatation au froid induit de nombreuses modifications physiologiques, biochimiques, métaboliques et moléculaires. Les mécanismes physiologiques, notamment la photosynthèse et la respiration, sont généralement les premiers à être influencés par des changements de température (Ensminger *et al.*, 2006; Kocova *et al.*, 2009). Notre but était d'apporter une contribution à la compréhension des mécanismes de la régulation de la production énergétique lors de l'acclimatation au froid et lors d'une élévation du taux de CO₂. Pour ce faire, nous avons étudié chez deux variétés de blé l'implication du froid et d'une concentration élevée de CO₂ dans la régulation de l'activité cytochrome c oxydase, une enzyme clé de la production de l'ATP au cours du transfert d'électrons dans la membrane mitochondriale interne.

L'activité cytochrome c oxydase en réponse au froid

Les résultats de notre étude ont démontré une accumulation différentielle des protéines COX II entre Norstar, une variété de blé d'hiver et Katepwa, une variété de blé de printemps, en réponse au froid. Chez Norstar qui est très tolérant au froid et au gel, on a enregistré une accumulation des protéines COX II en réponse au froid. Ces résultats sont en accord avec des études similaires menées chez *Arabidopsis* (Armstrong *et al.*, 2008). En effet, ces auteurs ont démontré une relation entre l'accumulation des protéines COX II et le froid chez *Arabidopsis*. Leurs études ont montré que les protéines COX II s'accumulent au froid, ceci en comparant les feuilles des plantes contrôles cultivées à 21°C avec celles des plantes acclimatées au froid (5°C) pendant 4, 10 et 45 jours. Chez les feuilles de plantes acclimatées au froid durant 45 jours, un niveau d'expression de protéines COX II trois fois plus élevé a été observé comparativement aux feuilles de plantes traitées au froid durant 4 et 7 jours. Nos résultats montrent une corrélation entre l'accumulation de protéines COX II et la tolérance au froid et au gel. Ces résultats suggèrent donc l'implication des protéines

COX II dans le processus d'acclimatation au froid. L'activité cytochrome c oxydase augmente aussi en réponse au froid parallèlement à l'accumulation des protéines COX II. Cependant, cette augmentation est nettement plus importante chez la variété d'hiver, Norstar en comparaison avec celle de printemps, Katepwa. En effet, chez Norstar on a enregistré une hausse de 1,5 fois chez les plantes acclimatées au froid par rapport aux plantes non-acclimatées alors que cette hausse n'est que de 40% chez Katepwa. Des résultats similaires ont été observés chez *Arabidopsis* (Armstrong *et al.*, 2006). En effet, ces études ont démontré que la capacité de production énergétique par la cytochrome c oxydase est nettement supérieure chez les feuilles d'*Arabidopsis* acclimatées au froid que chez celles des plantes non-acclimatées d'*Arabidopsis*. Des études similaires également ont été menées chez les animaux, notamment chez les poissons. Une étude de l'activité cytochrome c oxydase chez *Gadus morhua* a démontré que l'activité de l'enzyme augmente en réponse au froid et que cette augmentation est plus significative chez la morue de la Mer du Nord, très froide (2°C à 4°C) que chez celle de la Mer de Barents, plus chaude (4°C à 18°C) (Lucassen *et al.*, 2006). Cette étude a aussi montré que les poissons adaptés au froid (4°C) ont une activité cytochrome c oxydase plus élevée que celle des poissons de la même espèce adaptés à 10°C.

En réponse au froid, on a observé chez Norstar d'une part une accumulation des protéines COX II et d'autre part une augmentation très importante de l'activité cytochrome c oxydase. Ces faits importants suggèrent une augmentation probable de la production d'ATP en réponse au froid. Rappelons qu'en présence de découpleurs de la phosphorylation oxydative, il est possible d'observer une augmentation de l'activité cytochrome c oxydase parallèlement à la diminution de la synthèse d'ATP. Basé sur les résultats obtenus sur cette présente étude, nous émettons l'hypothèse qu'une hausse de la production d'ATP pourrait survenir suite à une hausse de l'activité cytochrome c oxydase. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette hausse de la production énergétique.

Cette hausse pourrait être en partie la conséquence d'une concentration élevée de substrats dans les feuilles au cours de l'acclimatation au froid. En effet, le saccharose, le glucose et le fructose augmentent considérablement chez les feuilles d'*Arabidopsis* acclimatées au froid (Strand *et al.*, 1997). Des études ont rapporté une corrélation entre l'acclimatation au froid, l'accumulation des sucres et celle des hexoses phosphates (Talts *et al.*, 2004). Les résultats de ces études ont démontré que le transfert des plantes à basse température est suivi d'une augmentation de la quantité d'hexoses phosphates de plus de 3 fois chez les feuilles de plantes acclimatées au froid durant 45 jours en comparaison avec les feuilles de plantes non-acclimatées. L'augmentation de la production d'ATP pourrait provenir de l'utilisation de l'excès des métabolites accumulés dans les feuilles au cours de l'acclimatation au froid (Talts *et al.*, 2004). Dans ce cas, l'augmentation de la production d'ATP serait la conséquence d'une augmentation de l'activité photosynthétique, en réponse au froid. En effet des études menées chez le blé et chez *Arabidopsis*, ont démontré une augmentation de l'assimilation du CO₂ et de la photosynthèse nette en réponse au froid (Strand *et al.*, 1997). Les résultats de ces études ont aussi montré une augmentation du taux de la respiration chez les plantes de blé et de seigle acclimatées au froid. Il a également été rapporté que l'augmentation de la capacité photosynthétique des céréales d'hiver, induite par le froid, n'est pas seulement associée à la régulation à la hausse du métabolisme du carbone mais aussi à une augmentation du taux de transfert des électrons au niveau des chloroplastes (Savitch *et al.*, 1997). On peut donc imaginer que l'acclimatation au froid puisse provoquer une augmentation similaire du taux de transfert des électrons au niveau des mitochondries, ce qui augmenterait la production d'ATP. L'augmentation de production d'ATP en réponse au froid pourrait donc être la réponse à une demande métabolique. Par ailleurs, on pourrait imaginer que l'augmentation de l'activité cytochrome c oxydase entraîne une hausse de la synthèse d'ATP qui pourrait accélérer la photosynthèse pour augmenter la biomasse.

Il convient de noter que les enzymes impliquées dans la production énergétique mitochondriale sont localisées dans la membrane interne des mitochondries. La hausse de la production d'énergie au cours de l'acclimatation pourrait être le résultat d'une augmentation du nombre de mitochondries en réponse au froid. Plusieurs études ont été réalisées pour démontrer des modifications concernant les mitochondries au niveau des feuilles de plantes et au niveau des poissons durant l'acclimatation au froid. En effet, des études menées par (Miroslavov et Kravkina, 1991) chez différentes espèces végétales de montagnes ont démontré que les mitochondries étaient plus nombreuses chez les plantes plus adaptées au froid. D'autres études ont démontré que les feuilles de plantes *d'Arabidopsis* acclimatées au froid renferment beaucoup plus de mitochondries par unité de volume que les feuilles de plantes traitées au froid pendant seulement 4 à 10 jours (Armstrong *et al.*, 2006). L'acclimatation au froid (le plus souvent étudiée chez les poissons de l'hémisphère nord) est bien connue pour provoquer une augmentation de la capacité aérobie, qui se reflète par la hausse de la densité des mitochondries et/ou l'augmentation de la capacité des enzymes mitochondriales (Guderley, 1998). Chez quelques espèces de poissons, dont *Morone saxatilis* et *Carassius carassius*, il a été montré que la densité des mitochondries est supérieure chez les poissons les mieux adaptés au froid (Guderley H, 2004; Pörtner, 2002). Ces différentes études démontrent, qu'en réponse au froid, les cellules pourraient adapter l'activité mitochondriale à leurs besoins.

L'acclimatation au froid nécessite des réactions de biosynthèses impliquant plusieurs gènes notamment les gènes *CORs* (Miroslavov et Kravkina, 1991) ainsi que d'autres gènes permettant la synthèse de protéines enzymatiques et d'osmoprotectants. Il est aussi possible que les cellules diminuent certaines activités (la synthèse de certaines protéines); ce qui économiserait de l'énergie qui pourrait être redirigée. L'ensemble des synthèses, indispensables à la survie des plantes aux basses températures, exige une demande énergétique supplémentaire. Ceci explique également la hausse de la production d'ATP en réponse au froid.

Par ailleurs, une accumulation des protéines WCS120 a été chez les plantes de Norstar acclimatées au froid. On peut aussi imaginer une accumulation de protéines impliquées dans la protection des plantes contre le stress. C'est le cas par exemple, des protéines chaperones et des protéines de liaison. Ces protéines pourraient procurer à la cytochrome c oxydase une meilleure protection contre les basses températures. En outre, l'analyse des données biochimiques a montré des différences entre les paramètres cinétiques de la cytochrome c oxydase chez les deux variétés. En effet, les rapports V_{max}/K_m semblent montrer une meilleure performance de l'enzyme chez Norstar en comparaison avec Katepwa. De plus, les deux diffèrent dans leur réponse à la température. Chez Norstar, la cytochrome c oxydase présente une température optimale de 30°C contre 32°C chez Katepwa.

L'analyse de la dénaturation thermique de l'enzyme a montré une meilleure stabilité chez les plantes acclimatées au froid. Cette stabilité est plus significative chez Norstar que chez Katepwa (perte de 50% de l'activité en 11 minutes chez Norstar contre 50% en 5 minutes chez Katepwa). L'acclimatation au froid procure donc à la cytochrome c oxydase une meilleure performance.

Nos résultats montrent globalement une régulation de l'activité cytochrome c oxydase chez le blé en réponse au froid. L'augmentation de cette activité pourrait s'inscrire dans le cadre d'une reprogrammation globale des mécanismes de la plante en réponse au froid. En effet, il a été rapporté que l'augmentation de la capacité photosynthétique des céréales d'hiver durant l'acclimatation au froid résulte d'une reprogrammation globale des enzymes photosynthétiques et respiratoires impliquées dans le métabolisme du carbone (Hurry *et al.*, 1995; Stitt et Hurry, 2002).

L'activité cytochrome c oxydase en réponse à une concentration élevée de CO₂ de courte durée

Nos résultats ont montré qu'une exposition des plantes de Norstar à une concentration élevée de CO₂ de courte durée (80 heures) entraîne une baisse de

l'activité enzymatique de 20% chez les plantes non-acclimatées et de 50% chez les plantes acclimatées au froid. La concentration élevée de CO₂ de courte durée a probablement eu pour effet une réduction de la production d'ATP chez les plantes. Plusieurs facteurs pourraient expliquer cette baisse.

En règle générale, lorsque les cellules des plantes sont exposées subitement à un facteur de stress, on assiste la plupart du temps à une réduction de l'intensité des processus biologiques pendant un certain temps. Ce temps correspond au phénomène d'ajustement. La baisse de l'activité enzymatique suite à une exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ pourrait donc être expliquée en partie par le phénomène d'ajustement métabolique. D'ailleurs, une situation identique a été observée lorsque les plantes non-acclimatées au froid ont été subitement exposées à 4°C. Dans ce cas, on a assisté non seulement à une baisse du contenu en protéines mais également à une réduction de l'activité enzymatique en réponse au froid (cf paragraphe 3.4). Cependant, l'ajustement à lui seul n'expliquerait pas la baisse de production d'ATP puisque l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ a duré 80 heures et ce temps serait probablement suffisant pour permettre aux plantes de s'ajuster au CO₂. La baisse de la production d'ATP pourrait être expliquée par une réduction de l'activité cytochrome c oxydase suite à l'exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂. Cette diminution de l'activité est parallèle à une réduction de l'activité spécifique de l'enzyme. L'inhibition serait partielle et réversible car à long terme, on a enregistré une augmentation de l'activité de l'enzyme. Nos résultats concernant la baisse de la production énergétique des plantes de Norstar, en réponse à une concentration élevée de CO₂ de courte durée sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres études menées chez plusieurs espèces. En effet, des expériences (*in vitro*) menées chez *Dianthus caryophyllus* ont montré que les concentrations élevées de CO₂ diminuent les activités de certaines enzymes impliquées dans le transport des électrons comme la succinate déshydrogénase et la cytochrome c oxydase (González-Meler, 1995; Drake, *et al.*, 1997; Reuveni et Gale,

1995). Chez le soja, des résultats ont montré qu'une concentration de CO₂ équivalente au double de celle de l'atmosphère actuelle réduit l'activité de la cytochrome c oxydase et de la succinate déshydrogénase dans des mitochondries isolées à partir de cotylédons et des racines (González-Meler *et al.*, 1996). Chez *Rumex crispus*, il a été rapporté une réduction de 15 à 20% de la respiration chez les tissus végétaux maintenus à une concentration de CO₂ équivalente au double de la concentration actuelle (Alonso *et al.*, 1997 ; Amthor, 1997). L'ajustement métabolique et la réduction de l'activité cytochrome c oxydase pourraient probablement expliquer la baisse de l'activité cytochrome c oxydase à la suite d'une exposition des plantes à une concentration élevée de CO₂ de courte durée.

L'activité cytochrome c oxydase en réponse à une exposition chronique de CO₂ (700 ppm)

Les effets d'une concentration élevée de CO₂ de longue durée sur les plantes ont été étudiés chez les deux variétés de blé. Les résultats de notre étude ont démontré chez Norstar, une hausse de l'activité cytochrome c oxydase de près de 50% chez les plantes acclimatées au froid et de plus de 40% chez les plantes non-acclimatées. Chez Katepwa, cette hausse a été de 30% aussi bien chez les plantes acclimatées au froid que chez les plantes non-acclimatées. En réponse à une concentration élevée de CO₂, l'activité cytochrome c oxydase augmente de manière différentielle chez les deux variétés de blé. Cette hausse de l'activité enzymatique, qui pourrait se traduire par une augmentation de la production d'ATP, pourrait être expliquée par diverses modifications notamment les modifications physiologiques. L'activité photosynthétique augmente chez les plantes exposées à une concentration élevée de CO₂ (Fukayama *et al.*, 2009). Cette concentration pourrait mettre à la disposition des plantes un surplus de substrats (résultant de la fixation du CO₂) par rapport aux conditions normales. En réponse à cette hausse de la photosynthèse, on assisterait alors à une augmentation de la production énergétique. Cette explication paraît très

probable car l'augmentation de l'activité enzymatique chez les plantes de la variété Norstar acclimatée au froid (+50%) en présence d'une concentration élevée de CO₂ est supérieure à celle des plantes acclimatées au froid dans une atmosphère de CO₂ ambiant (42%). Ces résultats sont en accord avec ceux des études menées chez le blé et chez *Arabidopsis* (Bloom *et al.*, 2010). En effet, les concentrations élevées de CO₂ diminuent la photorespiration et améliorent initialement la photosynthèse et la croissance de près de 35% chez la plupart des plantes C₃. Ces conditions inhibent de façon compétitive la réaction d'oxygénation qui produit du glycolate nécessaire à la photorespiration (Long *et al.*, 2004). Les substrats initialement destinés à la photorespiration sont remis dans le cycle de production de composés organiques, ce qui augmente la capacité de photosynthèse. Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus chez le riz (Fukayama *et al.*, 2009). En effet, les résultats chez le riz ont démontré une augmentation de la biomasse sous des concentrations élevées de CO₂ (700 ppm contre 350 ppm). Ces concentrations, en stimulant la photosynthèse, créent une augmentation de la demande énergétique. Cependant cette augmentation diminue au cours du temps (de quelques jours à quelques années), ce qui traduit un phénomène connu sous le nom d'acclimation au CO₂ (Long *et al.*, 2004). En effet, selon ces auteurs, lorsque certaines espèces de plantes dont le blé sont exposées à une concentration élevée de CO₂, elles pourraient s'y acclimater. Ceci pourrait expliquer en partie une légère baisse du contenu en protéines malgré une longue exposition des plantes à la concentration élevée de CO₂. Par ailleurs, cette baisse du contenu protéique pourrait être expliquée par une réduction de l'activité certaines enzymes comme la nitrate réductase. En effet, des études sur les concentrations élevées de CO₂ ont montré une réduction de l'assimilation des nitrates chez le blé et chez *Arabidopsis* (Bloom *et al.*, 2010). Les modifications physiologiques au cours de la photosynthèse sont donc essentiellement responsables de l'augmentation de la production énergétique dans une atmosphère de concentration élevée de CO₂. Cette augmentation pourrait aussi être le résultat d'une induction (par le CO₂) des gènes impliqués dans la régulation énergétique.

CONCLUSION

L'accumulation différentielle des protéines COX II entre les deux variétés de blé, ainsi que l'augmentation différentielle de l'activité cytochrome c oxydase, en réponse au froid, montrent qu'il existe une corrélation entre la tolérance au froid et l'accumulation des protéines COX II. Cette enzyme s'exprime de manière différentielle en réponse au froid entre Norstar, une variété d'hiver et Katepwa, une variété de printemps. Elle est serait impliquée dans les processus d'acclimatation au froid.

En réponse à une concentration élevée de CO₂, la cytochrome c oxydase s'exprime aussi de manière différentielle entre les deux variétés. Elle semble donc associée à la tolérance au CO₂. La baisse de l'activité enzymatique à court terme et son augmentation à long terme chez les deux variétés de blé étudiées cadrent parfaitement au phénomène d'acclimatation au CO₂. Notons par ailleurs que la répartition géographique du blé dans le monde est la preuve que cette espèce est sans doute l'une des espèces les plus aptes à s'adapter face à divers facteurs environnementaux et climatiques. L'élévation de la teneur en CO₂ dans l'atmosphère pourrait favoriser l'augmentation de la biomasse chez le blé dans les pays tempérés comme le Canada. Cependant, une réduction de l'assimilation des nitrates sous des concentrations élevées de CO₂ pourrait affecter la qualité des composés organiques issus de la photosynthèse car cette réduction appauvrirait les matières organiques en protéines. En définitive, une concentration élevée de CO₂ tout en augmentant la biomasse, pourrait négativement affecter la qualité des aliments.

L'augmentation de la production énergétique observée chez les deux variétés de blé en réponse au froid et à une concentration élevée de CO₂ serait due à une demande supplémentaire consécutive à la hausse de la capacité photosynthétique. Les cellules des plantes pourraient répondre à cette demande en augmentant le nombre de mitochondries, la synthèse des métabolites et les capacités oxydatives des enzymes mitochondriales. L'énergie produite par les plantes au cours de l'acclimation au froid

et dans une atmosphère de concentration élevée de CO₂ servirait aux divers mécanismes indispensables pour les modifications nécessaires à la survie dans ces conditions. Parmi ces mécanismes, la photosynthèse et la respiration occupent une place fondamentale aussi bien lors de l'acclimatation au froid qu'en présence d'une concentration élevée de CO₂.

L'ensemble de nos résultats démontre qu'en réponse au froid et à une concentration élevée de CO₂ l'activité cytochrome c oxydase serait régulée à la hausse chez le blé. L'accumulation différentielle des protéines COX II en réponse au froid ainsi que l'augmentation différentielle de l'activité cytochrome c oxydase entre les deux variétés semblent en faveur d'une régulation au niveau génétique. Cette régulation mérite une étude plus approfondie afin de comprendre, au niveau génétique, comment le gène *COX II* et probablement d'autres gènes assurent cette régulation.

RÉFÉRENCES

- Ainstworth, E A et A. Rogers. 2007. «The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions». *Plant Cell Environ*, vol. 30, p. 258-270.
- Ainsworth, E A et S P. Long. 2004. «What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂». *New Phytol* vol. 165, p. 351-372.
- Allard, F M. Houde, M. Krol, A. Ivanov, N PA. Huner et F. Sarhan. 1998. «Betaine improves freezing tolerance in wheat». *Plant Cell Physiol*, vol. 39, p.1194-1202.
- Alonso, A, C S. Queiroz et A C. Magalhaes. 1997. «Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L) seedlings». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembr*, vol. 1323, p. 75-84.
- Amthor, J S. 1997. «Plant respiratory responses to elevated CO₂ partial pressure». *American Society of Agronomy Special Publication*, p. 35-77.
- Armstrong, A, D C. Logan, A K. Tobin, P. O'toole et O K. Atkin. 2006. «Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves». *Plant Cell Environ*, vol. 29, p. 940-949.
- Armstrong, A F, M R. Badger, D A. Day, M M. Barthelet, P M C. Smith, A H. Millar, J. Whelan et O K. Atkin. 2008. «Dynamic changes in the mitochondrial electron transport chain underpinning cold acclimation of leaf respiration». *Plant Cell Environ*, vol. 31, p. 1156-1169.
- Badawi, M, Y V. Reddy, Z. Agharbaoui, Y. Tominaga, J. Danyluk, F. Sarhan et M. Houde. 2008. «Structure and functional analysis of wheat ICE (Inducer of CBF Expression) genes». *Plant Cell Physiol*, vol. 49, p. 1237-1249.
- Ballinger, S W, T G. Schurr, A. Torron, Y Y. Gan, J A. Hodge, K. Hassan, K H. Chen et D C. Wallace. 1992. «Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient mongoloid migrations». *Genetics*, vol. 130, p. 139-152.
- Barker, D H, B R. Loveys, J J G. Egerton, Gorton H, W E. Williams et M C. Ball. 2005. «CO₂ enrichment predisposes foliage of a eucalypt to freezing injury and reduces spring growth». *Plant Cell Environ*, vol. 28, p. 1506-1515.

- Bernacchi, C J, C. Pimentel et S P. Long. 2003. «In vivo temperature response functions of parameters required to model RuBP-limited photosynthesis». *Plant Cell Environ*, vol. 26, p. 1419-1430.
- Bertrand, A D. Prevost, F J. Bigras et Y. Castonguay. 2007. «Elevated Atmospheric CO₂ and Strain of Rhizobium Alter Freezing Tolerance and Cold-induced Molecular Changes in Alfalfa (*Medicago sativa*)». *Annals of Botany*, vol. 99 p. 275-284.
- Bloom, J A, M. Burger, J S R. Asensio, A B. Cousins et 2010. «Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis thaliana*». *Science*, vol. 328, p. 899-903.
- Borovskii, G B, I V. Stupnikova, A I. Antipina, O S. Anuchina et V K. Voinikov. 2005. «Association of dehydrins with wheat mitochondria during low-temperature adaptation». *Rus. J. Plant Physiol*, vol. 52, p. 194-198.
- Breton, G, J. Danyluk, F. Ouellet et F. Sarhan. 2000. «Biotechnological applications of plant freezing associated proteins ». *Biot. Ann. Rev*, vol. 6, p. 59-101.
- Browse, J, et Z. Xin. 2001. «Temperature sensing and cold acclimation». *Curr. Opin. Plant Biol*, vol. 4, p. 241-246.
- Cann, R L, et A C. Wilson. 1983. «Length mutations in human mitochondrial DNA». *Genetics*, vol. 104, p. 699-711.
- Cardoso, S, M M T. Proença, S. Santos, I. Santana et C R. Oliveir. 2004. «Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease». *Neurobiol. Aging*, vol. 25, p. 105-110.
- Chinnusamy, V, G. Zhizhong et J-K. Zhu. 2008. «Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses». *J. Integr. Plant Biol*, vol. 50, p. 1187-1195.
- Chinnusamy, V, et J K. Zhu. 2006. «Gene regulation during cold acclimation in plants». *Physiol Plant*, vol. 126, p. 52-61.
- Cornic, G, F-W. Badeck, J. Ghashghaie et N. Manuel. 1999. «Effect of temperature on net CO₂ uptake, stomatal conductance for CO₂ and quantum yield of photosystem II photochemistry of dehydrated pea leaves». *European community*, vol. 92, no 828, p. 6947- 6954.

- Cross, RL, D. Cunningham et J K Tamura. 1984. «Binding change mechanism for ATP synthetis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation». *Cell. Regul*, vol. 24, p. 335-344.
- Dalen, LS, O Johnsen et G. Ogner. 2001. «CO₂ enrichment and development of freezing tolerance in Norway spruce». *Physiol Plant*, vol. 113, p. 533-540.
- Dansereau, K A. 2007. «The role of plant water deficits on cold tolerance during cold acclimation of cold tolerant (*Poncirus trifoliata*) and cold sensitive (*Citrus unshiu*) species». These of Master Auburn University, p. 83 Pages
- Danyluk, J, M. Houde, E. Rassart et F. Sarhan. 1994. «Differential expression of gene encoding an acid dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerance gramineae species». *FEBS Lett*, vol. 344, p. 20-24.
- Deshnium, P, Z. Gombos, Y. Nishiyama et N. Murata. 1997. «The action in vivo of glycine betaïne in enhancement of tolerance of synechococcus sp. Strain PCC 7942 to low temperaturre». *J. Bact*, vol. 179, p. 339-344.
- Drake, BG, M A. Gonzalez-Meler et S P. Long. 1997. «More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂». *Ann. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol*, vol. 48, p. 609- 639.
- Drake, R P. 1999. «Laboratory experiments to simulate the hydrodynamics of supernova remnants and supernovae». *J. Geophys. Res*, vol. 104, no 14, p. 505-514.
- Dukes, J S, N R. Chiariello, E E. Cleland, L A. Moore, Shaw M R, S. Thayer, T. Tobeck, H A. Mooney et C B. Field. 2005. «Responses of Grassland Production to Single and Multiple Global Environmental Changes». *PLoS. Biol*, vol. 3, p. 1829-1837.
- Ensminger, I, F. Busch et N P A. Huner. 2006. «Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis». *Physiol Plant* vol. 126, p. 28-44.
- FAO. 2001. «The state of food and agriculture 2001. Food and agriculture organization of the United Nations» Rome (<http://www.fao.org>)
- Fukayama, H, F. Takuya, M Y. Chisato, H S. Taniguchi, C. Weiguo, H. Toshihiro et M. Mitsue. 2009. «Rice plant response to long term CO₂ enrichment: Gene expression profiling». *Plant Science*, vol. 177, p. 203-210.

- Gilmour, S J, A M. Sebolt, M P. Salazar, J D. Everard et M F. Thomashow. 2000. «Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation». *Plant Physiol*, vol. 124, p. 1854-1865.
- González-Meler, M A. 1995. «Effects of increasing atmospheric concentration of carbon dioxide on plant respiration ». Thèse Ph. D.Univ. Barc, Barcelona.
- González-Meler, M A., M. Ribas-Carbo, J N. Siedow et B G. Drake. 1996. «Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂». *Plant Physiol*, vol. 112, p. 1349-1355.
- Gray, G R, L P. Chauvin, F. Sarhan et N P A. Huner. 1997. «Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature». *Plant Physiol*, vol. 114, p. 467-474
- Gray, G R, L V. Savitch, A. Ivanov et N P A. Huner. 1996. «Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye». *Plant Physiol*, vol. 110, p. 61-71.
- Grossi, M, E. Giorni, F. Rizza, A M. Stanca et L. Cattivelli. 1998. «Wild and cultivated barleys show differences in the expression pattern of a cold-regulated gene family under different light and temperature conditions». *Plant Mol Biol*, vol. 38, p. 1061-1069.
- Guderley, H. 2004. «Metabolic responses to low temperature in fish muscle». *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, vol. 79, no 2, p. 409-4027.
- Guderley, H. 1998. «Temperature and growth rates as modulators of the metabolic capacities of fish muscle». vol. *Cold Ocean Physiol.* (ed. H-O. Pörtner and R. Playle): Cambridge University Press, p. 58-87.
- Guderley, H. 2004. «Metabolic responses to low temperature in fish muscle». *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, vol. 79, p. 409-427.
- Guy, C L. 1990. «Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, vol. 41, p. 187-223.
- Han, Q, et Y. Mukai. 1999. «Cold Acclimation and Photoinhibition of Photosynthesis Accompanied by Needle Color Changes in *Cryptomeria japonica* during the Winter». *J. For. Res.*, vol. 4, p. 229-234.

- Hinkle, P C, M A. Kumar, A. Resetar et D L. Harris. 1991. «Mechanism stoichiometry of mitochondrial oxydative phosphorylation». *Biochemistry*, vol. 30, p. 3576-3582.
- Hirihara, S, M. Hirai, Suutou Y, K. Shimizu et K. Omoto. 1992. «Frequency of a 9-bp deletion in the mitochondrial DNA among Asian populations». *Hum. Biol*, vol. 64, p. 161-166.
- Högy, P, H. Wieser, P. Köhler, K. Schwadorf, J. Franzaring et A. Fangmeier. 2009. «Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment». *Plant Biol (Stuttg). Suppl 1*, p. 60-69.
- Hong-Bo, S, C. Li-Ye et S. Ming-An. 2008. «Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress». *Bioassays*, vol. 30, p. 634-641.
- Hou, YD, ZF. Guo, Y. Yi, HN. Li et HG. Li. 2010. «Effects of cold acclimation and exogenous phytohormone abscisic acid treatment on physiological indicators of winterness wheat». *J. Plant Science*, vol. 5, p. 125-136.
- Houde, M, S. Dallaire, D. N'Dong et F. Sarhan. 2004. «Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves». *Plant Biotechnol. J*, vol. 2, p. 381-387.
- Houde, M., J. Danyluk et F. Sarhan. 1992. «A molecular marker to select for freezing tolerance in gramineae». *Mol. Gen. Genet*, vol. 234, p. 43-48.
- Huang, D J, M R. Paradat, W. Wu, S J. Ambrose, A R. Ross, S R. Abrams et A J. Cutler. 2007. «Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*». *Plant J*, vol. 50, no 414-428.
- Hughes, M A, M A. Dunn et 1996. «The molecular biology of plant acclimatation to low temperature: ». *J. exper. Bot*, vol. 47, p. 291-305.
- Hurry, V M, A. Strand, M. Tabiaeson, P. Gardeström et G. Öquist. 1995. «Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content». *Plant Physiol*, vol. 109, p. 697-706.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2001. «Climate change: the scientific basis». Cambridge University Press.

- Jaglo, K R, S J. Gilmour, D G. Zarka, O. Schabenberger et M F. Thomashow. 1998. «*Arabidopsis thaliana* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance». *Science*, vol. 280, p. 104-106.
- Jaglo, K R, S. Kleff, K L. Amudsen, X. Zhang, V. Haake, J Z. Zhang, T. Deits et M F. Thomashov. 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*, vol. 127, no 3, p. 910-917.
- Juszczuk, I M, et A M. Rychter. 2003. «Alternative oxidase in higher plants» *Rev. Acta.biochim.polon*, vol. 50 no 4, p.1257-1271
- Kadenbach, B, J. Jarausch, R. Hartmann et P. Merle. 1983. «Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure». *Anal. Biochem*, vol. 129, p. 517-521.
- Kaplan, B, D Y. Sung et C L. Guy. 2006b. «Roles of betaamylase and starch breakdown during temperatures stress». *Physiol Plant*, vol. 126, p. 120-128.
- Kaplan, B, O. Davydov, H. Knight, Y. Galon, M R. Knight, R. Fluhr et H. Fromm. 2006a. «Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Cell Environ*, vol. 18, p. 2733-2748.
- Kocova, M, D. Hola, N. Wilhelmova et O. Rothova. 2009. «The influence of low-temperature on the photochemical activity of chloroplasts and activity of antioxidant enzymes in maize leaves». *Biol. Plant*, vol. 53, p. 475-483.
- Kumar, S V, et P A. Wigge. 2010. «H2AZ-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis thaliana*». *Cell. Regul*, vol. 140, p. 136-147.
- Lang, V M, B. Welin, B. Sundberg et E T. Palva. 1994. «Alterations in water status, endogenous abscisic acid content and expression of rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Physiol*, vol. 104, p. 1341-1349.
- Li, P, S. Allan et P M. Shrinivasrao. 2006. «Response diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes in elevated [CO₂] in the field». *Plant Mol Biol*, vol. 62, p. 593- 609.

- Lineweaver, H, et D. Burk. 1934. «The Determination of Enzyme Dissociation Constants». *J. Amer. Chem. Soc.*, vol. 56, p. 658-666.
- Livingston, D P, R. Premakumar et S P. Tallury. 2006. «Carbohydrate partitioning between upper and lower regions of the crown in oat and rye during cold acclimation and freezing». *Cryobiology*, vol. 52, p. 200-208.
- Lloyd , A W, C J. Ollif et K J. Rutt. 1994. «A study of modified betaines as cryoprotective additives». *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 46, p. 704-707.
- Long, S P, E A. Ainsworth, A. Rogers et D R. Ort. 2004. «Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future». *Ann. Rev. Plant Biol.*, vol. 55, p. 591-628
- Lucassen, M, N. Koschnick, LG. Eckerle et H-O. Pörtner. 2006. «Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones». *J. Exp. Biol.*, vol. 209, p. 2462-2471.
- Martindale, W, et R C. Leegood. 1997. «Acclimation of photosynthesis to low temperature in *Spinacia oleracea* L. Effects of acclimation on CO₂ assimilation and carbon partitioning». *J. Exp. Bot.*, vol. 48, no 315, p. 1865-1872.
- Marzanna, S, K. Mieczyslaw, M. Kubacka-zebalska et A. Kacperska. 1999. «Low Temperature Affects Pattern of Leaf Growth and Structure of Cell Walls in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L var. *oleifera* L.)». *Ann. Bot.*, vol. 84, p. 313-319.
- McNeil, S D, M L. Nuccio et A D. Hanson. 1999. «Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance». *Plant Physiol.*, vol. 120, p. 945-949.
- Minorsky, P V, et R M. Spanswick. 1989. «Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings». *Plant Cell. Environ.*, vol. 12, p. 137-143
- Miroslavov, E A, et I M. Kravkina. 1991. «Comparative analysis of chloroplasts and mitochondria in leaf chlorenchyma from mountain plants grown at different altitudes». *Ann. Bot.*, vol. 68, p. 195-200.
- Monroy, A F, et R S. Dhindsa. 1995. «Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of *Alfalfa* by calcium at 25 degrees C». *Plant Cell*, vol. 7, p. 321-331.

- Monroy, A F, F. Sarhan et R S. Dhindsa. 1993. «Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression». *Plant Physiol*, vol. 102, p. 1127-1135.
- Mortley, D, J. Hill, P. Loretan, C. Bonsi, W. Hill, D. Hileman et A. Terse. 1996. «Elevated carbon dioxide influences yield and photosynthetic responses of hydroponically-grown sweet potato». *Acta Hortic*, vol. 440, p. 31-36.
- N'Dong, C, J. Danyluk, N P A. Huner et F. Sarhan. 2001. «Survey of gene expression in winter rye during changes in growth temperature, irradiance or excitation pressure». *Plant Mol Biol*, vol. 45, p. 691-703
- N'Dong, C, J. Danyluk, K E. Wilson, T. Pocock, N P A. Huner et F. Sarhan. 2002. «Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses». *Plant Physiol*, vol. 129, p. 1368-1381.
- N'Dong C N, J. Danyluk, K E. Wilson, T. Pocock, N P A. Huner et F. Sarhan. 2002. «Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses». *Plant Physiol*, vol. 129, p. 1368-1381.
- Nakashima, K, et K. Yamaguchi-Shinozaki. 2006. «Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants». *Physiol. Plant*, vol. 126, p. 62-71.
- Orvar, B L, V. Sangwan, F. Omann et R S. Dhindsa. 2000. «Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity». vol. 23 *Plant J*, p. 785-794.
- Papadopoulo, L C, C M. Sue, M M. Davidson, K. Tanji, I. Nishino, J E. Sadlock, S. Krishna, W. Walker, J. Selby, D M. Glerum, R V. Coster, G. Lyon, E. Scalais, R. Lebel, P. Kaplan, S. Shanske, D C. De vivo, E. Bonila, M. Hirano, S. DiMauro et E A. Schon. 1999. «Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene». *Nat. Genet*, vol. 23, no 3, p. 333-337.
- Parker, W D Jr, M D. Christopher, M D. Filly et J K. Parks. 1990. «Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease». *Neurology*, vol. 40, p. 1302-1303.
- Pearce, R S. 1999. «Molecular analysis of acclimation to cold». *Plant Growth Regulation*, vol. 29, p. 47-76.

- Penfield, S. 2008. «Temperature perception and signal transduction in plants». *New Phytol*, vol. 179, p. 615-628.
- Perras, M, et F. Sarhan. 1984. «Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides». *Physiol. Planta*, vol. 60, p. 129-132.
- Pfannschmidt, T, A. Nilsson et J F. Allen. 1999. «Photosynthetic control of chloroplast gene expression». *Nature*, vol. 397, p. 625- 628.
- Pörtner, H-O. 2002. «Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms». *J. Exper. Biol*, vol. 205, p. 2217-2230.
- Quail, P H. 1979. «Plant cell fractionation». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, vol. 130, p. 425-48.
- Rasmusson, AG, A R Fernie et J T. van Dongen. 2009 «Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations?» *Physiol Plant*, vol. 137, p. 371-82.
- Rasse, D P, Peresta. Gary, G. Bert et B G. Drake. 2005. «Seventeen years of elevated CO₂ exposure in a Chesapeake Bay Wetland: sustained but contrasting responses of plant growth and CO₂ uptake. Globale». *Change Biol*, vol. 11, p. 369-377.
- Reuveni, J, et J. Gale. 1995. «The effect of heigh levels of carbon dioxide on dark respiration and growth of plants». *Ann. Bot*, vol. 75, p. 365-368.
- Rhodes, D, et A D. Hanson. 1993. «Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, vol. 44, p. 357-384.
- Roland, F, E. Baena-Gonzalez et J. Sheen. 2006. «Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms». *Ann. Rev. Plant Biol*, vol. 57, p. 675-709.
- Sakamoto, A, H. Alia et N. Murata. 1998. «Metabolism engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to salt and cold». *Plant Mol. Biol*, vol. 38, p. 1011-1019.
- Sarhan, F, F. Ouellet et T A. Vazquez. 1997. «The wheat WCS120 gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals». *Physiol. Plant*, vol. 101, p. 439- 445.

- Sasaki, H, I. Kazuo, I. Shigeo et Y. Shohei. 2001. «Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase, but not acid invertase, are regulated by cold acclimation and deacclimation in cabbage seedlings». *Plant Physiol*, vol.158, p. 847-852.
- Savitch, L V, G R. Gray et N P A. Huner. 1997. «Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat». *Planta*, vol. 201, p. 18-26.
- Steponkus, P L, et D V. Lynch. 1989. «Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation». *J.Bioenerg.Biomembr*, vol. 21, p. 21-41
- Stitt, M, et V M. Hurry. 2002. «A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*». *Curr. Opin. Plant Biol*, vol. 5, p. 199-206.
- Stott, P A, et J A. Kettleborough. 2002. «Origins and estimates of uncertainty in twenty-first century temperature rise». *Nature*, vol. 416, p. 723-725.
- Strand, A, V. Hurry, P. Gustafsson et P. Gardström. 1997. «Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates». *Plant J*, vol. 12, p. 605-614.
- Stupnikova, I V, G B. Borovskii et V K. Voinikov. 2004. «Seasonal changes in the composition and content of dehydrines in winter wheat plants». *Rus. J. Plant. Physiol*, vol. 51, p. 636-641.
- Suzuki, N, et R. Mittler. 2006. «Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction». *Physiol. Plant*, vol. 126, p. 45-51.
- Svensson, J T, C. Crosatti, Campoli C, R. Bassi, A M. Stanca, T J. Close et L. Cattivelli. 2006. «Transcriptome analysis of cold acclimation in barley Albina and Xantha mutants». *Plant Physiol*, vol. 141, p. 257-270.
- Talts, P, T. Pärnik, P. Gardeström et O. Keerberg. 2004. «Respiratory acclimation in *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperature». *Plant Physiol*, vol. 161, p. 573-579.

- Terry, A C, W P. Quick et D J. Beerling. 2000. «Long-term growth of Ginkgo with CO₂ enrichment increases leaf ice nucleation temperatures and limits recovery of the photosynthetic system from freezing». *Plant Physiol*, vol. 124, p. 183-190.
- Thomashow, M F. 1999. «Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance». *Plant Physiol*, vol. 118, p. 1-8.
- Thomashow, M F, S J. Gilmour, E J. Stockinger, K R. Jaglo-Ottosen et D G. Zarka. 2001. «Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation». *Physiol. Plant*, vol. 112, p. 171-175.
- Vagujfalvi, A. , G. Galiba, L. Cattivelli et J. Dubcovsky. 2003. «The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A». *Mol. Genet. Gen.*, vol. 269, p. 60-67.
- Vagujfalvi, A, I Kerepesi, G. Galiba, T. Tischner et J. Sutka. 1999. «Frost hardiness depending carbohydrates changes during cold acclimation». *J. Plant Science*, vol. 144, p. 85-92.
- van Dongen, J T, K J. Gupta, S J. Ramirez-Aguilar, W L. Araújo, A. Nunes-Nesi et AR. Fernie. 2011. «Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways». *J.Plant Physiol*, doi:10.1016/j.jplph.2010.11.004
- Vitamvas P, et Prasil I T. 2008. «WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat». *Plant Physiol*, vol. 46, p. 970-976.
- Vitamvas, P, G. Saalbach, I T. Prasil, V. Capkova, Opatrna. J. et J. Ahmed. 2007. «WCS120 protein family and proteins soluble upon boiling in cold-acclimated winter wheat». *Plant Physiol*, vol. 164, p. 1197-1207.
- Wanner, L A, et O. Junttila. 1999. «Cold induced freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*». *Plant Physiol*, vol. 120, p. 391-399.
- Wayne, P M, E G. Reekie et FA. Bazzaz. 1998. «Elevated CO₂ ameliorates birch response to high temperature and frost stress: implications for modelling climate-induced geographic range shifts». *Oecologia*, vol. 114, p. 335-342.
- Wheeler, R M, C L. Mackowiak, N C. Yorio et J C. Sager. 1999. «Effects of CO₂ on stomatal conductance: do stomata open at very high CO₂ concentrations?». *Ann. Bot.*, vol. 83, no 243-251.

- Winfield, M O, Lu. Chungui, D W. Ian et J E. Keith. 2010. «Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat». *Plant Biotechnol. J*, vol. 8, p. 749-771.
- Xin, Z, et J. Browse. 2000. «Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures». *Plant. Cell. Environ*, vol. 23, p. 893-902.
- Xiong, L, K S. Schumaker et J K. Zhu. 2002. «Cell signalling during cold, drought, and salt stress». *Plant Cell*, vol. 14, no Suppl, p. 165-183.
- Zagoskina, N V, N A. Olenichenko, S V. Klimov, N V. Astakhova, E A. Zhivukhina et T I. Trunova. 2005. «The Effects of Cold Acclimation of Winter Wheat Plants on Changes in CO₂ Exchange and Phenolic Compound Formation». *Rus. J. Plant Physiol*, vol. 52, p. 320-325.
- Zhou, B L, K. Arakawa, S. Fujikawa et S. Yoshida. 1994. «Cold induced alteration in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat». *Plant Cell. Physiol*, vol. 35, p. 175-182
- Zhu, Sai-Y, X C. Yu, X J. Wang, R. Zhao, Y. Li, R C. Fan, Yi. Shang et S Y. Du. 2007. «Two Calcium-Dependent Protein Kinases, CPK4 and CPK11, Regulate Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. American Society of Plant Biologists». *Plant Cell*, vol. 19, p. 3019-3036.