



 N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille U.F.R. de Biologie

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université de Lille 1 Stratégies d'Exploitation des Fonctions Biologiques

Tolérance au gel après acclimatation au froid chez le pois : Identification de protéines et cartographie de PQL et QTL.

par Estelle DUMONT

Thèse dirigée par les co-directeurs : Jean-Louis HILBERT et Bruno DELBREIL Soutenue le 18 juin 2008

Jury :

J. Burstin (Directeur de recherches, INRA)	Rapporteur
E. Téoulé (Maître de conférences, Université de Paris VI)	Rapporteur
M. Zivy (Chargé de recherches, CNRS, Ferme du Moulon)	Examinateur
H. Hondermarck (Professeur, INSERM-USTL)	Examinateur
J. Le Gouis (Directeur de recherches, INRA)	Examinateur
I. Lejeune-Hénaut (Chargé de recherches, UMR INRA-USTL)	Examinateur
J-L. Hilbert (Professeur, UMR INRA-USTL)	Directeur
B. Delbreil (Maître de conférences, UMR INRA-USTL)	Co-directeur

Remerciements

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse. J'espère n'oublier personne… et si c'est le cas, j'espère que ces personnes me pardonneront parce qu'il y a déjà bien longtemps que je suis arrivée au laboratoire…

Je vais commencer ces remerciements par Jean-Louis Hilbert qui a accepté de m'accueillir pour mon DEA puis ma thèse dans son laboratoire qui s'intitulait alors "laboratoire de physiologie de la différenciation végétale" et qui depuis s'est transformé en "UMR USTL-INRA 1281 SADV (Stress et Adaptations Des Végétaux cultivés)".

Merci aussi à Bruno Delbreil, co-directeur de thèse, qui a suivi son déroulement plus particulièrement pour la partie protéomique et qui a lu et relu cette thèse et les articles. Merci à Christophe Vuylsteker pour la partie "métabolomique" et son aide précieuse lors des interminables séances de broyage, mais aussi pour les extractions de sucres et leur dosage par HPLC. Merci à Nasser Bahrman pour ses explications en statistiques et l'apprentissage de l'utilisation du logiciel SAS entre autres, ainsi que pour les heures passées à discuter de génétique qui n'est pas mon fort, merci pour sa patience ! Merci pour son aide pour les articles. Merci à Estelle Goulas (alias la grande Estelle) pour son soutien, ses conseils pour le manuscrit et l'article, ainsi que pour les pauses glace en Italie.

Merci à Isabelle Lejeune-Hénaut et Eric Hanocq pour leur initiation aux QTL... Ils ont dû être très patients avec moi et ils ont été très disponibles

Remerciements

malgré la distance qui nous séparait pour l'article. Merci aussi à Véronique Fontaine pour son aide lors de la rédaction de l'article. Je tiens à remercier toute l'équipe de l'INRA de Mons qui a permis la mise en place et le suivi des manips en chambre climatisée. Je pense surtout à Hélène Sellier qui a ensuite été épaulée par Benoît Decaux. Merci pour le soin apporté aux petits pois et pour les notations fastidieuses des stades et notes de gel... et toutes les autres mesures réalisées pour notre étude. Merci à l'équipe pois qui m'a accueillie, avec Christophe, pour leur repas de Noël (l'année prochaine, os à la moelle ?), merci à tous ceux qui nous ont donné un coup de main lors des récoltes, surtout pour celle des lignées recombinantes avec le découpage en "chambre froide" qui a duré toute la journée... alors merci à Rosemonde Devaux, Dominique Rabier, Komlan Avia, Martine Niarquin...

Merci à l'équipe de la ferme du Moulon de Gif-sur-Yvette pour l'ambiance que j'y ai trouvé lors de mes déplacements pour l'identification de nos protéines par spectrométrie de masse. Un grand merci à Benoît Valot pour ses explications de la technique et des logiciels utilisés pour l'identification. Merci pour son ingéniosité qui facilite le travail grâce à de petits programmes de sa création, merci pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci aussi à Michel Zivy pour son aide en statistiques et le tri des données, merci aussi d'avoir participé à mon comité de thèse et de nous avoir aiguillés.

Merci à toutes les personnes de l'UMR qui ont eu la gentillesse de lire les 2 articles et de me donner leur avis, et merci à Jacques Le Gouis (INRA Clermont-Ferrand) et Jenny Renaut (Institut Gabriel Lippmann, Luxembourg) pour leur lecture assidue. Je tiens aussi à remercier Judith Burstin pour avoir accepté de faire partie du jury en tant que rapporteur et merci à Evelyne Téoulé qui a suivi, avec Michel Zivy, mon travail lors des 2 comités de thèse et qui est rapporteur pour ma thèse.

Merci à Najia Voedts qui a participé aux broyages et à l'extraction des sucres ce qui m'a beaucoup aidée. Merci pour sa bonne humeur et son courage. Merci aussi à Eric Boulleaux pour le broyage et la préparation des solutions ainsi que le remplissage des bidons de 5L... pour la protéomique. Merci aux 2 stagiaires qui m'ont aidée. Tout d'abord Letizia, étudiante italienne qui a assisté au démarrage de la nouvelle HPLC avec injecteur automatique (ce qui nous a facilité la vie à Christophe et à moi). Ensuite Dev avec qui nous avons testé la cuve Ettan Dalt 12 et le DodecaStainer puis réalisé les gels de racines. Bon courage à lui pour sa thèse à Lausanne sur les champignons... des pieds !

Merci à tous les thésards de notre bureau... Les anciens (David et Clara), le moins ancien (Sylvain, futur papa, qui me fait croire que Pearl peut tout faire, même rédiger une thèse...), et ceux toujours présents par ordre d'ancienneté : Ildephonse (avec qui j'étais en DEA et qui, par intermittence, nous rend visite), Aline (spécialiste es QTL), Meriem (danseuse brésilienne), Jovana (qui m'a permis de me sentir moins seule parmi les chicorées...) et Lucy (pro en informatique, remplaçante de David et Sylvain ?). Merci aussi à Ahmad (de retour chez lui) et à Mohammed (bonne chance pour la fin de thèse...).

Merci aussi à Philippe Hance, industriel mais toujours étudiant dans l'âme, à Christelle Blassiau pour sa gentillesse et son écoute, à Monica Morchen avec qui j'ai passé de nombreuses heures en salle informatique à partager l'ordinateur et à manger des biscuits bio, à Thierry Cadalen toujours prêt à rendre service, à Marie-Christine Dendievel, Danielle Bendjelloul, Séverine Six et Sandrine Belingheri pour tous les services qu'elles ont pu me rendre. Merci aussi à toutes les autres personnes du laboratoire pour leur accueil.

Merci à Bertrand Dehorter et Lionel Belingheri que j'ai rencontré, grâce au monitorat, en TP de biologie végétale. Ils m'ont beaucoup appris et merci pour leur gentillesse. Bonne retraite à Bertrand ! Le monitorat avec les stages m'a permis de rencontrer de nombreux étudiants et surtout Ying alors merci au *C*IES.

Enfin un très grand merci à toute ma famille qui s'est intéressée à mes travaux même si, pour ma grand-mère, je travaille sur les petits pois surgelés... Merci à mes parents pour leur soutien. A ma maman pour les nombreuses lectures du manuscrit à la recherche de fautes et à mon papa pour les réparations de la dernière chance de mon ordinateur à la fin de la rédaction ! Merci à mes sœurs, Lysiane et Amandine, qui m'ont aidée à annoter les Eppendorfs et les Falcons quand j'étais débordée par le nombre !!!! Merci à Adil d'avoir essayé de me supporter pendant ces années de laboratoire même si tout ne se finit pas toujours comme on le souhaiterait... Pour finir, merci à tous mes amis qui ont patiemment attendu que je sois moins occupée par ma thèse... J'espère pouvoir enfin leur accorder plus de temps !... Alors merci à Céline, Alex et leur petite fille Romane qui a déjà plus d'un an (le temps passe trop vite...), à Manu et Javier qui attendent ma visite en Argentine, à Mounia, Youssef et leurs enfants repartis au Maroc, à Fatima, Aouatif, Gaëlle ou encore Marie-G sur Lille mais par manque de temps un peu perdu de vue... Je vais tout faire pour me rattraper !!!! Promis.

RESUME	4
Abstract	5
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ANNEXES	8
ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	. 12
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	. 16
I- Le pois : Pisum sativum L.	. 16
1- Description de la plante	. 16
2- Le cycle de vie du pois	. 18
3- Liens phylogénétiques entre Pisum sativum et Medicago truncatula	. 21
II- Le stress froid	. 23
1- Adaptations des plantes au froid	. 23
a. Classement des plantes vis-à-vis du froid	. 23
b. Réponses morphologiques et biologiques de lutte contre le froid	. 24
c. Moyens métaboliques de lutte contre le froid	. 25
* Les osmoprotectants	. 26
* Les protéines cryoprotectrices	. 27
* Les changements lipidiques de la membrane plasmique	. 28
* La paroi cellulaire	. 29
* Le stress oxydatif provoqué par le froid	. 29
* L'activation des métabolismes primaires	. 31
2- Transmission du signal froid	. 32
a. Rigidification de la membrane plasmique, cytosquelette et calcium	. 32
b. MAP kinases (Mitogen-Activated Protein)	. 33
c. Appareil photosynthétique : le chloroplaste	. 34
3- Régulation de la réponse au froid	. 34
a. Les voies ABA-indépendantes (Acide Abscissique)	. 35
* La voie des CBF (C-repeat Binding Factor)	. 35
* Autres voies ABA-indépendantes	. 38
b. La voie ABA dépendante	. 39
III- Les méthodes utilisées pour notre étude	. 40
1- La protéomique	. 40
2- Les Quantitative Trait Loci (QTL)	. 43
MATERIELS ET METHODES	. 47
I- Matériel végétal	. 47
II- Etude du protéome	. 51
1- Extraction des protéines tissulaires	. 51
2- Dosage des protéines	. 52
3- Qualité des extraits	. 52
4- Electrophorèse bidimensionnelle	. 52
5- Coloration argentique	. 54
6- Etude des gels avec ImageMaster [™] 2D Platinium	. 55
7- Gels préparatifs	. 55
8- Identification des protéines	. 56
III- Quantification de métabolites	. 58
1- Extraction des métabolites	. 58
2- CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance	. 59

IV- Méthodes statistiques	
1- Analyse statistique des données de protéomique	59
2- Analyse statistique des métabolites	
3- Analyse des Quantitative Trait Loci (QTL) et des Protein Trait Loci (PQL)	
a. Cartographie des QTL et PQL	
b. Vue d'ensemble des QTL	
RESULTATS ET DISCUSSION.	
I- Etude des lignées parentales	
1- Analyse du protéome au cours de la phase d'acclimatation au froid	67
2- Dosages du raffinose, du saccharose, du glucose et du citrate	115
a. Résultats	115
* Evolution des teneurs en métabolites	115
* Relation entre les évolutions des teneurs en métabolites et en protéines	118
b. Discussion	119
II- Etude des lignées recombinantes	123
1- Détection de QTL et PQL après 10 jours d'acclimatation au froid	123
2- Détection des PQL et des hot spots	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
ANNEXES	185

RESUME

L'acclimatation au froid est un phénomène qui permet aux plantes exposées régulièrement à de basses températures positives de pouvoir tolérer ensuite le gel. Elle est, ici, étudiée chez le pois (Pisum sativum L.) en conditions contrôlées grâce à deux lignées, Champagne tolérante au gel après cette phase d'acclimatation et Térèse sensible même après la phase d'acclimatation. L'analyse du protéome des feuilles, des tiges et des racines de ces lignées a permis l'identification de protéines avant un rôle potentiel dans l'acclimatation au froid. Pour les feuilles et la base des tiges, la majorité des protéines différentiellement exprimées et identifiées, soit 35% des protéines, participent à la photosynthèse et à la glycolyse (métabolisme primaire). Dans les tiges, 25% des protéines sont des chaperonnes et dans les racines, les protéines de défense représentent 47% des protéines identifiées. Les teneurs en raffinose, saccharose, glucose ainsi qu'en citrate augmentent chez Champagne dans les 3 parties étudiées de la plante lors de l'acclimatation au froid. Ces concentrations restent faibles et à peu près stables chez Champagne non acclimaté et Térèse qu'il ait ou non subi la phase d'acclimatation. Le dosage de ces métabolites a aussi été réalisé chez des lignées recombinantes issues du croisement entre Champagne et Térèse. Ceci a permis la détection de QTL pouvant être explicatifs de l'acclimatation au froid avec, notamment, des QTL de teneur en raffinose qui co-localisent avec des QTL de tolérance au gel présents sur les groupes de liaison 5 et 6. Des PQL ont aussi été recherchés avec l'analyse du protéome des feuilles des lignées recombinantes. Certains co-localisent avec les QTL précédemment détectés. L'ensemble des données fournies par les différentes approches nous permet d'émettre des hypothèses pour expliquer les mécanismes mis en place chez Champagne pour tolérer le gel.

Mots clés : acclimatation au froid, lignées recombinantes, *Pisum sativum* L., PQL, protéome, QTL.

ABSTRACT

Cold acclimation is the process whereby plants, previously exposed to low positive temperatures, are subsequently able to tolerate frost. This phenomenon was studied under controlled conditions in pea (Pisum sativum L.) in two lines: Champagne, frost tolerant after cold acclimation and Terese, frost sensitive even if previously submitted to a cold acclimation period. Leaf, stem and root proteomes were analysed. Thirty five per cent of the identified differentially expressed proteins in leaves and stems during the cold acclimation period were involved in photosynthesis and glycolysis. In stems, 25% were identified as folding proteins and in roots, 47% were involved in the defense response. The raffinose, sucrose, glucose and citrate contents increased in Champagne leaves, stems and roots during the cold acclimation. In contrast, the levels of these compounds were low in non-acclimated Champagne as well as in Terese submitted to the cold acclimation period or not. Metabolite levels were also determined on the recombinant inbred lines (RIL) resulting from the cross between Champagne and Terese. Subsequent analyses permitted the detection of potential cold acclimation explicative QTL. In particular, raffinose content QTL were colocalized with frost damage QTL on the linkage groups 5 and 6. PQL were also detected with the study of RIL leaf proteome. A number of these PQL colocalized with the previously detected QTL. The data obtained using these different approaches allowed us to propose hypothezises potentially explaining the mechanisms used by Champagne to tolerate frost.

Key words: cold acclimation, *Pisum sativum* L., PQL, proteome, QTL, recombinant inbred lines.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie du pois	. 17
Figure 2 : Principales étapes du cycle de culture du pois	. 18
Figure 3 : Les cycles de vie des pois de printemps et d'hiver	. 19
Figure 4 : Etapes-clés du développement et risques climatiques encourus pour les semis de	
printemps et d'automne (France septentrionale).	. 20
Figure 5 : Arbre phylogénétique des Légumineuses	. 21
Figure 6 : Processus de déshydratation cellulaire lors du gel	. 24
Figure 7 : Le système antioxydant des cellules	. 30
Figure 8 : La cascade des MAP kinases	. 33
Figure 9 : La voie des CBF	. 35
Figure 10 : La voie ABA dépendante	. 39
Figure 11 : Les deux cinétiques de l'étude	. 48
Figure 12 : Les différentes colorations argentiques testées sur un échantillon de feuilles	. 56
Figure 13 : Méthode employée pour déterminer les spots à identifier	. 60
Figure 14 : Résultats obtenus avec la procédure Univariate.	. 62
Figure 15 : Gels master pour les feuilles (L), les tiges (S) et les racines (R)	. 68
Figure 16 : Evolution des concentrations en raffinose (A), saccharose (B), glucose (C) et	
citrate (D) dans les feuilles, les tiges et les racines des plantes ayant subi la phase	
d'acclimatation au froid et des plantes contrôles 1	116
Figure 17 : Cercle des corrélations (A) et diagramme de dispersion des lignées (B) selon les	3
axes 1 et 2 de l'ACP pour les spots répondant à l'acclimatation au froid dans les feuille	es
(1), les tiges (2) et les racines (3) 1	120
Figure 18 : Localisation des hot spots sur le groupe de liaison 1	163
Figure 19 : Tous les PQL présents sur le groupe de liaison 1	164

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Correspondance entre les groupes de liaison de Pisum sativum et de Medicago
trucatula
Tableau 2 : Corrélations détectées dans les feuilles (a), les tiges (b) et les racines (c) entre les
métabolites dosés et les protéines impliquées dans l'acclimatation au froid pour les
lignées Champagne et Térèse117

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques phénotypiques des lignées recombinantes	185
Annexe 2 : Protocole d'extraction des protéines	186
Annexe 3 : RCDC Protein Assay, BioRad.	187
Annexe 4 : Composition du Laemli 2X.	188
Annexe 5 : Composition des gels d'acrylamide utilisés	189
Annexe 6 : Tampon de migration	190
Annexe 7 : Tampons utilisés pour l'IEF.	191
Annexe 8 : Coloration à l'argent	192
Annexe 9 : Coloration à l'argent ammoniacal.	193
Annexe 10 : Coloration argentique de Shevchenko.	194
Annexe 11 : Coloration argentique de Morrissey.	195
Annexe 12 : Extraction des métabolites	196
Annexe 13 : Carte génétique de Pisum sativum utilisée dans cette étude	197
Annexe 14 : Liste des marqueurs de la carte génétique ayant une fonction connue	198
Annexe 15 : Protéines identifiées dans les feuilles.	199
Annexe 16 : Concentration moyenne des métabolites dans les parties aériennes des plan	ntes
soumises à la phase d'acclimatation au froid (3 répétitions biologiques)	202
Annexe 17 : Concentration moyenne des métabolites dans les racines des plantes soum	ises à
la phase d'acclimatation au froid (3 répétitions biologiques).	204
Annexe 18 : Tableau récapitulatif des PQL détectés pour chaque spot	206
Annexe 19 : Position des 315 PQL détectés sur les 7 groupes de liaison pour les feuille	s 214
Annexe 20 : Localisation des hot spots sur les 7 groupes de liaison	222

ABRÉVIATIONS

2D-DIGE	2D-Differential In-Gel Electrophoresis
2-DE	2 Dimensional Electrophoresis
ABA	ABscisic Acid
ARE	ABRE Binding Factor
ABRE	ABA Response Flement
ACP	Analyse en Composantes Principales
	Acide DésovyriboNucléique (ou DNA)
	Amplified Fragment Length Polymorphism
	AntiFreeze Protein
	A Nalvsis Of V Ariance
AP2/ERF	APetala 2 / Ethylene Response Factor
APS	Ammonium PerSulfate
ΔΡΧ	Ascorbate PeroXidase
ARFR	ABA Responsive Element Binding protein
ARN	Acide RiboNucléique (ou RNA)
BSA	Bovine Serum Albumine
cas gene	gène Cold-Acclimated Specific
CAT	CATalase
CBF	C-repeat Binding Factor
CHAPS	3-([3 cholamidopropyl]dimethylammonio)-1-propanesulfonate
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
COR gene	COld Regulated gene
CRT	C-RepeaT
CSD	Cu-Zn Superoxide Dismutase
DDF	Dwarf and Delayed-Flowering
DGAP	Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes
DHAR	DeHydroAscorbate Reductase
DMSO	DiMethyl SulfOxide
DRE	Dehydration Responsive Element
DREB	DRE Binding element
DTT	DiThioThreitol
Ea	Energie d'activation
ESI	ElectroSpray Ionisation
esk	eskimo
EST	Expressed Sequence Tag
fab	fatty acid biosynthesis
FAD	Fatty Acid Desaturase
FDR	False Discovery Rate
FLC	Flowering Locus C
FRI	FRIgida

FRLa fry2	FRigida-Like a <i>fiery 2</i>
GNIS	Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants
GR	Glutathion Reductase
HAMK	Heat shock-activated MAPK
Hik33	Histidine kinase 33
<i>hos1</i>	high expression osmotically responsive 1
Hr	High responsive
HSP	Heat Shock Protein
ICE	Inducer of CBF Expression
IEF	IsoElectroFocalisation
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IPG	Gradient de pH Immobilisés
KAAS	KEGG Automatic Annotation Server
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KIN	Kinesin
KO	KEGG Orthology
LC-ESI/IT	Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionisation/Ion Trapp
LD	Linkage Desequilibrium (déséquilibre de liaison)
LEA protein	Late Embryogenesis Abundant protein
LMP	Low-Melting Point
LOD	Logarithm of Odds
LR LT50 LTI LTRE LUC	Low response to Osmolic Stress Lignée Recombinante Lethal Temperature (50% des plantes meurent) Low Temperature Induced Low Temperature Responsive Element Luciférase
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase
MDAR	MonoDehydroAscorbate Reductase
MDH	Malate DésHydrogénase
MS	Matière Sèche
MYA	Million Years Ago
MYC	MYeloCytomatosis oncogene
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pI	point Isoélectrique
PLOC	Protein LOCalization prediction
PQL	Protein Quantitative Loci
protéine PR	Pathogenesis-Related protein
PSII	PhotoSystème II

QTL	Quantitative Trait Loci
R	Constante des gaz (8,31kJ.mol ⁻¹)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
RCDC	Reducing agent Compatible, Detergent Compatible
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RFO	Raffinose Family Oligosaccharides (raffinose, galactinol, stachyose)
RIL	Recombinant Inbred Lines (lignées recombinantes)
RISC	RNA Induced Silencing Complex
ROS	Reactive Oxygen Species
SAMK	Cold shock-activated MAPK
SDS	Sodium DodecylSulfate
SDS-PAGE	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
sfr	sensitive to freezing
SLA	Stade Limite d'Avortement
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	SuperOxide Dismutase
TCA	TriChloroacetic Acid
TEMED	N, N, N, N-TEtraMethyl-EthyleneDiamine
TFA	TrifluoroAcetic Acid
TOF	Time Of Flight
UDP	Uridine DiPhosphate
UKS	Urée, K ₂ CO ₃ et SDS
UMR	Unité Mixte de Recherche
UNIP	Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en protéines
VH	Volt-Heure

Introduction

INTRODUCTION

Le pois (*Pisum sativum* L.) de la famille des Fabacées, a été l'une des premières plantes cultivées et améliorées par l'homme en Europe (Doré et Varoquaux, 2006). Selon la variété, il est utilisé dans l'alimentation humaine (pois potager) ou animale (pois fourrager et pois protéagineux).

Les pois potagers peuvent être récoltés frais (à écosser), ce sont les "petits pois". Ils peuvent être mangés frais, apertisés (conserves) ou surgelés. Les pois mangetout sont de jeunes gousses qui ne sont pas parcheminées et sont consommées entières. Les pois potagers sont aussi récoltés secs (pois de casserie) pour obtenir les pois cassés.

Pour l'alimentation animale, le pois fourrager fournit une quantité importante de matière verte à l'hectare et sert de fourrage vert après ensilage. Le plus intéressant économiquement est le pois protéagineux qui est une source de protéines (21 à 26% dans la graine) aux teneurs intermédiaires entre celles du soja et des céréales. Il est riche en lysine, principal acide aminé limitant dans les rations animales à base de céréales. C'est donc un complément aux céréales utile dans l'alimentation du bétail.

Comme les autres Légumineuses, le pois est capable d'utiliser l'azote de l'air grâce à ses nodules racinaires (symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote). Il ne nécessite donc pas d'apport d'engrais azoté important ce qui limite les risques de pollutions par lessivage des nitrates. L'azote fixé sera rendu au sol après la récolte et le retournement du champ, ce qui permettra d'en diminuer les apports pour la culture suivante. Le pois en association avec des céréales se prête bien à la culture biologique. Il permet de limiter l'apport d'engrais azotés et comme les céréales concurrencent les mauvaises herbes, pas d'utilisation d'herbicides (désherbage mécanique si besoin).

Le pois a donc des intérêts nutritionnels mais aussi environnementaux et économiques. Malgré ces avantages, cette culture ne peut concurrencer totalement le soja importé d'Amérique. En effet, il présente des rendements faibles et surtout très sensibles aux conditions climatiques. Les rendements des cultures doivent donc être stabilisés et les aires de production élargies pour contribuer à la rentabilité du pois.

Dans ce cadre, se pose le problème du froid qui est un facteur climatique clé à surmonter. On cultive soit des pois de printemps (plutôt Sud de la France) soit d'hiver (plutôt Nord Est de la France). Les pois de printemps sont semés vers février-mars et donnent des

rendements souvent fluctuants car l'initiation florale puis le développement des grains ont lieu de fin mai à mi-juin au moment des grosses chaleurs (Dumoulin *et al.*, 1994). Le semis d'automne, pour les pois dits d'hiver, permet aux plantes grâce à l'allongement de la durée de leur cycle de vie d'augmenter la biomasse, le nombre de grains et le poids de 1000 grains. Mais pour cela, les plantes devront passer l'automne et l'hiver au champ et donc résister au froid puis au gel. L'extension des zones de culture implique que les plantes seront confrontées à une apparition plus précoce du froid (vers le Nord) et des hivers plus rigoureux (Bourgogne, Lorraine).

Il est donc nécessaire, pour lutter contre les pertes de rendements et étendre les aires de production, de posséder des variétés de pois passant l'hiver dans les meilleures conditions. Des travaux de sélection sont menés depuis de nombreuses années, notamment par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et les sélectionneurs privés regroupés au sein de l'UNIP (Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en protéines). Ces travaux ont permis l'obtention de variétés comme FRIMAS (1973), FRISSON (1979) et FRIJAUNE (1984). Ce sont des pois résistants au gel mais très précoces, c'est-à-dire que leur stade d'initiation florale arrive rapidement ce qui peut provoquer une perte de rendement. FRILENE (1987) qui est un croisement entre FRISSON et un pois protéagineux de printemps est très résistant au gel après une phase d'acclimatation (période de basses températures positives) mais présente toujours une instabilité de rendement. Plus récemment, la variété ISARD (2004) a été obtenue, c'est un pois d'hiver qui donne de bons rendements mais son initiation florale est encore trop précoce.

Des recherches se poursuivent actuellement au Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes (DGAP) à la station INRA d'Estrées-Mons pour obtenir de nouvelles variétés dont l'initiation florale serait plus tardive et déclenchée par les jours longs. Ceci permettrait un semis plus tôt dans la saison, tout en évitant l'initiation florale pendant la mauvaise saison puisque la photopériode courte durant l'hiver n'est pas suffisante pour initier la floraison chez ce type de pois.

Dans le cadre de ce travail de sélection, notre laboratoire en association avec des équipes de l'INRA travaille sur différentes variétés parmi lesquelles Champagne (pois fourrager d'hiver résistant au froid après une phase d'endurcissement) et Térèse (pois protéagineux de printemps sensible au froid même après endurcissement). Le type *afila* (vrilles à la place des folioles) de Térèse donne à la plante un port érigé qui limite la verse. Ce

Introduction

point est important pour faciliter la récolte mécanique et permet aussi de limiter l'infection par les pathogènes fongiques tels que *Mycosphaerella pinodes* (responsable de l'anthracnose) grâce à une meilleure aération du couvert végétal.

L'acclimatation au froid est obtenue par exposition des plantes à des températures basses mais toujours positives pendant un certain laps de temps. Ces conditions permettent aux plantes d'adapter progressivement leur physiologie aux températures basses et par là de mieux supporter des températures ultérieures négatives : elles sont endurcies au gel. Ceci n'est valable que pour les variétés capables de s'endurcir. En champ, l'acclimatation au froid a naturellement lieu en automne (10°C en moyenne). Pour notre étude, un protocole expérimental en chambre climatisée mis au point par les équipes de l'INRA a été utilisé de façon à mimer ce qui se passe au champ et à pouvoir être reproduit grâce aux conditions standardisées contrôlées.

Nous avons, ainsi, étudié l'acclimatation au froid dans des conditions contrôlées et nous nous sommes plus particulièrement intéressés : 1) aux produits des gènes, induits par le froid, qui agissent directement contre les stress environnementaux et 2) à ceux qui correspondent à une adaptation du métabolisme primaire. Les premiers sont des protéines qui protègent les cellules contre la déshydratation causée par le gel (enzymes de la biosynthèse des osmoprotecteurs et cryoprotecteurs, protéines LEA, chaperonnes...) et les seconds sont les enzymes des divers métabolismes tels que la biosynthèse des sucres ou la photosynthèse. Nous avons privilégié dans notre étude les réponses à moyen terme qui permettent d'observer l'adaptation de la plante au froid (prélèvements à 5 et 10 jours d'acclimatation) plutôt que les réponses à court terme (quelques heures à 48h) qui ciblent la transduction de la réponse au froid.

Pour cela, nous avons suivi deux approches :

• protéomique par une étude cinétique du protéome de Champagne et Térèse afin de comparer l'évolution de leurs comportements au cours du temps et ainsi trouver des métabolismes ou métabolites cibles de l'acclimatation au froid.

• génétique avec une cartographie de QTL (Quantitative Trait Loci) à partir des notes de résistance au gel, du dosage de certains métabolites, de protéines (PQL : Protein Quantitative Loci), et des données phénotypiques obtenus chez des lignées recombinantes issues du croisement entre Champagne et Térèse.

14

Après une étude bibliographique sur le pois et l'action du stress froid sur les plantes, nous décrirons les méthodes utilisées lors de ces études avant d'aborder l'analyse des résultats.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Le pois : *Pisum sativum* L.

Le pois est originaire du Proche Orient méditerranéen et les premières traces de sa culture, en Irak et en Turquie, datent du début du Néolithique (7000 ans avant J.C.). Il arrive en Europe, d'abord en Grèce vers 5500 avant J.C. puis dans le sud de la France 1500 ans plus tard (Doré et Varoquaux, 2006).

Le pois est une Eudicotylédone de la famille des Fabacées (couramment appelée Légumineuses et anciennement Papilionacées). L'espèce est diploïde (2n = 2x = 14) et son génome a une taille de 4340Mb (1C = 4,4pg soit 4,4.10⁹ pb). C'est une plante cléistogame et autogame même s'il peut y avoir quelques rares allofécondations par les insectes qui occasionnent parfois des hybridations.

1- Description de la plante

Chez certaines variétés, comme les pois fourragers, les graines sont colorées par des tanins (Figure 1). Ces pois ont des fleurs colorées comme pour la lignée Champagne aux fleurs violettes (Figure 1). Les pois protéagineux ont des graines blanchâtres à jaunâtres et leurs fleurs sont blanches comme pour la lignée Térèse (Figure 1).

La partie aérienne (Figure 1) comprend, à sa base, l'épicotyle jusqu'au premier nœud. Les 2 premiers nœuds portent des écailles. Ensuite, chaque étage correspond à une feuille qui se décompose en 2 stipules au niveau de la tige, folioles et vrilles. Ce type de feuille est celui que nous appellerons feuillu ou conventionnel (allèle *Af*) comme chez Champagne. Le second est le type *afila* (allèle *af*) où les folioles sont remplacées par des vrilles comme chez Térèse (Figure 1). Certains génotypes de pois peuvent en plus être nains (allèle *le*) comme Térèse, leurs entre-nœuds sont alors courts (Figure 1) suite à une altération du métabolisme des gibbérellines. En effet, le gène *Le* code pour la 3β -hydroxylase qui intervient dans la voie de biosynthèse des gibbérellines.

Le pois présente sur ses racines des nodosités issues de l'hypertrophie d'une radicelle sous l'influence de bactéries symbiotiques (*Rhizobium*). Dans ces nodules, se déroule la fixation de l'azote atmosphérique.





Graine blanchâtre :

type champagne

Figure 1 : Morphologie du pois.

D'après Agrophysiologie du pois, INRA Editions, 2005.

2-Le cycle de vie du pois

La croissance des plantes peut être déterminée en fonction du temps thermique, c'està-dire du nombre de degrés-jours qui correspond à la somme des différences entre la température moyenne de chaque jour et la température du zéro végétatif. Le zéro de végétation du pois est de 0°C (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). Sous cette température, la plante stoppe sa croissance. Au champ, la durée du cycle varie de 130-150 jours pour le pois de printemps (équivalent à 1880°j) à 240 jours pour le pois d'hiver (équivalent à 2125°j) (Anonyme 2002).

Le pois a une germination hypogée (Figure 2). Les pois peuvent avoir transitoirement un port en rosette qui va maintenir les méristèmes terminaux près du sol pour les protéger du froid (hémicryptophytes). Ce phénomène est observé chez Champagne au champ en conditions de température défavorables, les entre-nœuds s'allongeant ensuite au printemps. Des bourgeons axillaires peuvent se développer et donner naissance à une ramification suite à une levée de dominance apicale, principalement sur les noeuds de la base de la tige principale.



Figure 2 : Principales étapes du cycle de culture du pois.

FF : fin de floraison, SLA : stade limite d'avortement, FRG : fin de remplissage des graines *In* Produire des grains oléagineux et protéagineux, Lavoisier Tec&Doc, 1991

A partir d'un nombre d'étages foliaires variable selon la variété de pois (en moyenne 15), et un certain nombre de degrés-jours (300 à 400°j) (Figure 3), les bourgeons axillaires vont se différencier en bourgeons floraux : le pois passe au stade de l'initiation florale. La fécondation a lieu peu avant l'ouverture de la fleur (cléistogamie) et les structures de la graine se forment par divisions cellulaires sans accumulation de réserves. A partir d'une taille d'environ 6mm, la graine dépasse le stade limite d'avortement (SLA), qui est critique pour sa survie. Il correspond à environ 270° j après la floraison (Figure 2 et 3). Le remplissage des graines commence réellement à partir du SLA. La fin du remplissage des graines est marquée par la rupture des communications entre la graine et la plante mère. Ceci correspond à la maturité physiologique de la graine. L'influence des conditions de température et d'hygrométrie de l'air sont très importantes pour obtenir une teneur en eau optimale pour la récolte des graines (5 à 15 jours après la fin du remplissage des graines) (Munier-Jolain *et al.* 2004).



Figure 3 : Les cycles de vie des pois de printemps et d'hiver.

D'après Produire des grains oléagineux et protéagineux, Lavoisier Tec&Doc, 1991 S : semis, L : levée, IF : initiation florale, DF : début de la floraison, FF : fin de la floraison, SLA : stade limite d'avortement (début de remplissage des graines), FRG : fin de remplissage des graines et R : récolte.

Le semis des pois de printemps se fait vers février-mars (Figure 3) pour obtenir la durée de culture la plus longue et les rendements les plus élevés. Toutefois les pois doivent terminer leur cycle qui dure environ 5 mois avant l'été (Figure 4). En effet, un stress hydrique estival, pendant la floraison, peut l'arrêter prématurément et diminuer le nombre de fleurs, ou s'il a lieu entre la fécondation et le SLA, entraîner une perte de rendement suite à une diminution du nombre de grains, et s'il a lieu après le SLA, provoquer la diminution du poids de 1000 grains (Guilioni *et al.*, 2003).



Figure 4 : Etapes-clés du développement et risques climatiques encourus pour les semis de printemps et d'automne (France septentrionale).

D'après Agrophysiologie du pois, INRA Editions, 2005

Pour les pois d'hiver, les plantules doivent avoir 1 à 2 feuilles avant les fortes gelées pour survivre (Lejeune-Hénaut et al., 2004). Plus le pois aura reçu de degrés-jours, plus il approchera de son stade d'initiation florale donc un semis trop précoce est préjudiciable pour le rendement en raison des risques de gelées sur les méristèmes reproducteurs (Figure 4). En effet, les méristèmes floraux sont plus sensibles au froid que les méristèmes végétatifs. Un gène contrôlant la sensibilité à la photopériode (gène Hr: High responsive) a été mis en évidence chez le pois par une équipe australienne (Murfet, 1973). La présence de l'allèle Hr bloque le passage à l'initiation florale jusqu'à ce que les durées de jour s'allongent, soit au printemps. L'allèle Hr constitue une stratégie d'évitement au froid : en effet, cet allèle bloque l'initiation florale en maintenant la plante à l'état végétatif pendant cette période. Une plante Hr verra ainsi son initiation florale bloquée en jours courts. Dans le cadre de notre étude, Champagne qui possède l'allèle Hr ne peut commencer son initiation florale que si la durée du jour dépasse 13h30. Par contre, Térèse avec l'allèle hr n'a besoin, après la levée, que d'environ 150°j pour débuter son initiation florale, quelque soit la photopériode (Lejeune-Hénaut et al., 1999). L'évitement est donc une stratégie utilisable pour la sélection de pois résistants au gel. De plus les pois Hr semés en automne permettent d'obtenir une biomasse plus importante puisque de la levée à l'initiation florale, la période végétative est plus longue que celle des pois de printemps. Un autre intérêt de ces pois d'hiver est qu'ils couvrent les sols limitant donc le lessivage et l'érosion des sols.

3- <u>Liens phylogénétiques entre *Pisum sativum* et *Medicago* <u>truncatula</u></u>

Si le pois a été un modèle de la génétique formelle grâce aux travaux de Mendel (XIX^{ème}) et s'il possède de nombreux mutants notamment d'architecture et de floraison, nous disposons de peu de données du point de vue moléculaire. Il est donc nécessaire pour progresser de disposer d'une plante modèle apparentée.

Les Légumineuses présentent certaines spécificités dont l'aptitude à réaliser des symbioses avec des bactéries (nodosités) voire des champignons (endomycorhizes), contrairement à *Arabidopsis thaliana*. Ceci a amené la communauté scientifique à rechercher une plante modèle dans la famille des *Papilionoideae*. L'étude de l'arbre phylogénétique des Légumineuses (Figure 5) montre que 5 tribus composent cette famille : les *Phaseoleae* (avec le soja), les *Loteae* (avec le lotus), les *Cicereae* (avec le pois chiche), les *Trifolieae* (avec la luzerne) et les *Viceae* (avec le pois).



Figure 5 : Arbre phylogénétique des Légumineuses.

In Choi et al., 2004 MYA : million years ago Le *Lotus japonicus* et la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) ont été retenus en raison de leur faible ploïdie (diploïde) comme de nombreuses espèces cultivées, d'un génome de taille modérée (500Mpb chacun avec 2n=16 pour *M. t.* et 2n=12 pour *L. j.*), et de leur aptitude à la transformation génétique. Comme *Medicago truncatula* est plus proche des espèces européennes que sont les Trifoliées et les Viciées, cette plante est choisie comme modèle pour les études génétiques visant à l'amélioration de ces espèces.

Medicago truncatula est une légumineuse annuelle originaire du pourtour méditerranéen, proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*). Son génome comprend environ 500Mpb (soit 10 fois plus petit que celui du pois qui possède, lui, de nombreux rétrotransposons) et il possède 8 chromosomes (1 de plus que le pois). C'est une espèce autogame qui produit de nombreuses graines en un temps de génération court (de 10 à 12 semaines), ce qui est favorable pour les croisements.

De plus, la faible synténie (ordre d'alignement des marqueurs le long des chromosomes) entre *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* fait de *Medicago truncatula* un modèle complémentaire et indispensable pour les Fabacées. Selon Aubert et collaborateurs (2006), le pois et *M. truncatula* sont très proches phylogénétiquement (Figure 5), et leur synténie (colinéarité entre les 2 génomes) est élevée. Les auteurs ont observé une conservation de l'ordre des marqueurs dans la plupart des cas : le groupe de liaison 1 du pois correspond au groupe de liaison 5 de *M. truncatula*. La répartition des marqueurs est donc en majorité colinéaire. Cependant, certains marqueurs sont retrouvés sur d'autres groupes de liaison, par exemple le groupe de liaison 3 du pois correspond aux groupes de liaison 2 et 3 de *M. truncatula* (Tableau 1).

Pois	1	2	3	4	5	6	7
M. truncatula	5	1*	2 et 3	8**	7	6	4

Tableau	1:	Correspondance	entre	les	groupes	de	liaison	de	Pisum	sativum	et	de
Medicago) tru	catula.										

d'après Aubert et al., 2006

* sauf 1 marqueur sur le chromosome 7 ; ** sauf 1 marqueur sur le chromosome 3 (pour 45 marqueurs étudiés)

Grâce à la comparaison de leurs cartes génétiques, les zones d'intérêt identifiées chez le pois par l'approche QTL, pourront être repérées chez *Medicago*. Les données de génomique, plus complètes chez *Medicago* que chez le pois, permettront alors d'accéder plus facilement aux gènes.

II- Le stress froid

Un stress selon Mahajan et Tuteja (2005) est une condition qui inhibe le fonctionnement normal et le "bien-être" d'un système biologique. Parmi les conditions déclenchant un stress abiotique, on peut citer la température, la salinité, l'eau (sécheresse ou asphyxie par inondation)... Les plantes étant incapables de se déplacer, elles ne peuvent échapper à ces stress et doivent pouvoir répondre rapidement et efficacement à ce problème pour survivre en adaptant leur physiologie.

La réponse à la température est un facteur écologique important en raison de ses fluctuations saisonnières mais aussi journalières. Le froid constitue une limitation majeure de la colonisation des espèces sauvages et conduit à la baisse de la productivité des cultures suite aux gelées soudaines d'automne ou à des températures inhabituellement basses en hiver. Les plantes doivent être capables d'appréhender les fluctuations transitoires (gelée soudaine par exemple) aussi bien que les changements thermiques saisonniers et de répondre à ces changements en ajustant leur métabolisme.

L'importance des dégâts causés par le froid va dépendre de son intensité, de sa durée, du stade de développement de la plante, mais aussi de l'histoire de ces plantes avant l'arrivée du froid.

Les plantes perçoivent le froid et modifient l'expression de gènes dont le produit permet de combattre ce stress et aussi d'autres stress qui s'y ajouteront en conditions naturelles (Smallwood et Bowles, 2002).

1- Adaptations des plantes au froid

a. Classement des plantes vis-à-vis du froid

Les plantes peuvent être divisées en différentes catégories selon leur comportement face au froid. Pour Pearce (1999), elles sont classées en "chill-susceptible" pour les plantes

qui sont sensibles au froid (température inférieure à 12°C, *Episcia reptans, Saintpaulia ionantha* ou *Gossypium hirsutum*), en "chill-tolerant" mais "freezing-susceptible" qui ne peuvent pas survivre au gel (*Hibiscus*) et enfin, en "freeze-tolerant" qui peuvent survivre à des températures négatives (blé d'hiver ou bruyère jusqu'à -25°C).

La différence entre le froid (chill) et le gel (frost) réside dans le fait que le gel va causer des dommages supplémentaires indirects via la déshydratation qui en découle (Pearce, 1999). En effet, des cristaux de glace vont se former dans les espaces intercellulaires (Figure 6) ce qui va augmenter la pression osmotique dans ces espaces. Cette augmentation de pression osmotique va entraîner le déplacement de l'eau de la cellule vers l'extérieur pour retrouver un équilibre osmotique, d'où la déshydratation cellulaire (Figure 6) (Sharma *et al.*, 2005). Il existe en plus un risque que les cristaux de glace lèsent les membranes par augmentation de leur volume, la perméabilité des membranes en sera donc altérée (Gusta *et al.*, 2004).



Figure 6 : Processus de déshydratation cellulaire lors du gel. *In* Sharma *et al.*, 2005

b. Réponses morphologiques et biologiques de lutte contre le froid

Chez certaines espèces, une morphologie particulière peut également être observée avec le port en rosette. C'est le cas des hémicryptophytes (selon la classification de Raunkier) tels que la pâquerette ou le séneçon. Les plantes ayant un port en rosette sont caractérisées par un nombre important de ramifications et des entre-nœuds courts. Ceci permet à la plante de garder ses méristèmes près du sol et au milieu des feuilles, ce qui les protège du froid.

Les plantes peuvent également retarder la survenue de leur stade de développement le plus sensible au froid, l'initiation florale, en restant à l'état végétatif. Cela s'appelle l'évitement du gel. Une plante au stade initiation florale est très sensible au froid, c'est pourquoi certaines plantes ne fleurissent qu'en jours longs. En effet, le froid est, normalement, présent en automne-hiver quand la photopériode est courte, ce qui permet aux plantes de jours longs de l'éviter. Certaines plantes sont obligatoirement de jours longs (avoine, pétunia), d'autres de jours courts (chrysanthème) et d'autres sont indifférentes à la photopériode (concombre). Chez le pois, le gène majeur impliqué dans ce retard de floraison est le gène *Hr*. Il induit des réponses similaires à celles obtenues avec *FLC/FRI* (Flowering Locus C/FRIgida) chez *Arabidopsis* ou *FRLa* (FRigida-Like) de *Medicago truncatula* (Hecht *et al.*, 2005).

c. Moyens métaboliques de lutte contre le froid

Certaines plantes peuvent lutter contre les dommages occasionnés par le gel à condition d'être soumises à une exposition préalable à de basses températures positives, c'est le processus d'acclimatation au froid. Cette lutte est possible de 2 façons (revue Breton *et al.*, 2000) : soit la plante développe une tolérance au gel, soit elle évite de geler grâce à la surfusion (supercooling). Le supercooling consiste à empêcher les liquides biologiques de geler même à une température inférieure au point de congélation. Ceci est dû à la théorie moléculaire selon laquelle les molécules sont ordonnées dans un solide et désordonnées dans un liquide. Pour qu'un liquide se solidifie, il doit avoir un noyau autour duquel les molécules désordonnées peuvent cristalliser. Il faut donc que la plante élimine les noyaux de nucléation afin d'éviter la formation de cristaux de glace.

L'acclimatation complète (pleine capacité à tolérer le gel et ainsi survivre à l'hiver) ne peut pleinement avoir lieu que dans les organes qui se sont développés au froid (Strand *et al.*, 1997). Ceci a été observé sur des plantes (*Arabidopsis*) qui ont grandi à 23°C et qui sont ensuite placées à 5°C : une quasi-suppression de la photosynthèse est corrélée à une accumulation d'hexose phosphates et de sucres solubles (saccharose, glucose et fructose). En effet, une accumulation de saccharose réduit les intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin, ce qui inhibe la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate. Les feuilles qui se sont développées à 5°C présentent une photosynthèse élevée malgré la hausse de la teneur en sucres solubles ce qui suggère une modification de la régulation de la photosynthèse et du métabolisme des sucres.

Toutes ces modifications sont sous le contrôle de gènes qui présentent des modalités d'induction différentes (Mahajan et Tuteja, 2005) :

★ précoce dans les minutes suivant la perception du signal avec souvent une expression transitoire comme pour les gènes CBF (C-repeat Binding Factor) qui codent des facteurs de transcription. ★ tardive après quelques heures comme pour les gènes COR qui codent et modulent des protéines impliquées dans la synthèse d'antioxydants, d'osmolytes ou de protéines stabilisant les membranes.

***** Les osmoprotectants

Certains solutés permettent d'augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme de la cellule et de stabiliser les protéines et les membranes quand la température est défavorable. Ces osmoprotectants sont présents des archaebactéries aux plantes supérieures et aux animaux. Ce sont des composés hautement solubles, neutres aux pH physiologiques et non toxiques à forte concentration. Parmi ces osmoprotectants, nous trouvons la proline, les polyamines, les bétaïnes ou glycine bétaïne, mais aussi des sucres comme le saccharose, le raffinose, le sorbitol ou des fructanes comme l'inuline (Chen et Murata, 2002 ; Gupta et Kaur, 2005).

Les sucres joueraient un rôle important dans l'acclimatation au froid. Castonguay et collaborateurs (1995) ont montré que, chez la luzerne, les taux de raffinose étaient plus bas en été qu'en automne et surtout qu'en hiver. Chez *Arabidopsis*, le taux de sucres double après 6 heures d'exposition à 4°C, il continue de croître jusqu'à atteindre un maximum au bout de 5 jours, puis diminue petit à petit (Ristic et Ashworth, 1993). Les auteurs remarquent qu'une exposition de plus de 10 jours à 4°C d'*Arabidopsis* n'augmente plus sa résistance au gel. Chez les herbacées, ce sont généralement le saccharose et parfois des fructanes (inuline chez la chicorée et phléanes pour les Poacées) qui sont associés à la tolérance au gel. Des changements de concentration et de distribution des sucres pourraient donc constituer un mécanisme pour protéger des compartiments spécifiques pendant la déshydratation (Gerhardt et Heldt, 1984).

Bourion et collaborateurs (2003) montrent que, seulement chez le pois d'hiver en conditions contrôlées, la teneur en sucres solubles augmente rapidement pendant les 7 premiers jours de froid puis diminue durant les 7 jours suivants. Le stockage des sucres chez le pois d'hiver pourrait donc avoir un rôle nutritionnel pendant l'acclimatation au froid mais aussi participer directement à la tolérance au gel en assurant la cryoprotection des tissus de la plante, surtout ceux des feuilles, nécessaires pour procurer l'énergie à la plante.

Chez le peuplier, Renaut et collaborateurs (2004) observent que le saccharose, le glucose, le fructose et le tréhalose s'accumulent rapidement avec le froid (dès 2 jours) tandis que le raffinose n'augmente qu'après une semaine à 4°C. Les 3 premiers sont essentiels pour la croissance de la plante, les processus de réparation et la survie puisqu'ils sont majoritairement des sucres utilisés pour l'énergie cellulaire. Toujours chez le peuplier, une forte corrélation négative (-0,96) entre le raffinose (triholoside) et la LT50 (Lethal Temperature : température à laquelle 50% de plantes meurent) a été mise en évidence, de même pour le tréhalose (-0,76), ce qui montrerait leur rôle potentiel dans l'acclimatation au froid du peuplier. Chez *Lonicera caerulea* (chèvrefeuille), Imanishi et collaborateurs (1998) montrent que c'est l'accumulation de raffinose et de stachyose (tétraholoside) qui est corrélée négativement à la LT50 (respectivement -0,77 et -0,95).

L'accumulation de raffinose est corrélée à la tolérance au gel chez certaines espèces. Taji et collaborateurs (2002) montrent que, chez *Arabidopsis*, il y a bien accumulation de raffinose et de galactinol lors du stress froid et que le gène de la galactinol synthase 3 est une cible de CBF3 (cf. II-3-a). Mais Zuther et collaborateurs (2004) observent que, chez *Arabidopsis* transformé avec un gène codant une galactinol synthase (enzyme clé de la synthèse des RFO (Raffinose Family Oligosaccharides)), l'expression constitutive de ce gène provoque une accumulation de raffinose sans pour autant augmenter la tolérance au gel. Le rôle exact du raffinose dans la protection contre le gel reste donc encore à préciser.

***** Les protéines cryoprotectrices

Les LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins) doivent leur nom au fait qu'elles sont synthétisées en grande quantité soit au cours de la dessiccation de la graine soit à la fin de l'embryogenèse (Roberts *et al.*, 1993). Des protéines LEA sont accumulées dans les tissus pendant les périodes de stress qui mettent en jeu la déshydratation comme c'est le cas avec le froid. Ce sont des protéines hautement hydrophiles et thermostables. Elles contiennent des motifs répétés en acides aminés capables de former des hélices α amphipathiques. Ces hélices permettraient à ces protéines de stabiliser les membranes contre les dommages du gel (Thomashow, 1999). Leur tolérance aux conditions dénaturantes suggère qu'elles pourraient stabiliser les structures dans un environnement pauvre en eau. Parmi les LEA, le groupe 2 est constitué de protéines appelées déhydrines. Une à cinq déhydrines répondant au froid ont été découvertes par espèce (Pearce, 1999).

Des protéines chaperonnes telles que les HSP (Heat Shock Proteins) participent aussi à la tolérance au gel. Elles sont réparties en 5 familles majeures : Hsp70, Hsp60 (chaperonines), Hsp90, Hsp100 et sHsp (small Hsp) (Wang *et al.*, 2004). Les chaperonnes assurent le repliement correct des protéines en se liant à celles-ci pendant leur synthèse par les ribosomes. Les chaperonines ont le même rôle que les chaperonnes mais interviennent plus tard lorsque les protéines ont quitté les ribosomes ou lorsqu'elles ont atteint leur destination (chloroplastes, mitochondries...). Les chaperonnes permettent aussi d'éviter l'agrégation des protéines ou de faciliter leur translocation (Wang *et al.*, 2004). Ces chaperonnes sont indispensables à certaines protéines pour stabiliser leur conformation et en conditions de stress, elles peuvent activer certaines enzymes en modifiant leur repliement (Wang *et al.*, 2003).

Enfin, les AFP (AntiFreeze Proteins) découvertes, chez les plantes, par Griffith et collaborateurs (1992) sont des protéines antigel qui inhibent le grossissement des cristaux de glace en formant des ponts hydrogènes entre la glace et leurs groupements hydrophobes (Atici et Nalbantoglu, 2003). Certaines ont une homologie de séquence avec des protéines PR (Pathogenesis-Related). Ces AFP sont présentes chez des gymnospermes et les angiospermes monocotylédones comme le seigle (Antikainen *et al.*, 1996) ou l'ivraie (Pudney *et al.*, 2003) et dicotylédones comme la carotte mais aussi chez certains poissons et insectes (revue de Griffith et Yaish, 2004).

***** Les changements lipidiques de la membrane plasmique

Lors du stress froid, la composition des membranes change. La fluidité des membranes plasmiques dépend de leur composition en lipides : plus les lipides insaturés sont nombreux, plus la membrane est fluide (Uemura *et al.*, 1995). L'asymétrie des lipides de la membrane semble aussi contribuer à la stabilité de cette dernière à basse température (Sung *et al.*, 2003). En utilisant le mutant fab1 (fatty acid biosynthesis) d'*Arabidopsis* qui a plus de lipides saturés dans ses membranes, Wu et collaborateurs (1997) montrent que l'efficacité de PSII diminue ainsi que son contenu en chlorophylle après exposition à de basses températures. Lors de l'acclimatation au froid, une augmentation du taux d'insaturation des acides gras constituant des lipides membranaires est observée dans les membranes d'*Arabidopsis* (Uemura *et al.*, 1995). Ces changements empêchent la rigidification et les ruptures de la membrane, phénomènes qui entraînent la perturbation du fonctionnement de certaines protéines de transport. Ces protéines ont un rôle important dans le contrôle des flux métaboliques et la

fuite d'électrolytes. Plus la membrane plasmique est endommagée, plus la fuite d'électrolytes est importante. Ceci est quantifiable grâce aux mesures de conductimétrie qui permettent de classer les plantes selon leur degré de résistance au gel (Pennycooke *et al.*, 2003).

* La paroi cellulaire

Chez le pois, Weiser et collaborateurs (1990) arrivent à la conclusion que l'acclimatation au froid peut être observée après quelques jours à 2°C à l'obscurité et atteint son maximum au bout de 20 jours avec une LT50 de -6°C. Les auteurs ont montré une accumulation d'ARNm d'extensine et une augmentation de l'incorporation de la glycoprotéine dans la paroi cellulaire. Les extensines joueraient ainsi un rôle structural dans l'acclimatation du pois en augmentant la rigidité de la paroi empêchant ainsi les cellules de se collapser lors de la déshydratation induite par le gel. Rajashekar et collaborateurs (1996) montrent, sur des cultures de cellules de pommier en suspension, que l'acclimatation au froid change la perméabilité à l'eau par la diminution de la taille des pores de la paroi. Ceci pourrait limiter la propagation de la glace à travers la paroi, constituant donc un mécanisme de défense contre le gel.

* Le stress oxydatif provoqué par le froid

Les plantes doivent aussi lutter contre les ROS (Reactive Oxygen Species) qui sont produites suite aux perturbations des métabolismes et des chaînes de transport des électrons notamment lors de la photoinhibition. Parmi ces ROS, les anions superoxydes (O_2^-) sont les produits de la photoréduction de l' O_2 dans le photosystème I du chloroplaste. Les autres ROS sont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les radicaux hydroxyles (OH⁻).

Six enzymes permettent de détoxiquer les ROS : la superoxide dismutase (SOD), l'ascorbate peroxidase (APX), la catalase (CAT), la monodehydroascorbate reductase (MDAR), la dehydroascorbate reductase (DHAR) et la glutathion reductase (GR) selon le mécanisme présenté figure 7. La SOD au niveau des thylakoïdes du chloroplaste permet de lutter efficacement et rapidement contre les O_2^- . Selon Chen et collaborateurs (Chen et Murata, 2002), ces ROS pourraient aussi être capturés par des osmoprotectants dans les cellules.



Figure 7 : Le système antioxydant des cellules.

Dans les conditions normales de croissance, les plantes présentent un équilibre entre la production des ROS et leur détoxication. Sunkar et collaborateurs (2006) ont montré, chez *Arabidopsis*, que les transcrits de deux SOD, la Cu-Zn superoxide dismutase 2 (CSD2 plastidique) et de la CSD1 (cytosolique) ne sont pas induits au niveau transcriptionnel pendant le stress oxydatif. La surexpression des deux gènes CSD est dépendante des changements de taux d'un "small RNA" (miR398). Les sRNA réduisent leurs gènes cibles au silence en agissant au stade post-transcriptionnel et sont divisés en 2 classes : les micro RNA (miRNA) et les short-interfering RNA (siRNA). Les miRNA sont des ARN de 20 à 22 nucléotides non codants simple brin. Ce sont des régulateurs clés de l'expression du génome. Ils peuvent intervenir dans la réponse à certains stress biotiques (tolérance à *Pseudomonas syringae* chez *Arabidopsis* : Navarro *et al.*, 2006) et abiotiques (tolérance à la privation de

phosphate chez *Arabidopsis*: Fujii *et al.*, 2005). Les miRNA et siRNA s'associent à un complexe protéique pour former le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui va s'apparier à l'ARNm cible. Avec les miRNA, l'appariement est imparfait ce qui bloque la transcription tandis qu'avec les siRNA, l'appariement parfait permet une coupure endonucléolitique qui détruit les ARNm (Dautry et Ribet, 2004).

Pour ce qui est des CSD, ils sont traduits mais leurs ARNm ne s'accumulent pas à cause des miR398. En réponse au stress oxydatif, les miR398 sont sous-exprimés limitant ainsi leur action sur les gènes CSD. La sous-expression des miR398 permettrait l'accumulation des ARNm de CSD puis leur traduction qui permettrait la détoxication des ROS et donc la résistance des plantes aux stress (Sunkar *et al.*, 2006).

* L'activation des métabolismes primaires

Pendant l'hiver, les plantes voient leur respiration, leur photosynthèse et toute leur machinerie pour la synthèse protéique être activées ce qui permet de maintenir la croissance et le processus d'acclimatation (Guy, 1990). Hughes et Pearce (1988) ont démontré que, chez l'orge, la croissance diminuait d'abord fortement avec le froid puis qu'elle augmentait au bout de quelques jours, même si celle-ci demeurait plus faible qu'à température normale.

Levitt (1980) a montré que la photosynthèse apportait l'énergie nécessaire pour l'acclimatation au froid des plantes ce qui leur permet de résister au gel. Mais les basses températures ont pour effet de diminuer la vitesse des réactions enzymatiques dans les cellules. Selon l'équation d'Arrhenius, $k = Ae^{-Ea/RT}$ (où k est la vitesse de réaction, A une constante dépendante de la réaction étudiée, Ea l'énergie d'activation, R la constante des gaz et T la température en kelvin), une diminution de température induit une diminution exponentielle de la vitesse de réaction de l'enzyme. Pour contrecarrer l'effet du froid, les êtres vivants devraient produire beaucoup plus d'enzymes mais ceci leur coûterait beaucoup trop d'énergie (D'Amico *et al.*, 2002). L'adaptation la plus efficace serait donc la synthèse d'enzymes ayant une meilleure efficacité catalytique (isoformes) à basse température. Cette adaptation, en terme d'isoformes, peut être étudiée par les analyses du protéome.

2- Transmission du signal froid

Pour mettre en place les moyens de lutte contre le froid, les plantes doivent tout d'abord le percevoir. La voie de transduction n'est pas encore complètement connue mais différentes hypothèses sont émises.

a. Rigidification de la membrane plasmique, cytosquelette et calcium

Pour Murata et Los (1997), la fluidité de la membrane plasmique joue un rôle déterminant dans la perception du stress froid. Un détecteur serait localisé dans les microdomaines de la membrane plasmique. Il ressentirait les changements de phase physique avec la rigidification de la membrane ce qui provoquerait un changement de conformation de ce détecteur et déclencherait une cascade de phosphorylations-déphosphorylations pour débuter la transduction du signal froid. Ce détecteur pourrait ressembler à une histidine kinase comme Hik33 chez *Synechocystis* (Murata et Los, 2006) ou être un canal calcique (Monroy et Dhindsa, 1995).

Ainsi, la rigidification de la membrane couplée au réarrangement du cytosquelette permettrait la réponse de cellules en suspension de *Medicago sativa* aux basses températures (Örvar *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré que l'addition de substances déstabilisant la membrane plasmique agit sur la réponse au froid. Ainsi le DMSO provoque la rigidification de la membrane et mime les effets du froid sur l'expression du gène *cas30*, l'influx de Ca^{2+} et l'acclimatation au froid. Quant à l'ajout de jasplakinolide (toxine d'une éponge marine), qui stabilise certains types d'actine et empêche l'influx de calcium, il empêche une acclimatation au froid complète. Le cytosquelette est couplé à la membrane plasmique et le fait de le stabiliser empêche l'ouverture des canaux calciques activés par l'étirement ("stretch-activated") chez les plantes (cellules épidermiques d'oignon (Ding et Pickard, 1993)). La rigidification de la membrane déstabilise le cytosquelette et déclenche l'ouverture des canaux calciques et l'influx de Ca^{2+} .

Certains auteurs proposent que les canaux calciques soient les détecteurs primaires (Minorsky, 1989; Monroy et Dhindsa, 1995) mais Örvar et collaborateurs (2000) ont démontré que l'influx de calcium est en aval de la rigidification de la membrane puisqu'il est inhibé quand la membrane plasmique est fluidisée et déclenché à 25°C quand du DMSO est appliqué ce qui rigidifie la membrane.
Monroy et collaborateurs (1993) montrent l'existence d'une corrélation positive entre la disponibilité du calcium, l'expression des gènes CAS (Cold-Acclimation Specific genes), appelés aussi COR (COld Regulated gene), et le développement de la tolérance au gel chez *Medicago sativa*. Le calcium serait donc bien un important second messager pour la transduction du signal froid. Cette hypothèse est renforcée par l'utilisation de chélateurs du calcium ou d'agents bloquants des canaux calciques qui empêche l'acclimatation au froid (Monroy et Dhindsa, 1995). Le calcium est surtout stocké dans la paroi et la vacuole. Dans le stress froid, c'est celui localisé dans la paroi qui est majoritairement relargué dans la cellule (Knight *et al.*, 1996). Monroy et Dhindsa (1995) observent que l'accumulation de calcium est transitoire dans la cellule et que le calcium libéré doit sûrement être transféré dans la vacuole pour rétablir une homéostasie pour le calcium cytoplasmique de la cellule végétale.

b. MAP kinases (Mitogen-Activated Protein)

Parmi les voies de transduction du signal, celle des MAP kinases (MAPK) est activée par le froid et la sécheresse (Jonak *et al.*, 1996), mais aussi par d'autres stress tels que le vent ou l'augmentation de la concentration en ozone (Samuel *et al.*, 2002 ; Mishra *et al.*, 2006). Ces MAPK sont des sérine/thréonine kinases. La cascade des MAPK fait intervenir 3 kinases : la MAP3K serait activée par un messager du signal froid, elle phosphoryle la MAP2K sur ses résidus sérine et thréonine qui elle-même phosphorylera la MAPK (Figure 8). Sangwan et Dhindsa (2002) ont identifié, chez *Medicago sativa*, des MAPK activées par les chocs thermiques froid SAMK (cold shock-activated MAPK) et chaud HAMK (heat shock-activated MAPK). L'activation de SAMK se ferait via la rigidification de la membrane plasmique, la réorganisation du cytosquelette, l'influx de calcium et la cascade des MAPK.



Figure 8 : La cascade des MAP kinases.

c. Appareil photosynthétique : le chloroplaste

Huner et collaborateurs (1998) proposent comme hypothèse que l'appareil photosynthétique perçoit les changements de température grâce au déséquilibre de la balance entre l'énergie absorbée par photochimie et celle utilisée dans la chaîne de transport des électrons et le métabolisme de la plante. En effet, les réactions photochimiques des photosystèmes II et aussi I se déroulent plus rapidement que le transport d'électrons et le métabolisme surtout lorsque la diminution de la température réduit les activités enzymatiques. De l'énergie lumineuse en excès conduit donc à une perturbation de la balance énergétique qui entraîne généralement la photoinhibition (baisse durable du rendement du photosystème II). La production de ROS est habituelle dans les chloroplastes puisque la formation d'oxygène a lieu à proximité d'une source d'électrons, la plante possède un système de détoxication. Mais lors de la photoinhibition, il y a accumulation de ces ROS qui vont endommager les pigments et les membranes des thylakoïdes.

Une fois le signal froid ressenti, il serait donc transmis via une cascade de kinases et de phosphatases menant à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui activeraient la transcription des gènes COR. L'expression de ces gènes est responsable de l'ajustement du métabolisme de la croissance à de basses températures et du développement de la tolérance au gel. Artus et collaborateurs (Artus *et al.*, 1996) montrent que l'expression constitutive de COR15a chez *Arabidopsis* non acclimatée augmente la tolérance au gel.

Les gènes répondant aux basses températures sont également induits par d'autres stimuli tels que : la sécheresse, la salinité ou l'acide abscissique. Il est donc difficile d'identifier les différentes composantes du signal menant à l'activation de gènes spécifiques.

3- Régulation de la réponse au froid

Nous avons séparé les voies de régulation au froid selon leur dépendance à l'ABA mais Knight et collaborateurs (2004) ont montré que, chez *Arabidopsis*, les CBF1 à 3 peuvent aussi répondre à l'ABA mais de façon plus modérée qu'au froid.

a. Les voies ABA-indépendantes (Acide Abscissique)

***** La voie des CBF (C-repeat Binding Factor)

Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (1994) observent que l'expression des gènes des CBF est induite après 1 heure à basse température, et que les facteurs de transcription qu'ils codent activent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse au froid, les gènes *cor* (COld Regulated). Les protéines COR n'ont pas toutes une activité enzymatique connue, beaucoup d'entre elles sont hydrophiles et thermostables. FAD8 d'*Arabidopsis* est une désaturase d'acides gras chloroplastique qui modifie la composition lipidique des membranes (Gibson *et al.*, 1994). D'autres pourraient être des cryoprotectants comme les HSP (Heat Shock Protein) qui, pour certaines, stabilisent les protéines (hsp70 de l'épinard, Anderson *et al.*, 1994).



Figure 9 : La voie des CBF.

Selon Puhakainen (2004)

A ce jour, six CBF ont été identifiés chez *Arabidopsis*, mais chez *Triticum aestivum* jusqu'à 25 gènes différents de CBF ont été découverts (Badawi *et al.*, 2007). Les CBF sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la famille AP2/ERF (APetala2 / Ethylene Response Factor) des protéines se liant à l'ADN (Stockinger *et al.*, 1997). Chez *Arabidopsis*, CBF1, CBF2 et CBF3 interviendraient dans l'acclimatation au froid, CBF4 jouerait un rôle équivalent aux autres CBF mais dans l'adaptation à la sécheresse (Haake *et al.*, 2002) et, DDF1 et DDF2 (Dwarf and Delayed-Flowering) interviendraient dans la tolérance au stress salin et dans la biosynthèse de la gibbérelline (Magome *et al.*, 2004). Les CBF se lient à des éléments contenant la séquence CCGAC, aussi appelés CRT (C-Repeat) ou DRE (Dehydration Responsive Element) parce qu'ils ont été détectés lors d'études sur la déshydratation (Thomashow, 1999) (Figure 9).

La surexpression de CBF1 chez Arabidopsis induit l'expression de nombreux gènes répondant au froid contenant le CRT et cela sans le stimulus froid (Jaglo-Ottosen et al., 1998). De plus, ces plantes transgéniques non acclimatées sont plus tolérantes au gel que les plantes sauvages non acclimatées. Les auteurs en ont conclu que le régulon CBF comprenait des gènes qui avaient un rôle dans l'acclimatation au froid. Gilmour et collaborateurs (1998) montrent que les taux de transcrits de CBF1, CBF2 et CBF3 augmentent fortement 15min après le transfert des plantes à basse température. Ceci est suivi de l'accumulation de transcrits des gènes COR environ deux heures après, ce qui confirme le rôle des CBF dans l'acclimatation au froid. En 2000, Gilmour et collaborateurs ont montré que les plantes surexprimant CBF3 présentent une tolérance au gel sans passage par une période de basses températures. Toutefois, ces plantes ont une croissance et un développement très ralentis en conditions normales. La surexpression de CBF3 dans des conditions normales de croissance serait donc défavorable ce qui confirme l'hypothèse proposée par Xin et Browse (1998). Pour eux, l'acclimatation à 5°C ne permet pas d'atteindre la tolérance au gel maximale. En effet, l'acclimatation au froid doit être suffisante pour assurer la survie de la plante sans pour autant limiter sa compétitivité (capacité de rivaliser avec d'autres plantes). C'est pourquoi les auteurs font l'hypothèse qu'un niveau supérieur de tolérance au gel pourrait être atteint par ces plantes mais juste en cas de nécessité. Des orthologues des CBF d'Arabidopsis ont été retrouvés chez d'autres espèces telles que le blé, le riz, la tomate (Jaglo et al., 2001) mais aussi le bouleau (Puhakainen et al., 2004), ce qui montre que les CBF sont hautement conservés chez certaines plantes.

Comme le motif LTRE CCGAC n'est pas présent dans la région promotrice des gènes CBF/DREB induits par le froid, il n'y a pas d'autorégulation de ces gènes (Gilmour et al., 1998). En effet, les CBF eux-mêmes n'auront aucun effet sur leurs propres promoteurs (Figure 9). Il semble donc que d'autres éléments existent. Comme la réponse aux basses températures est très rapide, avec accumulation des transcrits CBF en 15min, certains auteurs proposent l'existence d'une forme inactive d'un facteur qui pourrait être constitutivement présente dans la cellule à température contrôlée. Son expression serait activée par l'exposition aux basses températures (Gilmour et al., 1998; Xin et Browse, 1998), il est appelé « ICE » (Inducer of CBF Expression, Figure 9). ICE1 a été isolé et caractérisé chez Arabidopsis par Chinnusamy et collaborateurs (2003). C'est un activateur transcriptionnel de type MYC-like qui peut se lier à une ou plusieurs des cinq séquences MYC du promoteur de CBF3 (1 seule dans les promoteurs de CBF1 et CBF2). Chez le mutant *ice1*, il n'y a plus accumulation des CBF3 en réponse au froid ce qui diminue l'expression des gènes cibles des CBF lors du froid (Chinnusamy et al., 2003). Novillo et collaborateurs (2004) ont montré que CBF2 est un inhibiteur de CBF1 et CBF3, ce qui permet une expression transitoire et contrôlée de ces deux protéines (Figure 9).

Pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de la voie des CBF mis en place pour la réponse au froid, de nombreux autres mutants d'Arabidopsis thaliana ont été sélectionnés. Le mutant hos1 (High expression of OSmotically responsive gene) d'Arabidopsis a une réponse accrue des gènes dont l'expression est modifiée lors de la réponse au froid. HOS1 est un répresseur de l'expression des CBF puisque sa mutation augmente l'expression à la fois des CBF et de leurs gènes cibles. Il code une protéine qui ciblerait les protéines régulant les CBF (comme ICE1) en contrôlant leur turnover (Lee et al., 2001). Quand HOS1 est exprimé, il détruit ICE1 ce qui empêche le déclenchement de la réponse au froid (Figure 9). Il a été montré que les taux d'ARNm de hos1 diminuent transitoirement en réponse aux basses températures jusqu'à être quasi-nuls au bout de 30min, puis reviennent à leur taux initial au bout d'une heure. Cette diminution transitoire permet à ICE1 d'activer les gènes des CBF (Lee et al., 2001). Le mutant chs3 (chilling-sensitive) est un mutant d'Arabidopsis sensible au froid. Il ne montre pas de libération de calcium par le froid et présente un faible niveau d'expression de certains gènes cor : LTI78 et KIN1. Ceci pourrait s'expliquer par un faible niveau de facteurs de transcription CBF (Knight, 2002). Son équipe a réalisé des constructions géniques (promoteur avec l'élément CRT fusionné avec un gène rapporteur) qui ont montré que l'expression des gènes portant un élément CRT est induite par

l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire ou est inhibée par les chélateurs de Ca^{2+} . Ils ont ainsi montré que l'expression des gènes CBF est dépendante du calcium (Figure 9).

Le mutant *los4-1* (Low response to Osmotic Stress, Ishitani *et al.*, 1998) d'*Arabidopsis* transgénique montre une expression réduite de RD29A-LUC (luciférase qui rend les plantules luminescentes) en réponse au froid mais pas à l'ABA et au stress salin. Ce mutant est sensible au froid parce qu'il n'exprime plus les gènes CBF (Gong *et al.*, 2002). LOS4 code une hélicase à ARN et interviendrait dans la régulation du métabolisme des ARN. La résistance au froid peut être restaurée en surexprimant CBF3. Ce mutant est très sensible au froid à l'obscurité ce qui pourrait être dû à l'absence de CBF2 puisque seul CBF2 est exprimé chez *Arabidopsis* de type sauvage à l'obscurité. LOS4 est un activateur de l'expression des CBF (Figure 9) permettant l'expression de gènes impliqués dans l'acclimatation au froid.

Le mutant *fry2* (fiery2) montre une super-induction des gènes contenant l'élément CRT donc FRY2 régule négativement l'activation de ces gènes. Il agirait en amont des CBF (Xiong *et al.*, 2002). La voie des CBF est de mieux en mieux comprise grâce aux mutants d'*Arabidopsis* et de nouveaux facteurs de transcription sont régulièrement découverts (revues de Gao *et al.*, 2007 et Sreenivasulu *et al.*, 2007).

***** Autres voies ABA-indépendantes

Deux mutants d'Arabidopsis montrent une tolérance au gel accrue même sans acclimatation au froid. *eskimo1* accumule des taux élevés de proline et de sucres solubles sans présenter une expression constitutivement élevée des CBF. Par conséquent, la voie de signalisation qui permet l'acclimatation au froid, chez *esk1*, est différente de la voie des CBF (Xin *et al.*, 1998). Pour les différents mutants *sfr* (Sensitive to FReezing), Warren et collaborateurs (1996) ont observé qu'ils sont incapables de s'acclimater complètement comparativement à la plante sauvage. Ceci s'explique par le fait que chaque mutation *sfr* touche une voie de signalisation différente et donc chaque mutant utilise les autres voies disponibles pour s'acclimater au froid. Par exemple, pour *sfr6*, c'est la tolérance au stress osmotique qui est réduite (Knight *et al.*, 1999). Pour *sfr4*, c'est une déficience en sucres solubles après l'acclimatation au froid (Uemura *et al.*, 2003).

Il existe une autre grande voie de transmission du stimulus basse température qui est ABA dépendante. La voie des CBF signale le stress précocement tandis que la voie ABA fonctionne après accumulation d'ABA.

b. La voie ABA dépendante

L'ABA est, en effet, impliqué dans la réponse au froid car une augmentation transitoire des concentrations d'ABA endogène est observée au froid chez *Arabidopsis thaliana* (Lang *et al.*, 1994) et une application d'ABA exogène peut induire une augmentation de la tolérance au gel chez les plantes d'*Arabidopsis* qui ont poussé à 22°C (Mantylä *et al.*, 1995). De plus, les mutants ABA-insensitive (*abi* : insensible à l'ABA) et ABA-deficient (*aba* : déficient en ABA) ne présentent pas une acclimatation totale au froid (Heino *et al.*, 1990). L'application d'ABA exogène peut rétablir l'acclimatation au froid chez les mutants *aba*.



Figure 10 : La voie ABA dépendante.

Selon Puhakainen (2004) et Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (2005).

Pour cette voie ABA dépendante (Figure 10), les éléments cis sont les ABRE (ABA Response Element) avec pour séquence consensus C/T<u>ACGT</u>GGC dans le promoteur des gènes qui répondent à l'ABA et au froid. Il existe des ABRE ne contenant pas cette séquence mais <u>CGCGT</u> (Choi *et al.*, 2000). Quant aux éléments trans, ce sont les AREB1 et AREB2 (ABA Responsive Element Binding protein) dont les gènes répondent à la sécheresse, au stress salin et à l'ABA (Palva *et al.*, 2002). Ce sont des facteurs de transcription de type bZIP (Choi *et al.*, 2000). Les gènes codant les AREB (ou ABF : ABRE Binding Factors) sont euxmêmes induits par l'ABA (Figure 10) et présentent des régulations différentes selon les stress puisque ABF1 est induit par le froid, ABF2 et ABF3 par les fortes concentrations en sel et ABF4 à la fois par le froid, le sel mais aussi la sécheresse (Choi *et al.*, 2000).

III- Les méthodes utilisées pour notre étude

Nous venons d'aborder la diversité des réponses des plantes au froid. Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes focalisés sur deux approches complémentaires pour l'étudier. L'approche protéomique va nous permettre d'obtenir une cartographie de la réponse du protéome au froid en vue d'identifier les modifications des profils protéiques et ainsi de pouvoir mettre en évidence les voies métaboliques clés de l'acclimatation au froid. La seconde approche est une étude génétique basée sur la cartographie de QTL (Quantitative Trait Loci) de différentes données (dosage de quelques métabolites, conductimétrie, note de tolérance au gel,...) et de PQL (Protein Quantitative Loci) par utilisation de lignées recombinantes (RIL). Ces RIL sont issues d'autofécondations successives des individus F2 dérivés du croisement entre deux lignées parentales. Cette approche génétique permettra de cerner les régions chromosomiques d'intérêt. Nous observerons aussi le comportement des protéines répondant au froid, cette fois-ci, chez les lignées recombinantes afin de savoir s'il y a réellement un lien génétique entre les protéines mises en évidence lors de la réponse au froid et si ces protéines pourraient être utilisées comme aide à la sélection.

1- La protéomique

La protéomique consiste en l'analyse du protéome c'est-à-dire de l'ensemble des protéines qu'il nous est possible d'extraire d'un type de tissu, à un moment donné et dans une situation donnée. Le terme protéome a été inventé en 1994 par Wilkins pour faire un parallèle avec le génome. Si le génome est unique (même s'il peut y avoir différents allèles pour un gène), le protéome est multiple. En effet, le protéome d'une feuille de pois stressé par le froid

ne sera pas le même que celui de cette même feuille non stressée par exemple. Le protéome peut être extrait de différents organes voire de différents organites (mitochondries, chloroplastes...).

L'électrophorèse bidimensionnelle est un bon outil pour séparer des mélanges complexes de protéines. Elle a été utilisée pour obtenir des cartes de référence du protéome de végétaux au niveau d'organes (feuilles, tiges ou racines de *Medicago truncatula* (Watson *et al.*, 2003)), de tissus (endosperme du maïs (Méchin *et al.*, 2004) ou paroi cellulaire du maïs (Zhu *et al.*, 2006)), d'organites (noyau de feuilles d'*Arabidopsis* (Bae *et al.*, 2003) ou chloroplaste d'*Arabidopsis* (Goulas *et al.*, 2006)), ou de cellules de cultures en suspension comme chez *Medicago truncatula* (Lei *et al.*, 2005).

Avec cette technique, l'étude du protéome au cours d'une cinétique telle que l'évolution du contenu en protéines dans les graines de *Medicago truncatula* (Gallardo *et al.*, 2003) ou de soja (Hajduch *et al.*, 2005) a pu être réalisée. La 2-DE peut aussi permettre de classer des espèces telles que le café (Gil-Agusti *et al.*, 2005) en détectant les protéines spécifiques aux différentes espèces et ainsi servir pour le contrôle qualité. Des mutants ou des écotypes peuvent aussi être comparés afin de préciser quelles protéines les différencient (Chevalier *et al.*, 2004). L'étude du comportement d'espèces vis-à-vis d'un stress comme la sécheresse et la salinité chez le riz (Salekdeh *et al.*, 2002), le froid chez le peuplier (Renaut *et al.*, 2004) ou le riz (Cui *et al.*, 2005, Hashimoto et Komatsu, 2007), est facilitée en comparant le profil de plantes stressées à celui de plantes témoins. De même, l'étude de l'effet de différentes concentrations d'azote sur deux variétés de blé (Bahrman *et al.*, 2004) a aussi été réalisée afin d'identifier les protéines qui fluctuent et évaluer leur implication dans l'utilisation de l'azote.

Enfin, la protéomique peut être couplée à la génétique (Thiellement *et al.*, 1999) si on observe le comportement des spots sur les gels. Il peut y avoir des variations qualitatives avec apparition ou disparition d'un spot, voire déplacement (shift) d'un spot par rapport à son pI s'il y a variation allélique (par substitution), ou par rapport à son poids moléculaire s'il y a une modification post-traductionnelle ou une insertion/délétion, ou encore des variations qualitatives avec augmentation ou diminution de la quantité d'une protéine. Les différences qualitatives peuvent être observées à l'œil nu sur les gels et sont sûrement sous contrôle monogénique (Bahrman et Damerval, 1989). En observant ainsi les protéines communes chez des mégagamétophytes de pin provenant de sept zones différentes, Bahrman et collaborateurs (1994) ont montré que ces arbres pouvaient être classés en trois groupes selon leur origine géographique. Les études en électrophorèse bidimensionnelle peuvent aussi être utilisée pour

la cartographie génique car les protéines peuvent servir de marqueurs (de Vienne *et al.*, 1999). Ces marqueurs protéiques seront plus informatifs que les marqueurs moléculaires puisqu'ils reflèteront mieux le phénotype étant donné que la protéine exprimée est à l'origine de ce phénotype (Thiellement *et al.*, 2002).

Les profils d'expression globale de protéines peuvent être comparés entre les plantes soumises au froid et les plantes témoins. Cui et collaborateurs (2005) ont étudié les feuilles de plantes de riz qui étaient soumises successivement à 16°C pour la culture témoin, à 15°C puis 10°C et 5°C (par palier de 24 heures). Pour les protéines solubles, 37 (sur 1330) sont surexprimées lors de la diminution de température. Les auteurs ont identifié des protéines intervenant dans le métabolisme et l'assemblage des protéines (chaperonines), des protéines participant à la biosynthèse des composants de la paroi cellulaire, d'autres intervenant dans la détoxication (glutathione S-transferase) et enfin des protéines jouant un rôle dans la production d'énergie (oxygen-evolving complex proteins). Une autre étude sur le riz a été réalisée par Hashimoto et Komatsu (2007). Cette fois, les plantes ont été transférées directement de 25°C à 5°C pendant 48 heures. Dans les racines, sept protéines étaient surexprimées et cinq sous-exprimées, dans les feuilles (limbe et gaine), 12 étaient surexprimées et 15 sous-exprimées. Une S-méthyltransférase était sous-exprimée à la fois dans la racine et dans la feuille, il pourrait donc y avoir des voies de réponses communes entre les organes mais la plupart des protéines présentaient des variations organe-spécifiques. Dans les feuilles, deux protéines étaient communes aux deux études (l'UDP-glucose pyrophosphorylase et l'oxygen-evolving complex), elles pourraient donc avoir une réelle implication dans la réponse au froid du riz quel que soit le protocole expérimental.

Amme et collaborateurs (2006) ont utilisé la technique 2D-DIGE pour étudier le protéome des feuilles d'*Arabidopsis*. Après 1 semaine de stress froid à 6°C, 22 spots montraient des variations entre les plantes témoin et les plantes stressées. Si les plantes étaient placées à 10°C au lieu de 6°C, 18 protéines (sur les 22) avaient encore des variations significativement différentes par rapport au témoin mais avec un moindre écart. Bae et collaborateurs (2003) se sont intéressés, plus précisément, au protéome du noyau des feuilles d'*Arabidopsis*. Ils ont placé les plantes à 4°C et à l'obscurité pendant 6 heures après trois semaines à 22°C pour étudier la régulation de l'expression des protéines lors du stress froid. Ils ont identifié 184 protéines pour faire la carte du protéome, parmi elles 54 varient avec le froid : des protéines de choc thermique, des facteurs de transcription, des protéines se liant à l'ADN... L'étude d'un autre organite, le chloroplaste, d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée

par Goulas et collaborateurs (2006) en séparant le stroma du lumen. Ils observèrent que 43 protéines étaient différentiellement exprimées dans le stroma. Elles ont un rôle dans la photosynthèse, la synthèse d'hormones ou encore la transduction du signal.

Le froid a aussi été étudié chez le lin lors de stress froid de courtes durées (1min à 2 heures) (Tafforeau *et al.*, 2002). Ils ont détecté sept spots corrélés au choc froid et ont essayé d'identifier les protéines grâce au séquençage d'Edman (partie N-terminal). Une seule a pu être identifiée, la saccharopine dehydrogenase qui participe au catabolisme de la lysine.

Une étude a aussi été menée sur un ligneux, le peuplier (Renaut *et al.*, 2004), chez qui les basses températures (4°C) n'empêchent pas la survie de l'arbre mais ont un effet négatif sur sa croissance. Ces auteurs ont observé que 60 protéines ont des changements significatifs entre le témoin et les plantes placées à 4°C pendant 7 ou 14 jours. La majorité est constituée de protéines chaperonne-like, d'autres sont impliquées dans la transduction du signal ou encore dans la détoxication.

En conclusion, les études du protéome montrent que les mêmes classes de protéines sont impliquées dans l'acclimatation au froid chez les herbacées et les plantes ligneuses. Mais si les protéines différentiellement exprimées appartiennent aux mêmes classes, elles ne sont pas forcément les mêmes, parce qu'il faut tenir compte du protocole expérimental et de l'espèce étudiée.

2- Les Quantitative Trait Loci (QTL)

Dès 1923, Sax remarque une association entre la taille de la graine de haricot (caractère continu) et la pigmentation des téguments de la graine (caractère discontinu ou mendélien). Il attribue cela à la liaison entre le facteur génétique qui contrôle la taille de la graine et le locus déterminant sa couleur. Geldermann (1975) évoque le terme de QTL (Quantitative Trait Loci). Un QTL est une zone chromosomique polymorphique qui contient les allèles qui touchent différentiellement l'expression d'un caractère quantitatif, résultant de l'expression de plusieurs gènes (de Vienne et Causse, 1998). Pour l'étude de QTL, il est nécessaire d'avoir une population en ségrégation pour le caractère d'intérêt. Cette population peut être, entre autres, une descendance F2, une population issue de backcross (croisement d'un individu avec l'un de ses parents) ou encore une population de lignées recombinantes. Ces lignées recombinantes sont fixées (ou presque) et des copies identiques de chaque plante

pourront être obtenues ce qui permettra une meilleure précision lors de la mesure de caractères quantitatifs (Plomion, 1995).

Il faut noter que l'environnement joue un rôle important dans la présence ou non d'un QTL. De Vienne et Causse (1998) distinguent les QTL présents dans tous les environnements, appelés QTL généralistes, des QTL spécifiques.

Pour accéder aux QTL, la population doit déjà être génotypée sur un certain nombre de marqueurs idéalement placés tous les 10cM (Darvasi *et al.*, 1993). Les marqueurs peuvent être physiologiques, biochimiques ou morphologiques mais, de plus en plus, ils sont moléculaires (Santoni *et al.*, 2000). Les marqueurs moléculaires sont issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN : microsatellites (séquences de 1 à 4 nucléotides répétées n fois), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ou des EST (Expressed Sequence Tag)... Les cartes génétiques saturées (nombreux marqueurs et autant de groupes de liaison que de chromosomes) permettent d'obtenir des QTL plus précis (zone restreinte du chromosome) ce qui facilite l'utilisation des liaisons entre marqueurs et QTL pour la sélection assistée par marqueurs.

En amélioration des plantes, les détections de QTL se font sur de nombreux caractères comme par exemple, le rendement, avec des études sous différentes conditions d'apport d'azote comme pour le maïs cultivé (Ribaut *et al.*, 2007) ; la saveur avec des QTL de sucres et autres composés chez la tomate (Fulton *et al.*, 2002) ou encore la résistance à certaines maladies et parasites comme la résistance partielle à *Aphanomyces* chez le pois (Pilet-Nayel *et al.*, 2005).

En ce qui concerne les stress abiotiques, différents travaux se sont intéressés notamment au stress salin chez le riz (Koyama *et al.*, 2001) avec la cartographie de QTL de consommation en sodium, en chlorure et aussi en potassium ; au stress forte température avec l'identification, chez le blé, de deux QTL (Yang *et al.*, 2002) ; à la tolérance à la sécheresse chez le coton avec la cartographie de QTL de rendement et de pression osmotique (Saranga *et al.*, 2004) ; à l'anoxie chez le riz avec un QTL de tolérance à la submersion (Toojinda *et al.*, 2005) ou à la tolérance à l'aluminium chez *Arabidopsis thaliana* avec présence d'un QTL associé à un transporteur de malate (excrétion) mais aussi de deux autres QTL (Ikka *et al.*, 2008).

Pour le stress froid, des travaux chez le saule (Tsarouhas *et al.*, 2004) ont mis en évidence la présence d'un QTL de résistance au gel expliquant 45% de la variation phénotypique. Une étude menée chez le riz (Zhang *et al.*, 2005) montre qu'après 10 jours à

10°C, des QTL à effets mineurs sont détectés alors qu'après 13 jours à 10°C, il existe un QTL majeur et des QTL mineurs. Ceci est sûrement dû à l'interaction génotype×environnement. Il est donc important de faire des tests dans différentes conditions. Alonso-Blanco et collaborateurs (2005) ont localisé, chez *Arabidopsis thaliana*, 7 QTL de tolérance au gel dont un colocalise avec le cluster CBF (C-repeat binding factor), facteurs de transcription impliqués dans la réponse au froid. Chez le maïs, Presterl et collaborateurs (2007) ont cartographié deux QTL de tolérance au gel colocalisés avec un QTL de rendement en matière fraîche. La tolérance au gel a également été étudiée chez le pois au champ (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008). Cette étude a détecté plusieurs QTL dont un majeur colocalisé avec le gène *Hr* sur le chromosome 3.

Dès 1994, Damerval et collaborateurs utilisent le principe de la cartographie des QTL pour analyser le déterminisme génétique, dans une population F2 de maïs, de la variation quantitative de 72 protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Le caractère mesuré est la quantité de ces protéines dans une population donnée. Des PQL (Protein Quantitative Loci) sont ainsi cartographiés. S'il y a co-localisation d'un PQL d'une protéine impliquée dans la réponse au froid et d'un QTL d'un caractère lié à la réponse de la plante au froid, ceci ajoute un argument génétique à un argument physiologique pour confirmer l'hypothèse d'une relation entre variations phénotypique et protéique (Thiellement *et al.*, 1999).

Les PQL obtenus avec les données d'analyse de gels d'électrophorèse bidimensionnelle du fait du nombre de caractères accessibles sont nombreux comme les eQTL (expression QTL) obtenus avec les microarrays (Jansen et Nap, 2001). Différentes études ont utilisé ces eQTL. Keurentjes et collaborateurs (2007) ont étudié les eQTL des parties aériennes d'*Arabidopsis* et se sont principalement intéressés aux gènes de floraison. Ces auteurs ont analysé la distribution des eQTL le long du génome et ont trouvé des régions génomiques contenant un grand nombre de eQTL. Ces "hot spots" pourraient représenter des régions riches en gènes et/ou pourraient contenir des gènes régulateurs (Keurentjes *et al.*, 2007). Chez l'orge, des gènes candidats pour l'interaction entre la plante et la rouille ont pu ainsi être mis en évidence grâce aux eQTL : ceux de l'histidine kinase ou de l'ADF (actin depolymerising factor) qui agiraient à la fois pour protéger la plante du stress froid mais aussi du stress biotique provoqué par *Puccinia graminis* causant la rouille (Druka *et al.*, 2008).

Après cette analyse bibliographique sur le pois, le stress froid et les méthodes employées pour notre étude de l'acclimatation au froid, nous allons aborder la partie matériels et méthodes.

MATERIELS ET METHODES

I- Matériel végétal

Nous avons étudié deux lignées de pois, Champagne (pois fourrager, au feuillage de type conventionnel, avec un bon niveau de résistance au gel) et Térèse (pois protéagineux de printemps, type *afila* très sensible au gel), ainsi que certaines des 164 lignées recombinantes (RIL : Recombinent Inbred Lines) issues de leur croisement.

Les RIL obtenues à l'INRA d'Estrées-Mons sont issues d'autofécondations successives (génération 8) des individus F2 dérivés du croisement Champagne (\bigcirc) × Térèse (\bigcirc). Cette population a déjà été caractérisée pour un certain nombre de marqueurs (Loridon *et al.*, 2005, Aubert *et al.*, 2006). Parmi ces 164 RIL, 78 sont de type *Hr* (High responsive) comme le parent Champagne et 73 constituent la sous-population *Hr* que nous avons étudié (mort de 5 RIL). Le choix de se limiter uniquement à cette sous-population nous a permis de nous affranchir de l'effet de cet allèle majeur dans nos résultats.

La culture des plantes a été réalisée en chambre climatisée à l'INRA d'Estrée-Mons. Lors de notre étude, nous avons comparé ce qui se passe chez les plantes acclimatées et celles qui ne le sont pas. Il a donc été mis en place des séries d'expérimentations avec deux cinétiques : acclimaté et contrôle (non acclimaté).

Les semences ont été traitées à l'aide d'un fongicide, le Wakil®, pour prévenir l'apparition de maladies comme l'anthracnose ou la bactériose. La veille du semis, les terrines ont été mises en chambre climatisée pour que les mottes soient à température pour le semis. Les graines ont été placées dans un mélange de tourbe, de chaux et de fertilisant azoté placé au-dessus de la perlite qui permet une meilleure restitution de l'eau. L'arrosage est réalisé à la main tous les 2 jours avec 1,5L d'eau répartie uniformément par terrine (sauf pendant le gel). La photopériode est reproduite grâce à un ensemble de tubes fluorescents (40 tubes Fluora® et Biolux® ainsi que 40 tubes Fluo-compacts Philips) et l'association de ces sources a permis d'obtenir le spectre lumineux similaire à celui de la lumière naturelle. L'ensemble des tubes est allumé pour les phases de conditions optimales de croissance et de réchauffement soit une intensité de 300 µmol.m⁻².s⁻¹ et uniquement les tubes Fluora® et Biolux® pour les phases d'acclimatation et de gel soit 250 µmol.m⁻².s⁻¹.

Figure 11 : Les deux cinétiques de l'étude.



Pour la cinétique acclimatée, après semis, les plantes ont subi successivement 4 phases de culture : nurserie (conditions optimales de croissance), acclimatation, gel et réchauffement (Figure 11). Pour la cinétique contrôle, la phase de conditions optimales de croissance a été prolongée afin que les plantes atteignent le même nombre de degré-jours que lors de l'acclimatation et les plantes ont été soumises directement au gel sans acclimatation préalable (Figure 11).

Quatre dates de prélèvement ont été choisies pour l'étude du protéome. Pour la cinétique acclimatée, les prélèvements ont eu lieu après 10 jours de conditions optimales de croissance (T1), 5 et 10 jours après le début de l'acclimatation (respectivement T_A2 et T_A3) et 3 jours après le début du gel (T_A4). Les phases de gel et de réchauffement ont permis d'attribuer à chaque lignée une note de gel représentative de sa capacité à résister ou non au gel (Figure 11).

Pour la cinétique contrôle, les prélèvements ont été réalisés après 10 jours de conditions optimales de croissance (T1 : point commun entre les 2 cinétiques) puis après 12 et 14 jours de conditions optimales de croissance ($T_{NA}2$ et $T_{NA}3$). Ces 2 derniers prélèvements correspondent, du point de vue du stade ou "âge physiologique" de la plante, à ceux de la cinétique acclimatée T_A2 et T_A3 . En effet, les plantes ont accumulé le même nombre de degré-jour et des observations phénotypiques révèlent qu'elles sont au même stade de développement. Comme les plantes de la cinétique non acclimatée n'ont pas été soumises au froid, elles poussent plus rapidement que celles soumises au froid (2 jours au lieu de 5 pour le stade T2 et 4 au lieu de 10 pour le stade T3). Enfin, un prélèvement a été réalisé après 3 jours de gel ($T_{NA}4$) : les plantes de cette cinétique ont subi directement le gel sans acclimatation préalable.

Les prélèvements ont été effectués le matin juste après le changement de température et d'éclairage (8h25) et après notation du stade de chaque plante. Cette notation prend en compte le nombre d'étages foliaires et leur déploiement : 0,25 pour les folioles qui commencent à s'ouvrir, 0,5 quand elles s'ouvrent, 0,75 quand les stipules commencent à s'ouvrir et 1 quand la feuille est épanouie (ceci pour le type conventionnel : Af, les vrilles remplaçant les folioles chez le type afila : af).

Lors du prélèvement, les parties aériennes ont été séparées des parties racinaires. Pour les échantillons (parents et lignées recombinantes) nécessaires à l'étude protéomique, la partie aérienne a été découpée en feuilles (stipules, folioles et vrilles) et bas de la tige (de l'épicotyle jusqu'à la 2^{ème} écaille) tandis que pour le dosage des métabolites chez les lignées

recombinantes, elle a été maintenue entière. Certaines études ont montré qu'il existait des variations organe-spécifiques de la répartition des protéines (découpage de Medicago truncatula : Watson et al., 2003), ce qui justifie une analyse plus fine de la distribution des protéines. De plus, Welbaum et collaborateurs (1997) ont montré que l'augmentation de la tolérance au gel chez le pois est organe-spécifique. Ils ont utilisé la mesure de conductimétrie pour estimer les dommages causés par le froid sur les membranes plasmiques (fuite d'ions). Pour l'apex racinaire (les 5 derniers millimètres de la racine principale), il y avait seulement 1°C de différence pour la T50 (température qui provoque 50% de dommages) entre les plantes (cultivar Alaska) acclimatées au froid et celles qui ne l'étaient pas. Par contre, pour l'apex caulinaire (les 5 derniers millimètres de la tige), la T50 passait de -2,2°C pour les non acclimatées à -17°C pour les plantes acclimatées et pour l'épicotyle, de -4,9°C à -12,3°C. Nous avons donc étudié l'épicotyle jusqu'à la 2^{ème} écaille qui est la zone de reprise de croissance de l'appareil aérien de la plante après le gel, les feuilles et la racine. La racine est un organe qui va mieux résister au gel que les parties aériennes puisqu'elle est protégée par le sol. La racine contient des réserves qui seront sûrement nécessaires à la plante pour qu'elle reprenne sa croissance lors de la phase de réchauffement.

Pour chaque lignée et chaque date, nous disposions de 3 répétitions biologiques comprenant chacune 5 plantes pour les métabolites et 10 pour le protéome. Les échantillons récoltés de chaque lignée et de chaque répétition ont été broyés dans un mortier en présence d'azote liquide. En ce qui concerne les parents (Champagne et Térèse), les extractions de métabolites et de protéines ont été réalisées sur la même matière fraîche broyée afin de pouvoir mettre en relation nos résultats. Pour les lignées recombinantes, les extractions de métabolites ont été faites sur la partie aérienne totale et aussi racinaire et les extractions de protéines ont uniquement été effectuées sur les feuilles (nous voulons tester la méthode PQL).

Certains caractères des lignées (Annexe 1) ont servi à l'analyse : le type de feuilles de la plante (conventionnel ou *afila*), le port avec 2 descripteurs : le nanisme (court ou long) et la présence ou l'absence d'une rosette foliaire. D'autres indications ont été relevées au cours de la cinétique comme le stade atteint par la plante avant chaque prélèvement.

Après le réchauffement, 4 paramètres ont été pris en compte : la note de tolérance au gel, le nombre de rames totales et vertes et la conductimétrie. La note de tolérance au gel, comprise entre 0 et 5, a été attribuée à chaque plante en fonction de l'aspect de la partie aérienne. Les dégâts du gel apparaissent d'abord par des brûlures sur le bord des limbes puis

des nécroses du haut vers le bas de la plante. Lorsqu'il n'y a aucun dégât sur la plante, celle-ci est notée 0 et à l'opposé, quand elle est complètement brûlée, ce sera 5. Entre les deux, les dégâts au niveau des feuilles sont observés. Si la première feuille est brûlée sur les bords, la note est de 1. Les 2 premières feuilles avec les bords brûlés donne 2, les 3 premières feuilles 3 et enfin les 3 premières feuilles totalement brûlées correspond à 4. La survie de l'individu dépendra de la proportion de tiges non nécrosées à la base mais aussi de l'état du système racinaire. Ensuite, les rames totales (y) et les rames vertes (x) ont été dénombrées. Les rames vertes sont les nouvelles pousses qui démarreront au niveau des 2 premiers nœuds de la plante qui a subi la période de gel. Enfin, la mesure de la conductimétrie a été réalisée sur les plantes qui ont servi à la notation de la tolérance au gel. La conductimétrie correspond à une mesure de fuite des électrolytes et estime les dommages au niveau des membranes plasmiques. Plus la plante a souffert du froid, plus ses membranes sont fragilisées et plus la fuite d'électrolytes est importante (Dexter et al., 1932). Deux stipules ont été prélevés par plante et placés dans 15mL d'eau déionisée pendant 24 heures. L'appareil utilisé est un conductimètre Ion check 30 (Radiometer Analytical, France). La première mesure (C_0) effectuée correspond à la quantité d'ions qui a diffusé librement à travers la membrane plasmique. Les échantillons ont ensuite été placés à -80°C pendant 24 heures pour faire exploser les cellules et mesurer la quantité totale d'ions qu'elles contiennent (C₁). Le rapport $C_0/C_1 \times 100$ nous donne le pourcentage de fuite d'électrolytes.

II- Etude du protéome

1- Extraction des protéines tissulaires

L'extraction peut ou non dénaturer les protéines selon le protocole choisi. Dans notre cas, l'utilisation du β -mercaptoéthanol mais aussi de l'urée et de l'UKS (Annexe 2) va réduire les ponts disulfures et dénaturer les protéines qui perdront leurs conformations quaternaire, tertiaire voire secondaire. La majorité d'entre elles sera linéarisée.

Le protocole d'extraction des protéines utilisé est celui de Damerval *et al.* (1986) modifié par Boyer *et al.* (1993) (Annexe 2). Nous avons majoritairement récupéré les protéines solubles. L'extraction des protéines tissulaires se déroule sur 2 jours.

2- Dosage des protéines

Afin de doser la quantité de protéines de l'échantillon, un aliquot de 2 μ L est soumis à une précipitation par ajout de 1mL d'acétone, le tout est placé à -20° C pendant 1h. Les tubes sont ensuite centrifugés 15min à 15000g à 4°C et le surnageant est éliminé. Les tubes ouverts sont placés sous la hotte pour que l'acétone s'évapore. Le culot est repris dans 25 μ L d'eau ultra pure.

Une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumine) de 0 à 1,5mg.mL⁻¹ est préparée et, pour le dosage en lui-même, les instructions du kit RCDC Protein Assay (BioRad) ont été suivies (Annexe 3). Ce dosage est de type colorimétrique, il suit la méthode de Bradford (1976). La lecture de l'absorbance se fait à 750nm.

3- Qualité des extraits

Des gels monodimensionnels (Mini PROTEAN system, BioRad) ont servi à vérifier la présence effective et la qualité des protéines dans nos échantillons ainsi que l'estimation quantitative en protéines obtenue par le kit. En effet, d'après la concentration obtenue avec le dosage, nous avons estimé le volume d'échantillon nécessaire pour avoir 5µg de protéines. Ce volume est mélangé au même volume de Laemli 2X (Annexe 4) et le tout est chauffé à 95°C pendant 3 minutes.

Les gels sont composés d'un gel de séparation à 12,5% d'acrylamide (Annexe 5) et d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide (Annexe 5).

Une fois le tout polymérisé, les puits sont chargés avec le mélange échantillon-Laemli. La migration s'effectue à 100V et se poursuit jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel (tampon de migration : Annexe 6). Le gel est coloré au nitrate d'argent (cf. coloration argentique II-5).

4- Electrophorèse bidimensionnelle

Pour l'électrofocalisation, nous avons utilisé des ReadyStrips (gels IPG) de chez Biorad de 17cm de long, et 3,3mm de large avec une épaisseur de 0,5mm. Les strips sont échelonnés de pH4 à pH7.

Il faut, en premier lieu, réhydrater les gels IPG. Ceci se fait par un mode de réhydratation actif à 50V pendant 16 heures à 20°C en présence de l'échantillon protéique (80µg) avec un tampon de réhydratation (volume de l'échantillon complété par volume du

52

tampon jusqu'à 350µL) comprenant de l'urée, du CHAPS (3-([3-.Cholamidopropyl] dimethylammonio)-1-propanesulfonate), du DTT et des ampholytes (Annexe 7) dans l'appareil PROTEAN IEF Cell (BioRad). L'urée est un chaotrope qui va promouvoir la dénaturation et la solubilisation des protéines. Il faut tout au long de l'expérience conserver une température de 20°C car à température inférieure, l'urée cristallise à l'intérieur du gel. Le CHAPS est un détergent zwittérionique qui facilite la solubilisation des protéines et minimiser les précipitations. Le DTT est un agent réducteur ioniquement chargé qui migre dans le gradient de pH lors de la focalisation ce qui permet la reformation de ponts disulfures. Les ampholytes augmentent la solubilité des protéines en minimisant leur agrégation due aux charges électrostatiques mises en présence, et assurent une conductivité uniforme au cours de la focalisation sans altérer le pH des gels IPG. La réhydratation active permet des dépôts plus importants de protéines et améliore l'entrée des protéines de hauts poids moléculaires dans le gel.

Après les 16 heures de réhydratation, des papiers buvards (BioRad) trempés dans de l'eau ultra-pure sont placés entre le strip et l'électrode. En effet, lors de la focalisation qui suit la réhydratation, des ions, des molécules chargées et des protéines exclues de la gamme de pH du strip migrent jusqu'aux électrodes où ils s'accumulent. Donc, au niveau des électrodes, il existe une surconcentration ionique locale qui augmente la conductivité et par conséquent l'échauffement par effet Joule. Il peut y avoir brûlure du strip, c'est pourquoi les papiers buvards sont placés afin que les ions, les molécules chargées et les protéines exclus de la gamme de pH soient dilués dans cette épaisseur.

Les conditions électriques de la focalisation varient avec la composition de l'échantillon et la gamme de pH utilisée. Pour nos échantillons, le programme de focalisation se fait à 20°C et comporte 4 étapes. Tout d'abord, une montée progressive à 250V pendant 1 heure, puis une montée progressive à 8000V en 5 heures suivie par une phase de 8000V jusqu'à ce que 35000VH soient atteints et enfin, une phase de maintien à 500V des strips pour que les protéines ne diffusent pas à l'arrêt de l'appareil.

Pour homogénéiser le traitement de nos différents strips, ils ont tous été congelés à -80°C dans du tampon d'équilibration (Annexe 7) jusqu'à la réalisation de la 2^{ème} dimension.

Avant de démarrer la seconde dimension, il faut équilibrer les gels IPG dans un tampon dénaturant contenant du SDS (tampon d'équilibration avec du dithiothreitol 130mM, ou de l'iodoacétamide 135mM) sous une agitation douce pour ioniser les protéines. Une première incubation de 15 minutes permet de saturer le gel en SDS et en un agent réducteur

DTT. Mais comme le DTT est chargé, une seconde incubation de 15 minutes avec de l'iodoacétamide est nécessaire afin de prévenir la réoxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et d'alkyler le DTT résiduel pour minimiser les traînées verticales en seconde dimension. Une fois le gel IPG équilibré, il est déposé au sommet du gel d'acrylamide dans une solution d'agarose LMP 0,5% préparée dans le tampon de migration SDS (Annexe 6).

Les gels sont à 12,5% d'acrylamide (Annexe 5) et sont coulés par 6 dans le Protean II xi cell (BioRad®) en utilisant l'IPG Conversion Kit (1mm, 18,5cm × 20cm, plaques de 20cm × 20cm). Avant d'ajouter le TEMED et l'APS, la solution d'acrylamide est dégazée sous pompe à vide afin d'éviter la formation de bulles dans les gels polymérisés.

La migration se fait à 50V, 300mA et 100W pendant 45 minutes pour permettre la sortie du SDS avec les protéines du gel IPG vers le gel vertical puis la tension est augmentée à 350V. La migration est stoppée quand le front de migration atteint le bas du gel.

Pour les gels de racines de Térèse et Champagne ainsi que pour les gels de feuilles des LR, une nouvelle cuve a été utilisée. Les gels sont coulés dans le DALTtwelve gel caster (GE Healthcare) et la migration se déroule dans l'Ettan DALTtwelve (GE Healthcare). La migration s'effectue sur la nuit avec 1 à 3 W par gel, au matin, la puissance est augmentée jusqu'à 25W par gel. Des tests ont été réalisés et n'ont montré aucune différence en terme de profils protéiques pour un même échantillon dont la 2^{ème} dimension a eu lieu dans l'une ou l'autre cuve.

5- Coloration argentique

La coloration argentique utilisée pour l'étude est celle de Blum et collaborateurs (1987) (Annexe 8).

Pour les 12 gels réalisés dans la cuve Ettan DALTtwelve, un large Dodeca Stainer (BioRad) est utilisé pour la coloration. Il permet de colorer les 12 gels en même temps de façon homogène. Seuls 2 rinçages dans l'éthanol 50% pendant 25 min ont été effectués. Le $2^{\text{ème}}$ bain est conservé pour servir de premier bain lors de la coloration suivante afin d'économiser de l'eau. Après le prétraitement, seulement 2 rinçages à l'eau ultra pure sont réalisés dans le même but. La révélation est stoppée avec une solution d'acide acétique 2% qui sera réutilisée plusieurs fois.

54

6- Etude des gels avec ImageMasterTM 2D Platinium

Les gels colorés sont scannés (UMAX® PowerLook 1120 piloté par le logiciel LabScan 5.0, GE Healthcare) afin d'être analysés avec l'aide du logiciel ImageMasterTM 2D Platinium 5.0 (GE Healthcare). Deux premières étapes sont nécessaires à l'étude : la détection des spots et le lissage des gels. Ensuite, pour chaque organe, un gel master (référence) est sélectionné. C'est celui qui, dans toute la cinétique, a le plus de spots. Ce gel master sera comparé à chacun des gels (Champagne ou Térèse, acclimaté ou non, 4 dates de prélèvement). Si un spot n'est pas présent dans le gel master, il y sera ajouté de façon à être pris en considération et à ce qu'il ait un numéro de groupe nécessaire pour la suite de l'étude. Le numéro de groupe est le numéro que le logiciel a donné à un spot sur le gel de référence. Ce numéro sera donné à chaque spot matché avec le spot du gel de référence. Ceci permet de retrouver l'ensemble des spots matchés sur tous les gels avec un seul et même numéro. Une analyse statistique a ensuite été réalisée pour déterminer quels spots interviennent dans l'acclimatation au froid et seront donc séquencés (cf. IV.1).

7- Gels préparatifs

La méthode utilisée pour les gels préparatifs est la même que celle pour les gels séparatifs sauf que 260µg de protéines sont chargées au lieu de 80µg. Des tests de différentes colorations argentiques (Figure 12) ont été réalisés de façon à en trouver une permettant une meilleure identification de nos spots par spectrométrie de masse (coloration compatible) : coloration à l'argent ammoniacal (Annexe 9, Chevallet *et al.*, 2006), coloration de Shevchenko (Annexe 10, Shevchenko *et al.*, 1996) et coloration de Morrissey (Annexe 11, Morrissey, 1981).

La coloration à l'argent ammoniacal (Figure 12b) fait apparaître de nombreux spots que nous n'avons pas avec la coloration couramment utilisée au laboratoire (Figure 12a). Mais il y a aussi des spots colorés négativement ce qui est atténué lorsque du thiosulfate de sodium est ajouté lors du coulage des gels (résultats non montrés). Comparer ces gels avec ceux de notre étude pourrait être problématique à cause des nombreux spots supplémentaires. La coloration de Shevchenko (Figure 12c) donne un profil plus proche de celui de nos gels mais les spots restent globalement très clairs et sont moins nombreux. La coloration de Morrissey (Figure 12d) a été finalement choisie car elle donne un très bon résultat avec à peu près le même nombre de spots et le même profil que ceux de l'étude ce qui facilitera le prélèvement des spots.

Des gels préparatifs colorés comme les gels analysés seront aussi réalisés pour retrouver les spots non détectés sur ceux colorés selon Morrissey. Il est à signaler que de très bons résultats à l'identification ont été obtenus avec la coloration habituellement utilisée au laboratoire même si cette coloration est déconseillée pour la spectrométrie de masse.



Figure 12 : Les différentes colorations argentiques testées sur un échantillon de feuilles. a : coloration habituelle (§II-5), b : argent ammoniacal, c : méthode de Shevchenko, d : méthode de Morrissey

8- Identification des protéines

L'identification des protéines se déroule à la plate-forme de protéomique de l'UMR de génétique végétale de Gif-sur-Yvette (ferme du Moulon). Les spots sont prélevés automatiquement grâce à EXQuestTM Spot Cutter (BioRad) et sont collectés dans des plaques de 96 puits. Cet appareil est piloté par le logiciel PDQuest Advanced 8.0.1 et tous les marquages des spots à prélever ont été faits en manuel. Les spots sont décolorés pendant 2min dans une solution d'hexacyanoferrateIII 30mM et de thiosulfate de sodium 100mM. Trois rinçages de 10min à l'eau distillée sont ensuite pratiqués avant congélation des échantillons.

Un robot d'hydrolyse (Progest system, Genomic Solution) permet l'hydrolyse des protéines par la trypsine dans le gel. Les morceaux de gel sont lavés 2 fois dans un bain d'acide acétique 10%, éthanol 40% et acétonitrile. Puis ils sont lavés 2 fois par des bains de NH₄CO₃ 25mM et acétonitrile. La digestion se fera ensuite pendant 6 heures à 37°C avec 125ng de trypsine modifiée (Promega) dissous dans du méthanol 20% contenant 20mM de NH₄CO₃. Les peptides résultant de l'hydrolyse sont extraits avec un mélange acide trifluoroacétique (TFA) 2% et acétonitrile 30%, puis avec de l'acétronitrile seul. Les extraits peptidiques sont séchés au speedvac et resuspendus dans 20µL d'une solution TFA 0,05%, HCOOH 0,05% et acétonitrile 2%.

La séparation par CLHP est réalisée sur un système Ultimate LC combiné avec un autosampler Famos et un système switch microcolonne Switchos II (Dionex). Quatre microlitres de l'extrait sont injectés. Après élution, les peptides sont analysés on-line avec un LCQ Deca XP⁺ ion trapp (ThermoElectron) qui utilise une interface nanoelectrospray.

Le logiciel BioWorks 3.2 (ThermoElectron) permet l'identification des protéines avec les spectres obtenus après passage en LC-ESI/IT (Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionisation/Ion Trapp). La digestion par la trypsine, la carboxyamidométhylation des cystéines et l'oxydation des méthionines sont les paramètres entrés dans le logiciel comme clivage enzymatique et modifications possibles. La recherche de corrélations entre les masses peptidiques des spectres expérimentaux et théoriques (découpage virtuel des protéines de la base de données par l'enzyme de digestion) est réalisée sur la base de données NCBInr (non redondante) avec 485 043 entrées (28-11-2006) (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/ FASTA/) et une base de données de 73 120 EST clusterisés qui a été construite à partir des EST de *Glycine max* (20-09-2004) et *Phaseolus vulgaris* (21-07-2005) (http://www.tigr.org/ tdb/tgi/plant.shtml). L'attribution d'une identité à un spot se fait si, et seulement si, au moins 2 peptides différents issus de la digestion ont été reconnus. De plus, si 2 ou plusieurs protéines sont identifiées pour 1 seul spot, nous privilégierons celle qui est reconnue grâce au plus grand nombre de peptides différents.

Si aucune identification n'est trouvée, l'interprétation *de novo* est utilisée avec le logiciel PepNovo (version 1.03, Frank et Pevzner, 2005). Cette méthode permet de déduire une séquence à partir de chaque spectre. Cette séquence est comparée à celles des banques de données et, de cette façon, il est fait abstraction des masses peptidiques. Si la séquence est légèrement modifiée, l'identification de la protéine pourra quand même être possible. Seules

les séquences contenant une suite de 6 acides aminés avec une probabilité supérieure à 0,9 sont sélectionnées (Frank *et al.*, 2005). Les recherches d'homologies sont réalisées par le logiciel Fasts (version 3.4t26) utilisant une matrice MD20-MS (Mackey *et al.*, 2002). Les séquences correspondant à des contaminants et à la trypsine sont exclues grâce à l'interrogation d'une base de données dédiée contenant notamment les kératines (réalisée par l'équipe de la Ferme du Moulon). La recherche se poursuit ensuite dans la banque de données protéiques non redondante limitée aux Viridiplantae (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Une fois les identifications obtenues, les poids moléculaires et les points isoélectriques théoriques de chaque protéine sont déterminés. Les identifications réalisées grâce à la banque NCBInr ont déjà ces renseignements. Pour les autres, nous passons par le serveur Expasy pour utiliser l'outil pI/MW (<u>http://expasy.org/tools/pi_tool.html</u>, Gasteiger *et al.*, 2005).

Nous recherchons aussi dans quel compartiment se trouve la protéine. Nous pouvons utiliser le site PLOC (Protein LOCalization prediction : <u>http://www.genome.jp/SIT/plocdir/</u>) en sélectionnant le groupe des plantes pour avoir les chloroplastes et la vacuole sans les lysosomes (Park et Kanehisa, 2003) si cette information n'est pas donnée dans l'identification de la protéine ou dans sa fiche SwissProt.

Nous nous intéressons aussi aux voies métaboliques dans lesquelles sont impliquées les protéines identifiées. Pour cela, nous utilisons, sur le serveur KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), l'outil KAAS (KEGG Automatic Annotation Server : <u>http://www.genome.jp/kegg/kaas/</u>), option KAAS interactive afin d'obtenir les KO (KEGG Orthology), c'est-à-dire, la voie métabolique et aussi les cartes des métabolismes avec mise en évidence des protéines identifiées (Moriya *et al.*, 2007).

Enfin, nous étudions la (ou les) signature(s) des protéines en utilisant le serveur Expasy et l'outil Prosite accessible dans la plupart des fiches des protéines.

III- Quantification de métabolites

1- Extraction des métabolites

Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide puis pesés (100 à 150mg de matière fraîche) pour obtenir après lyophilisation au moins 10mg de matière sèche.

Une fois les échantillons lyophilisés, l'extraction éthanolique des métabolites peut commencer (Annexe 12).

Matériels et méthodes

2- CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

Toutes les analyses ont été réalisées sur un système Prominence (Shimadzu) équipé d'un injecteur automatique SIL-20AC, d'un four-colonne CTO-20AC et d'un réfractomètre RID-10A. Vingt microlitres sont injectés. Les extraits racinaires sont injectés directement tandis que les extraits aériens sont dilués au tiers dans de l'eau ultrapure.

On réalise une séparation sur une colonne à exclusion ionique OA-1000 organic acid (Alltech, $300 \text{mm} \times 6,5 \text{mm}$) avec pour solvant de l'acide sulfurique (H₂SO₄) à 0,01N avec un débit de 0,4mL.min⁻¹. La colonne est thermostatée à 40°C. Le raffinose, le saccharose, le glucose et le citrate sont alors identifiés et dosés. Cependant le fructose et le malate coéluent. Des gammes de standards de sucres et d'acides organiques passés seuls ou en mélange permettent d'identifier les pics et de réaliser la conversion de leur aire en teneur avec le logiciel LCsolution (Shimadzu).

IV- Méthodes statistiques

1- Analyse statistique des données de protéomique

Afin d'analyser les données issues du matching, nous avons construit un réseau d'analyses. Une fois tous les gels comparés, un tableau récapitulatif des volumes des spots selon leur numéro de groupe est extrait du logiciel. Dans Excel®, ce tableau est trié de façon à ne garder que les spots qui sont au moins présents dans 4 gels sur les 6 (3 répétitions biologiques× 2 répétitions techniques) et ceci pour au moins 1 point de la cinétique en ce qui concerne l'étude des feuilles et du bas de la tige. Pour l'étude des racines, nous avons uniquement pris en compte celle réalisée à 35000VH et nous n'avons que 3 répétitions biologiques, les spots devront donc être présents sur au moins 2 des 3 gels (tableau trié, Figure 13).

Une normalisation des volumes (tableau normalisé, Figure 13) est ensuite réalisée avec le logiciel SAS® system 8^{ème} édition grâce à un programme inspiré de celui de Zivy (2006). Le gel master est le gel de référence pour la normalisation. Les spots sont ensuite triés (tableau trié, Figure 13) par la probabilité qu'ils ont de varier selon l'expérimentation (acclimatée ou contrôle), la date de prélèvement (stade de la plante, âge physiologique), la

lignée (Champagne ou Térèse) ou l'interaction de ces variables. Ceci est aussi réalisé grâce au logiciel SAS par une analyse de variance (ANOVA, procédure glm (general linear model)). Un seuil de 1% de significativité (p-value < 1%, moins d'une chance sur 100 d'erreur en disant qu'ils varient) est utilisé pour choisir les spots que nous essayerons d'identifier par spectrométrie de masse (tableau intérêt, Figure 13). A ces spots sont ajoutés ceux qui sont corrélés aux spots sélectionnés avec toujours une probabilité de 1% (logiciel SAS, procédure corr) (Figure 13).



Figure 13 : Méthode employée pour déterminer les spots à identifier.

Nous avons choisi d'utiliser l'analyse de variance pour sélectionner les spots différentiellement exprimés au cours de la cinétique chez nos 2 lignées car cette méthode statistique permet de prendre en compte à la fois le paramètre expérimentation (acclimatée et contrôle) et le paramètre lignée (Champagne et Térèse). Ceci ne peut pas uniquement être fait avec l'observation du ratio qui indique une augmentation ou une diminution de 1.5, 2 ou 3 fois de l'expression d'une protéine au cours du stress pour une lignée (Cui *et al.*, 2005 ; Bae *et al.*, 2003 et Renaut *et al.*, 2004 respectivement). Des études faites avec la 2D-DIGE utilisent un test statistique t de Student, qui permet de comparer 2 moyennes (Amme *et al.*, 2006 ; Goulas *et al.*, 2006) mais, ces travaux ne sont menés que sur une seule lignée qui a subi ou non une phase d'acclimatation au froid. L'ANOVA est une généralisation du test t qui nous permet donc de comparer les moyennes de nos 2 lignées au cours des 2 traitements.

La p-value représente le taux de faux positifs (false positive rate, risque α). Elle rend compte du nombre de faux positifs par rapport au nombre de tests non significatifs. Ces tests non significatifs sont ceux pour lesquels l'hypothèse nulle (H₀) est vraie (non rejetée). Avec un seuil de 1%, sur 100 tests non significatifs, un test, juste par chance, pourrait être considéré comme significatif : c'est un faux-positif. Une deuxième indication peut être utilisée, la q-value (ou FDR : False Discovery Rate) pour essayer de contrôler la proportion d'erreurs. Le calcul de la valeur q est basé sur la probabilité p (Benjamini et Hochberg, 1995). Il est réalisé avec le logiciel de statistique R grâce au module QVALUE (Storey et Tibshirani, 2003). La valeur q indique la proportion attendue du nombre de faux positifs parmi les tests significatifs identifiés par l'analyse (H₀ rejetée). Enfin, la puissance statistique est la probabilité que ne soit pas rejetée une réelle différence donc un faux-négatif. Elle est égale à 1 – β où β est la probabilité d'erreur de type II (risque β), c'est-à-dire la probabilité de garder l'hypothèse nulle alors qu'elle est fausse. Une puissance de 0,80 est un seuil acceptable qui correspond à 20% de chance de rejeter une réelle différence.

Une classification hiérarchique grâce au logiciel TMEV (TIGR Multiple Experiment Viewer, <u>http://www.tm4.org/mev.html</u>) a été réalisée afin de regrouper les spots présentant une évolution similaire au cours de la cinétique. Ces spots se classent en cluster grâce au module SOTA (Self-Organizing Trees, Herrero *et al.*, 2001). Une analyse en composantes principales (ACP) a aussi été effectuée grâce au logiciel SAS avec la procédure princomp. Cette méthode multifactorielle permet de réduire l'étude aux variables les plus intéressantes pour expliquer les phénomènes.

61

2- Analyse statistique des métabolites

Moments Ν 1851 Sum Weights 1851 Mean 0 Sum Observations 0 0.47347552 0.22417907 Std Deviation Variance 0.0940957 0.72988946 Skewness Kurtosis Corrected SS Uncorrected SS 414.731283 414.731283 Coeff Variation 0.01100511 Std Error Mean Normal Probability Plot Histogram Boxplot 1.7+* 3 0 1.7-14 0 29 55 **** С 40 166 **** ********* ****** 277 301 356 -0.1 236 207 ***** . ********* ******* 74 ***** 48 *** 23 0 10 С 5 0 -1. +* 0)+* 1

The UNIVARIATE Procedure

-2

-1

0

+1

+2

Figure 14 : Résultats obtenus avec la procédure Univariate.

may represent up to 8 counts

skewness (coefficient d'asymétrie) et kurtosis (coefficient d'aplatissement) valeurs "hors normes" entourées en bleu

L'analyse statistique des différentes variables de l'étude est réalisée grâce au logiciel SAS® system 8^{ème} édition. Nous avons effectué des analyses de variance (ANOVA, procédure glm) suivies quand elles étaient significatives du test post-hoc de comparaisons multiples de Student-Newman-Keuls pour classer les lignées et des analyses de corrélations (procédure corr). Les variables de l'analyse sont les concentrations en raffinose, saccharose, glucose, fructose, et citrate. Nous comparerons aussi la note de gel, le stade, le nombre de rames total (y) et de rames vertes (x), le type de feuille (conventionnel ou *afila*) et le port de la plante (nanisme et rosette). La procédure Univariate nous a permis grâce aux résultats de skewness (coefficient d'asymétrie) et de kurtosis (coefficient d'aplatissement) de déterminer si nos données étaient ou non normalisées (dans ce cas, skewness = 0 et kurtosis = 1) (Figure 14). De plus, différents diagrammes sont présentés pour chaque variable dont la droite de

Henry (Normal probability plot, Figure 14). L'utilisation de ces diagrammes permet de repérer les données "hors normes" c'est-à-dire celles qui ne sont pas sur la droite (entourées en bleu, Figure 14). Par exemple, pour les mesures de métabolites, cela indique les échantillons qui sont à redoser. Si les nouvelles données satisfont aux critères de normalité, elles sont gardées. Sinon elles ne sont pas prises en compte et considérées comme valeur manquante (représentées par un point). Une fois ce contrôle des données réalisé, le calcul des LS Means ou moyenne ajustée est effectué et les LS Means de chaque variable sont à la base de l'analyse des QTL.

3- <u>Analyse des Quantitative Trait Loci (QTL) et des Protein Trait</u> Loci (PQL)

a. Cartographie des QTL et PQL

Des cartes génétiques du pois ont été réalisées à partir des 164 lignées recombinantes (LR) issues du croisement Champagne × Térèse. Les dernières versions sont celles de Loridon *et al.* (2005), de Aubert *et al.* (2006) et de Lejeune *et al.* (2008). Nous avons utilisé la carte dressée par cette dernière (Annexe 13) à partir des 164 LR plutôt qu'une carte obtenue à partir de nos 73 lignées étudiées de façon à ce que les distances entre les marqueurs soient les plus exactes possibles. Cette carte contient 254 marqueurs (Annexe 14) et couvre 1491cM sur 7 groupes de liaison autant que le nombre de chromosomes du Pois. En plus de cette carte, il est nécessaire de connaître la provenance (du parent Térèse = A ou de Champagne = B) de chaque marqueur pour chaque lignée étudiée et les données (LS Means) de chaque variable pour chaque lignée (métabolites, conductimétrie, x, y, stade ou encore protéines).

La cartographie des QTL est réalisée grâce au logiciel Windows QTL Cartographer version 2.5 (Wang *et al.*, 2007). La première étape consiste à réaliser 1000 permutations qui sont une association aléatoire des données phénotypiques et génotypiques pour déterminer un LOD seuil (Logarithm of ODds). Les permutations seront réalisées 5 fois afin de calculer une moyenne qui sera notre LOD seuil et ce pour chacun des caractères étudiés.

Ensuite la détection de QTL se fait par cartographie d'intervalles (Composite Interval Mapping) qui teste l'hypothèse qu'il existe au plus 1 QTL dans l'intervalle entre 2 marqueurs. Cette hypothèse est exprimée en probabilité par le calcul du LOD score. Un LOD de 2 signifie qu'il y a 100 fois plus de chance qu'il existe un QTL à cet endroit plutôt qu'il n'en existe pas. Quand un QTL est retenu, un intervalle de confiance est déterminé par la méthode de décroissance du LOD de 1 puis de 2.

Un QTL est défini par sa position sur le groupe de liaison, là où le LOD est maximal, et son intervalle de confiance. La variation phénotypique R^2 est aussi importante puisqu'elle donne sa puissance au QTL : si $R^2 = 0,2056$ alors il indique que 20,56% de la variation phénotypique est expliquée par le QTL. L'effet d'additivité (a) quantifie l'effet allélique de chacun des allèles parentaux.

b. Vue d'ensemble des QTL

Nous avons utilisé l'approche "QTL overview" (vue d'ensemble) développée par Chardon et collaborateurs (2004) qui permet de détecter les "hot spots". Les auteurs ont pu observer, grâce à elle, l'importance de six régions génomiques dans la précocité de floraison chez le maïs. Hanocq et collaborateurs (2007) ont également étudié la précocité de floraison chez le blé grâce à cette méthode. Ces deux études avaient pour but de regrouper les expérimentations de diverses équipes, ce sont des analyses de métaQTL. Dans notre cas, nous voulons, grâce à cette approche, savoir sur quelles zones d'intérêt nous devrons nous focaliser par la suite. Cette étude a été réalisée avec Excel.

Nous avons pris en considération les intervalles de confiance (IC) à LOD-2 et la position du LOD maximal pour chaque PQL. Ceci a permis de calculer les écart-types (S) inférieurs et supérieurs :

$$S_{inf} = (Position LOD_{max} - Début IC) / 1.96$$

$$S_{sup} = (Fin IC - Position LOD_{max}) / 1.96$$

Pour chaque PQL et tous les 0,5 cM, nous avons d'abord calculé la probabilité pour que la position de ce PQL se trouve entre x et x+0,5 puis nous en avons fait la somme :

$$P(x, x+0,5) = \sum_{i=1}^{nbPQL} \int_{x}^{x+0,5} N(p_i, S_i^2) d(x)$$

où nbPQL est le nombre de PQL dans l'expérimentation, N loi normale, p_i position la plus probable du PQL, S² variance.

Ceci nous a permis de réaliser une courbe pour chaque groupe de liaison (Annexe 20). Les zones intéressantes sont celles où la courbe dépasse le seuil de 5U(x), avec U(x) la probabilité uniforme. C'est la probabilité que le segment [x,x+0,5] comprenne un PQL en connaissant le nombre moyen de PQL présents mais sans information sur leur position :

$$U(x) = \frac{nbPQL}{Longueur totale \ de \ la \ carte} \times 0.5$$

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus avec les lignées Champagne et Térèse (lignées parentales) puis les lignées recombinantes.

I- <u>Etude des lignées parentales</u> : Nous avons tout d'abord observé les variations quantitatives des protéines au cours des cinétiques acclimatée et contrôle dans les feuilles, les tiges et les racines. Ceci fait l'objet de l'article "Proteome pattern variations in two pea lines induced by cold acclimation and freezing" (article 1) soumis à Experimental and Environmental Botany. En complément de l'étude de l'acclimatation au froid, nous nous sommes aussi intéressés au protéome de Champagne et Térèse après 3 jours de gel. Les teneurs en raffinose, saccharose, glucose et citrate ont été étudiées chez ces lignées car des travaux précédents (Alvarez, 2004) ont montré une corrélation des teneurs de ces métabolites avec la tolérance au gel. Nous avons séparé les feuilles des tiges afin de pouvoir corréler les teneurs de ces métabolites et les quantités de protéines présentes dans ces parties de la plante ainsi que dans les racines.

II- <u>Etude des lignées recombinantes *Hr* : L'utilisation des lignées recombinantes nous a permis de localiser des QTL de tolérance au gel en conditions contrôlées lors de l'acclimatation au froid. Nos résultats sont comparés à ceux obtenus avec la population totale (champ et conditions contrôlées) et avec la sous-population de lignées *Hr* au champ. Des QTL physiologiques et morphologiques sont aussi recherchés sur les lignées *Hr* ainsi que des corrélations avec les QTL de tolérance au gel. Ceci est présenté dans l'article "Explicative quantitative trait loci for the frost tolerance of *Pisum sativum* L. in field and in controlled environment." (article 2) qui a été accepté avec modifications à Theoretical and Applied Genetics. Les lignées recombinantes nous ont aussi permis de rechercher des PQL pour 264 spots protéiques, dont 70 identifiés, après 10 jours d'acclimatation au froid.</u>

I-Etude des lignées parentales

1- Analyse du protéome au cours de la phase d'acclimatation au froid

Les précédentes études sur le froid chez le pois s'intéressaient au retard de l'initiation florale, stade critique en période de froid (Lejeune-Hénaut et al., 1999) et aux teneurs en sucres solubles totaux chez différents génotypes (Bourion et al., 2003). Afin d'apporter des informations supplémentaires, l'approche protéomique a été choisie pour étudier, lors de l'acclimatation au froid et aussi au cours du gel, les lignées Champagne (tolérante au gel après acclimatation) et Térèse (sensible au gel même après une phase d'acclimatation). La comparaison d'une lignée résistante et d'une lignée sensible au cours de 2 cinétiques (acclimatée et non acclimatée) nous permet d'aborder le déterminisme génétique de l'acclimatation au froid. Nous avons détecté 506, 501 et 1050 protéines dans les gels 2D de feuilles, tiges et racines, respectivement, pour les expérimentations acclimatée et contrôle. Une analyse de variance nous a permis de sélectionner 260 spots sur- ou sous-exprimés selon que les plantes aient subi la phase d'acclimatation ou non. Parmi ces 260 spots, 75 ont été prélevés pour être identifiés par spectrométrie de masse et 60 ont été assignés à une protéine (Figure 15). Après trois jours de gel, 112 spots sont significativement variables et 31 protéines ont été identifiées. L'implication des protéines identifiées dans les mécanismes possibles de cette adaptation est discutée.

Figure 15 : Gels master pour les feuilles (L), les tiges (S) et les racines (R).

Les numéros des spots sont ceux utilisés dans l'article 1.


Article 1

Title:

Cold acclimation and subsequent frost differentially affect the proteome pattern of leaves, stems and roots in two pea lines

Authors:

Estelle Dumont^a, Nasser Bahrman^{a,b}, Benoît Valot^c, Hélène Sellier^b, Jean-Louis Hilbert^a, Estelle Goulas^a, Christophe Vuylsteker^a, Isabelle Lejeune-Hénaut^b, Bruno Delbreil^{a,*}

Addresses:

^a UMR USTL-INRA 1281 Laboratoire des Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés bât SN2, 3^{ème} étage, Université des Sciences et Technologies de Lille1 F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b UMR USTL-INRA 1281 Laboratoire des Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés, Estrées-Mons BP50136, F-80203 Péronne cedex, France

^c Plate-forme de Protéomique, La ferme du Moulon, F-91190 Gif-sur-Yvette, France.

Abstract

Two pea lines (*Pisum sativum* L.) with highly contrasted behaviours towards cold were studied by a proteomic approach in order to better understand cold acclimation and also frost phenomena. After cold acclimation exposure, the Champagne line becomes tolerant to frost whereas the Terese line remains sensitive. By comparing control *versus* cold-acclimated plants, 506, 501, and 1050 protein spots were screened in leaves, stems, and roots respectively. Variance analysis allowed the selection of 260 statistically variable spots (88 in leaves, 97 in stems, and 75 in roots), among which 60 spots were successfully identified with NanoLC-MS/MS. Three major functional groups have been highlighted: photosynthesis in leaves, folding in stems, and defense in roots. During cold-acclimation, Champagne showed a much wider differential protein expression in the first and third groups, compared to Terese. After three days of subsequent frost, leaf, stem, and root proteomes of previously cold-acclimated plants showed significant differences regarding to control plants. Out of 112 statistically variable spots (44 in leaves, 38 in stems, and 30 in roots), 31 proteins were identified. The variation of 20 identified proteins already linked to cold acclimation was observed during the frost period and 11 proteins exclusively linked to frost tolerance were

also selected. Altogether, our results suggest photosynthesis and defense mechanisms to be particularly involved in Champagne strategy to cope with frost principally because of proteins which were constitutively more abundant in this line.

Introduction

Pea (*Pisum sativum* L.) is a main crop used as a protein source in animal feeding. Pea seeds have a high protein content (21 to 26%) and, in contrast to cereals, are especially rich in lysine, a short amino acid in the feed for animals. An important aim for the north European pea breeders is the increase of yield and the extension of the production areas. Autumn sowings could be a solution: the longer growth period between germination and flowering would result in naturally higher biomasses and seed numbers (Uzun and Açikgöz 1998), but requires plants resistant to low temperatures or even frost.

Since 1973, pea has been studied for its frost escape capacity by using genetic approaches involving several genes related to flowering (Late flowering: Lf, Sterile nodes: Sn, Early initiating: E (Weller et al. 1997)). Flowering initiation is the most sensitive stage during the plant development in stress conditions like frost. In this context, a Hr gene allows plants to delay flowering until the daylengths become sufficiently long (Murfet 1973). Plants remain in the vegetative stage in winter and early spring and therefore are able to avoid frost injuries. In earlier studies, a contrasted behaviour regarding to cold conditions was observed among different pea lines in field experimentations (Bourion et al. 2002), as well as controlled conditions (Bourion et al. 2003). A QTL (Quantitative Trait Loci) approach on recombinant inbred lines of a cross between a frost-resistant line (Champagne) and a frost-sensitive line (Terese) identified a major QTL colocalizing with the Hr locus, linked to frost escape and cold acclimation (Lejeune-Hénaut et al. 2008). Cold acclimation covers all processes taking place under low positive temperatures exposure, which subsequently allows plants to survive frost (Levitt 1980, Thomashow 1999). Frost acts by damaging cells by dehydration caused by ice formation (Pearce 1999) and cold acclimation prevents it. Acclimation modifications are, as example, the cellular osmotic stabilization with the accumulation of osmolytes (soluble sugars or amino acids) to avoid water loss in cells during frost, changes in membrane composition to increase its fluidity, the increase of antioxidants or the activation of the primary metabolism such as photosynthesis with, among other, new biosynthesis of proteins (Sharma et al., 2005). The 2D-electrophoresis technique is a powerful tool to detect genetic polymorphisms of different genotypes, at different developmental and physiological stages, and under stress conditions. Studies of cold stress have been realized in poplar (Renaut et al. 2004) or rice (Cui et al. 2005), and also in pea at a subcellular level in mitochondria (Taylor et al. 2005).

We used a proteomic approach to better understand the physiological mechanisms involved in the contrasted response to cold and frost of the two pea lines (Champagne and Terese). Analysis of variance was performed on the expressed protein patterns in leaves, stems, and roots at three developmental stages submitted to two temperature conditions (cold acclimated and non acclimated control). As cold and frost have different impacts on plants, an other analysis of variance was performed with data obtained after frost. To our knowledge, the study of cold acclimation and frost is uncommon. In our study, the characteristics of Champagne and Terese in regard to the polymorphism of their protein patterns in response to cold acclimation and frost are discussed, as well as the possible role and implication of identified proteins in the metabolic pathways.

Materials and methods

Plant material and culture conditions

Two pea lines with contrasting behaviour were studied: Champagne, a cold tolerant winter forage variety and Terese, a cold sensitive spring dry pea variety. The two varieties differ in leaf architecture, presence of rosette, flower colour, and seed colour and size (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008).

Champagne and Terese seeds were germinated under controlled environmental conditions: 250 μ mol photons.m⁻².sec⁻¹; day/night temperature regime 19/12°C; photoperiod 10h ("nursery"). After 11 days, both sets of plants were divided in two different sub-sets, "cold acclimated" and "control" experiments, respectively. Champagne and Terese control plants were still grown for 4 days with the same conditions as before, and thereafter shifted for 4 days to a day/night temperature regime of 6/-8°C; photoperiod 8h ("frost"). Champagne and Terese cold-acclimated plants were shifted for 11 days to a day/night temperature regime of 10/2°C; photoperiod 10h ("cold"), followed by a 4 days period of a day/night temperature regime of 6/-8°C; photoperiod 8h ("frost").

Roots, stems, and leaves of all sub-sets of Champagne and Terese were separately sampled during a time study in order to investigate the organ acclimation response. The developmental stage of the seedlings was regularly evaluated through leaf unfolding, allowing the harvest of plants at the same developmental stage, *i.e.* with the same amount of degree-day (DD). At each sampling, three independent replicates of ten plants were harvested.

For all experiments, the first sampling occurred after 149 DD following the germination (after ten days of nursery: T1). For cold acclimated plants, samplings occurred when 190 DD and 217 DD were reached (after five and ten days of cold: T2 and T3, respectively), and 220 DD (after three days of frost: T4). For the control plants, harvests were performed when 190 DD and 217 DD were reached (after 12 and 14 days of nursery: T2' and T3', respectively), and 220 DD (after three days of frost: T4').

Damages were evaluated after the frost period by considering the size of yellowing and necrotic areas on leaves (Lejeune-Hénaut et al. 2008). Terese never survives to frost whether a cold acclimation period was applied or not (data not shown).

2D gel electrophoresis, protein staining and image acquisition

Soluble protein extractions were realized (Dupire et al. 1999) and proteins quantified using the RC DC Protein Assay Kit (BioRad). Isoelectric focusing (IEF) was performed using 17cm immobilized pH gradient strips with a linear pH gradient (4-7) and achieved using a Protean® IEF Cell (BioRad). Eighty micrograms of solubilized proteins were mixed with the rehydration buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 20 mM dithiothreitol and 0.6% of an ampholyte mixture 4-6: 5-8 (2: 1, v/v, BioRad)). After active rehydration at 20°C during 16 h at 50 V, the voltage was increased step by step from 50 to 8000 V: 1 h at 250 V, increased progressively 5 h up to 8000 V, then 8000 V until 35000 Vh was reached.

Prior to the second dimension, strips were equilibrated 15 min with 130 mM dithiothreitol followed by a 15 min incubation with 135 mM iodoacetamide in equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 375 mM TrisHCl 1.5 M (pH8.8) and 20% glycerol) with 0.6% bromophenol blue (24mM). The strip was sealed at the top of gel (200×200×1 mm) polymerized from 12.5% acrylamide (acrylamide-bisacrylamide 30%). Migration was performed in PROTEAN II xi XL Multi-cells (BioRad) for the aerial parts and in Ettan DALTtwelve (GE Healthcare) for roots in SDS-electrophoresis buffer (192 mM glycine, 25 mM TrisHCl (pH8.8) 1.5 M, and 0.05% SDS). Separation was carried out at 4°C at 50 V for 45 min, followed by 350 V until the bromophenol blue front reaches the basis of the gel. Gels were stained with silver nitrate (Blum et al., 1987), except formaldehyde was used instead of glutaraldehyde. For cold and control conditions, 84 gels (2 lines, 2 experiments, 4 sampling dates, 3 biological repetitions and 2 technical repetitions) were run. Wet gels were digitalized at 300 dpi with a UMAX® Powerlook 1120 scanner driven by LabScan 5.0 (GE Healthcare). Gel analysis was performed with ImageMasterTM 2D Platinium 5.0 (GE Healthcare) comparing each plant sample with a master gel. This master gel corresponded to the gel

containing the maximum number of spots and to which supplementary spots of other gels were added.

Scoring method and statistical analyses

Spot volume data were analysed with the SAS system version 8 (1999). A functional analysis was made in order to determine variable spots and their characteristics. Only spots being present in 4 gels out of 6 were taken into account. Spots were normalized according to the master gel's spots exhibiting a volume between 50 and 300 (Zivy 2006). The normalization factor was the median of the ratio between spot's volume in the master gel and spot's volume in another gel.

The analysis of variance (ANOVA, glm procedure) was performed with the following model with the whole data (Champagne and Terese): $Y_{ijk} = A_i + L_j + AL_{ij} + AD_{ik} + LD_{jk} + e_{ijk}$ where A_i was the acclimation effect (acclimated *vs* control), L_j the line effect (Champagne *vs* Terese), AL_{ij} the interaction between acclimation and line effects, AD_{ik} the interaction between acclimation and date (T1, T2 *vs* T3) effects, LD_{jk} the interaction between line and date effects and e_{ijk} the residual effect. Results of this analysis showed that the volume of selected spots varied both in Champagne and Terese for the acclimation effect and/or that it was more abundant in one line for the line effect.

An other analysis was realized within each variety data set considered separately: $Y_{ijk} = A_i + AD_{ik} + e_{ijk}$. Volume of selected spots varied specifically in Champagne or in Terese for the acclimation effect during cold acclimation.

 $\label{eq:samples T4 and T4' (frost) were analysed separately with the following model Y_{ij} = A_i \\ + L_j + AL_{ij} + e_{ij}.$

The chosen *p*-value threshold was $\alpha = 1\%$ so that all spots with *p*-value < 1% were kept (Appendix S1 and S2 in supplementary material).

Preparative electrophoresis, protein spot picking, and trypsin digestion

The 2D gels for spot picking were loaded with 260 μ g of proteins. Only indisputable spots were picked with the EXQuestTM Spot Cutter (BioRad®) drive by the software PDQuest Advanced 8.0.1 (BioRad®) at the proteomic platform of the Ferme du Moulon (Gif-sur-Yvette, France). Spots were destained with a mix of v/v hexacyanoferrate II (30mM) and sodium thiosulfate (100 mM) at least 2 min. After 3 water washes of 10 min, in-gel digestion was performed with the Progest system (Genomic Solution) according to a standard trypsin protocol (Martin et al. 2006).

Protein identification by ESI (ElectroSpray Ionisation) and database search

Proteins were identified by ESI (Martin et al. 2006). A database search was performed with Bioworks 3.2 (Thermo Electron). Trypsin digestion, Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to enzymatic cleavage, static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 1.4 and 1, respectively. The databases nrviridiplantae from NCBI (485043 entrances (11.28.2006), <u>ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/</u>) and EST from *Glycine max* (09.20.2004) and *Phaseolus vulgaris* (07.21.2005) of TIGR (73120 entrances, <u>http://www.tigr.org/tdb/tgi/plant.shtml</u>) were used. Identified tryptic peptides were filtered according to Martin et al. (2006).

Peptide sequences were determined by *de novo* interpretation from MS/MS spectra using PepNovo software (version 1.03) (Frank and Pevzner 2005) with the same previous parameters. Only sequences containing a tag of at least 6 amino acids (Frank et al. 2005) with an associated probability greater than 0.9 were selected. Homology searches were performed by Fasts software (version 3.4t26) using the MD20-MS matrix (Mackey et al. 2002). Sequences corresponding to keratins or trypsin, were first removed by interrogating a homemade contaminant database. Secondly, the search computing process was carried out on the Nr protein database limited to viridiplantae (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Only homologies with a minimum of 2 independent peptides and an E-value smaller than 0.001 were selected. In any case, the automatic *de novo* interpretation of MS/MS spectra was visually confirmed.

At the end of the identification steps, all identified ANOVA selected proteins were submitted to a careful bioinformatical analysis. After searching in protein databases (http://beta.uniprot.org/ and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), proteins were classified according to FunCat (http://mips.gsf.de/). Their possible involvement in metabolic pathway relationships were obtained using the site KEGG (http://www.genome.jp/). Functional location in cellular compartments were defined by PLOC (http://www.genome.jp/SIT/plocdir/). Proteins identified during cold acclimation were classified according to their molecular weight from L1 to L25 for leaves, S1 to S20 for stems, and R1 to R15 for roots. Proteins selected during the frost period were named Lf1 to Lf8 for leaves, Sf1 for stems and Rf1 to Rf3 for roots (f: frost).

Results

After gel comparisons, 506, 501 and 1050 spots were detected in leaves, stems and roots respectively. Regarding to the acclimation effect, 7.9%, 14.4% and 5.1% of spots showed a quantitative variation in leaves, stems and roots. Concerning the line effect, 11.1%, 6.8% and 3.3% of spots showed a differential expression. The cold acclimation response of plants was thus higher in stems than in leaves or roots. We also observed that more spots showed quantity difference in leaves between the two lines.

The acclimation effect was also detected after the frost period since plants have been cold acclimated or not before frost. After three days of frost, the acclimation effect concerned 6.1% of spots in leaves, 5.6% in stems and only 1.8% in roots while 3.9%, 3.4% and 1.7% of spots in leaves, stems and roots respectively varied according to the line effect. After a frost period differences between plant parts were slight related to the acclimation period. We observed that, in roots, less than 2% of the proteins were affected by the acclimation or line effect.

Changes in protein quantity during cold acclimation

Variance analysis led to the selection of 260 statistically variable spots in leaves, stems and roots (88, 97 and 75, respectively). Spots have been selected because of their variation during acclimation and/or between the two lines. Only spots which were located without any doubt on preparative 2D gels were picked for identification by LC-MS/MS.

In leaves, the 88 selected spots could be divided into 56 spots linked to the line effect and 40 linked to the acclimation effect. Some of these spots were selected with the two effects (see Appendix S1 in supplementary material). Thirty seven spots among 88 were analysed by LC-MS/MS and 25 proteins successfully identified (Fig. 1a, Table 1 and Appendix S1, S7 and S8 in supplementary material). Nineteen proteins were more abundant in one of the two lines (line effect) and six others proteins varied in quantity during the acclimation among which four varied differently between Champagne and Terese (acclimation effect).

Forty percent of the identified spots in leaves were implicated in energy supply especially photosynthesis (Fig. 2a), 24% in the primary metabolism and 16% in defense mechanisms.

In stems, the 97 selected spots could be divided into 34 spots linked to the line effect and 72 to the acclimation effect. Some of these spots were selected with the two effects (Appendix S2 in supplementary material). Twenty-two spots among 97 were analysed by LC-MS/MS and 20 proteins were identified (Fig. 1b, Table 1 and Appendix S2, S7 and S8 in supplementary material). Four proteins were more abundant in one of the two lines (line effect), 15 others proteins varied in quantity during the acclimation among which eight varied differently between Champagne and Terese (acclimation effect), and one protein was selected for the two effects.

Forty percent of the characterized proteins in stems were involved in the energy supply, mainly photosynthesis, 25% in protein folding (Fig. 2c), and 15% in primary metabolism.

In roots, the 75 selected spots could be divided into 35 spots linked to the line effect and 54 to the acclimation effect. Some of these spots were selected with the two effects (Appendix S3 in supplementary material). Sixteen spots among 44 were analysed by LC-MS/MS and 15 of them were identified (Fig. 1c, Table 1 and Appendix S3, S7 and S8 in supplementary material). Six proteins were more abundant in one of the two lines (line effect), 4 others proteins varied differently between Champagne and Terese in quantity during the acclimation (acclimation effect), and five proteins were selected for the two effects.

For these identified proteins in roots, 47% were classified in the defense mechanism (Fig. 2b), 20% in protein degradation, and 20% in energy supply with glycolysis.

Changes in protein quantity after three days of frost

In leaves, the 44 selected spots could be divided into 20 spots linked to the line effect and 31 to the acclimation effect. Some spots were selected with the two effects (Appendix S4 in supplementary material).Twenty three spots among 44 were analysed by LC-MS/MS and 13 of them were identified (Table 2, and Appendix S4, S7 and S9 in supplementary material). Four proteins were more abundant in one of the two lines (line effect), 7 others proteins varied in quantity during the acclimation among which four varied differently between Champagne and Terese (acclimation effect), and two proteins were selected for the two effects.

In stems, the 38 selected spots could be divided into 17 spots linked to the line effect and 28 to the acclimation effect. Some spots were selected with the two effects (Appendix S5 in supplementary material). Nine spots among 38 were analysed and identified (Table 2, and Appendix S5, S7 and S9 in supplementary material). Eight proteins varied in quantity during the acclimation among which six varied differently between Champagne and Terese (acclimation effect), and one protein was selected both for the line and the acclimation effects.

In roots, the 30 selected spots could be divided into 18 spots linked to the line effect and 19 to the acclimation effect. Some spots were selected with the two effects (Appendix S6 in supplementary material). Nine spots among 30 were analysed and identified (Table 2, and Appendix S6, S7 and S9 in supplementary material). Three proteins were more abundant in one of the two lines (line effect), five others proteins varied in quantity during the acclimation among which four varied differently between Champagne and Terese (acclimation effect), and one protein was selected for the two effects.

Discussion

The aim of this work was to better understand the response of two contrasted pea lines to cold acclimation and frost using a proteomic approach. These two lines are characterized by opposite behaviours during frost: following a cold acclimation period, the Champagne line becomes frost tolerant, whereas the Terese line remains frost sensitive. We identified (i) 60 proteins differentially expressed in leaves, stems and/or roots of cold acclimated plants as compared to control plants putatively implicated in cold acclimation (Table 1 and Fig. 1), and (ii) 31 proteins differentially expressed in Champagne and Terese after three days of frost, potentially involved in frost tolerance (Table 2 and Fig. 2). No new spots appeared during the cold acclimation process, as it was observed during nitrogen mobilization from pea leaves during seed filling (Schiltz et al. 2004), as well as for the process of white clover leaf senescence (Wilson et al. 2002).

Our proteomic analysis revealed spots whose intensity varied with cold acclimation in both lines. It might be suggested that the proteins which have the same behaviour in the two lines during acclimation, might therefore be part of metabolisms affected by cold but not be linked to frost tolerance, since the Terese line is unable to survive frost. Conversely, spots with opposite behaviour in the lines might be more specifically involved in the process of cold acclimation or even in the frost resistance. All differences observed in this study were not necessarily related to the acclimation effect. Our findings suggested that frost tolerance of Champagne might be reinforced by some proteins which were more or less abundant in this line related to Terese (Curto et al. 2006).

Protein variations in leaves during cold acclimation

The two lines differ by their leaf morphology: conventional for Champagne and *afila* for Terese. Gottlieb and de Vienne (1988) showed that tendrils and leaflets of pea are two different organs but have the same protein profiles. Our gel patterns confirmed these findings (Figs. 1a and 1b). Moreover, the authors observed that the morphological difference did not influence neither the photosynthesis, nor the processing of assimilates.

In our study, 7 proteins among 25 identified (28%) in leaves submitted to cold stress were involved in photosynthesis. In other stresses like elevated CO_2 levels, Bokhari et al. (2007) observed the effect on the leaves of rice with 34% of the 56 identified spots involved in photosynthesis. Primary metabolisms such as photosynthesis and glycolysis are often modified under stress situations. Low temperatures are known to slow down enzymatic reactions and thus enable the plant to increase the quantity of enzymes or produce adapted enzymes to maintain energy balance and carbon metabolism (d'Amico et al. 2002).

All identified proteins involved in photosynthesis were much more abundant in Champagne than in Terese (line effect), except for the RuBisCO large subunit binding α (L1) and for one RuBisCO small subunit (L25). Oxygen-evolving enhancer protein, OEE1 (L11) and OEE2 (L20), were located in PSII complex, and were involved in the H⁺ production which where used by PSI. These two proteins were highly present in Champagne (1.2 and 3fold respectively). The content of RuBisCO activases (L2 and L5) was higher in Champagne than in Terese (5 and 1.5-fold respectively), without significant variation between control and cold-acclimated plants. These results were different from the decrease in RuBisCO activase content observed in Arabidopsis leaves exposed to low temperature (Goulas et al. 2006). Contents of RuBisCO small subunit (L25) and RuBisCO large subunit-binding proteins a (L1) were higher in Terese than in Champagne (2 and 1.25-fold respectively) and the content of another RuBisCO small subunit (L24) was 4-fold higher in Champagne than in Terese without significant variation between control and cold-acclimated plants. This is also original regarding to Hashimoto et al. (2007) data which showed that the RuBisCO large subunitbinding proteins decreased in rice leaf sheaths during cold stress. In both pea lines, no significant change was observed for plastocyanin (L23) during cold acclimation in leaves. The Champagne plastocyanin content was always 1.5-fold higher than in Terese. Pea plants may therefore adapt differently according to their needs by using different regulations such as activity and/or turn-over of the RuBisCO activase and holoenzyme.

The better adaptation of Champagne to cold might also be related to a higher content in key proteins (Fig. 2a), leading to a better efficiency of photosynthesis. Two proteins involved in the chlorophylle biosynthesis, magnesium-chelatase subunit chlI (L4 and L6), were also identified. When the protein was down-regulated in Champagne, it was upregulated in Terese (L4). In the case of L6, only Terese showed a decrease in quantity and no change was observed in Champagne. The opposite behaviour of the two lines was shown.

Altogether our results suggest a strong link between photosynthetic pathway and the cold-responses of our two lines. Champagne might be naturally able to prevent cold damages by a higher content of photosynthetic proteins than Terese. The selected proteins which showed a difference between the two lines were more abundant than those varying during cold acclimation in leaves. These two above cited observations lead us to think that Champagne is constitutively armed to prevent freezing tolerance. The same observation was reported in the response of *Pisum sativum* to powdery mildew (Curto et al. 2006), where the cultivar JI2480 was shown constitutively resistant.

Protein variation in stems during cold acclimation

The identified proteins in stems were mostly involved in folding. Six up-regulated proteins were identified both in Champagne and Terese. Contents of chaperones (Hsp70: S1 and S4) and chaperonins (chaperonin 21: S15) increased in both lines during cold acclimation: they are involved in folding during protein synthesis by ribosomes, or later in cellular organelles such as chloroplasts or mitochondria. This is in agreement with the similar increase of Hsp70 in mitochondria of pea during cold (4°C, 36 h) observed by Taylor et al. in 2005. The cyclophilin (S17) and the protein disulfide isomerase (S2) also increased in both acclimated lines, but cyclophilin subsequently decreased after the 5th day in Terese. These two proteins are known to accelerate the folding of proteins. Rassow et al. (1995) have observed an association of cyclophilins with Hsp70 chaperones. Chaperones and chaperonins also avoid the aggregation of proteins (Wang et al. 2004) and can facilitate in stress situations the correct folding of enzymes in order to activate them (Wang et al. 2003). The expression of such proteins may support the hypothesis that proteins are synthesized under cold stress and that the quality control of proteins is very important, as it has been shown for rice (Cui et al. 2005).

The RuBisCO large subunit binding α (S3), also named chaperonin 60 alpha, operates the assembly of the different subunits of the RuBisCO. The content of S3 was 1.5-fold higher in Terese than in Champagne (line effect), maybe indicating that Terese compensates the decrease of photosynthesis efficiency during the cold period (d'Amico et al. 2002) by facilitating the holoenzyme formation. But this strategy was not sufficient since Terese died. In leaves, no quantity differences between cold acclimated and control plants or between the two lines could be detected for folding proteins. Maybe the high abundance of RuBisCO in leaves hides a lot of proteins in leaf gels, a phenomenon already observed by Hashimoto and Komatsu (2007) in rice leaf blades, where the removal of RuBisCO large subunits allowed the revelation of 250 additional spots.

Stem is an interface between leaves and roots: as an example, soluble sugars were synthesized in leaves and they were stocked in roots. Stem is a strategic place for this transport and the presence of folding proteins is necessary for the good progress of storage. Moreover, in our study, we have sampled the basal part of stems between seed and the second node because all of other parts of plants will be destroyed by frost in acclimated Champagne. The high contain in folding proteins could also be explained by the survival of this stem part and that for protecting the two first nodes which could grow in Champagne when normal conditions will come back.

Protein variation in roots during cold acclimation

Proteins involved in defense mechanisms were mainly identified in roots. Six out of the 7 identified proteins belonged to the Bet v1 family, including a ABA-responsive protein (R15: ABR17) which quantity progressively increased in both lines during cold acclimation. Among the multiple pathways involved in cold stress response, one is ABA dependent (Nordin et al. 1991). This phytohormone content increases during cold acclimation in several plants such as *Arabidopsis* (Lang et al. 1994). The ABR17 protein had a homology of 80% with the sequence of a 17.3kDa VSP (vegetative storage protein) of white clover (Goulas et al. 2007) involved in nitrogen storage. The authors hypothesized the involvement of the VSP in cold response, like Kuwabara et al. (2002) have done for PR-10 proteins (Bet v1 family) in winter wheat due to its accumulation in roots after six days of low temperature. In our study, ABR17 content was 1.5-fold higher in Champagne than in Terese. Therefore, we hypothesize that ABR17 is accumulated during the cold period in order to foresee its further mobilisation during the mild period and sustain new organ differentiation and development in Champagne.

The five other members of the Bet v1 family are also related to pathogenesis related proteins (PR proteins). The type of PR protein involved depended on the line. The one disease resistance response protein (R14) increased in both lines while the another one (R13) decreased. Two ripening-related proteins (R10 and R12) and a disease resistance response protein (R13) showed a higher quantity in Champagne than in Terese (7, 6 and 2-fold), in opposition to Bet v1 family protein-like (R11) pattern (2-fold higher in Terese). The

accumulation of PR proteins during cold can be interpreted as a protective mechanism (Uemura et al. 1995). Przymusinski et al. (2004) observed in lupine that the PR proteins are synthesized in response to various abiotic stress factors. In rice, PR-10 was much more abundant in roots and flowers than in stems (Kim et al. 2007). Indeed frost is known to damage plant epidermis, thus leading to the destruction of protective barriers. In our study, the majority of the proteins were much more abundant in Champagne which could confirm their protective role against cold stress as previously observed.

Three other proteins were identified in roots: 20S proteasome α subunit B (R6 and R8) and 20S proteasome α subunit E (R7). R6 and R8 were always more abundant in Terese than in Champagne during cold acclimation (2 and 3-fold respectively). A proteasome is a complex composed of at least 15 subunits which cleaves peptide bonds of proteins generally marked with ubiquitin. Conrath et al. (1998) and Suty et al. (2003) observed that proteasomes were involved in the elicitation of defense responses. But despite the higher content of proteasome proteins in Terese, the elimination of damaged proteins is apparently not sufficient to sustain correct growth conditions. This hypothesis is supported by the incapacity of Terese to survive after the frost period, even after previous submission to a cold acclimation period. An other proteasome function is its involvement in senescence (Roberts et al. 2002). The senescence process must be start in Terese while in Champagne proteasomes cleaned cells.

Proteins changes after three days of frost

Since cold and frost have different impacts on plants, their studies were considered separately. Due to the limited number of identified proteins (13 in leaves, 9 in stems and 9 in roots), no major classes were detected. We therefore focused our discussion on some proteins which permitted us to deliver explanations for the frost tolerance.

In leaves, plastoglobulin (Lf3) was up-regulated after three days of frost in cold acclimated plants. These proteins are localized in chloroplasts and form a coat on the surface of the plastoglobules (Kessler et al. 1999). Plastoglobules are lipid reservoirs and Bréhélin et al. (2007) have shown that their number and volume increase in oxidative stress conditions. Plastoglobules are also synthesis and storage place for tocopherols which may protect membranes against photooxidation and PSII against photoinactivation (Havaux et al. 2005). Tocopherols are necessary for cold adaptation of *Arabidopsis* (Maeda et al. 2006), so the higher content of plastoglobules in cold acclimated peas might stand for a subsequent higher content of tocopherols, even if thus are not sufficient for frost tolerance since Terese died.

Glycine decarboxylase H subunits (L21 and Lf7) were also up-regulated in cold acclimated leaves after three days of frost. These enzymes are involved in glycine degradation which is a step of photorespiration in mitochondria. Higher photorespiration prevents photoinhibition during stress, by using the excess of energy, hence assuring the production of glutathione involved in the cell detoxification (Wingler et al. 2000). Peas were thus protected against photoinhibition. The superoxide dismutase (Lf8), directly involved in the antioxidant pathway, was down-regulated in cold acclimated plants, as if the oxidative stress was less important in acclimated peas than control plants. The cold acclimate itself.

In stems, three proteins were involved in photosynthesis: RuBisCO activase (S7), OEE2 (S16) and plastocyanin (S20). Interestingly, the expression of the RuBisCO activase and the OEE2 was up-regulated in cold acclimated Terese plants after three days of frost compared to control plants while the plastocyanin was down-regulated in cold acclimated Champagne. Terese tried to maintain its photosynthesis during the frost period but it was not sufficient. The chalcone isomerase (S14), an enzyme of the flavonoid biosynthesis, was up-regulated after three days of frost in cold acclimated plants. Flavonoids are involved in the production of anthocyanins in a lot of species submitted to cold. We observed that Champagne seedlings are slightly purple in contrast to Terese. To our knowledge, no anthocyanin measures have up to now been realized in peas. Christie et al. (1994) have shown that the anthocyanin biosynthesis pathway involves *cor* (cold regulated) genes in maize. Solecka et al. (1999) observed that anthocyanins are much more abundant (2-fold) in cold acclimated rape leaves, and that this increase is cold dependent. In pea, anthocyanins could therefore play a role in the frost tolerance.

In roots, four of the nine identified proteins after three days of frost were involved in the defense mechanisms of plants: disease resistance response protein (R14 and Rf3), ABR17 (R15), and ripening related protein (R10). These proteins were as well selected during the cold acclimation period (except Rf3). A ABR17 (R15) was up-regulated in cold acclimated roots after three days of frost while another ABR17 (S19) was down-regulated in stems at the same time, in higher quantity in Champagne than in Terese. This observation probably indicated two different roles for this protein in roots and stems of pea. ABR17 might be involved in stress tolerance because its constitutive expression in *Arabidopsis* enhances the tolerance in the concerned transgenic lines (Srivastava et al. 2006). ABR17 could therefore protect Champagne against cold stress. An other protein, 20S proteasome α (R6) was more abundant in Terese during the frost period in cold acclimated as well as in control plants.

Roberts et al. (2002) have shown that the wheat ubiquitin-20S proteasome proteolytic system plays a part in the senescence process. We hypothesized that maybe an activation of senescence processes was begun in Terese leading to its death under frost.

To our knowledge, only a few articles focus on both cold acclimation and frost in the same study. Our work is innovative since we studied the proteome of pea during cold acclimation and after three days of frost. In order to differentiate the cold acclimation effects and the frost effects, separated data were taken into account in two distinct analyses. Our statistical analysis allowed us to identify three major functional groups involved in cold acclimation: photosynthesis, folding, and defense mechanisms. Each group was predominant in one of the three studied parts of plants: leaves, stems, and roots, respectively. Therefore, for the first time in pea, an organ-/tissue-specific expression of proteins was detected, as it has been shown for Medicago truncatula (Watson et al. 2003). Leaves bring energy to the plant with the photosynthesis process. Stem constitutes a region of transit, as example, for assimilates produced in leaves and its basal part is important, as roots, for the plant recovery. The frost resistant Champagne showed a higher range of quantity variation in photosynthesis and defense mechanism related proteins than Terese (Figs. 2a and 2b), whereas only slight variations were observed between the two lines in folding related proteins (Fig. 2c). This difference probably reflected the nature of the genetic elements that allow Champagne to resist to frost. The identification of more proteins will be necessary to better understand the elements which allowed Champagne to be resistant since our results were already interesting.

Acknowledgements

We thank T. Balliau, N. Voedts and D. Sriranganadane, for technical assistance. The mass spectrometry and proteomic equipment were purchased with funds from IFR87 "la plante et son environnement", région Ile-de-France, INRA, CNRS, Université Paris Sud and Génoplante. Thanks also to Dr M. Faurobert and Dr E. Hanocq for pre-reviewing of this paper and M. Morchen for her helpful comments. This work was supported in part by the program Plan Etat-Région 2006-2009. This is a part of PhD thesis of Estelle Dumont supported by a grant from the French Ministère de la Jeunesse, de l'Education Nationale et de la Recherche.

References

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99.

Bokhari, S.A., Wan, X.Y., Yang, Y.W., Zhou, L., Tang, W.L., Liu, J.Y., 2007. Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO2 levels. J. Proteome Res. 6, 4624-4633.

Bourion, V., Fouilloux, G., Le Signor, C., Lejeune-Hénaut, I., 2002. Genetic studies of selection for productive and stable peas. Euphytica 127, 261-273.

Bourion, V., Lejeune-Hénaut, I., Munier-Jolain, N., Salon, C., 2003. Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. Europ. J. Agronomy 19, 535-548.

Bréhélin, C., Kessler, F., van Wijk, K.J., 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. Trends Plant Sci. 12(6), 260-266.

Christie, P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V., 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. Planta 194, 541-549.

Conrath, U., Klessig, D.F., Bachmair, A., 1998. Tobacco plants perturbed in the ubiquitindependent protein degradation system accumulate callose, salicylic acid, and pathogenesisrelated protein 1. Plant Cell Rep. 17, 876-880.

Cui, S., Huang, F., Wang, J., Ma, X., Cheng, Y., Liu, J., 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics 5, 3162-3172.

Curto, M., Camafeita, E., Lopez, J.A., Maldonado, A.M., Rubiales, D., Jorrin, J.V., 2006. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). Proteomics 6, S163-S174.

D'Amico, S., Claverie, P., Collins, T., Georlette, D., Gratia, E., Hoyoux, A., Meuwis, M.A., Feller, G., Gerday, C., 2002. Molecular basis of cold adaptation. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 357, 917-925.

Dupire, L., Décout, E., Vasseur, J., Delbreil, B., 1999. Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L.. Plant Sci. 147, 9-17.

Frank, A., Pevzner, P., 2005. PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling. Anal. Chem. 77, 964-973.

Frank, A., Tanner, S., Bafna, V., Pevzner, P., 2005. Peptide sequence tags for fast database search in mass-spectrometry. J. Proteome Res. 4, 1287-1295.

Gottlieb, L.D., de Vienne, D., 1988. Assessment of pleiotropic effects of a gene substitution in pea by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Genetics 119, 705-710.

Goulas, E., Schubert, M., Kieselbach, T., Kleczkowski, L.A., Gardeström, P., Schröder, W., Hurry, V., 2006. The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show

differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. Plant J. 47, 720-734.

Goulas, E., Richard-Molard, C., Le Dily, F., Le Dantec, C., Ozouf, J., Ourry, A., 2007. A cytosolic vegetative storage protein (TrVSP) from white clover is encoded by a cold-inducible gene. Physiol. Plant. 129, 567-577.

Hashimoto, M., Komatsu, S., 2007. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. Proteomics 7, 1293-1302.

Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dörmann, P., 2005. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 17, 3451-3469.

Kessler, F., Schnell, D., Blobel, G., 1999. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. Planta 208, 107-113.

Kim, S.T., Yu, S., Kang, Y.H., Kim, S.G., Kim, J.Y., Kim, S.H., Kang, K.Y., 2007. The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. Plant Cell Rep. online first.

Kuwabara, C., Takezawa, D., Shimada, D., Hamada, T., Fujikawa, S., Arakawa, K., 2002. Abscisic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. Physiol. Plant. 115, 101-110.

Lang, V., Mäntylä, E., Welin, B., Sundberg, B., Palva, E.T., 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. 104, 1341-1349.

Lejeune-Hénaut, I., Hanocq, E., Béthencourt, L., Fontaine, V., Delbreil, B., Morin, J., Petit, A., Devaux, R., Boilleau, M., Stempniak, J.J., Thomas, M., Lainé, A.L., Foucher, F., Baranger, A., Burstin, J., Rameau, C., Giauffret, C., 2008. The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L.. Theor. Appl. Genet. 116(8), 1105-1116.

Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses, New-York, Academic Press.

Mackey, A.J., Haystead, T.A.J., Pearson, W.R., 2002. Getting more for less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. Mol. Cell. Proteomics 1, 139-147.

Maeda, H., Song, W., Sage, T.L., DellaPenna, D., 2006. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. Plant Cell 18, 2710-2732.

Martin, A., Lee, J., Kichey, T., Gerentes, D., Zivy, M., Tatout, C., Dubois, F., Balliau, T., Valot, B., Davanture, M., Tercé-Laforgue, T., Quilleré, I., Coque, M., Gallais, A., Gonzalez-

Moro, M.B., Bethencourt, L., Habash, D.Z., Lea, P.J., Charcosset, A., Perez, P., Murigneux, A., Sakakibara, H., Edwards, K.J., Hirel, B., 2006. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. Plant Cell 18, 3252-3274.

Murfet, I.C., 1973. Flowering in *Pisum. Hr*, a gene for high response to photoperiod. Heredity 31, 157-164.

Nordin, K., Heino, P., Palva, E.T., 1991. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Mol. Biol. 16, 1061-1071.

Pearce, R.S., 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. Plant Growth Regul. 29, 47-76.

Przymusinski, R., Rucinska, R., Gwozdz, E.A., 2004. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. Environ. Exp. Bot. 52, 53-61.

Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I.B., Pfanner, N., Tropschug, M., 1995. Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. Mol. Cell. Biol. 15(5), 2654-2662.

Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L., Hausman, J.F., 2004. Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. Plant Biol. 6, 81-90.

Roberts, I., Murray, P.F., Passeron, S., Barneix, A.J., 2002. The activity of the 20S proteasome is maintained in detached wheat leaves during senescence in darkness. Plant Physiol. Biochem. 40, 161-166.

SAS, User's guide, ver. 8.2, Cary, NC, SAS Institute, 1999.

Schiltz, S., Gallardo, K., Huart, M., Negroni, L., Sommerer, N., Burstin, J., 2004. Proteome reference maps of vegetative tissues in pea. An investigation of nitrogen mobilization from leaves during seed filling. Plant Physiol. 135, 2241-2260.

Sharma, P., Sharma, N., Deswal, R., 2005. The molecular biology of the low-temperature response in plants. BioEssays 27, 1048-1059.

Solecka, D., Boudet, A.M., Kacperska, A., 1999. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. Plant Physiol. Biochem. 37(6), 491-496.

Srivastava, S., Rahman, M.H., Shah, S., Kav, N.N., 2006. Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotechnol. J. 4(5), 529-549.

Suty, L., Lequeu, J., Lançon, A., Etienne, P., Petitot, A.S., Blein, J.P., 2003. Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions : towards the characterization of "plant defense proteasomes". Int. J. Biochem. Cell B. 35, 637-650.

Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., Millar, A.H., 2005. Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. Mol. Cell. Proteomics 4, 1122-1133.

Thomashow, M.F., 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 571-599.

Uemura, M., Joseph, R.A., Steponkus, P.L., 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. Plant Physiol. 109, 15-30.

Uzun, A., Açikgöz, E., 1998. Effect of sowing season and seeding rate on the morphological traits and yields in pea cultivars of differing leaf types. J. Agron. Crop Sci. 181, 215-222.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218, 1-14.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Sci. 9, 244-252.

Watson, B.S., Asirvatham, V.S., Wang, L., Sumner, L.W., 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). Plant Physiol. 131, 1104-1123.

Weller, J.L., Reid, J.B., Taylor, S.A., Murfet, I.C., 1997. The genetic control of flowering in pea. Trends Plant Sci. 2, 411-418.

Wilson, K.A., McManus, M.T., Gordon, M.E., Jordan, T.W., 2002. The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). Proteomics 2, 1114-1122.

Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., Leegood, R.C., 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 355, 1517-1529.

Zivy, M., 2006. Quantitative analysis of 2D gels. Totowa, New Jersey, USA, Humana Press.

Table 1: Identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R) during cold acclimation.

Variation of spot quantity: \neg (increase), \lor (decrease); more abundant in Champagne (+) and Terese (-). a: spot selected for the acclimation effect with Champagne and Terese data, b: with Champagne data, c: with Terese data, d: spot selected for the line effect.

Spot	Protein name	Species Accession number	Possible function	Spot volume Champagne Térèse T1 T1 T2' T2 T3' T3	Variation of spot quantity
L1 ^d	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	Pisum sativum P08926	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)		-
L2 ^d	RuBisCO activase alpha form precursor	<i>Larrea tridentata</i> Q7X9A0	Photosynthesis (02.30)		+
L5 ^d	RuBisCO activase	Phaseolus aureus 098997	Photosynthesis (02.30)		+
L11 ^d	Oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1)	<i>Pisum sativum</i> P14226	Photosynthesis (02.30)		+
L20 ^d	OEE2	<i>Pisum sativum</i> P16059	Photosynthesis (02.30)		+
L23 ^d	Plastocyanin	<i>Pisum sativum</i> P16002	Photosynthesis (02.30)		+
L24 ^d	RuBisCO small chain 3A	<i>Pisum sativum</i> P07689	Photosynthesis (02.30)	 j 	+
L25 ^d	RuBisCO small chain 3C	<i>Pisum sativum</i> P00869	Photosynthesis (02.30)		-
L10 ^{a, c}	L-ascorbate peroxidase	<i>Cucurbita</i> 004873	Detoxification (32.07)		ΤĽ
L16 ^c	Dehydroascorbate reductase	<i>Brassica juncea</i> Q8LJP9	Detoxification (32.07)		∕T
L19 ^d	Glutathione S-transferase	Malva pusilla Q84VH2	Detoxification (32.07)		-
L4 ^a	Magnesium-chelatase subunit chll	<i>Glycine max</i> P93162	Chlorophylle metabolism (01.07)	מלומלוגיה מ ^ל ומלוגיה	И
L6 ^c	Magnesium-chelatase subunit chll	<i>Glycine max</i> P93162	Chlorophylle metabolism (01.07)		Tلا
L3 ^d	Actin-51	Solanum lycopersicum Q96483	Cytoskeleton (42.04)	┍╾┪╵┙┑	+
L8 ^{a, b}	Thiamine biosynthetic enzyme	Oryza sativa Q7XXS4	Thiamine biosynthesis (01.07)		Л
L9 ^d	Alcohol dehydrogenase	<i>Phaseolus lunatus</i> Q8H0D9	Carotenoïd biosynthesis (01.20)		-
L12 ^d	28 kDa ribonucleoprotein	<i>Spinacia oleracea</i> P28644	mRNA processing (11.04)	╎┶┙┙┫╴┙	+
L14 ^d	Putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase	Oryza sativa Q65XW4	Steroid synthesis (01.08)		+
L15 ^d	Ribose-5-phosphate isomerase precursor	<i>Spinacia oleracea</i> Q8RU73	Pentose phosphate pathway (02.07)		+
L17 ^b	Triose phosphate isomerase	<i>Lactuca sativa</i> P48493	Glycolysis (02.01)		⊅C
L18 ^d	Ferritin	<i>Glycine max</i> Q94IC4	Iron storage (04.01)		-
L21 ^d	Glycine decarboxylase multi- enzyme complex, H subunit	Pisum sativum Q4LAP1	Defense (32.05)		+
L22 ^d	Bet vI allergen	<i>Medicago truncatula</i> Q1T055	Glycine degradation (01.01)		-
L7 ^d	Quinone oxidoreductase-like protein At1g23740	Arabidopsis thaliana Q9ZUC1	Unclassified (99)		+
L13 ^d	At1g16880 (uridylyltransferase)	Arabidopsis thaliana Q9FZ47	Unclassified (99)	╷ ┍╴╴╴╴╴╴╼╴╼╸╼╸ ┍╴╴╴╴╴╸╼╸╼╸╼╸╼╸	-
S1 ^a	Heat shock protein Hsp70	<i>Medicago truncatula</i> Q1SKX2	Chaperone (14.01)		л

S2 ^a	Protein disulfide isomerase	Datisca glomerata Q9XF61	Folding (14.01)		7
S3 ^d	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	<i>Pisum sativum</i> P08926	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)	<u>Ċ<u>ġŀġŗ</u>ġĊ<u>ġŗ</u>ġ</u>	-
S4 ^a	Heat shock protein Hsp70	Pisum sativum Q02028	Chaperone (14.01)		7
S15 ^{a, c}	Chaperonin 21 precursor	Solanum lycopersicum Q9M5A8	Chaperone (14.01)		7
$S17^{a}$	Cyclophilin	<i>Vicia faba</i> Q41651	Folding (14.01)		7
S7 ^d	RuBisCO activase	<i>Phaseolus aureus</i> 098997	Photosynthesis (02.30)		+
S9 ^{a, c}	OEE1	<i>Pisum sativum</i> P14226	Photosynthesis (02.30)	<u>היקייקין קיקי</u>	7
S16 ^d	OEE2	<i>Pisum sativum</i> P16059	Photosynthesis (02.30)		+
S20 ^{a, c, d}	Plastocyanin	<i>Vicia faba</i> P00288	Photosynthesis (02.30)		+ لا
S5 ^a	Actin	Gossypium hirsutum 081221	Cytoskeleton (42.04)		Я
S6 ^a	Actin-like protein	Phalaenopsis Q9M4Y1	Cytoskeleton (42.04)	┎┲╍┫┙┫╎╧╗╺╝┙┙	7
S 10 ^{a, c}	Triose phosphate isomerase	<i>Glycine max</i> Q38IW8	Glycolysis (02.01)		7
S13 ^{a, b, c}	Triose phosphate isomerase	<i>Lactuca sativa</i> P48493	Glycolysis (02.01)		א
S8 ^{a, c}	Nodule-enhanced malate dehydrogenase	<i>Glycine max</i> 081278	Krebs cycle (02.10)		דע ⊃ע
S11 ^{a, b}	Putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase	Oryza sativa Q65XW4	Steroid synthesis (01.08)	 	Я
S14 ^{a, c}	Putative chalcone isomerase	Lotus japonicus Q8H0G1	Flavonoid biosynthesis (01.20)	<u>ċæŧ₫ŧ₫</u> ċ <u>ġ</u> ŧ₫	7
S18 ^d	Glycine cleavage system H protein	<i>Pisum sativum</i> P16048	Glycine degradation (01.01)		+
S19 ^d	ABA-responsive protein	Pisum sativum Q06931	Defense (32.05)		+
S12 ^a	RNA-binding region RNP-1	<i>Medicago truncatula</i> Q1RYP4	Unclassified (99)		7
R9 ^c	Protease inhibitor	<i>Pisum sativum</i> Q41015	Defense (32.05)		Tلا
R10 ^d	Ripening-related protein	<i>Pisum sativum</i> Q6UEJ1	Defense (32.05)		+
R11 ^d	Unknown (Bet V1 family)	Astragalus membranaceus Q5EFL2	Defense (32.05)		-
R12 ^d	Ripening-related protein	<i>Glycine max</i> Q9SWS4	Defense (32.05)		+
R13 ^{a, b, d}	Disease resistance response protein	<i>Pisum sativum</i> P27047	Defense (32.05)		+ لا
R14 ^{a, b}	Disease resistance response protein	<i>Pisum sativum</i> P13239	Defense (32.05)	<u>מילילילי</u> ה	7
R15 ^{a, d}	ABA-responsive protein: ABR17	<i>Pisum sativum</i> Q06931	Defense (32.05)	ſ <u>₩</u> ₩₩ <u></u> ſ₩₩	7 +
R6 ^d	20S proteasome alpha subunit B	Arabidopsis thaliana 023708	Protein degradation (14.13)		-
$R7^{a, d}$	20S proteasome alpha subunit E	<i>Glycine max</i> Q9M4T8	Protein degradation (14.13)		- لا
R8 ^d	20S proteasome alpha subunit B	<i>Arabidopsis thaliana</i> 023708	Protein degradation (14.13)		-
R1 ^c	Enolase	<i>Glycine max</i> Q6RIB7	Glycolysis (02.01)		η Τ
R5 ^a	Triose phosphate isomerase	Fragaria ananassa Q9M4S8	Glycolysis (02.01)		И

R2 ^{a, c, d}	Malate dehydrogenase	<i>Glycine max</i> Q6RIB6	Malate-Asp shuttle Unclassified (99)	+ لا
R3 ^{a, d}	Malate dehydrogenase precursor	<i>Medicago sativa</i> O48904	Krebs cycle (02.10)	- דע C
R4 ^d	Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductase	<i>Medicago sativa</i> Q9SDZ7	Unclassified (99)	-

Table 2: Identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R) after three days of frost.

Variation of spot quantity: \neg (increase), \lor (decrease); more abundant in Champagne (+) and Terese (-). a: spot selected for the acclimation effect with Champagne and Terese data, b: with Champagne data, c: with Terese data, d: spot selected for the line effect.

Spot	Protein name	Species Accession number	Possible function	Spot volume Champagne Térèse T4' T4	Variation of spot quantity
L4 ^d	Mg-chelatase subunit chl1	<i>Glycine max</i> P93162	Chlorophylle metabolism (01.07)	┍╍┢╵╵	-
L6 ^{b, d}	Mg-chelatase subunit chl1	<i>Glycine max</i> P93162	Chlorophylle metabolism (01.07)		7 C -
L22 ^d	Bet v1 allergen	<i>Medicago truncatula</i> Q1T055	Glycine degradation (01.01)		-
Lf7 ^c	Glycine cleavage system H protein	<i>Pisum sativum</i> P16048	Glycine degradation (01.01)		⊅ T
L8 ^{a, b}	Thiamine biosynthetic enzym	Oryza sativa Q7XXS4	Thiamine biosynthesis (01.07)	al di	7
L21 ^{a, c}	Glycine decarboxylase H subunit	Pisum sativum Q4LAP1	Defense (32.05)	ĊŪĿĹ	7
Lf1 ^{b, d}	RuBisCO large subunit-binding α	Pisum sativum P08926	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)		- C -
Lf2 ^d	Actin-like protein	Phalaenopsis Q9M4Y1	Cytoskeleton (42.04)	┍╌┏┷┓└╴┲┓	-
Lf3 ^a	Plastoglobulin-1	<i>Pisum sativum</i> Q9ZP40		di di	7
Lf4 ^a	Malate deshydrogenase	<i>Medicago sativa</i> 048904	Krebs cycle (02.10)		И
Lf5 ^d	Fructose bisphosphate aldolase	<i>Pisum sativum</i> Q01517	Glycolysis (02.01)		-
Lf6 ^b	ATP synthase	<i>Glycine max</i> Q39852	Energy conversion (02.45)		۲C
Lf8 ^{a, b}	Superoxide dismutase Cu-Zn	<i>Pisum sativum</i> P11964	Detoxification (32.07)		И
S7 ^c	RuBisCO activase	<i>Phaseolus aureus</i> 098997	Photosynthesis (02.30)		₹T
S16 ^c	OEE2	<i>Pisum sativum</i> P16059	Photosynthesis (02.30)		Τĸ
S20 ^{a, b, d}	Plastocyanin	<i>Vicia faba</i> P00288	Photosynthesis (02.30)		S
S5 ^a	Actin	Gossypium hirsutum 081221	Cytoskeleton (42.04)		7
S10 ^a	Triose phosphate isomerase	<i>Glycine max</i> Q38IW8	Glycolysis (02.01)		7
S14 ^{a, c}	Chalcone isomerase	<i>Lotus japonicus</i> Q8H0G1	Flavonoid biosynthesis (01.20)	ĊŎ ċŎ	7
S15 ^{a, b, c}	Chaperonin 21	<i>Solanum lycopersicum</i> Q9M5A8	Chaperone (14.01)	<u>الے الے</u>	7
S19 ^d	ABA-responsive protein : ABR17	<i>Pisum sativum</i> Q06931	Defense (32.05)		ب لا
Sf1 ^b	Ribose-5-phosphate isomerase	<i>Spinacia oleracea</i> Q8RU73	Pentose-phosphate pathway (02.07)		⊅C
R10 ^d	Ripening related protein	Pisum sativum Q6UEJ1	Defense (32.05)	<u> </u>	+
R14 ^a	Disease resistance response protein	<i>Glycine max</i> Q9SWS4	Defense (32.05)		7
R15 ^{a, c}	ABA-responsive protein : ABR17	<i>Pisum sativum</i> P27047	Defense (32.05)	₫₫	7

Rf3 ^a	Disease resistance response protein	<i>Pisum sativum</i> P14710	Defense (32.05)	₫₫	7
Rf1 ^d	Chaperonin 60	<i>Cucurbita maxima</i> Q05046	Chaperone (14.01)		-
Rf2 ^a	Protein disulfide isomerase	<i>Medicago sativa</i> P29828	Chaperone (14.01)		7
R1 ^a	Enolase	<i>Glycine max</i> Q6RIB7	Glycolysis (02.01)		7
R3 ^{a, b, d}	Malate deshydrogenase	<i>Medicago sativa</i> 048904	Krebs cycle (02.10)		7 C +
R6 ^d	20S proteasome α	<i>Arabidopsis thaliana</i> 023708	Protein degradation (14.13)		-

Figure legends

Fig. 1: Master gel for leaves (a), stems (b) and roots (c), numbers referred to the identified proteins (Table 1).

Fig. 2: Histograms of the cumulative proteins richness for 3 groups, a: photosynthesis, b: defense mechanism and c: folding during the cold acclimation (T1, T2 and T3) in Champagne and Terese.



Fig. 1: Master gel for leaves (a), stems (b) and roots (c), numbers referred to the identified proteins (Table 1).



Fig. 2: Histograms of the cumulative protein richness for 3 groups, a: photosynthesis, b: defense mechanism and c: folding during the cold acclimation (T1, T2 and T3) in Champagne and Terese.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article: **Appendix S1**: ANOVA results for spots selected in leaves (L) during cold acclimation.

Appendix S2: ANOVA results for spots selected in stems (S) during cold acclimation.

Appendix S3: ANOVA results for spots selected in roots (R) during cold acclimation.

Appendix S4: ANOVA results for spots selected in leaves (L) after three days of frost.

Appendix S5: ANOVA results for spots selected in stems (S) after three days of frost.

Appendix S6: ANOVA results for spots selected in roots (R) after three days of frost.

Appendix S7: Details of identified proteins.

Appendix S8: Supplementary data on identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R) during cold acclimation.

Appendix S9: Supplementary data on identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R) after three days of frost.

The material is available as part of the online article from: http://www.blackwell-synergy.com/doi/

Appendix S1: ANOVA results for spots selected in leaves (L) during cold acclimation. L1 to

L25: identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect, ADik: interaction between acclimation and date effect, LDjk: interaction between line and date effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Leaf spot number	Category	pAi	pLj	pALij	pADik	pLDjk
102	Line	0.52635	0.31502	0.78209	0.85711	0.00706
143 = L1	Line	0.43931	0.00842	0.75238	0.67874	0.71518
164	Line	0.88544	0.00615	0.82388	0.99019	0.16153
173	Line, AcclimationC&T	0.00894	0.09811	0.00642	0.27441	0.68584
185	AcclimationChampagne	0.00055	-	-	0.00055	-
191	Line	0.02715	0.0055	0.45401	0.03153	0.02965
194	AcclimationC&T	0.00594	0.09448	0.62662	0.0693	0.76566
207	Line	0.25512	0.00676	0.23083	0.53199	0.31409
259	Line	0.41866	0.00219	0.73486	0.19946	0.5175
275	AcclimationTerese	0.96004	-	-	0.00856	-
280	Line	0.04974	0.0002	0.40996	0.34319	0.10214
284	Line, AcclimationC&T	0.01635	0.00001	0.47324	0.0088	0.05278
296	AcclimationTerese	0.00198	-	-	0.02379	-
309	AcclimationChampagne	0.00264	-	-	0.01798	-
310	Line	0.21069	0.00004	0.42844	0.56109	0.96336
314 = L2	Line	0.35389	0	0.58341	0.53026	0.06932
315	Line	0.0932	0.00011	0.21354	0.19411	0.55555
344	AcclimationC&T	0.00477	0.10039	0.0308	0.00623	0.06924
	AcclimationChampagne	0	-	-	0	-
351	Line	0.45374	0.56723	0.94653	0.10253	0.00166
359	AcclimationTerese	0.16201	-	-	0.00745	-
365	Line	0.57911	0.00842	0.38305	0.35762	0.05056
377 = L3	Line	0.02691	0.00893	0.23325	0.19065	0.02003
384 = L4	AcclimationC&T	0.0018	0.51784	0.49044	0.07542	0.38561
390 = L5	Line	0.16362	0.00238	0.4049	0.54869	0.04122
391 = L6	AcclimationTerese	0.00071	-	-	0.02299	-
470	Line	0.07119	0.00129	0.96819	0.43498	0.36873
488 = L7	Line	0.31508	0.00002	0.7437	0.77902	0.01492
496	Line	0.92602	0.00103	0.78375	0.64335	0.57721
533	AcclimationC&T	0.00088	0.1491	0.51058	0.12992	0.36602
	AcclimationC&T	0.45781	0.00146	0.01938	0.33927	0.85633
542	AcclimationChampagne	0.00671	-	-	0.00671	-
	AcclimationTerese	0.13365	-	-	0.00872	-
	AcclimationC&T	0.00008	0.36926	0.15705	0.01493	0.87506
543 = L8	AcclimationChampagne	0.00175	-	-	0.0699	-
	AcclimationTerese	0.01416	-	-	0.03751	-
561	Line	0.35238	0.00339	0.40438	0.33696	0.69874
569	AcclimationC&T	0.24618	0.00095	0.96041	0.53719	0.28097
	AcclimationTerese	0.00139	-	-	0.0228	
582	AcclimationChampagne	0.00133	-	-	0.00746	-
586	AcclimationChampagne	0.05533	-	-	0.00517	-
606 = L11	Line	0.84965	0.00694	0.60152	0.94732	0.21212
607 = L9	Line	0.04847	0.00303	0.3274	0.33697	0.51631
613 = L10	AcclimationC&T	0.00836	-	-	0.13765	-
	AcclimationTerese	0.00836	-	-	0.13765	-
634	AcclimationChampagne	0.00916	-	-	0.15788	-
641 = L12	Line	0.84743	0.00707	0.70283	0.64336	0.31749
646	AcclimationC&T	0.00461	0.89121	0.98635	0.10435	0.63886
649 = L13	Line	0.17497	0.00402	0.47188	0.17321	0.00024

	Line AcclimationC&T	0.00762	0.01788	0 02807	0 01997	0.00079
664	AcclimationChampagne	0	-	-	0	-
665	AcclimationChampagne	0.00104	-	-	0.01172	-
667	Line	0.48583	0		0.61943	
672	Line	0.32835	0.0067	0.15024	0.74024	0.22273
	Line, AcclimationC&T	0.00211	0.0081	0.10056	0.099	0.27517
679	AcclimationChampagne	0.00183	-	-	0.03313	-
	AcclimationTerese	0.25661	_	-	0.05979	-
	Line. AcclimationC&T	0.00114	0.00004	0.49242	0.04559	0
693	AcclimationChampagne	0.03946	_	_	0.22048	-
695	AcclimationTerese	0.01397	_	_	0.00338	-
702	Line	0.21285	0.00086	0.62057	0.62846	0.91329
704 = L14	Line	0.93211	0.0017	0.54593	0.8853	0.06724
706	AcclimationChampagne	0.11732	-	-	0.00784	-
715	Line	0.3826	0.00373	0.19872	0.74419	0.44836
718 = L15	Line	0.63677	0	0.19041	0.88235	0.24042
723 = L16	AcclimationTerese	0.00036	-	-	0.00695	-
734 = L17	AcclimationChampagne	0.00544	-	-	0.00036	-
739 = L18	Line	0.20787	0.001	0.3593	0.61473	0.31722
748 = L19	Line	0.44548	0	0.78932	0.86806	0.10559
756	Line	0.58247	0.00001	0.60049	0.10254	0.46803
760	AcclimationChampagne	0.01182	-	-	0.00849	-
774	AcclimationChampagne	0.0038	-	-	0.0038	-
781	AcclimationChampagne	0.00123	-	-	0.00043	-
815	Line	0.31664	0.00371	1	0.13875	0.12614
817 = L20	Line	0.71975	0.00027	0.20389	0.94101	0.03712
840	Line, AcclimationC&T	0.09958	0.03972	0.00323	0.94038	0.00566
845	AcclimationTerese	0.00769	-	-	0.10327	-
861	AcclimationC&T	0.42448	0.11712	0.4673	0.00288	0.11189
873	Line	0.4926	0.00071	0.4476	0.33882	0.74453
878	AcclimationTerese	0.15815	-	-	0.00672	-
879 = L22	Line	0.07764	0.00003	0.94011	0.44291	0.76956
880 = L21	Line	0.03393	0	0.12578	0.02617	0.71687
889	AcclimationC&T	0.09222	0.3798	0.95923	0.00109	0.28565
906	Line	0.0301	0.00474	0.05278	0.27291	0.33095
911	Line	0.04371	0.00029	0.12325	0.08062	0.0721
925 = L24	Line	0.21396	0.00246	1	0.16832	0.0146
926 = L25	Line	0.07358	0.02629	0.83156	0.28216	0.00895
931	Line, AcclimationC&T	0.00006	0.08098	0.43093	0.00162	0.26572
	AcclimationChampagne	0.0009	-	-	0.01441	-
935	Line	0.24972	0.00468	0.03929	0.69574	0.00123
942	Line	0.70433	0	1	0.76325	
944	Line	0.04292	0.00348	0.25484	0.46254	0.22477
974 = L23	Line	0.01584	0.00252	0.18762	0.16442	0.71152
990	Line	0.65174	0.00743	0.63983	0.84962	0.46532
1018	Line	0.69543	0.00025	0.51814	0.36588	0.2725
1021	Line	0.62102	0.00972	0.65312	0.91687	0.11909
1087	AcclimationTerese	0.00931	-	-	0.00931	-
1276	AcclimationC&T	0.01092	0.55365	1	0.0051	
	AcclimationChampagne	0.0051	-	-	0.0051	-
1306	AcclimationTerese	0.00912	-	-	0.01034	-
1333	Line	0.72864	0.00827	0.82676	0.90122	

Appendix S2: ANOVA results for spots selected in stems (S) during cold acclimation. S1 to S20:

identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect, ADik: interaction between acclimation and date effect, LDjk: interaction between line and date effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Stem spot number	Category	pAi	pLj	pALij	pADik	pLDjk
27	AcclimationC&T	0.0002	0.02183	0.87801	0.00127	0.20053
21	AcclimationChampagne	0.00006	-	-	0.00198	-
28	AcclimationChampagne	0.00188	-	-	0.00583	-
49	Line	0.18597	0.77914	0.3624	0.51089	0.00728
52 = S1	AcclimationC&T	0.00281	0.80478	0.22088	0.08034	0.16645
68	AcclimationC&T	0.00537	0.89056	0.84713	0.06304	0.92078
80 = S2	AcclimationC&T	0.00051	0.7047	0.88481	0.02694	0.21728
87 = S3	Line	0.15311	0.00978	0.11858	0.57942	0.68229
88	AcclimationC&T	0.00485	0.07682	0.23151	0.07823	0.07889
100	AcclimationChampagne	0.00877	-	-	0.00877	-
113	AcclimationTerese	0.00715	-	-	0.08533	-
126 = S4	AcclimationC&T	0.00562	0.41829	0.92705	0.08907	0.18105
127	AcclimationC&T	0.00048	0.76635	0.30897	0.03014	0.0592
137	AcclimationTerese	0.00376	-	-	0.07191	-
140	AcclimationC&T	0.00151	0.61858	0.21717	0.05187	0.10845
143	AcclimationTerese	0.00594	-	-	0.09692	-
148	Line	0.33805	0.00785	0.86231	0.55411	0.59905
151	AcclimationChampagne	0	-	-	0	-
150	AcclimationC&T	0.00375	0.23977	0.20667	0.10365	0.20123
153	AcclimationTerese	0.00658	-	-	0.12594	-
400	AcclimationC&T	0.00031	0.1781	1	0.00016	0.06203
160	AcclimationChampagne	0.00111	-	-	0.00111	-
180 = S5	AcclimationC&T	0.00551	0.35903	0.46704	0.09257	0.56478
182 = S6	AcclimationC&T	0.0029	0.55018	0.62681	0.09144	0.67411
199	Line	0.92578	0		0.84748	0.0174
200 = S7	Line	0.23254	0.00002	0.52659	0.34903	0.24673
201	Line, AcclimationC&T	0.00054	0.05273	0.90402	0.0147	0.00269
207	AcclimationC&T	0.00229	0.22416	0.0724	0.06716	0.49248
207	AcclimationTerese	0.00382	-	-	0.04185	-
208	Line	0.40431	0.00795	0.68786	0.28078	0.74902
010	AcclimationC&T	0.00961	0.16068	1	0.00961	0.03636
213	AcclimationChampagne	0.00321	-	-	0.00321	-
223	Line	0.00354	0.00504	0.25873	0.02892	0.65776
226	Line	0.04184	0.00972	0.45911	0.10074	0.50466
230	Line	0.58839	0.00825	0.9914	0.77227	0.00734
238	Line	0.06277	0.26376	0.39024	0.15028	0.00967
241	Line	0.52602	0.00676	0.96155	0.87121	0.15394
047	AcclimationC&T	0.00002	0.10465	0.02026	0.00072	0.41509
247	AcclimationTerese	0.00007	-	-	0.00242	-
252	AcclimationC&T	0.00559	0.03115	0.61454	0.1204	0.43555
	AcclimationC&T	0.0044	0.06338	0.16914	0.00899	0.26452
259	AcclimationChampagne	0.00022	-	-	0.00164	-
	AcclimationTerese	0.12659	_	-	0.12659	-
268	Line	0.7447	0.00268	1	0.68416	0.07614
	AcclimationC&T	0.00049	0.02192	0.10595	0.02304	0.50908
282	AcclimationTerese	0.00237	_	-	0.03979	-
	Line	0.08276	0.00001	0.10849	0.0133	0.01435
203	AcclimationTerese	0.00496	-	-	0.00247	-

285	AcclimationC&T	0.00005	0.13272	0.34242	0.01061	0.50893
200	AcclimationTerese	0.0006	-	-	0.02373	-
290	AcclimationTerese	0.00625	-	-	0.05226	-
305 - 58	AcclimationC&T	0.00058	0.97815	0.37275	0.00952	0.24241
505 = 66	AcclimationTerese	0.00853	-	-	0.08028	
315	AcclimationC&T	0.00119	0.75818	1	0.00385	0.36209
332	AcclimationChampagne	0.00704	-	-	0.00704	-
343 = \$9	AcclimationC&T	0.00035	0.0195	0.25061	0.01651	0.82333
	AcclimationTerese	0.00482	-	-	0.1066	-
357	AcclimationC&T	0.00004	0.05435	0.01601	0.00494	0.04039
	AcclimationTerese	0	-	-	0.00001	-
361	Line, AcclimationC&T	0.00108	0.00714	1	0.00108	0.00162
	AcclimationTerese	0.00083	-	-	0.00083	-
363	Line	0.35891	0.00091	0.29467	0.11602	0.02413
372	Line, AcclimationC&T	0.00261	0.01344	1	0.01501	0.00005
	AcclimationChampagne	1	-	-	•	-
390	AcclimationTerese	0.00958	-	-	0.05193	-
403 = S10	AcclimationC&T	0.00019	0.68868	0.21116	0.01667	0.61718
	AcclimationTerese	0.00296	-	-	0.07274	-
404 = S11	AcclimationC&T	0.00028	0.32651	0.3444	0.01662	0.62241
	AcclimationChampagne	0.00031	-	-	0.01886	-
407 = S12	AcclimationC&T	0.00272	0.03662	0.52676	0.09328	0.887
410	AcclimationC&T	0.00082	0.38598	0.16462	0.03684	0.90697
	AcclimationTerese	0.00947	-	-	0.09771	-
413	AcclimationC&T	0.00016	0.14107	0.70015	0.00278	0.93756
	AcclimationChampagne	0.00101	-	-	0.00645	-
	AcclimationC&T	0.00001	0.97543	0.17198	0.00682	0.11851
416 = S13	AcclimationChampagne	0.00244	-	-	0.06971	-
	AcclimationTerese	0.00292	-	-	0.09009	-
418	AcclimationC&T	0.00793	0.44915	0.15734	0.14207	0.28406
426	Line	0.08129	0.00701	1	0.09797	0.74652
431 = S14	AcclimationC&T	0.00016	0.34933	0.368	0.01697	0.45874
	AcclimationTerese	0.00495	-	-	0.10706	-
434 = S15	AcclimationC&I	0.00013	0.5986	0.10312	0.0173	0.47333
	Acclimation lerese	0.0004	-	-	0.02483	-
437	AcclimationC&I	0.00168	0.02979	0.04709	0.00942	0.4278
	Acclimation lerese	0.0013	-	-	0.00766	-
441	Acclimation C& I	0.00475	0.32861	0.13902	0.09705	0.48372
447	Acclimation rerese	0.00449	-	-	0.03842	
454	Acclimation C& I	0.00027	0.91078	0.39645	0.02002	0.78141
460	AcclimationC&T	0.00322	-	-	0.07469	0.52602
400		0.0000	0.29912	0.01900	0.09037	0.32093
400	Line	0.30990	0.00401	0.99783	0.63898	0.30078
409 - 510		0.21700	0.00030	0.10704	0.03090	0.86797
477		0.00654	0.00373	0.03130	0.12021	0.00797
	Acclimation C8T	0.00031	0.57092	0 40308	0.0715	0 22177
479	AcclimationCon	0.00031	0.57962	0.40396	0.0213	0.32177
480	AcclimationChampagne	0.00763	_		0.00064	
483 = \$17	AcclimationC&T	0.00004	0.01856	0 87375	0.00004	0 18455
	AcclimationC&T	0.0000	0.01066	0.05504	0.05500	0.22046
485	AcclimationChampage	0.35780	-	-	0.00333	-
	AcclimationTerese	0.00026	_	-	0.00042	-
506		0.25401	0.00289	0 43318	0.61379	0 16333
	Line AcclimationC&T	0.20401	0.00209	0.00564	0.013/3	0.10000
511	AcclimationChampage	0.00002	-	-	0.11618	-
	AcclimationTerese	0.00633	_	-	0.021/1	-
	///////////////////////////////////////	0.00000		-	0.02141	_

513	AcclimationTerese	0.00454	-	-	0.01427	-
516	Line	0.50251	0.00849	1	0.49093	
527 = S18	Line	0.3517	0.00213	0.25048	0.77171	0.26408
532	AcclimationTerese	0.00124	-	-	0.00198	-
536	AcclimationTerese	0.00267	-	-	0.02102	-
537	AcclimationC&T	0.00022	0.39573	0.61541	0.02334	0.99852
	AcclimationTerese	0.00615	-	-	0.10717	-
542 = S19	Line	0.10138	0.00134	0.31143	0.29429	0.5417
555	AcclimationC&T	0.00331			0.0057	
	AcclimationChampagne	0.00331	-	-	0.0057	-
556	AcclimationC&T	0.0083	0.31253	1	0.00666	0.9996
561	AcclimationChampagne	0.00515	-	-	0.03426	-
566 - 520	Line, AcclimationC&T	0.00329	0	0.09704	0.06	0.01343
500 = 020	AcclimationTerese	0.06477	-	-	0.35013	-
570	AcclimationChampagne	0.00044	-	-	0.01563	-
588	Line	0.8028	0	0.1412	0.81127	0.14528
612	AcclimationTerese	0	-	-	0.00001	-
	Line, AcclimationC&T	0.00369	0.00341	0.08678	0.01244	0.07426
631	AcclimationChampagne	0.90401	-	-	0.90401	-
	AcclimationTerese	0.00409	-	-	0.00409	-
645	Line	1	0.00001	1		
661	Line	0.1078	0.00447		0.37288	0.67524
694	AcclimationChampagne	0.00015	-	-	0.00015	-
717	AcclimationChampagne	0.00065	-	-	0.00106	-
750	Line	0.4515	0.00043	0.67103	0.4515	0.00025
771	Line, AcclimationC&T	0.00358	0.00425	0.00905	0.0065	0.83036
	AcclimationChampagne	0.00953	-	-	0.75205	-
844	AcclimationC&T	0.00913	0.67544	0.04861	0.16088	0.11052
913	AcclimationTerese	0.00978	-	-	0.05929	-
914	AcclimationC&T	0.00435	0.25438	0.67322	0.06619	0.08435
921	Line	0.18523	0.00003		0.18523	

Appendix S3: ANOVA results for spots selected in roots (R) during cold acclimation. R1 to R15:

identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect, ADik: interaction between acclimation and date effect, LDjk: interaction between line and date effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Root spot number	Category	pAi	pLj	pALij	pADik	pLDjk
276	AcclimationChampagne	0.02721	-	-	0.00956	-
282	Line, AcclimationC&T	0.29306	0.00719		0.00433	0.8831
202	AcclimationChampagne	0.00218	-	-	0.00035	-
416	AcclimationTerese	0.00114	-	-	0.00576	-
428	AcclimationChampagne	0.00445	-	-	0.00468	-
453	AcclimationC&T	0.00441	0.54225	0.63354	0.11126	0.27675
	AcclimationTerese	0.00096	-	-	0.00872	-
459	Line	0.82518	0.06172			0.00835
460	AcclimationC&T	0.00677	0.0725	0.16285	0.064	0.24739
471	Line, AcclimationC&T	0.00177	0.0338	0.00214	0.00117	0.00136
	AcclimationChampagne	0.02613	-	-	0.00576	-
523	AcclimationC&T	0.00464	0.81686	0.73988	0.02846	0.74281
577	AcclimationChampagne	0.00559	-	-	0.01445	-
589	AcclimationChampagne	0.07066	-	-	0.00981	-
605	Line	0.15674	0.00908	0.67144	0.45004	0.01832
688	Line, AcclimationC&T	0.04205	0.00119	0.00124	0.79134	0.18698
714	AcclimationTerese	0.00033	-	-	0.04514	
746	Line, AcclimationC&T	0.00049	0.0018			
	AcclimationTerese	0.00049	-	-		-
749	AcclimationChampagne	0.00004	-	-	0	-
752	Line, AcclimationC&T	0.00017	0.00012	0.00048	0.17735	0.39491
	AcclimationTerese	0	-	-	0.00176	-
756	AcclimationTerese	0.00677	-	-		-
788	AcclimationChampagne	0.00198	-	-	0.12422	-
845 = R1	AcclimationTerese	0.00428	-	-	0.8365	-
867	Line	0.93735	0.00066	0.73155	0.53918	0.00146
878	AcclimationChampagne	0.00133	-	-	0.00248	-
907	AcclimationTerese	0.13538	-	-	0.00933	-
908	AcclimationChampagne	0.00203	-	-	0.00223	-
919	AcclimationChampagne	0.00761	-	-		-
933	AcclimationChampagne	0.00737	-	-	0.00988	-
951	Line	0.42845	0.00585		0.02294	0.90165
964	AcclimationTerese	0.16133	-	-	0.00102	-
1012	AcclimationC&T	0.01348	0.15534	0.22032	0.0042	0.02173
1026	Line	0.4212	0.0089	0.03111	0.292	-
1054	Line	0.02048	0.00531	0.51663	0.02299	0.0221
	AcclimationTerese	0.00757	-	-	0.01204	-
1073	AcclimationChampagne	0.06384	-	-	0.00751	-
1165	AcclimationTerese	0.00021	-	-	0.22457	-
1196	AcclimationChampagne	0.00499	-	-		-
1233	AcclimationTerese	0.00126	-	-	0.00908	-
1286	Line	0.02567	0.05202	0.27217	0.88066	0.00378
1317 = R2	Line, AcclimationC&T	0.00188	0.5723	0.40071	0.7858	0.00848
	AcclimationTerese	0.00252	-	-	0.55547	-
1339	AcclimationTerese	0.00426	-	-	0.11611	-
1373 = R3	Line, AcclimationC&T	0.69778	0.09378	0.0072	0.14505	0.10387
1382	Line, AcclimationC&T	0.0295	0.00004	0.00006	0.00019	0.69159
1405	AcclimationChampagne	0.00305	-	-	0.01713	-

1444 = R4	Line	0.9323	0.64945	0.05861	0.1782	0.00869
1488	AcclimationC&T	0.73075	0.62061	0.68128	0.00447	0.58704
1490	AcclimationChampagne	0.00821	-	-		-
1680	Line	0.83004	0.00148	0.75163	0.15422	0.00162
1689	Line, AcclimationC&T	0.57025	0.01167	0.00745	0.06363	0.01486
1737	Line		0.00838			
1774 = R5	AcclimationC&T	0.09729	0.01346	0.40951	0.00944	0.01287
1804 = R6	Line	0.67334	0.00001	0.1511	0.66287	0.76701
1820 = R7	Line, AcclimationC&T	0.52528	0.03902	0.00551	0.0088	0.023
1832 = R8	Line	0.17859	0.00636	0.05786	0.04755	0.57861
1847	Line	0.02189	0.00814			0.02705
18/0	Line, AcclimationC&T	0.00365	0.00473			
1049	AcclimationChampagne	0.00365	-	-		-
1875	AcclimationC&T	0.00409	0.87976			0.31535
1883	AcclimationC&T	0.00697	0.52233	0.11917	0.19991	0.80655
1919	AcclimationChampagne	0.16211	-	-	0.00664	-
1974	Line	0.53619	0.00064	0.08805	0.1162	0.12823
2033	Line	0.04149	0.00456			
2069 = R9	AcclimationTerese	0.00637	-	-	0.01848	-
2118 = R10	Line	0.58454	0	0.89689	0.62044	0.36899
2125 = R11	Line	0.41394	0.00001	0.67799	0.96196	0.34314
2169	AcclimationC&T	0.03779	0.43277	0.81715	0.00953	0.45419
2209 = R14	AcclimationC&T	0.00169	0.39742	0.83447	0.1258	0.84821
2200 - 111	AcclimationChampagne	0.00137	-	-	0.00582	-
2217	AcclimationTerese	0.00927	-	-	0.15073	-
2226 = R15	Line, AcclimationC&T	0.00271	0.00382	0.91575	0.6448	0.29492
2240	Line	0.61276	0.00908	0.09916	0.92955	0.54563
2322	Line	0.46118	0.00075	0.71639	0.20037	0.27644
2393	AcclimationChampagne	0.24545	-	-	0.00369	-
3080 = R12	Line	0.37809	0.00051	0.72486	0.84043	0.89063
3081 - R13	Line, AcclimationC&T	0.37002	0.00071	0.60552	0.00202	0.46196
3001 = 1(13	AcclimationChampagne	0.68273	-	-	0.00233	-
	AcclimationC&T	0.00001	0.11239	0.27062	0.46174	0.15167
3086	AcclimationChampagne	0.00197	-	-	0.41562	-
	AcclimationTerese	0.00632	-	-	0.49362	-
3095	Line		0.00086			
3112	Line	0.11969	0.00173	0.24611	0.06116	0.00882
3118	AcclimationC&T	0.03141	0.04886		0.00678	0.01994
3146	AcclimationTerese	0.00974	-	-	0.01213	-

Résultats et discussion

Appendix S4: ANOVA results for spots selected in leaves (L) after three days of frost. Lfl to

Lf8, L4, L6, L8, L21, L22: identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Leaf spot number	Category	pAi	pLj	pALij
72	AcclimationC&T	0.00968	0.06753	0.80697
167 = Lf1	Line	0.01485	0.00856	0.78316
	AcclimationChampagne	0.00185	-	-
168	AcclimationC&T	0.00987	0.01465	0.3123
310	Line	0.615	0.00866	0.35194
343	AcclimationC&T	0.00615	0.01649	
344	Line, AcclimationC&T	0.00001	0	0
345 = Lf2	Line	0.66025	0.00263	0.24664
348	Line, AcclimationC&T	0.00236	0.00187	
349	AcclimationC&T	0.00704	0.02525	
	AcclimationChampagne	0.00704	-	-
359	Line	0.44513	0.00597	0.45881
384 = L4	Line	0.03732	0.00028	0.89765
385	Line	0.13574	0.00776	0.86651
391 = L6	Line	0.04945	0.00252	0.76702
	AcclimationChampagne	0.00302	-	-
395 = Lf3	AcclimationC&T	0.00728	0.03197	0.35185
439	Line	0.02911	0.00646	
452 = Lf4	AcclimationC&T	0.00873	0.52584	0.37515
470	Line	0.13205	0.00024	0.19341
515	AcclimationC&T	0.00804	0.06848	
522 = Lf5	Line	0.03707	0.00567	0.70303
523	Line, AcclimationC&T	0.00693	0.00702	0.00669
	AcclimationTerese	0.00446	-	-
543 = L8	AcclimationC&T	0.00008	0.39549	0.06405
	AcclimationChampagne	0.00207	-	-
550	AcclimationC&T	0.00146	0.12463	0.14435
	AcclimationChampagne	0.00033	-	-
583	AcclimationC&T	0.00282	0.03977	
	AcclimationChampagne	0.00547	-	-
639	AcclimationC&T	0.00324	0.65808	0.49044
667	Line	0.5298	0.0078	
693	AcclimationC&T	0.00001	0.01066	0.52535
	AcclimationChampagne	0.00424	-	-
	AcclimationTerese	0.00126	-	-
702	AcclimationC&T	0.00266	0.11301	
	AcclimationTerese	0.00266	-	-
708	AcclimationC&T	0.00406	0.49316	0.40473
	AcclimationChampagne	0.00072	-	-
720 = Lf6	AcclimationChampagne	0.00075	-	-
829	Line, AcclimationC&T	0.00388	0.00625	0.00837
836	AcclimationTerese	0.00018	-	-
867	AcclimationTerese	0.00892	-	-
879 = L22 880 = L21	Line	0.07348	0.00057	0.41658
	AcclimationC&T	0.00052	0.01284	0.24504
	AcclimationTerese	0.00216	-	-
882 = Lt7	AcclimationTerese	0.0014	-	-
888 = Lf8	AcclimationC&T	0.00933	0.91023	0.22298
	AcclimationChampagne	0.00647	-	-
896	Line	0.3505	0.00462	0.64437
------	----------------------	---------	---------	---------
940	Line	0.92545	0.00916	
944	AcclimationTerese	0.00797	-	-
990	AcclimationChampagne	0.00654	-	-
1018	Line	0.01047	0.00049	0.14784
1131	Line, AcclimationC&T	0.0008	0.00063	0.00073
1260	AcclimationChampagne	0.0023	-	-
1261	AcclimationC&T	0.00549	0.28875	

Appendix S5: ANOVA results for spots selected in stems (S) after three days of frost. sf1, s5,

S7, S10, S14-S16, S19, S20: identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Stem spot number	Category	pAi	pLj	pALij
73	Line		0.00246	
137	AcclimationC&T	0.00798	0.02663	0.85215
148	Line, AcclimationC&T	0.22531	0.0056	0.00428
177	Line	0.04847	0.00798	0.05027
179	AcclimationChampagne	0.00242	-	-
180 = S5	AcclimationC&T	0.00982	0.56233	0.50257
200 = S7	AcclimationTerese	0.0069	-	-
210	AcclimationChampagne	0.00138	-	-
240	AcclimationC&T	0.00186	0.04889	
240	AcclimationTerese	0.00599	-	-
244	Line	0.18279	0.00375	
265	Line	0.0939	0.00406	0.29499
202	AcclimationC&T	0.00278	0.01375	
292	AcclimationTerese	0.00278	-	-
327	AcclimationC&T	0.00559	0.49061	0.71018
367	Line	0.12216	0.0093	
403 = S10	AcclimationC&T	0.00149	0.47769	0.67105
410	AcclimationC&T	0.00125	0.83798	0.37184
411 = Sf1	AcclimationChampagne	0.00304	-	-
	AcclimationC&T	0.00701	0 7289	0 03007
431 = S14	AcclimationTerese	0.00513	0.7200	
	AcclimationC&T	0.0001	0 76228	0 39288
434 = S15	AcclimationChampagne	0.00001	0.70220	0.00200
101 - 010	AcclimationTerese	0.00053		
<u> 169 - S16</u>	AcclimationTerese	0.00032		
511	Line AcclimationC&T	0.00034	0.00988	0.00204
511	Line, AcclimationC&T	0.00021	0.00900	0.00294
513	Line, AcclimationC&T	0.01325	0.1062	0.00369
510	Lino	0.00903	0.00207	
519	Line ApplimationC&T	0.13037	0.00297	0.00005
520		0.93528	0.13033	0.00095
520	Lino	0.0012	0.78008	0.00357
551		0.96296	0.00955	0.0050
541	Line, AcclimationC&I	0.0100	0.00478	0.0050
<u> </u>	AcclimationChampagne	0.00367	0.00074	-
542 = 519		0.10457	0.00071	0.0000
545	Line, AcclimationC&T	0.94755	0.19201	0.00331
555	Acclimation C& I	0.00968	0.37931	
	AcclimationChampagne	0.00968	-	-
564	Acclimation rerese	0.00288	-	-
566 = S20	Line, AcclimationC&I	0.01401	0.03336	0.00161
	AcclimationChampagne	0.00425	-	-
588	Line	0.23183	0.00011	0.13191
612	Line	0.91798	0.00008	0.15546
673	AcclimationC&T	0.00009	0.07262	•
771	AcclimationC&T	0.00312	0.01042	0.64784
	AcclimationChampagne	0.00688	-	-
800	AcclimationC&T	0.00601	0.01796	0.0625
	AcclimationChampagne	0.00478	-	-
935	AcclimationC&T	0.00323	0.92083	
	AcclimationTerese	0.00323	-	-

Appendix S6: ANOVA results for spots selected in roots (R) after three days of frost. Rf1 to Rf3,

R1, R3, R6, R10, R14, R15: identified spots, Line: line effect, AcclimationC&T: acclimation effect with Champagne and Terese data, AcclimationChampagne: acclimation effect with Champagne data, AcclimationTerese: acclimation effect with Terese data, p: p-value of Ai: acclimation effect, Lj: line effect, Alij: interaction between acclimation and line effect. Coloured boxes corresponded to p-value < 1%.

Root spot number	Category	pAi	pLj	pALij
395	Line	0.02521	0.00392	
471	Line	0.01892	0.00313	
510 = Rf1	Line	0.17511	0.00502	0.70297
566	Line	0.17579	0.00341	0.10183
568	Line, AcclimationC&T	0.01682	0.0102	0.00891
637 = Rf2	AcclimationC&T	0.0059	0.45656	0.0976
669	Line	0.04021	0.00047	
750	AcclimationTerese	0.00955	-	-
845 = R1	AcclimationC&T	0.00187	0.5771	0.67482
999	AcclimationC&T	0.00525	0.90727	0.01446
1003	Line	0.86586	0.00798	0.33159
1192	Line	0.06632	0.00255	
1200	Line, AcclimationC&T	0.00971	0.00887	
1218	Line, AcclimationC&T	0.01207	0.00504	0.00886
1239	Line, AcclimationC&T	0.19709	0.18409	0.00328
1283	Line	0.37891	0.0001	
1327	Line, AcclimationC&T	0.00361	0.00646	
	AcclimationTerese	0.00361	-	-
1373 – R3	Line, AcclimationC&T	0.00751	0.153	0.00817
	AcclimationChampagne	0.00071	-	-
1682	AcclimationTerese	0.00739	-	-
1701	Line, AcclimationC&T	0.00091	0.00205	0.0006
1709	Line	0.5664	0.00612	
1717	AcclimationC&T	0.0016	0.02154	0.04209
1804 = R6	Line	0.88976	0.00944	
1860	AcclimationTerese	0.00844	-	-
1917	AcclimationC&T	0.00887	0.65622	
2118 = R10	Line	0.41581	0.00013	0.34179
2209 = R14	AcclimationC&T	0.00091	0.41338	0.15151
2212 = Rf3	AcclimationC&T	0.00297	0.01939	0.29583
2226 - R15	AcclimationC&T	0.00301	0.88221	0.93883
	AcclimationTerese	0.00257	-	-
2246	AcclimationTerese	0.00633	-	-

Spot no.	Accession no.	Sequence	
L1	P08926	K.ELSETDSIYDSEK.L	K.LADAVGLTLGPR.G
		K.TNDSAGDGTTTASILAR.E	R.AIELPDPM*ENAGAALIR.E
		K.SIVEFENAR.V	K.LGLLNVTSGANPVSIK.K
		K.AVATISAGNDELIGK.M	K.TVAALVEELEK.L
		R.GYISPQFVTNPEK.S	K.ALVAPAALIAQNAGIEGEVVVEK.I
		R.GILNVAAIK.A	K.DSTTIIADAASK.D
		R.NVVLDEFGSPK.V	
L2	Q7X9A0	GLAYDVSDDQQDITR	M*GINPIMMSAGELESGNAGEPAK
		LLEYGNM*LVQEQENVK	MCCLFINDLDAGAGR
		LLEYGNMLVQEQENVK	VPLILGIWGGK
		M*CCLFINDLDAGAGR	VPIIVTGNDFSTLYAPLIR
L3	Q96483	K.NYELPDGQVITIGAER.F	
		K.DLYGNIVLSGGSTM*FPGIADR.M	
L4	P93162	EGISISHPAR	LRKDPLESIDSGLLVTEK
		VCAELNVDGLR	SLVDLLPEIK
		INM*VDLPLGATEDR	SILSSVQIDQDLK
L5	O98997	GLAYDISDDQQDITR	M*GINPIMMSAGELESGNAGEPAK
		IGVCTGIFR	VPIIVTGNDFSTLYAPLIR
		M*CALFINDLDAGAGR	LVDTFPGQSIDFFGALR
L6	P93162	EGISISHPAR	INM*VDLPLGATEDR
		IGGVM*IM*GDR	INMVDLPLGATEDR
		VCAELNVDGLR	LCLLLNVIDPK
		IGGVMIMGDR	SLVDLLPEIK
L7	Q9ZUC1	KLNPYLESGK	SLGADLAIDYTK
		VGDEVYGDVNEK	ATDSPLPTVPGYDVAGVVVK
		QFGSLAEYTAVEEK	
L8	Q7XXS4	HAALFTSTIM*SK	MGPTFGAMMISGQK
		ALDM*NTAEDAIVR	EIVPGM*IVTGM*EVAEIDGAPR
		HAALFTSTIMSK	LFNAVAAEDLIVK
		SIGMIDSVPGM*K	EIVPGMIVTGM*EVAEIDGAPR
		M*GPTFGAM*MISGQK	EIVPGMIVTGMEVAEIDGAPR
		SIGM*IDSVPGMK	ALDMNTAEDAIVR
		SIGMIDSVPGMK	
L9	Q8H0D9	YNQLDDDGLLGFYSNLK	
		LTGGAGGLGEATAR	
L10	O04873	EIVALSGAHTLGR	
		YAEDQEAFFKDYAEAHAK	
L11	P14226	R.GDEEELGKENNK.S	R.LTFDEIQSK.T
		R.GDEEELGK.E	K.KLCLEPTSFTVK.S
		K.TYLEVK.G	K.RLTFDEIQSKTYLEVK.G
		K.GRGASTGYDNAVALPAGGR.G	K.LCLEPTSFTVK.S
		K.RLTFDEIQSK.T	K.QLVASGKPDSFSGEFLVPSYR.G
		R.GASTGYDNAVALPAGGR.G	R.LTYTLDEIEGPFEVSADGSVK.F
		R.GASTGYDNAVALPAGGRGDEEELGK.E	K.GTGTANQCPTIDGGVDSFSFKPGKYNAK.K
		K.KLCLEPTSFTVKSEGVTK.N	
L12	P28644	R.LEQLFSEHGK.V	R.GFGFVTMSTVEEAER.A
		R.GFGFVTM*STVEEAER.A	

Appendix S7: Details of identified proteins

L13	Q9FZ47	VEDPELLEAIR	
	0.053/44/4	LGALLDTMINALK	DI A OSPECI
L14	Q65XW4		DLAQSPEGK
1.45	0001172		
LID	QORU73		
116			
LIU	QOLJF 9	IFSTFIGFLK	
L17	P48493	VLACLGETLEOR	
		TVGTTLDVVSVGTTK	
L18	Q94IC4	FFKESSEEEREHAEK	
		GDALYAM*ELALSLEK	
l 19	Q84VH2	R SPLI PSDPYOR A	VANYEYRDEDLR
210	GOTTIE	K VYEEIVEIR K	MWADFTAK
1 20	P16059		
220	1 10000		
		K.AKTNTDYLPYNGDGFK.L	K.SITDYGSPEEFLSK.V
		R.KEVEDTASSESVA	K.TNTDYLPYNGDGFKLLVPAKWNPSK.E
L21	Q4LAP1	K.IKPTSPDELESLLGAK.E	
		K.PGLINSSPYEDGWMIK.I	
L22	Q1T055	QGLEVPMELK	HQAKSLVEGDLLQYYTK
		DVLEGDGK	
L23	P16002	K.ISM*PEEDLLNAPGETYSVK.L	K.FYCSPHQGAGM*VGQVTVN
		K.NNAGFPHNVVFDEDEIPAGVDASK.I	
L24	P07689	K.LPM*FGTTDASQVLK.E	K.GWVPCLEFELEK.G
		R.QVQCISFIAHTPESY	K.KKFETLSYLPPLTR.E
		K.LPMFGTTDASQVLK.E	R.EHNNSPGYYDGR.Y
		R.KGWVPCLEFELEK.G	
L25	P00869	K.LPM*FGTTDASQVLK.E	R.KGWVPCLEFELEK.G
		K.LPMFGTTDASQVLK.E	K.ELDEVVAAYPQAFVR.I
Lf1	P08926	K.DIAFDQHSR.S	R.NVVLDEFGSPK.V
		R.LGADIVQK.A	K.LGLLNVTSGANPVSIKK.G
		K.VVNDGVTIAR.A	K.LADAVGLTLGPR.G
		K.VGAATETELEDR.Q	K.AAVAAAPQGLTI
		K.TNDSAGDGTTTASILAR.E	R.GILNVAAIKAPGFGER.R
		K.ELSETDSIYDSEK.L	R.AIELPDPM*ENAGAALIR.E
		K.SIVEFENAR.V	K.TVAALVEELEK.L
		K.AVATISAGNDELIGK.M	R.SAM*QAGIDKLADAVGLTLGPR.G
		K.DSTTIIADAASKDELQSR.V	R.AIELPDPMENAGAALIR.E
		R.GYISPQFVTNPEK.S	K.ALVAPAALIAQNAGIEGEVVVEK.I
	001404		
Lf2	Q9M4Y1		DLYGNIVLSGGSTM*FPGIADR
	007040	LAYVALDFEQEM^ETTK	
Lt3	Q92P40		
1.64	048004		
Lī4	048904		
1.65	004547		
LID	QUIST		

		R.GILAMDESNATCGK.R	R.KIVDVLVEQNIIPGIK.V
		K.AAQEALLFR.A	K.GLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR.E
Lf6	Q39852	K.NKFETAIGILKK.E	
		K.GM*DLLLAEFDK.I	
Lf7	P16048	K.FCEEEDAAH	K.IKPTSPDELESLLGAK.E
		K.EYTKFCEEEDAAH	K.PGLINSSPYEDGWMIK.I
Lf8	P11964	K.LTHGAPEDEIR.H	R.ALVVHELQDDLGKGGHELSLSTGNAGGR.L
		K.GTSAVEGVVTLTQDDEGPTTVNVR.I	R.LACGVVGLTPV
S1	Q1SKX2	K.AVVTVPAYFNDSQR.Q	R.IINEPTAASLAYGFER.K
		K.SFAAEEISAQVLR.K	K.IAGLEVLR.I
S2	Q9XF61	YADDLAHTLDAK	LVVVGVmPK
		DGLVEYLK	
S3	P08926	K.M*IAEAIDK.V	R.NVVLDEFGSPK.V
		K.VLITDQK.I	R.GILNVAAIK.A
		K.DIAFDQHSR.S	K.LADAVGLTLGPR.G
		K.VVNDGVTIAR.A	R.AIELPDPM*ENAGAALIR.E
		K.VGAATETELEDR.Q	K.LGLLNVTSGANPVSIK.K
		K.ELSETDSIYDSEK.L	K.TVAALVEELEK.L
		K.DSTTIIADAASK.D	R.AIELPDPMENAGAALIR.E
		K.AVATISAGNDELIGK.M	K.SLVEFENAR.I
		R.GYISPQFVTNPEK.S	
S4	Q02028	R.TPVENSLR.D	K.SFAAEEISAQVLR.K
		K.QDITITGASTLPGDEVER.M	R.IINEPTAASLAYGFER.K
		K.EGPEGDVIDADFTDSK	K.MELSSLSQTNISLPFITATADGPK.H
		K.DIDEVILVGGSTR.I	
S5	O81221	DAYVGDEAQSK	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
		AGFAGDDAPR	DLYGNIVLSGGSTMFPGIADR
		AVFPSIVGRPR	
S6	Q9M4Y1	DAYVGDEAQSK	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
		AGFAGDDAPR	SYELPDGQVITIGSER
		AVFPSIIGRPR	DLYGNIVLSGGSTMFPGIADR
		VAPEEHPVLLTEAPLNPK	
S7	O98997	GLAYDISDDQQDITR	VPIIVTGNDFSTLYAPLIR
		IGVCTGIFR	LVDTFPGQSIDFFGALR
		M*CALFINDLDAGAGR	
S8	O81278	R.ANTEVAQR.K	K.GVEAFIPTDLQGLSEYEQK.A
		K.ALEALKPELK.A	R.IQNAGTEVVEAK.A
		K.VADFTGAAELANCLK.G	K.GVDVVVIPAGVPR.K
		K.LFGVSTLDVVR.A	
S9	P14226	GASTGYDNAVALPAGGR	LCLEPTSFTVK
		KLCLEPTSFTVK	DGIDYAAVTVQLPGGER
S10	Q38IW8	LLYGGSVNNNSK	INFINEMDGDK
010	Quanto	KETTI DVVSEQTK	
S11	065XW4		
011	QUUMA		
		VITVGAGGR	LOADD WIN ODER
S12			PSI DGVDI RGR
012	SCH111-4		
		DPSGPPPPPR	
Q10	D/0/02		
313	F40493	GTILDVVJEQIK	

		VLACLGETLEQR	
S14	Q8H0G1	K.VSENCVAIWK.H	K.FMQVTMILPLTGQQYSEK.V
		K.LLSEAVLESMIGAHGVSPAAK.Q	
S15	Q9M5A8	PQGGEVVAVGEGK	
		YTAIKPLGDR	
		HLIVKDDDIVGILETDDIK	
S16	P16059	R.TADGDEGGKHQLITATVK.D	K.QYYNISVLTR.T
		R.EFPGQVLR.Y	R.YEDNFDATSNVSVLVQTTDKK.S
		R KEVEDTASSESVA	K SITDYGSPEEEI SK V
		K.TNTDYI PYNGDGEK I	
S17	Q41651		GYOGSYEHR
017	QTIOOT		
C10	D16048		
310	F 10048		
<u>610</u>	006021		
519	Q06931		
			K.VAFETILAGSDGGSIVK.I
		K.EAQGVEIIEGNGGPGTIK.K	
S20	P00288	K.FYCSPHQGAGMVGQVTVN	K.ISMPEEDLLNAPGETYSVK.L
		K.ISM*PEEDLLNAPGETYSVK.L	
Sf1	Q8RU73	SLGIPLSVLDDNPR	
		FVVVVDDTK	
R1	Q6RIB7	YGQDAINVGDEGGFAPNIQENK	
		VNQIGSVTESIEAVR	
R2	QORIBO	- ALGQISER	
		- VI VVANPANTNALII K -	- FLIADDAWI NGEFITTVOOR -
		M*ELVDAAFPLLK	
R3	O48904	R.TQDGGTEVVTAK.A	
		K.ALEGADVVIIPAGVPR.K	
R4	Q9SDZ7	LLMLGGTGYLGK	WMNQEDDLGTFTLR
		AGHPTFALLR	EPYLQPPK
		MMPSEMGNDVDR	SYLPEDK
		DRLVLYGDGNPK	FGVEAMELYPDVK
R5	Q9M4S8	IIYGGSVNGGNSAELAK	GGAFTGEISVEQLK
		QEDIDGFLVGGASLK	R.IDISGQNSWVGK.G
		TFDVCFQQLK	
R6	O23708	NIEIGIIGADKK	LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK
		EPIPVTQLVR	YTDDM*ELDDAVHTAILTLK
R7	Q9M4T8	GVNTFSPEGR	FSYGEPM*TVESTTQALCDLALR
		AIGSGSEGADSSLQEQYNK	FSYGEPMIVESTIQALCDLALR
		IISPLLEPSSVEK	IMEIDDHIGCAMSGLIADAR
P8	023708		
NO	023700	- KLPSII VDFASVQK -	- IQLI TPNIGVVYSGMGPDFR -
		LVQIEHALTAVGSGQTSLGIK	EPIPVTQLVR
		YTDDM*ELDDAVHTAILTLK	-
R9	Q41015	LVFVDNVLQK	LCLTCPVTVLQDR
		PTCLDVGR	
R10	Q6UEJ1	VLAGRLLTELGLK	PYASELHEVQNPNLER
		EVDGHLLK	
R11	Q5EFL2	LFGDTLDPMNMLVR	LLTELGLK
		TVRDVDTPGNWMDYLSK	MESAELHEVQNYCER
	0.000	MPDGHLLK	
R12	Q9SWS4	LEAVDDENK	EVDAHLVK

		VESETDLEATAAK	TmEYEK
R13	P27047	K.LTFVEDGETK.H	K.ALEGYCVANPDYN
		K.SIEIVEGNGGPGTIK.K	K.ALVTDADNLTPK.V
R14	P13239	K.KLTFVEDGETK.H	K.GDAAPTEEQLK.N
		K.SIEIVEGNGGAGTIK.K	K.ALEGYCLAHPDYN
		K.ALVTDADTLTPK.V	K.ITFVEDGETK.Y
R15	Q06931	K.YHTKGDAALSDAVR.D	K.VIKEAQGVEIIEGNGGPGTIK.K
		K.DADEIVPK.V	K.AIEGYVLANPGY
		K.GDAALSDAVR.D	K.LDAVDEANFGYNYSLVGGPGLHESLEK.V
		K.KLSILEDGK.T	K.AKGTGLIKAIEGYVLANPGY
		K.EAQGVEIIEGNGGPGTIKK.L	K.GTGLIKAIEGYVLANPGY
		K.LSILEDGK.T	
Rf1	Q05046	VLEQSYGAPK	NGLVPGGGVALLAAETGLPPR
		TNDVAGDGTTCATLNQK	LGVQLLQNALK
		VDLNELEVVEGMK	TLASNAGVEQVVVGK
		LSPYFLTNQK	LLEQDNPDLGYDAAK
		LEDPLLLLHEK	WYVDMLK
		LGGASEAEVGEK	AGLLDPLK
Rf2	P29828	K.GDSSVSGPVVR.L	R.LFKPFDELFVDSK.D
		R.TKEDIIEFIEK.N	K.LDATANDIPTDTFDVQGYPTLYFR.S
Rf3	P14710	K.GDAAPSEEQLK.T	K.ALEGYCLAHPDYN
		K.LTFVEDGETK.H	K.ALVTDADILTPK.V
		K SIEIVEGNGGAGTIK K	

Appendix S8: Supplementary data on identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R)

during cold acclimation. Chl: chloroplast, Mito: mitochondrion, Cyto: cytoplasm, PM: plasma membrane and ER: endoplasmic reticulum. Possible function according to the FunCat classification. Reference: protein already identified in previous studies on stress.

Smot	Peptide	MW (k	Da) / pI	Logation	Possible function	Deferences
Spot	number	Exp	Theo	Location	Possible function	References
L1	13	69.7/4.9	61.9/5.1	Chl	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)	Goulas et al. 2006. Hashimoto et al. 2007
L2	6	52.0/5.4	52.1/6.3	Chl	Photosynthesis (02.30)	Goulas et al. 2006. Bokhari et al. 2007
13	ž	47 6/5 4	37 1/5 2	Cyto	Cytoskeleton (42.04)	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
14	6	47 2/5 0	45 8/5 5	Chl	Chlorophylle metabolism (01 07)	
1.5	11	46 9/5 3	47 9/7 5	Chl	Photosynthesis (02 30)	Goulas et al. 2006. Bokhari et al. 2007
16	6	46 7/5 1	45 8/5 5	Chl	Chlorophylle metabolism (01 07)	Sound et al. 2000, Domain et al. 2007
17	5	40.7/5.1	40.0/8.4	Chl	Unclassified (00)	Goulas et al. 2006
18	5 7	37 7/5 1	37 2/5 4	Chl	Thiamine biosynthesis (01.07)	Cui at al. 2005. Coules at al. 2006
	2	24 5/6 4	20 0/5 0	Cuto	Carotonoïd biosynthesis (01.20)	Cur et al. 2005, Goulas et al. 2000
L9 L 10	2	24.2/5.9	26.6/5.6	Cylo	Deterification (22.07)	Beneut et al. 2004, Balthari et al. 2007
L10	10	24.3/3.8	21 9/6 2	Chl	Detoxification (32.07) Destocumption (32.07)	Reliant et al. 2004, Bokhari et al. 2007
	10	34.2/5.2	34.8/0.3	Chi	Photosynthesis (02.30)	Boknari et al. 2007
LIZ	0	33.2/4.7	25.2/4.4	Chi	IL 1 (00)	
LI3	2	32.9/4.7	31.2/4.9	Chi	Unclassified (99)	
L14	6	31.1/5.5	31.2/9.1	Chi	Steroid synthesis (01.08)	
LI5	/	30.5/4.9	30.8/6.5	Chi	Pentose phosphate pathway (02.07)	Bokhari et al. 2007
L16	2	30.3/5.2	28.5/8.2	Cyto	Detoxification (32.07)	
L17	2	30.0/5.6	20.5/5.2	Cyto	Glycolysis (02.01)	
L18	3	29.8/4.8	28.7/5.7	Chl	Iron storage (04.01)	Cui et al. 2005
L19	4	29.3/5.6	25.2/5.9	Cyto	Detoxification (32.07)	Cui et al. 2005, Goulas et al. 2006
L20	6	25.1/5.8	28.0/8.4	Chl	Photosynthesis (02.30)	Cui et al. 2005, Bokhari et al. 2007, Hashimoto et al.
1.21	3	19 5/5 3	17 4/5 1	Cyto	Defense (32.05)	2007
122	3	19.6/4.5	17.4/5.1	Mito	Glycine degradation (01.01)	Taylor et al. 2005
122	6	163/66	20 2/9 3	Chl	Photosynthesis (02.30)	Taylor et al. 2005. Goulas et al. 2006
L23 L24	2	16.2/6.2	20.2/9.5	Chl	Photosynthesis (02.30)	Taylor et al. 2005, Goulas et al. 2006,
L24 L25	2	10.2/0.2	20.2/9.5	Chl	Photosynthesis (02.30)	Taylor et al. 2005, Goulas et al. 2000
L23	5	16.0/4.4	1/.1/4.9	CIII	Filotosynthesis (02.50)	Report et al. 2004. Cui et al. 2005. Taylor et al.
S1	4	66.1/4.9	75.7/5.1	Chl	Chaperone (14.01)	2005, Bokhari et al. 2007
S2	3	58.3/5.0	57.0/4.8	ER	Folding (14.01)	Hashimoto et al. 2007
S 3	17	56.7/5.0	61.9/5.0	Chl	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)	Goulas et al. 2006
\$4	7	52 1/5 /	75 5/5 2	Chl	Chaperone (1/101)	Renaut et al. 2004, Cui et al. 2005, Taylor et al.
05	, -	32.1/5.4	11.0/5.2	C í	$C \neq 1, 1, 2, \dots, (12, 0.4)$	2005, Bokhari et al. 2007
55	2	44.1/5.5	41.6/5.3	Cyto	Cytoskeleton (42.04)	
56	6	43.7/5.4	41.6/5.3	Cyto	Cytoskeleton (42.04)	
S/	5	42.5/5.5	47.9/7.5	Chi	Photosynthesis (02.30)	Goulas et al. 2006, Bokhari et al. 2007
58	8	37.3/6.2	43.6/6.9	Mito	Krebs cycle (02.10)	
S9	3	33.5/5.4	34.8/6.3	Chi	Photosynthesis (02.30)	Bokhari et al. 2007
S10	5	29.5/5.8	27.2/5.8	Cyto	Glycolysis (02.01)	
SII	4	29.5/5.7	31.2/9.1	Chl	Steroid synthesis (01.08)	
S12	5	29.4/5.0	30.3/4.9	Chl	Unclassified (99)	
S13	2	29.2/5.7	20.5/5.2	Cyto	Glycolysis (02.01)	
S14	3	27.6/5.0	23.9/5.7		Flavonoid biosynthesis (01.20)	
S15	3	27.4/5.4	26.5/6.8	Chl	Chaperone (14.01)	
S16	7	21.7/5.9	28.0/8.4	Chl	Photosynthesis (02.30)	Cui et al. 2005, Bokhari et al. 2007, Hashimoto et al.
\$17	Δ	19 5/5 0	26 5/8 6	Chl	Folding (14.01)	2007
S18	+ 2	160/16	17 6/5 1	Mito	Glycine degradation (01.01)	Taylor et al. 2005
S10 S10	∠ 5	16 7/5 2	16.6/4.0	Cyto	Defense (32.05)	1 ayioi 61 al. 2003
\$20	2	15.0/4.3	10.0/4.9	Chl	Photosynthesis (02.30)	
D1	2	56 8/5 5	10.3/4.1	Cuto	Chaolucia (02.01)	
	10	30.0/3.3	41.1/3.3	Cyto	Malata Asp shuttle Upalassified (00)	Taylor et al. 2005
K2 D2	10	41.0/0.3	25 0/0.5	Cyto	Vraha avala (02.10)	Taylor et al. 2005
K3 D4	12	39.9/0.3	22.0/0.0	Casta	Linelassified (00)	Taylor et al. 2005
R4 D5	15	38.1/6.0	33.9/0.4	Cyto	$Cl_{1} = \frac{1}{2} (02.01)$	
K5 DC	5	28.6/5.7	21.3/5.4	Cyto	Giycolysis (02.01)	
K0 D7	4	28.1/3./	25.1/5.5	Cyto	Protein degradation (14.13)	
K/	0	21.1/4.1	25.9/4.7	Cyto	Protein degradation (14.13)	
K8	6	21.1/5.6	25.1/5.5	Cyto	Protein degradation (14.13)	
K9	3	20.8/5.8	23.7/5.2	PM	Defense (32.05)	
R10	3	19.3/5.6	18.2/5.1	Cyto	Defense (32.05)	
R11	5	19.1/5.5	-	Cyto	Detense (32.05)	
R12	4	17.5/4.9	17.6/5.3	Cyto	Detense (32.05)	
R13	3	17.4/4.7	16.7/4.6	Cyto	Defense (32.05)	
R14	6	17.0/4.9	16.9/4.9	Cyto	Defense (32.05)	
R15	15	16.5/5.2	16.6/4.9	Cyto	Defense (32.05)	

Appendix S9: Supplementary data on identified spots in leaves (L), stems (S) and roots (R)

after three days of frost. Lf, Sf and Rf: proteins which varied only in frost. Chl: chloroplast, Mito: mitochondrion, Cyto: cytoplasm, PM: plasma membrane and ER: endoplasmic reticulum. Possible function according to the FunCat classification.

Spot	Peptide	MW (kDa) / pI		Location	Possible function
Spor	number	Exp	Theo	Location	
L4	6	47.2/5.0	45.8/5.5	Chl	Chlorophylle metabolism (01.07)
L6	6	46.7/5.1	45.8/5.5	Chl	Chlorophylle metabolism (01.07)
L8	7	37.7/5.1	37.2/5.4	Chl	Thiamine biosynthesis (01.07)
L21	3	19.5/5.3	17.4/5.1	Cyto	Defense (32.05)
L22	3	19.6/4.5	17.6/5.1	Mito	Glycine degradation (01.01)
Lf1	22	67.3/4.9	61.9/5	Chl	Chaperone (14.01) / Photosynthesis (02.30)
Lf2	3	49.2/5.5	41.6/5.3	Cyto	Cytoskeleton (42.04)
Lf3	3	46.8/4.5	38.4/4.4	Chl	
Lf4	3	43.4/6.5	35.8/8.8	Mito	Krebs cycle (02.10)
Lf5	10	39.7/6.3	37.8/5.4	Chl	Glycolysis (02.01)
Lf6	2	30.5/5.9	20.2/8.8	Mito	Energy conversion (02.45)
Lf7	4	19.3/4.6	17.7/5.1	Mito	Glycine degradation (01.01)
Lf8	4	19.2/5.7	20.6/5.9	Chl	Detoxification (32.07)
S5	5	44.1/5.5	41.6/5.3	Cyto	Cytoskeleton (42.04)
S7	5	42.5/5.5	47.9/7.5	Chl	Photosynthesis (02.30)
S10	5	29.5/5.8	27.2/5.8	Cyto	Glycolysis (02.01)
S14	3	27.6/5.0	23.9/5.7		Flavonoid biosynthesis (01.20)
S15	3	27.4/5.4	26.5/6.8	Chl	Chaperone (14.01)
S16	7	21.7/5.9	28.0/8.4	Chl	Photosynthesis (02.30)
S19	5	16.7/5.2	16.6/4.9	Cyto	Defense (32.05)
S20	2	15.0/4.3	10.3/4.1	Chl	Photosynthesis (02.30)
Sf1	4	29.3/5.0	30.9/6.5	Chl	Pentose-phosphate pathway (02.07)
R1	2	56.8/5.5	47.7/5.3	Cyto	Glycolysis (02.01)
R3	2	39.9/6.5	35.8/8.8	Mito	Krebs cycle (02.10)
R6	4	28.1/5.7	25.7/5.5	Cyto	Protein degradation (14.13)
R10	3	19.3/5.6	18.2/5.1	Cyto	Defense (32.05)
R12	4	17.5/4.9	17.6/5.3	Cyto	Defense (32.05)
R13	3	17.4/4.7	16.7/4.6	Cyto	Defense (32.05)
Rf1	17	75.2/5.6	61.1/6.2	Mito	Chaperone (14.01)
Rf2	4	64.5/4.9	57.0/4.8	ER	Chaperone (14.01)
Rf3	5	17.0/4.8	16.7/4.9	Cyto	Defense (32.05)

Nous venons d'aborder l'étude protéomique au cours de la phase d'acclimatation au froid et de la phase de gel. Parmi les protéines identifiées, aucune n'est impliquée dans la voie de biosynthèse des sucres. Nous avons donc décidé de ne pas inclure nos données sur les sucres pour les lignées Champagne et Térèse lors de l'acclimatation au froid dans l'article précédent. Nous pourrons valoriser ces données quand nous aurons plus de métabolites dosés grâce à une collaboration avec l'institut Gabriel Lippman de Luxembourg qui devrait débuter en septembre 2008.

2- Dosages du raffinose, du saccharose, du glucose et du citrate

En parallèle à notre étude du protéome des lignées Champagne et Térèse, le dosage du raffinose, saccharose, glucose et citrate qui ont été corrélés à l'acclimatation au froid par Sophie Alvarez (2004) dans les parties aériennes et racinaires a été réalisé. Les feuilles ont été séparées des tiges dans notre étude. Des corrélations entre ces teneurs en métabolites et les quantités de protéines détectées ont été calculées pour chaque partie de la plante. Ceci afin de déterminer si des protéines impliquées dans le métabolisme de ces composés sont retrouvées et également si des protéines intervenant dans d'autres voies métaboliques impliquées dans l'acclimatation au froid leur seraient liées.

a. Résultats

* Evolution des teneurs en métabolites

Dans les feuilles de Champagne acclimaté, le raffinose, le saccharose le glucose et le citrate sont plus abondants à T2 (respectivement 10, 4, 3 et 3 fois plus) que dans Champagne non acclimaté (Figure 16). Ils atteignent respectivement 0.5, 8, 3 et 2.5mg.g⁻¹ de matière sèche (MS). La quantité de ces métabolites diminue à T3 pour revenir au même niveau que celle de Champagne non acclimaté. Chez Térèse, la différence entre les plantes qui ont subi la phase d'acclimatation et celles ne l'ayant pas subie est très faible (Figure 16). Une corrélation positive de 0,94 est obtenue entre l'évolution des teneurs en saccharose et en citrate ($\alpha < 0,0001$) et une autre de 0,69 entre celle du saccharose et du glucose ($\alpha = 0,0065$) (Tableau 3a).



Figure 16 : Evolution des concentrations en raffinose (A), saccharose (B), glucose (C) et citrate (D) dans les feuilles, les tiges et les racines des plantes ayant subi la phase d'acclimatation au froid et des plantes contrôles.

Champagne : phase d'acclimatation (■) ou contrôle (□), Térèse : phase d'acclimatation (●) ou contrôle (○),
T1 : 10 jours de nurserie, T2 : 5 jours d'endurcissement ou 12 jours de nurserie (contrôle), T3 : 10 jours d'endurcissement ou 14 jours de nurserie (contrôle), les écart-types sont représentés par les barres verticales.

Dans les tiges, le contenu en raffinose est faible (0,03mg.g⁻¹ de MS). Le saccharose augmente d'un facteur 2,5 et le citrate d'un facteur 3 à T2 chez Champagne acclimaté. Pour le glucose, les 2 lignées ont à peu près le même profil d'évolution avec une augmentation de 2 fois à T2 (Figure 16). A T3, les teneurs en métabolites sont, comme pour les feuilles,

similaires à celles des plantes contrôles. Les teneurs maximales à T2 sont proches de celles observées dans les feuilles avec $8mg.g^{-1}$ de MS pour le saccharose, 2,5 pour le glucose et 1,75 pour le citrate. Des corrélations positives sont obtenues entre saccharose et citrate (0,92), saccharose et glucose (0,83) comme dans les feuilles mais aussi entre glucose et citrate (0,83) et raffinose et citrate (0,68) (Tableau 3b).

a. Feuilles	Saccharose	Citrate	Glucose	Raffinose
Glucose	0,69 *	n.s.	1	n.s.
Citrate	0,94 **	1	n.s.	n.s.
L5 RuBisCO activase	0,81 **	0,73 **	n.s.	n.s.
L10 Alcohol dehydrogenase	-0,85 **	-0,82 **	n.s.	n.s.
L17 Triose phosphate isomerase	n.s.	n.s.	n.s.	0,84 *
L19 Glutathione S-transferase	-0,87 **	-0,87 **	-0,76 *	n.s.
L21 Bet v I allergen	-0,83 **	-0,83 **	n.s.	n.s.
L22 Glycine decarboxylase multi- enzyme complex, H subunit	0,79 **	0,85 **	n.s.	n.s.
b. Tiges	Saccharose	Citrate	Glucose	Raffinose
Glucose	0,83 **	0,83 *	1	n.s.
Citrate	0,92 **	1	0,83 *	0,68 *
S9 OEE1	n.s.	n.s.	0,67 *	n.s.
c. Racines	Saccharose	Citrate	Glucose	Raffinose
Glucose	0,87 **	0,76 **	1	0,84 **
Citrate	0,96 **	1	0,76 **	0,86 **
Sucrose	1	0,96 **	0,87 **	0,93 **
R2 Malate dehydrogenase	-0,66 *	-0,65 *	n.s.	-0,65 *
R14 Ripening related protein	0,64 *	0,69 *	n.s.	n.s.

Tableau 2 : Corrélations détectées dans les feuilles (a), les tiges (b) et les racines (c) entre les métabolites dosés et les protéines impliquées dans l'acclimatation au froid pour les lignées Champagne et Térèse.

* ou ** : statistiquement significatif pour p<1% ou 1‰, respectivement.

n.s. : non significatif

La numérotation des protéines correspond à celle de l'article 1.

(Seules les protéines corrélées à l'un des métabolites sont indiquées dans le tableau)

Dans les racines, une augmentation progressive jusqu'à T3 des teneurs en raffinose, saccharose, glucose et citrate (respectivement 5, 3, 1,5 et 3 fois) est observée pour Champagne acclimaté (Figure 16). Nous notons que, pour Térèse non soumis à la phase d'acclimatation (contrôle), les concentrations de ces métabolites sont plus élevées que celles

de Térèse soumis à l'acclimatation, avec une concentration en glucose très élevée à T2 par rapport à toutes les autres plantes (Figure 16). Chez Champagne, la quantité de raffinose est de $0,25 \text{mg.g}^{-1}$ de MS. Le saccharose, le glucose et le citrate sont respectivement 3.75, 2 et 2.5 à 3.5 fois plus importants dans les racines que dans les feuilles et les tiges. Nous trouvons des corrélations entre les métabolites similaires à celles obtenues dans les tiges, s'y ajoute une corrélation entre le raffinose et le glucose (0,84) (Tableau 3c).

***** Relation entre les évolutions des teneurs en métabolites et en protéines

Comme les études du protéome et des métabolites sont réalisées sur le même échantillon, nous avons recherché des corrélations entre les protéines identifiées intervenant dans l'acclimatation au froid chez nos lignées (article 1 et annexe 15) et ces métabolites. Pour les feuilles, 6 protéines sur les 25 identifiées montrent des corrélations positives (L5 : RuBisCO activase et L22 : glycine decarboxylase H subunit) ou négatives (L10 : alcohol dehydrogenase, L19 : glutathione S-transferase et L21 : Bet v1 allergen) avec principalement le saccharose et le citrate (le glucose en plus pour la L19) et seule la L17 (triose phosphate isomerase) est corrélée au raffinose (Tableau 3a). Dans les tiges, seule la S9 (OEE1) est corrélée positivement au glucose (Tableau 3b). Enfin dans les racines, une protéine (R2 : MDH) est corrélée négativement au saccharose, raffinose et citrate tandis qu'une autre (R14 : ripening related protein) est corrélée positivement au saccharose et au citrate (Tableau 3c).

Une ACP (Analyse en Composantes Principales) a été réalisée avec les spots répondant à l'acclimatation au froid identifiés dans chaque organe ainsi que les métabolites dosés (raffinose, saccharose, glucose et citrate). Pour les feuilles, les tiges et les racines, les axes 1 et 2 permettent d'expliquer environ 60% de la répartition des lignées. Pour les feuilles et les racines, les lignées sont séparées selon l'axe 1 et pour les tiges selon l'axe 2.

Pour les feuilles (Figure 17-1), Champagne et Térèse sont séparés suivant l'axe 1 qui peut être relié aux teneurs en saccharose et citrate, mais aussi en partie aux protéines intervenant dans la photosynthèse (L5, L25, L23, L20, L2 et L9). Pour les tiges (Figure 17-2), l'axe 1 peut être relié aux protéines participant au folding et les lignées Champagne et Térèse au cours de l'acclimatation au froid (TA2 et TA3) sont regroupées sur la droite du graphique. Elles contiennent plus de protéines de folding que les plantes contrôles. Champagne et Térèse

sont séparées suivant l'axe 2 qui peut être relié à la photosynthèse. Pour les racines (Figure 17-3), les lignées sont séparées le long de l'axe 1 qui est majoritairement relié aux protéines impliquées dans les mécanismes de défense de la plante (R13, R14, R10 et R15). Ces données concordent avec les analyses réalisées dans l'article sur l'étude du protéome (article 1).

b. Discussion

Dans notre étude, chez Champagne acclimaté, l'augmentation des teneurs en sucres dans les feuilles et les tiges (sauf pour le raffinose) à T2 (5 jours d'acclimatation au froid) est suivie par une diminution. Chez le pois, en conditions contrôlées, Bourion et collaborateurs (2003) observaient aussi une augmentation des teneurs en sucres solubles dans les feuilles, cela pendant les 7 premiers jours de la période de froid (3,5 fois plus soit jusqu'à 65mg.g⁻¹ de MS pour Champagne et 1,5 fois plus soit 22mg.g⁻¹ de MS pour Térèse) et ensuite une diminution. Les plantes de l'étude de Bourion et collaborateurs (2003) contiennent plus de sucres solubles que les nôtres mais elles sont aussi plus âgées (21 jours au lieu de 15 avec 14 jours de nurserie et 7 jours d'endurcissement) et leur dosage prend en compte l'ensemble de sucres solubles.

Pour nos 2 lignées, dans l'expérimentation contrôle, les contenus en métabolites mesurés restent à peu près constants. L'augmentation des teneurs en métabolites est donc due à l'acclimatation au froid et non à une différence de croissance des plantes. Ceci est confirmé par les corrélations entre la note de gel et la teneur en saccharose (0,79 et α =0,0008), en glucose (0,74 et α =0,0022) et en citrate (0,71 et α =0,0041) dans les feuilles, et en saccharose dans les tiges avec α <5% (0,57 et α =0,032).

Chez Champagne acclimaté, l'accumulation de sucres pourrait s'expliquer par différentes hypothèses : i) la photosynthèse est plus active ou plus efficace donc les sucres s'accumulent, ii) la photosynthèse reste stable mais les sucres ne sont pas utilisés par la plante ce qui provoque leur accumulation, mais un dosage de l'amidon réalisé dans une précédente étude (Alvarez, 2004) a montré que, pendant l'acclimatation au froid, il y a bien accumulation d'amidon, iii) la respiration diminue puisqu'il y a baisse de la température ce qui ralentit les métabolismes et provoque l'accumulation de sucres. Nos résultats ne nous permettent pas de privilégier la première ou la troisième hypothèse.



Figure 17 : Cercle des corrélations (A) et diagramme de dispersion des lignées (B) selon les axes 1 et 2 de l'ACP pour les spots répondant à l'acclimatation au froid dans les feuilles (1), les tiges (2) et les racines (3).

Les protéines surlignées en vert correspondent aux protéines impliquées dans la photosynthèse, en bleu aux protéines impliquées dans les mécanismes de folding, et en orange aux protéines impliquées dans les mécanismes de défense.

Cette augmentation des teneurs en sucres lors de la phase d'acclimatation permettrait aux sucres de remplir 2 rôles : être une source de carbone disponible et être des osmo et cryoprotecteurs (Steponkus, 1978). Guy et collaborateurs (1992) proposent que le saccharose soit un sucre de stockage qui pourrait être rapidement mobilisé par la plante en cas de besoin. Le saccharose est le sucre dosé le plus abondant chez Champagne acclimaté, que ce soit dans les feuilles, les tiges ou les racines. Les teneurs en saccharose, glucose et citrate sont supérieures dans les racines par comparaison aux parties aériennes même dans les plantes témoin. De plus, dans les racines, pour Champagne acclimaté, l'augmentation des teneurs en métabolites est progressive jusque T3 (10 jours d'acclimatation au froid) et la note de tolérance au gel est corrélée au saccharose (0,69 et α =0,0031), au glucose (0,75 et α =0,0007) et aussi au raffinose (0,60 et α =0,01) présents dans les racines. Ces racines pourraient donc être considérées comme un lieu de stockage des réserves comme les sucres (saccharose et glucose) remobilisables lors de la reprise du développement de la plante après la phase de gel.

Le raffinose est corrélé positivement à la triose phosphate isomérase dans les feuilles, et négativement à la malate déhydrogénase dans les racines. La corrélation positive entre le saccharose et le citrate est élevée et retrouvée dans les 3 parties de la plante. Plaxton (1996) proposent que les intermédiaires du cycle de Krebs (dont le citrate) auraient un effet feedback inhibiteur sur la pyruvate kinase et la phosphoénolpyruvate carboxylase de la voie de la glycolyse-néoglucogenèse. Pendant l'acclimatation au froid, les métabolismes sont ralentis par les basses températures et le citrate s'accumule chez Champagne. Il inhiberait la glycogenèse et activerait donc la néoglucogenèse qui aboutirait à l'accumulation de saccharose observée chez Champagne. Ceci permettrait la mise en réserve d'une source de carbone rapidement mobilisable.

Plus le saccharose est présent dans les feuilles, moins la Bet v1 allergen (L21) est détectée. Cette protéine joue un rôle dans le mécanisme de défense de la plante et le saccharose protège la plante (osmo et cryoprotecteur) contre la conséquence majeure du gel qu'est la formation de glace (Sharma *et al.*, 2005). En effet, les cristaux provoquent des lésions des membranes plasmiques, une opportunité pour le développement des pathogènes. Si ceci est limité par la présence du saccharose, certaines des protéines de défense ne seraient plus nécessaires. Par contre, dans les racines, le saccharose et le citrate sont corrélés positivement à la ripening related protein (R14). L21 et R14 appartiennent à la même famille des Bet v1 allergen mais elles sont, ici, dans 2 compartiments distincts de la plante (feuilles et racines). De plus, L21 est moins abondante chez Champagne que chez Térèse et R14 plus

abondante chez Champagne. Przymusinski et collaborateurs (2004) ont montré que des protéines PR (Pathogen-Related), de la famille des Bet v1, peuvent être synthétisées en réponse à des stress autres que biotiques, dont le stress froid, dans les racines de lupin. De plus, des protéines PR ont certaines homologies de séquences avec des AFP connues chez certaines Poacées pour leur activité antigel (Hon *et al.*, 1995). La capacité de Champagne à tolérer le gel après l'acclimatation au froid est peut-être possible car, en plus de la protection des cellules grâce à leur contenu en métabolites, des protéines de défense induites par le froid sont synthétisées dans la racine.

L'ensemble de ces mécanismes physiologiques, accumulation de sucres et de protéines de défense, permettraient de protéger la racine lors du gel et ainsi de préserver son potentiel pour la reprise de croissance de la plante lors de la phase de réchauffement.

II- Etude des lignées recombinantes

1- Détection de QTL et PQL après 10 jours d'acclimatation au froid

Grâce aux lignées recombinantes, nous pouvons rechercher des QTL liés à la tolérance au gel par l'intermédiaire des notes attribuées à chaque lignée au champ mais aussi en conditions contrôlées. Nous avons comparé la localisation (zones chromosomiques) de ces QTL sur la population complète mais aussi sur la sous-population composée des lignées *Hr*. Deux régions chromosomiques ont été retenues sur les groupes de liaison 5 et 6. Avec la souspopulation *Hr*, nous avons réalisé différentes mesures : concentration en raffinose, saccharose, glucose et citrate sur les plantes cultivées en chambre et au champ, activité de la RuBisCO et pression osmotique en champ et aussi quantité de protéines en chambre contrôlée. Les LSmeans (moyennes ajustées) obtenues (Annexes 16 et 17) avec toutes les données récoltées ont été utilisées pour la détection de QTL physiologiques ou morphologiques et de PQL et leurs corrélations avec les QTL de tolérance au gel chez le pois.

Résultats et discussion

Article 2

Title:

Comparative studies of frost tolerance QTL in *Pisum sativum* L. under field and controlled conditions using physiological and phenotypical traits

Authors:

Estelle Dumont^a, Véronique Fontaine^b, Christophe Vuylsteker^a, Hélène Sellier^b, Sylvie Bodèle^b, Najia Voedts^a, Rosemonde Devaux^b, Marlène Frise^b, Komlan Avia^b, Jean-Louis Hilbert^a, Nasser Bahrman^{a,b}, Eric Hanocq^b, Isabelle Lejeune-Hénaut^b, Bruno Delbreil^a.

Addresses:

^a UMR USTL-INRA 1281 Laboratoire des Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés bât SN2, 3^{ème} étage, Université des Sciences et Technologies de Lille1 F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

^b UMR USTL-INRA 1281 SADV Laboratoire des Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux cultivés, Estrées-Mons BP 50136, F-80203 Péronne cedex, France.

Abstract

To increase yield in pea (*Pisum sativum* L.), autumn sowing would be preferable. Hence, frost tolerance of pea became a major trait of interest for breeders. In order to better understand cold acclimation in pea, Champagne a frost tolerant line and Terese, a frost sensitive line, and their recombinant inbred lines (RIL) were studied. RIL frost tolerance was evaluated by a frost damage scale under field as well as controlled conditions. A quantitative trait loci (QTL) approach was used to identify chromosomal regions linked to frost damage. The detected QTL explained from 6.5 to 46.5% of the phenotypic variance. Among them, those located on linkage groups 5 and 6 were consistent over all experiments, in field as well as in controlled environments. In order to improve the understanding of the frost tolerance mechanisms, several cold acclimation key characters like concentration of sugars, electrolyte leakage, osmotic pressure, and activity of RuBisCO were assessed. Some of these physiological QTL colocalized with QTL for frost damage, in particular two raffinose QTL on LG5 and LG6 and one RuBisCO activity QTL on LG6, explaining 8.8 to 27.0% of the phenotypic variance. In

addition, protein quantitative loci (PQL) were mapped; some of them colocalized with frost damage and physiological QTL on LG5 and LG6, explaining 16.0 to 43.6% of the phenotypic variance. Raffinose metabolism and RuBisCO activity and its effect on photosynthesis might play a major role in cold acclimation of pea.

Key words: Cold acclimation, Pisum sativum, QTL, PQL, Recombinant inbred lines

INTRODUCTION

A stress is a condition which inhibits the normal functioning of living beings (Mahajan and Tuteja, 2005). Higher plants, representing about 99% of the eukaryotic biomass of the planet (Trewavas, 2003), might be better adapted to changes than animals, because their immobility resulted in a stronger selection for a greater phenotypic plasticity (Bradshaw, 1972). Cold stress is an important factor in agriculture since yield and biomass often largely vary with temperature conditions. Facing frost stress, plants may develop two strategies: frost escape and/or frost tolerance achieved by a preceding cold acclimation. In some plants like cereals, vernalization corresponds to a frost escape strategy, since it delays the transition from the vegetative to the reproductive phase, the latter being the most sensitive to frost (Fowler et al., 2001). Some species can tolerate negative temperatures, if they were previously exposed to a few days of low, but still positive temperatures. This ability is known as cold acclimation (Levitt, 1980). It depends on metabolic changes that lead to plant adaptation. For winter wheat, Baga et al. (2007) have described a QTL for low-temperature tolerance, located close to the vrn-A1 locus (vernalization) and to two CBF (C-repeat Binding Factor) genes within the confidence intervals. These genes are expressed during cold acclimation (Thomashow, 1999). Some of the characters often cited for a relationship with the process of cold acclimation, are the accumulation of sugars (Castonguay et al., 1995), the modification of the plasma membrane composition (Uemura et al., 1995) preventing electrolyte leakage (Dexter et al., 1932), and an increase of the RuBisCO activity (Holaday et al., 1992).

Pea (*Pisum sativum* L.), a crop used as protein source in animal feeding due to its relatively high protein seed content (21 to 26%) is distinguished from cereals by a high concentration of the essential amino acid lysine. Thus, breeders are interested in an increase of yield via an increase of the production of biomass and/or an extension of the production

area. Both of these goals could be realized by the availability of frost resistant peas. Higher biomasses, as well as increased seed numbers, can be naturally achieved by autumn sowing (peas are normally sown in spring) and the resulting longer growth period until the flowering state. But to achieve this goal, they have to resist different winter stresses among which frost is particularly important.

The pea forage line Champagne possesses the Hr allele (high response to the photoperiod on linkage group 3) which delays flowering initiation (Murfet, 1973) under short days. Plants remain in a vegetative stage until a minimum threshold daylength of 13.5h is reached, normally corresponding to the beginning of April. In this way plants escape frost because the vegetative state is less sensible to frost (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). In fact, a field winter frost damage QTL previously described (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) colocalizes with the Hr locus. In addition to this escape ability, other QTL have been detected beside the Hr locus.

Among known cold acclimation characters, measurements were performed for sugar contents, RuBisCO activity, electrolyte leakage, and osmotic pressure in field and controlled environment experiments. De Vienne *et al.* (1999) have shown that proteins for which PQL (Protein Quantitative Loci, Damerval *et al.*, 1994) colocalize with QTL of interest could be candidate proteins. Our objective was to detect QTL as well as PQL for physiological and phenotypical parameters and to verify a possible linkage with frost damage QTL related to cold acclimation.

In order to eliminate the major effect of the Hr locus, a homogeneous sub-population was used for which all lines possessed the dominant Hr allele from Champagne. Two regions on the pea linkage groups 5 and 6 were correlated to the freezing tolerance QTL in the whole population or the Hr sub-population, in the field as well as under controlled conditions. Validations of the sub-population choice and the controlled environment study were established. Some PQL and physiological and morphological QTL co-localized with the freezing tolerance QTL; the involvement of these characters in cold acclimation was examined.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Two pea lines were chosen for their contrasted behaviour against frost: Champagne, a winter forage frost tolerant variety and, Terese, a spring dry frost sensitive variety. Champagne and Terese differ for leaf structure: Champagne is a wild-type pea and Terese an *afila*-type. A population of 164 recombinant inbred lines (RIL) has been derived by SSD (Single Seed Descent) from the cross between Champagne and Terese until the F8 generation. This population named Pop2 has been described by Loridon *et al.* (2005). It segregates for the *Hr* locus: 78 lines are *Hr and* 86 lines are *hr*.

By delaying the floral initiation, a critical stage, the Hr allele confers a better frost tolerance to peas. An earlier study (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) has described a major QTL of frost damage colocalizing with the Hr locus. The strong influence of this gene might limit or even prevent the detection of other QTL having lower effects. We therefore only used the sub-population carrying the Hr allele issued from the frost tolerant parent Champagne in order to eliminate its influence. In any case, a recovery of hr lines is normally excluded, as they are generally destroyed by frost.

Growth conditions and samplings

In field experiments

For the *Hr* sub-population, plants were sown in two different INRA experimental stations: Clermont-Ferrand Theix (45°70'N, 3°02'E) in the middle of France (mountainous area, 890m) and Mons (49°53, 3°00'E) in northern France. Sowing dates were 27 September 2004 in Clermont-Ferrand and 30 September 2004 in Mons. Each plot was sown in three replicates contained 12 rows of 1.5 m, 20 cm apart, with a density of 20 seeds per row in Clermont-Ferrand and 25 seeds per row in Mons. For biochemical measurements, four samplings (S1 to S4) were carried out: three of them were performed during the acclimation period (S1: 26 October 2004, S2: 16 November 2004 and S3: 07 December 2004 in Clermont-Ferrand or S1: 19 October 2004, S2: 22 November 2004 and S3: 13 December 2004 in Mons) and the fourth at the end of winter (S4: 20 March 2005 in Clermont-Ferrand or S4: 24 March 2005 in Mons) as shown on Figure 1.

In the controlled environment chamber

In the controlled environment chamber, plants were grown in 12 cm-high isolating trays, each having one hundred holes containing a Jiffy block (Ets Puteaux, France) with one seed. The chamber allows 800 plants to be grown at a time. Plants were grown according to the temperature and daylength conditions described in Table 1 with a photosynthetically active radiation varying from 250 μ mol.m⁻².s⁻¹ (for cold and freezing periods) to 300 μ mol.m⁻².s⁻¹ (for nursery and recovery).

After a 11 day-nursery period at 19°C/12°C (day/night, respectively)which allowed the seeds to emerge and to produce up to two fully expanded leaves, the plants were submitted to an 11 day-cold acclimation period at 10°C/2°C. Frost (6°C/-8°C) was then applied during four days and plants were finally allowed to recover at 16°C/5°C during eight days. A first set of experiments was carried out with the whole Pop2 population (78 Hr and 86 hr lines). Three successive repetitions were realized with four plants per line. Due to this small number only the freezing damage could be scored at the end of these experiments. A second set of experimentations was undertaken in order to evaluate the cold acclimation traits on the Hr sub-population. Four experiments were performed successively in the same chamber using the resistant parental line Champagne as a control. Each experiment followed a 3-block design in which each line was represented by 15 plants. At each sampling date, five plants were harvested for each of the three biological repetitions. Before harvesting, the developmental stage of each plant was evaluated. For the *afila* lines, the note 0.25 was attributed at the emergence of the tendrils; 0.50 to the entire spreading of the tendrils; 0.75 to the beginning of the opening of the stipules and 1 to the complete opening of both tendrils and stipules. For the other lines, leaflets were considered instead of the tendrils. Samples were furthermore separated in aerial part and roots. Three samplings (T1 to T3) were realized during each experiment: the first one after ten days of the nursery period (T1), and the second one after ten days of the cold acclimation period (T2). Five plants remained in the controlled room for an evaluation of their frost damage before being sampled for the other measurements at the end of the recovery period (T3).

Résultats et discussion

Evaluation of frost damage

In the controlled chamber, at the end of the recovery period (T3), frost damage (FD) of each seedling were evaluated through the extent of yellowing and necrotic areas on leaves. Seedlings were at the four leaf stage. The uninjured plants were scored 0, 1 for plants with their first leaf injured at the margin, 2 for their first and second leaves injured, 3 for their first, second and third leaves injured, 4 for their first, second and third leaves totally injured and 5 for the dead plants. The number of total branches (NTB) and green branches (NGB) at T3 were assessed. The number of green branches is another means to evaluate frost tolerance damage. In the field experiment, adult plants were submitted to winter frost and winter frost damage (WFD) was evaluated at S4 with scores varying from 0 to 5 (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008).

Electrolyte leakage assay

The electrolyte leakage assay was used to estimate cell damage following frost. Measurements were realized after eight days of recovery period (T3) in the controlled environment chamber. In the field, the electrolyte leakage assay was performed at S1, S2, and S3, both in Clermont-Ferrand and Mons.

Two stipules per plant were taken on five plants at each repetition. They were placed in 15 mL of deionised water for 24 h and the first measure was done (C₀) with an Ion Check 30 conductivity meter (Radiometer Analytical, France). C₀ corresponds to the quantity of ions which diffuse freely through the membranes. The samples were then placed at -80°C for 24 h in order to make the cells burst and to measure the total quantity of ions in the cells (C₁). The ratio (C₀/C₁)×100 corresponded to the percentage of electrolyte leakage (Campos *et al.*, 2003).

RuBisCO activity

In the field experiment in Clermont-Ferrand (S2), the carboxylase activity of RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase) was determined via the oxidation rate of NADH at 340 nm. Plants were ground in liquid nitrogen in a mortar to a fine powder and 500 μ L of an extraction buffer (100 mM bicine pH8.2, 1 mM EDTA, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10% (v/v) glycerol and inhibitors cocktail (Sigma)) were added to 500 mg of fresh

material to extract soluble proteins. Samples were centrifuged (21000g, 4°C, 10 min), the supernatant was transferred to a new tube and centrifuged a second time. The assay was performed in the presence of two enzymes: 3-phosphoglycerate kinase (PGK, EC2.7.2.3) and glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (Gal3PDH, EC1.2.1.12). The phosphocreatine and the creatine phosphokinase (EC2.7.3.2) were used in order to regenerate ATP during the assay. Ten microliters of the supernatant (soluble proteins) were placed in 1mL of a solution composed of 100 mM bicine KOH pH8, 25 mM NaHCO₃, 20 mM MgCl₂, 0.25mM NADH, 3.5 mM ATP, 5 U.mL⁻¹ 3PGK, 5 U.mL⁻¹ Gal3PDH, 5 U.mL⁻¹ creatine phosphokinase and 5 mM phosphocreatine. The extract was incubated 15 min at 30°C. The reaction was initiated by the addition of 0.5 mM RuBP (Ribulose-1,5-bisphosphate) (Di Marco and Tricoli, 1983; Ward and Keys, 1989). The assay was performed at 30°C and the absorbance at 340 nm was measured in a spectrophotometer (CARY50, Varian). Enzyme activities were expressed as nanomoles CO2 (RuBisCO) degraded per second (nanokatal) in relation to total protein unit. Total soluble proteins were determined by the method of Bradford (1976) with BSA (Bovine Serum Albumin) as a standard.

Osmotic pressure

For the samples from the field experiment in Clermont-Ferrand (S2), the osmotic pressure was estimated by measuring the vapour pressure deficit, which is a linear function of the osmolarity. After grinding the plants, deionised water was added to the powder in order to recover all the soluble substances (ions, soluble sugars...) of the cells. The samples were then centrifuged and 10μ L of the supernatant were put on a disc of blotting paper which was inserted in the chamber of the micro-osmometer (Vapro® 5520, Wescor, Utah, USA) (Ball and Oosterhuis, 2005).

Analysis of soluble sugars

Sample preparation

Analysis of soluble sugars was realized for the samples T1 and T2 in the controlled environment chamber (both aerial parts and roots) and for the sample S2 in Clermont-Ferrand, for the aerial parts only.

Plant material was ground in liquid nitrogen in a mortar to a fine powder. For carbohydrate extraction 200 mg of this powder were lyophilised and mixed with 1 mL 80% ethanol, vortexed and placed at 60°C for 30 min. After a 15 min centrifugation at 15000g and 4°C, the supernatant was transferred to a new tube. The pellet was re-suspended in 500 μ L 80% ethanol for 15 min at 60°C, followed by a second centrifugation under the same conditions. Supernatants were combined. The same extraction procedure was repeated with 250 μ L 80% ethanol and the supernatants were gathered and dried in a speed-vacuum. The dried residue was re-suspended in 150 μ L of distilled water for aerial parts and 100 μ L for roots, and the aerial extracts were filtered and diluted (1/3) before the HPLC assay (high performance liquid chromatography).

High Performance Liquid Chromatography

A Prominence system (Shimadzu) was used. The separation was obtained on an Alltech OA-1000 organic acids column (300 mm \times 6.5 mm) with 0.01 N H₂SO₄ mobile phase. The flow was 0.4 mL.min⁻¹ and the column was heated to 40°C. Runs lasted 20 minutes. Peaks corresponding to raffinose, glucose, and sucrose were detected with a refractive index detector (RID-10A, Shimadzu). The use of standards allowed us to determine the concentration of the different metabolites with the LCsolution software (Shimadzu). For each sample, the sugar content was expressed as mg.g⁻¹ of dry matter.

Two-dimensional electrophoresis

Protein gels were realized with leaves harvested at T2 in the controlled environment. Stipules, leaflets and tendrils were harvested for wild-type leaf pea and stipules and tendrils for *afila*-type leaf pea. Plant material was ground in liquid nitrogen in a mortar to a fine powder and the extraction protocol was performed according to Dupire *et al.* (1999). Immobilized pH gradient strips (17cm ReadyStrip IPG Strips, BioRad) with a linear pH gradient from 4 to 7 were used with 80 µg of proteins. After active rehydration at 20°C during 16 h at 50 V, the IEF was run until 35000 Vh were reached. The second dimension was realized in a 12.5% polyacrylamide gel at 350V using an Ettan DALTtwelve (GE Healthcare). Protein spots were silver-stained according to Blum *et al.* (1987). Gels were compared using ImageMaster 2D Platinium (GE Healthcare) and spots were quantified in each gel. Seventy spots were identified by nanoLC-MS/MS.

Statistical and QTL and PQL analyses

Statistical analyses were done with the SAS package version 8. (SAS Institute Inc., 1999). The glm (general linear model) procedure was used for the analysis of variance, the glm procedure with manova for the genetic correlations and the univariate procedure to test the normality and to detect abnormal residues. The data being out of the Henry's line in the normal probability plot were verified and measured once again if possible. If necessary they were eliminated from the data set. For each variable, the adjusted means were calculated and used in the QTL and PQL analyses.

The QTL and PQL analyses were performed with Windows QTL Cartographer version 2.5 (Wang *et al.*, 2007). The genetic map has already been used for QTL mapping in Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), and the genetic data are detailed in Aubert *et al.* (2006) and Loridon *et al.* (2005). The genetic map comprises 1491 cM with 258 markers on seven linkage groups (LG). QTL mapping was realized by composite interval mapping (model 6) with the forward and backward regression method for covariate selection (method 3). The LOD threshold was determined for each variable after running five times a 1000 permutation test ($\alpha = 0.05$) and calculating the mean LOD for the five repetitions. In addition, the part of the phenotypic variance (\mathbb{R}^2) explained by the QTL and the corresponding additive effect (a) were calculated for each QTL.

RESULTS

Frost damage QTL

The evaluation of the *Hr* sub-population in the field in Mons and Clermont-Ferrand resulted in the detection of six winter frost damage (WFD) QTL: on LG1 (WFDcle.a), LG4 (WFDmon.a), LG5 (WFDcle.b and WFDmon.b) and LG6 (WFDcle.c and WFDmon.c), as shown in Figure 2 and Table 2. Based on the scale 0 to 5, the WFD varied from 0.5 to 4.5 for Mons, and from 0.0 to 5.0 for Clermont-Ferrand.

The QTL mapping for freezing tolerance on the 164 RIL in a controlled coldacclimated experimentation lead to the detection of three frost damage (FD) QTL on LG3 (FD164.a), LG5 (FD164.b) and LG6 (FD164.c) (Figure 2 and Table 2). The FD values for this experimentation ranged from 0.03 to 2.39. For the *Hr* sub-population, three FD QTL were detected: on LG5 (FD.a) and LG6 (FD.b) as for the whole population and another one on LG7 (FD.c) (Figure 2 and Table 2). The FD varied from 0.06 to 3.

LG5 and LG6 QTL were very consistent between the field and the controlled chamber conditions. LOD values ranged from 3.54 (FD.c) to 17.31 (WFDcle.c) and phenotypic variance explanation (\mathbb{R}^2) from 8.0% (FD164.c) to 46.5% (WFDcle.c). The favourable alleles for winter frost damage on LG5 and LG6 were those given by the Champagne parent.

Colocalization of freezing tolerance QTL with QTL for soluble sugars concentrations and other physiological measurements in the aerial parts (Figure 3, Tables 2 and 3)

Two QTL (RafCleS2.c and GlcT2.b) were detected on LG5 between the markers AA475 and AA163.2, the first being a QTL for the concentration of raffinose at S2 in the field and the second related to the concentration of glucose at T2 in the controlled environment chamber. For example, the genetic correlation between freezing damage and raffinose concentration is 0.78 ($\alpha < 0.0001$) with minimum and maximum values of 0.60 and 7.89 (Table 3). On linkage group 6, six QTL were detected between the markers AD159 and G04.950. For the controlled chamber plants one QTL for the concentration of raffinose was detected after ten days of cold acclimation (RafT2.b). The other QTL were detected from field data during the cold acclimation period: the concentration of raffinose at S2 (RafCleS2.d), the RuBisCO activity at S2 (RuBisCOcleS2), and the electrolyte leakage at S1 and S2 (LeakCleS1 and LeakCleS2) for Clermont-Ferrand, and S3 for Mons (LeakMonS3). All these QTL colocalized with the QTL of freezing tolerance in the LG5 and LG6 (Figure 2). The LOD values ranged from 3.78 (GlcT2.b) to 8.31 (RafCleS2.d) and R² from 14.3% (RafT2.b) to 25.2% (RafCleS2.d).

In roots no QTL for sugar concentrations were found to colocalize with QTL for freezing tolerance, whereas in leaves no osmotic pressure QTL could be detected. The data of additional QTL are shown in figures S1 and S2.

Colocalization of freezing tolerance QTL with QTL for plant development (Figure 3, Tables 2 and 3)

In the cold-acclimated experimentation, one QTL for NTB (NTB.a) and another for NGB (NGB) were detected on LG5. This was in agreement with the correlations in cold-

acclimated experimentation between freezing tolerance and NTB or NGB (Table 3). In addition, two QTL for seedling stage were detected at T1 (StageT1) and T2 (StageT2) in the same linkage group 5 region. The location might be independent of the physiological stage of the seedlings. On LG6, only a QTL for NTB was detected (NTB.b). LOD ranged from 3.66 (NTB.b) to 6.24 (NGB) and R^2 from 10.8 (NTB.b) to 27.0% (StageT2).

Colocalization of freezing tolerance QTL with PQL (Figure 4, Tables 2 and 4)

Among 264 spots detected in 2D gels, 191 spots allowed for the mapping of 315 PQL across seven linkage groups (Figure S3). LOD ranged from 2.83 (L264, GL2) to 18.80 (L269, GL3) and R² from 12.1 (L173, GL3) to 63.0% (L606: OEE1, GL3). Twenty two PQL were colocalized with freezing tolerance QTL on LG5. Among these PQL, four spots were identified: fructose bisphosphate aldolase (L522), triose phosphate isomerase (L680), chaperonin 21 (L768), and RuBisCO small subunit (L925). On LG6 five PQL colocalized with the freezing damage QTL ; one of them was related to plastocyanin (L917).

Discussion

Bourion et al. (2003) have already shown that, in a controlled environment chamber, Champagne exhibits a better frost tolerance than Terese. These results were confirmed by our experiments. We also observed that when plants were placed in the greenhouse after the recovery period Terese was unable to survive. Without application of a cold acclimation period, both Champagne and Terese perish under frost (data not shown), whereas the application of such a process enables Champagne, but not Terese, to gain frost tolerance.

Relevance of the sub-population study choice

Several QTL described by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008) in a field experiment with the Pop2 lines were used to verify that our detection of QTL was relevant. In our field study, two QTL were detected on LG5 (Mons and Clermont-Ferrand) and two on LG6 (Mons and Clermont-Ferrand). These QTL were at the same position (except for LG3) as those found with the entire population by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008). Therefore the use of the Hr sub-population allowed us to eliminate the influence of Hr (no colocalized QTL) and to observe the intrinsic frost tolerance obtained by cold acclimation.

Homogeneity of plant responses between controlled environment and field

To compare the experiments of the controlled chamber with those in the field, the 164 RILs were first observed for winter frost damage. The range of scores among the lines in the controlled environment was 2-5, which was smaller than the range of 0-5 previously observed in the field (Bourion *et al.*, 2003). The QTL for frost damage for the 164 RIL did not colocalize with *Hr* under controlled growth conditions. In fact the seedlings were young and the stage of flowering initiation not yet reached. Nevertheless, the QTL on LG3 around *Le* (dwarfism allele) and the two other QTL on LG5 and LG6, determined by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008), were once again confirmed.

The major QTL obtained in the field (except around Hr) were also observed under controlled conditions, so comparison between the two experiments was possible. The next step, the elimination of the influence of the Hr locus by analysing exclusively the Hr sub-population, revealed QTL on LG5 and LG6, but not on LG3 (around *Le*). In this case the lower number of individuals, linked to a relatively low range of frost damage, might have diminished its significance.

Altogether, QTL on LG5 and LG6 were observed in all experiments. The reliability of the detection for these QTL did not depend on the number of individuals as results were consistent between the whole population (164 lines) and the *Hr* sub-population (78 lines). These QTL probably depend on mechanisms independent of the vegetative developmental stage of the plants, as described for pathogenesis related QTL (Prioul *et al.*, 2004). Our study was focused on linkage groups 5 and 6.

Involvement of physiological parameters and some proteins during cold acclimation

We chose to analyse soluble sugars because of their involvement in cold acclimation as osmoprotectants (Levitt, 1980) and their detection in different pea lines (Bourion *et al.*, 2003). In the field, a QTL for raffinose concentration was observed during cold acclimation on both LG5 and LG6, in the controlled chamber only on LG6. They all colocalize with the QTL of frost damage. This triholoside certainly plays a role in cold acclimation as in other species (*Arabidopsis*: Ristic and Ashworth, 1993; *Lonicera*: Imanishi *et al.*, 1998; poplar: Renaut *et al.*, 2004). Raffinose is the soluble sugar having been shown to have a major effect during cold acclimation for different species like poplar, with a correlation of -0.96 between raffinose and LT50 (temperature inducing 50% of injured cells) (Renaut *et al.*, 2004) but its effect is also much debated (Taji et al., 2002; Zuther et al., 2004). Even if the role of raffinose is not yet well established, our results for pea strongly suggest its implication in freezing tolerance.

A QTL for glucose at T2 in the controlled environment chamber was detected on LG5. Additional QTL for glucose, sucrose or raffinose were detected but did not colocalize with those for freezing tolerance. In 3-week-old seedlings of *Arabidopsis*, Wanner and Junttila (1999) have observed that sucrose, glucose, and fructose are accumulated within a few hours after the transfer of plants to 1°C and during the 5 days of cold acclimation under different photoperiods. The content of these sugars increased in our experiment under cold acclimation, but no correlation with frost damage could be observed for sucrose and fructose.

On LG5, a QTL for branching traits was detected. Cold acclimated seedlings having more branches (NTB) and green branches (NGB) were more resistant to frost. This was in accordance with the fact that pea seedlings must have a minimum number of leaves (1 or 2) to resist frost (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2004). So the number of green branches represents an indication for the degree of frost tolerance in resistant plants.

Two hundred and sixty-four protein spots were detected and 70 proteins among them identified. Among the 22 PQL having been mapped on LG5, four could be attributed to functions: triose phosphate isomerase (L680) and fructose bisphosphate aldolase (L522) are involved in glycolysis and the RuBisCO small subunit (L925) in photosynthesis. These two primary metabolisms are linked with sugars and these three PQL colocalized with glucose concentration QTL. The fourth PQL corresponded to chaperonin 21. This protein binds to cpn60 which is indispensable for the assembly of RuBisCO (Yong *et al.*, 2006). Chaperonin 21 shows homologies with *E. coli* GroES (Baneyx *et al.*, 1995) involved in the folding of several proteins. The chaperonin 21 might promote the protein folding in order to maintain metabolism during the cold acclimation. PQL can colocalize or not with their structural genes (de Vienne *et al.*, 1999). The density of the actual genetic map of pea (one marker every 5.7 cM corresponding to 16820 kb: 1 cM = 2951 kb) and the relatively low number of identified genes does not yet allow us to draw conclusions for possible colocalizations.

For a given QTL, many genes could be found within the confidence interval focusing on markers with a known function localized on the genetic map. On LG5, QTL were located in the same region as the *Tri* locus (trypsin inhibitor activity), *AGL20a* (Agamous-like 20a =SOC1 suppressor of overexpression of CONSTANS) and *DHPS1* (dihydrodipicolinate synthase). The trypsin inhibitor gene is expressed during drought stress in roots of pea (Welham and Domoney, 2000) and cold acclimation is a process that leads to freezing tolerance by avoiding the dehydration of a plant due to ice formation (Sharma *et al.*, 2005). Nevertheless trypsin inhibitor activity decreases the nutritional value of peas (Page *et al.*, 2002) and cannot be used for an improvement of frost tolerance in pea during cold acclimation.

The gene agl20a is an activator of flowering (Lee *et al.*, 2000) and regulated by photoperiod, vernalization, and autonomous floral induction pathways. Ohto *et al.* (2001) have demonstrated that sugars have a negative effect on the floral transition: sucrose, but also glucose, fructose or galactose, can delay flowering time. As raffinose can be hydrolysed to sucrose and galactose by α -galactosidase, it might be interesting to measure the activity of this enzyme during cold acclimation. Indeed raffinose accumulation and its degradation in glucose and galactose could possibly delay floral initiation which would result in an increase in resistance to cold temperatures since the reproductive state is the most sensitive to frost (Fowler *et al.*, 2001). The observed increase of the raffinose content in our seedlings during cold acclimation is consistent with this hypothesis.

DHPS1 is a key enzyme for amino acid biosynthesis, in particular lysine biosynthesis via the DAP (diaminopimelic acid) pathway. Tafforeau *et al.* (2002) have observed by twodimensional electrophoresis a saccharopine dehydrogenase which participates in the lysine metabolism during a short cold shock in flax. Seki *et al.* (2002) have found by microarray analysis in *Arabidopsis* that mRNA of this enzyme is upregulated during cold stress (1 to 24 hours at 4° C). Among the amino acids, proline might be an osmoprotectant in plants. According to Trischuk *et al.* (2006), thylakoid membranes are protected from freezing inactivation by exogenous proline, arginine, threonine, and lysine. Another hypothesis was that the higher amino acid concentrations are caused by the need to enhance protein synthesis.

A QTL for the activity of RuBisCO colocalized with a QTL for frost damage on LG6. RuBisCO is the key enzyme of the Calvin cycle which allows the fixation of CO₂ during the photosynthesis. Holaday *et al.* (1992) have observed that the activity of RuBisCO in spinach increases by 20% after 10 days at 10°C. In winter rye, the photosynthetic capacity of cold hardening leaves at 5°C increases and is correlated with a 3-fold increase in RuBisCO activity (Hurry *et al.*, 1994). The same phenomena have been observed for wheat and rape at 5°C (Hurry *et al.*, 1995). Goulas *et al.* (2006) have studied the proteome of chloroplasts in *Arabidopsis*; they observed that the amount of some large and small subunits of RuBisCO increased during cold acclimation.

QTL for the electrolyte leakage measured in field were detected on LG6. This measure gives information on cell damage (Dexter *et al.*, 1932). If it is high, damage in the plasma

membrane are significant so the plant is not able to adapt itself to frost. In the field, a correlation between electrolyte leakage and the score for freezing tolerance of 0.44 ($\alpha < 1$ ‰) was detected. The electrolyte leakage is the physical measure of a phenomenon (membrane damage), which could be used to screen more quantitatively and objectively the frost damage.

Markers under the QTL on the LG6 did not provide candidate genes, but with the map from Aubert *et al.* (2006), different markers with known function were found: *Gbsts2* (granule-bound starch synthase II), *GA20ox* (Gibberellin20 oxidase) and *RNAhel* (RNA helicase).

Up to now, 70 out of 264 protein spots have been identified. Consequently, many of the observed PQL are not yet informative, but the ongoing identification process should enable us to further elucidate the mechanisms of cold acclimation and frost resistance.

To our knowledge, our study is the first one to focus on frost damage QTL (abiotic stress) in pea under both field and controlled conditions. Gusta et al. (2005) noticed some difficulties in this kind of comparison, namely the differences in plant age and growth conditions. Our study was conducted under field and controlled conditions, but furthermore on an entire population (Hr and hr lines, 164 lines) and the Hr subset of the population, QTL found on LG5 and LG6 were consistent in all experiments, hence independent of plant age (seedling or adult). Using the entire population under field conditions, Lejeune-Hénaut et al. (2008) have detected a major QTL around the *Hr* locus that we chose to eliminate by working on the homogenous Hr sub-population. Our results enable us to conclude that the QTL on LG5 and LG6 are linked to cold acclimation and not to freezing escape conferred by the Hr allele. The second new item was the use of physiological data measured during cold acclimation for the QTL approach. The increase in RuBisCO activity seems to have an important impact on cold acclimation in pea, as it has been shown for others species including spinach (Holaday et al., 1992) and rye (Hurry et al., 1994). Raffinose is a soluble sugar which seemed to have a major effect during the cold acclimation for different species. Although the mechanism of its action has not been well established, it seems to be linked to freezing tolerance in pea. The observed electrolyte leakage might represent the major damage caused by frost. The consistency of the results for field and controlled growth conditions represents a major finding of our study. The search and validation of candidate genes will be performed by dissecting chromosomal regions of interest. Experiments will also be expanded to a higher number of segregating populations in different varieties with the aim to confirm the localized regions in the linkage groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr J. Le Gouis for pre-reviewing this paper and M. Morchen for her helpful comments on the manuscript. Thanks to F. Batifoy and B. Debote for technical assistance in the plant material at INRA experimental station of Clermont-Ferrand Theix, and to J.J. Stempniak, J.F. Hû, D. Rabier, M. Thomas, F. Depta and B. Decaux from INRA station Mons. This work is part of the PhD thesis of Estelle Dumont, financially supported by a grant from the French Ministère de la Jeunesse, de l'Education Nationale et de la Recherche. This work was also supported by Genoplante (project GOP-PEAD2) and the region Picardie (project ProgenFroid).

REFERENCES

Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet MC, Petit A, Rameau C, Lejeune-Hénaut I, Huguet T, Burstin J (2006) Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. Theor Appl Genet 112:1024-1041

Baga M, Chodaparambil SV, Limin AE, Pecar M, Fowler DB, Chibbar RN (2007) Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. Funct Integr Genomics **7**(1):53-68

Ball RA, Oosterhuis DM (2005) Measurement of root and leaf osmotic potential using the vapor-pressure osmometer. Env Exp Bot 53(1):77-84

Baneyx F, Bertsch U, Kalbach CE, van der Vies SM, Soll J, Gatenby AA (1995) Spinach chloroplast cpn21 co-chaperonin possesses two functional domains fused together in a toroidal structure and exhibits nucleotide-dependent binding to plastid chaperonin 60. J Biol Chem 270(18):10695-10702

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8:93-99

Bourion V, Lejeune-Hénaut I, Munier-Jolain N, Salon C (2003) Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. Eur J Agron19:535-548

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Bradshaw AD (1972) Some of the evolutionary consequences of being a plant. Evol Biol 5:25-47

Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. J Plant Physiol 160(3):283-292

Castonguay Y, Nadeau P, Lechasseur P, Chouinard L (1995) Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. Crop Sci 35:509-516

Damerval C, Maurice A, Josse JM, de Vienne D (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. Genetics 137: 289-301

de Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. J Exp Bot 50(332): 303-309

Dexter ST, Tottingham WE, Graber LF (1932) Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. Plant Physiol **7**(1): 63-78

Di Marco DI, Tricoli D (1983) RuBP carboxylase determination by enzymatic estimation of D-3-PGA formed. Photosynth Res 4: 145-149

Dupire L, Décout E, Vasseur J, Delbreil B (1999) Histological and 2-D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L.. Plant Sci 147: 9-17

Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F (2001) Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. Plant Physiol 127: 1676-1681

Goulas E, Schubert M, Kieselbach T, Kleczkowski LA, Gardeström P, Schröder W, Hurry V (2006) The chloroplast lumen and stromal proteomes of *Arabidopsis thaliana* show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature. Plant J 47: 720-734

Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ (2005) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. J Plant Growth Regul 24: 308-318

Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks AL, Leegood RC (1992) Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. Plant Physiol 98: 1105-1114

Hurry V, Malmberg G, Gardeström P, Oquist G (1994) Effects of a short-term shift to low temperature and of long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter rye (*Secale cereale* L.). Plant Physiol 106: 983-990

Hurry V, Strand A, Tobiaeson M, Gardeström P, Oquist G (1995) Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism and carbohydrate content. Plant Physiol 109: 697-706

Imanishi HT, Suzuki T, Masuda K, Harada T (1998) Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. Sci Horti-Amsterdam 72: 255-263

Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM, Lee I (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. Gen Dev 14: 2366-2376

Lejeune-Hénaut I, Bourion V, Etévé G, Cunot E, Delhaye K, Desmyter C (1999) Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. Euphytica 109: 201-211

Lejeune-Hénaut I, Delbreil B, Devaux R, Guilioni L (2004) Températures froides et fonctionnement d'un couvert de pois. In: Agrophysiologie du pois protéagineux. N. Munier-Jolain, I. Chaillet, J. Lecoeur and M. H. Jeuffroy. Paris, INRA-Arvalis, pp 184-195

Lejeune-Hénaut I, Hanocq E, Béthencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Lainé AL, Foucher F, Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C (2008) The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L.. Theor Appl Genet 116(8): 1105-1116

Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. New-York, Academic Press

Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Hénaut I, Burstin J (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Theor Appl Genet 111: 1022-1031

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. Arch Biochem Biophys 444: 139-158

Murfet IC (1973) Flowering in *Pisum. Hr*, a gene for high response to photoperiod. Heredity 31(2):157-164

Ohto MA, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. Plant Physiol 127: 252-261

Page D, Aubert G, Duc G, Welham T, Domoney C (2002) Combinatorial variation in coding and promoter sequences of genes at the *Tri* locus in *Pisum sativum* accounts for variation in trypsin inhibitor activity in seeds. Mol Genet Genomics 267: 359-369

Prioul S, Frankewitz A, Deniot G, Morin G, Baranger A (2004) Mapping of quantitative trait loci for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.), at the seedling and adult plant stages. Theor Appl Genet 108: 1322-1334

Renaut J, Lutts S, Hoffmann L, Hausman JF (2004) Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. Plant Biol 6: 81-90

Ristic Z, Ashworth EN (1993) Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation. Protoplasma 172: 111-123

SAS, User's guide, ver. 8.2, Cary, N.C., SAS Institute, 1999

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J 31(3): 279-292

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

Tafforeau M, Verdus MC, Charlionet R, Cabin-Flaman A, Ripoll C (2002) Two-dimensional electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock. Electrophoresis 23: 2534-2540

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 29: 417-426

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

Trewavas A (2003) Aspects of plant intelligence. Ann Bot 92: 1-20

Trischuk RG, Schilling BS, Wisniewski M, Gusta LV (2006) Freezing stress: systems biology to study cold tolerance. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. KVM Rao, A S Raghavendra, KJ Reddy, Springer

Uemura M, Joseph RA, Steponkus PL (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. Plant Physiol 109: 15-30

Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. http://statgen.ncsu.edu/ qtlcart/WQTLCart.htm.

Wanner LA, Junttila O (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. Plant Physiol 120: 391-399

Ward DA, Keys AJ (1989) A comparison between the coupled spectrophotometric and the uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. Photosynth Res 22: 167-171

Welham T, Domoney C (2000) Temporal and spatial activity of a promoter from a pea enzyme inhibitor gene and its exploitation for seed quality improvement. Plant Sci 159: 289-299

Yong ZH, Chen GY, Shi JN, Xu DQ (2006) *In vitro* reassembly of tobacco ribulose-1,5bisphosphate carboxylase/oxygenase from fully denatured subunits. Acta Biochem Biophys Sin 38: 737-745

Zuther E, Büchel K, Hundertmark M, Stitt M, Hincha DK, Heyer AG (2004) The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. FEBS_Letters 576: 169-173

Figure legends

Figure 1. Temperature conditions in field experiment.

Mean daily temperature during field experiments in Clermont-Ferrand (continuous line) and in Mons (dotted line). Standard screen air temperature was registered 2 m above the ground. Four samplings were conducted (S1 to S4) at each location. S1: 10.26.2004, S2: 11.16.2004 and S3: 12.07.2004 in Clermont-Ferrand and S1: 10.19.2004, S2: 11.22.2004 and S3: 12.13.2004 in Mons, and the 4th at the end of winter S4: 03.20.2005 in Clermont-Ferrand and S4: 03.24.2005 in Mons.

Figure 2. QTL of winter frost damage (WFD) and frost damage (FD).

Each field QTL (black box) is identified by WFD and the location abbreviation (mon: Mons, cle: Clermont-Ferrand). For the controlled chamber experimentation (white box), QTL were named only FD for the *Hr* sub-population or followed by 164 for the whole population. Confidence intervals are defined as 1 (box) and 2 (whisker) units decrease in LOD. The closest markers to the peaks are in bold. On the left, the QTL detected by Lejeune-Hénaut *et al.* (2008) in field with the whole population (*: name used in the published article) were figured with hachured boxes. Only major QTL regions were showed.

Figure 3. Metabolites, physiological and morphological QTL on LG5 and LG6.

Field data QTL (black box) in Clermont-Ferrand or Mons are identified by cle or mon respectively. Controlled chamber QTL are represented in white boxes. T1: harvest after 10 days of nursery, T2: harvest after 10 days of cold acclimation, S2: harvest during cold acclimation in field, Leak: electrolyte leakage, Raf: concentration of raffinose, Glc: concentration of glucose, Suc: concentration of sucrose, stage: number of leaves on the plants, NTB: total number of branches, NGB: number of green branches after recovery period, RuBisCO: activity of RuBisCO. When the term root is added, the QTL was detected with root data. ●, on the left, indicates the position of frost damage QTL represented in Figure 2. Only QTL regions of interest were showed.

Figure 4. PQL colocalized with frost damage QTL on LG5 and 6.

PQL were identified by the spot name (L: leaf). ●, on the left, indicates the position of frost damage QTL represented in Figure 2. Only QTL regions of interest were showed.



Figure 1. Temperature conditions in field experiment.





Figure 2. QTL of winter frost damage (WFD) and frost damage (FD).



Figure 3. Metabolites, physiological and morphological QTL on LG5 and LG6.



Figure 4. PQL colocalizing with frost damage QTL on LG5 and 6.

100.4

G04.950

Period	Nursery	Cold acclimation	Frost	Recovery
Number of days	11	11	4	8
Daylengh (h) Day / Night	10 / 14	10 / 14	8 / 16	10 / 14
Temperature (°C) Day / Night	19 / 12	10 / 2	6 / -8	16 / 5

Table 1. Growth conditions for the frost experiment with cold acclimation in the controlled
 environment chamber. Total length of the experiment was of 34 days.

QTL	Population	Condition	Linkage	Closest marker	LOD	R ² (%)	я	Phenotypical values	
identification	ropulation		group				u	minimal	maximal
WFDcle.a			1	AA67	4.74	6.53	0.33	0.00	5.00
WFDcle.b	Hr	Clermont	5	AGL20a	7.31	16.22	0.53		
WFDcle.c			6	AD141	17.31	46.46	0.88		
WFDmon.a			4	SucSyn	7.36	14.10	0.31	0.50	4.50
WFDmon.b	Hr	Mons	5	AA475	7.71	17.01	0.33		
WFDmon.c			6	I01.600	10.66	24.71	0.40		
FD164.a		Controllad	3	AB64	5.91	10.03	0.12	0.03	2.39
FD164.b	whole	chamber	5	AGL20a	8.02	16.56	0.16		
FD164.c		chamber	6	AD141	4.19	8.06	0.11		
FD.a		Controllad	5	AGL20a	4.55	20.81	0.30	0.06	3.00
FD.b	Hr	chamber	6	AD60	3.66	15.72	0.24		
FD.c		chamber	7	D24	3.54	14.32	0.24		

Table 2. Characteristics of the QTL obtained in the entire or sub F8 RIL population derived from Champagne×Terese.

LOD: Logarithm of Odds, R²: phenotypic variance, a: additive allelic value of Terese.

WFD: field winter frost damage, cle: Clermont, mon: Mons, FD: frost damage in controlled environment chamber.

QTL	C IV	Linkage	Closest	LOD	\mathbf{R}^2		Phenotypical values		Genetic correlation
identification	Condition	group	marker	LOD	(%)	а	minimal	maximal	with WFD
									or FD
RafCleS2.c	Clarmont	5	DHPS1	4.51	8.8	-0.53	0.60	7.89	0.78***
RafCleS2.d	Clerinoin	6	AD60	8.31	25.2	-0.93			
RafT2.b	Controlled chamber	6	AD159	4.71	14.3	-0.04	0.01	0.54	0.36**
GlcT2.b	Controlled chamber	5	AD79	3.78	12.3	-0.57	1.54	7.45	n.s.
LeakCleS1	Clarmont	6	E16.1630	3.92	14.8	3.15	5.15	46.83	0.44***
LeakCleS2	Clefinolit	6	AD159	4.73	23.4	6.91	5.15	65.32	0.49***
LeakMonS3	Mons	6	AD159	5.97	24.6	11.56	5.95	97.93	-
RuBisCOcleS2	Clermont	6	I01.600	4.89	15.8	-0.16	3.29	5.70	0.56***
NTB.a	Controlled	5	AA475	4.80	21.8	-0.42	0.26	4.20	0.43***
NTB.b	chamber	6	AD141	3.66	10.8	-0.29			
NGB	Controlled chamber	5	AD79	6.24	26.3	-0.45	0	3.90	0.71***
StageT1	Controlled	5	AGL20a	5.05	15.5	-0.14	0.52	2.12	
StageT2	chamber	5	AA475	4.90	27.0	-0.17	2.29	3.51	ns

Table 3. Characteristics of metabolites, physiological and morphological QTL obtained in the sub F8 RIL population derived from Champagne×Terese.

LOD: Logarithm of Odds, R²: phenotypic variance, a: additive allelic value of Terese.

cle: Clermont, mon: Mons, Raf: concentration of raffinose, Glc: concentration of glucose, Suc: concentration of sucrose, Leak: electrolyte leakage, RuBisCO: activity of RuBisCO, NTB: total number of branches, NGB: number of green branches after recovery period, stage: number of leaves on the plants, T1 and T2: harvest after 10 days of nursery and after 10 days of cold acclimation in controlled environment chamber respectively, S1 to S3: harvest during cold acclimation in field, root: QTL detected with data of roots in the controlled environment chamber. Genetic correlation between WFD (or FD) and other parameters, level of significance (***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05, ns: not significant).

PQL	Linkage	Closest	LOD	$\mathbf{P}^{2}(0(1))$	
identification	group	marker	LOD	K (%)	a
L132	5	Tri	5.44	31.1	-0.02
L191	5	Tri	4.73	27.6	-0.08
L257	5	Tri	4.20	25.4	-0.06
L294	5	AD79	4.12	29.0	-0.06
L305	5	AA163.2	4.53	23.0	-0.05
L339	5	Tri	7.17	35.0	-0.07
L365	5	AA99	5.27	32.1	-0.04
L664	5	Tri	4.44	29.0	-0.01
L680	5	Tri	6.19	26.0	-0.01
L727	5	AD79	4.02	21.3	-0.11
L732	5	Tri	5.16	31.6	-0.10
L733	5	Tri	5.02	30.3	-0.17
L749	5	Tri	3.50	16.0	-0.04
L768	5	AA475	5.14	30.9	-0.16
L779	5	Tri	6.03	28.9	-0.09
L873	5	AA475	3.32	25.2	0.25
L905	5	DHPS1	6.54	26.5	-0.09
L925	5	AGL20a	7.61	38.6	-0.49
L1024	5	Tri	9.32	35.2	-0.01
L1071	5	Tri	4.99	27.4	-0.03
L1185b	5	AD79	5.68	28.3	-0.08
L349b	6	AD59	4.77	27.2	0.01
L733	6	AD141	7.83	34.7	0.20
L779	6	AD59	5.69	36.7	0.10
L802	6	AD59	4.72	23.1	0.05
L917	6	E16.1630	5.31	38.6	-1.06

Table 4. Characteristics of PQL obtained in the sub F8 RIL population derived from Champagne×Terese.

LOD: Logarithm of Odds, R²: phenotypic variance, a: additive allelic value of Terese.

Electronic supplementary material



Figure S1. Metabolites, physiological and morphological QTL.

Figure S2. Characteristics of metabolites, physiological and morphological QTL obtained in the sub F8 RIL population derived from Champagne×Terese.

LOD: Logarithm of Odds, R^2 : phenotypic variance, a: additive allelic value of Terese (additive effect). cle: Clermont, mon: Mons, Raf: concentration of raffinose, Glc: concentration of glucose, Suc: concentration of sucrose, Leak: electrolyte leakage, RuBisCO: activity of RuBisCO, NTB: total number of branches, NGB: number of green branches after recovery period, stage: number of leaves on the plants, T1 and T2: harvest after 10 days of nursery and after 10 days of cold acclimation in controlled environment chamber respectively, S1 to S3: harvest during cold acclimation in field, root: QTL detected with data of roots in the controlled environment chamber. Genetic correlation between WFD (or FD) and other parameters, level of significance (***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05, ns: not significant).

QTL identification	Condition	Linkage group	Closest marker	LOD	R ² (%)	a	Minimal value	Maximal value	Genetic correlation with WFD or FD
RafCleS2.a		2	MDHc	3.54	7.4	0.49	0.60	7.89	0.78***
RafCleS2.b	Clermont	4	SucSyn	3.98	7.7	-0.51			
RafT2.a	Controlled chamber	1	Af	5.58	17.8	-0.05	0.01	0.54	0.36**
GlcCleS2	Clermont	1	AA258	6.57	23.6	1.96	9.12	24.95	0.45***
GlcT2.a	Controlled chamber	3	bfruct	10.31	49.9	-1.10	1.54	7.45	ns
GlcT2root	Controlled chamber	3	Hr	3.39	23.0	37.80	13.7	125.7	
SucCleS2	Clermont	4	V12.1600	4.59	19.8	5.37	39.86	98.08	ns
SucT2.a SucT2.b SucT2.c	Controlled chamber	1 3 4	Af Le A A 349	13.27 5.76 5.16	40.1 12.6 12.8	-1.40 -0.80 -0.80	2.31	11.23	ns



Figure S3. The 315 PQL mapped on the seven linkage group of pea.



156



157











Nous avons détecté des QTL de tolérance au gel et trouvé des corrélations entre ces QTL et des QTL morphologiques et physiologiques ainsi que des PQL sur les groupes de liaison 5 et 6. Nous avons cartographié au total 315 PQL et dans l'article 2 nous nous sommes uniquement intéressés à ceux des GL5 et 6 colocalisant avec des QTL de tolérance au gel. Dans cette partie, nous allons étudier les accumulations locales de PQL.

2- Détection des PQL et des hot spots

Pour étudier le protéome des lignées recombinantes, nous avons choisi de commencer par les lignées *Hr* de type conventionnel pour le feuillage (comme la lignée parentale Champagne) soit 41 RIL. Les plantes ont été prélevées et découpées à TA3 soit après 10 jours d'endurcissement. Seules les feuilles ont été analysées. Nous avons fait correspondre 264 spots de ces RIL aux spots des parents et détecté 315 PQL. Pour 73 spots, aucun PQL n'a été détecté, 94 spots ont un seul PQL et 97 en ont entre 2 et 4 (Annexes 18 et 19). Sur ces 264 spots, 70 ont été identifiés (Annexe 15) et 54 ont au moins 1 PQL.

Les PQL sont répartis sur les 7 groupes de liaison (Annexes 18 et 19). Les LOD sont compris entre 2,83 pour le spot F264 (groupe de liaison 2 : GL2) et 18,80 pour le spot F269 (GL3). En ce qui concerne la variation phénotypique (\mathbb{R}^2), elle est comprise entre 12,1% (F173, GL3) et 63,0% (F606 = L9 = OEE1, GL3) (Annexe 18).



GL1

Figure 18 : Localisation des hot spots sur le groupe de liaison 1.

La courbe (en bleu) représente la somme des probabilités d'avoir un PQL à une position donnée P(x,x+0.5). La droite (en rouge) correspond à U(x) calculé pour 315 PQL et une longueur totale de la carte de 1491 cM.

Afin de détecter les zones génomiques d'intérêt, nous avons appliqué la méthode "QTL overview" en utilisant Excel. En prenant l'exemple du groupe de liaison 1 (Figure 18), nous détectons un hot spot à 151 cM qui correspond au cumul de 18 PQL (Figure 19).



Figure 19 : Tous les PQL présents sur le groupe de liaison 1.

La ligne orange en pointillés est positionnée à 151 cM et recouvre les 18 PQL formant le hot spot.

Cinq hot spots ont ainsi été détectés (Annexes 19 et 20) sur quatre groupes de liaison :

* Pour le GL1, la probabilité la plus élevée correspond à 151cM aux alentours du marqueur *Af*. Il regroupe 18 PQL dont 4 sont obtenus avec des protéines identifiées : pyridoxal-5-phosphate dependant enzyme (L432), malate dehydrogenase (L452), plastocyanin (L916) et peroxiredoxin-like protein (L876).

★ Deux hot spots sont présents sur le GL3. Le premier aux alentours de 43cM, au niveau du marqueur Hr, contient 10 PQL dont un seul correspond à une protéine identifiée, la triose phosphate isomérase (L734 = L17). Le deuxième se situe à 73cM au niveau du marqueur Z03.1500 et comprend aussi 10 PQL dont 7 PQL sont associés à une protéine connue : 2 RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta (L147 et L152), une RuBisCO small subunit (L926 = L25), une fructose bisphosphate aldolase (L491), une

chaperonine 60 (L958), une quinone oxydoreductase-like protein (L488 = L7) et une OEE1 (L606 = L11).

★ Sur le GL5, un hot spot se situe à 152cM au niveau des marqueurs Tri, AGL20a et DHPS1 et contient 17 PQL dont 3 pour lesquels la protéine est connue : une fructose bisphosphate aldolase (L522), une triose phosphate isomerase (L680) et une RuBisCO small subunit (L925 = L24).

 \bigstar Sur le GL6, à 24cM au niveau des marqueurs K16.450 et O04.850 se trouve un hot spot composé de 9 PQL et pour lesquels 4 protéines sont identifiées : une énolase (L260), un Mg chelatase subunit chl1 (L384 = L4), une thiamine biosynthetic enzyme (L543 = L8) et une sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (L428).

Seul le hot spot situé sur le GL5 colocalise avec les QTL de tolérance au gel et des QTL physiologiques ou morphologiques comme nous l'avons explicité dans l'article 2. Le hot spots du GL3 où 7 protéines sont connues est aussi intéressant. Nous y trouvons 3 chaperones (2 RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta et cpn60) pouvant participer au folding de la RuBisCO dont nous avons ici la petite sous-unité. Une autre protéine participe aussi à la photosynthèse : OEE1. Nous avons donc 5 protéines sur 10 qui participent à la photosynthèse. Ce hot spot se situe au niveau d'une région chromosomique possédant peu de marqueurs. Il serait intéressant d'y rechercher d'autres marqueurs et de voir s'il n'y aurait pas des gènes de régulation de la photosynthèse et surtout de la RuBisCO. Pour les autres hot spots, plus d'identifications serait nécessaire pour les discuter.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons étudié deux lignées de pois, une tolérante et une sensible au gel même après acclimatation au froid, au cours de deux cinétiques. Cette étude est originale puisque nous comparons à la fois acclimatation et non acclimatation et le comportement de deux lignées à réponses contrastées. Nous avons aussi subdivisé la plante en trois parties : feuilles, base de la tige et racines. Seule la base de la tige, de l'épicotyle jusqu'à la 2^{ème} écaille, est étudiée car le reste de la tige se nécrose après la phase de gel et la reprise de la croissance de Champagne acclimaté a lieu au niveau des deux premiers nœuds (les écailles). Nous avons observé grâce au découpage que la réponse des plantes lors de la phase d'acclimatation est "organe"-spécifique.

L'approche protéomique a montré que des protéines ont une expression différentielle entre Champagne et Térèse lors de la phase d'acclimatation au froid notamment pour les protéines identifiées impliquées dans la photosynthèse (RuBisCO activase, OEE2 et petite sous-unité de la RuBisCO) pour les feuilles et les tiges, et dans les mécanismes de défense de la plante (ripening-related protein, ABA-responsive protein et disease resistance response protein) pour les racines. Le dosage des métabolites (raffinose, saccharose, glucose et citrate) connus pour leur implication dans l'acclimatation au froid montre que Champagne acclimaté en contient plus que Térèse qu'il ait ou non subi la phase d'acclimatation. De plus, leur concentration est plus élevée dans les racines. Ce polymorphisme dans la réponse aux basses températures pourrait expliquer le fait que Champagne s'acclimate au froid pour ensuite tolérer le gel contrairement à Térèse.

Les lignées recombinantes issues du croisement entre Champagne et Térèse nous ont permis de détecter des QTL de tolérance au gel ainsi que des QTL physiologiques et morphologiques et des PQL. Deux régions chromosomiques nous ont plus particulièrement intéressé puisque nous y avons détecté des QTL de tolérance au gel avec la population totale des 164 RIL et la sous-population *Hr* aussi bien en champ qu'en conditions contrôlées. De plus, des QTL de la teneur en raffinose, en glucose ou encore de l'activité de la RuBisCO mais aussi des PQL (triose phosphate isomerase, fructose bisphosphate aldolase, petite sousunité de la RuBisCO, Cpn21 et plastocyanine pour les protéines identifiées) co-localisent avec les QTL de tolérance au gel. La petite sous-unité de la RuBisCO a été sélectionnée pour son comportement chez les parents et nous détectons un PQL colocalisé avec un QTL de tolérance au froid sur le groupe de liaison 5. L'identification des protéines ayant un PQL dans cette zone du GL5 ou celle du GL6 serait donc intéressante. Nous aurons ainsi des pistes à explorer pour continuer nos investigations sur l'acclimatation au froid du pois.

La prochaine étape sera de continuer l'identification des spots sélectionnés grâce à l'ANOVA lors de la phase d'acclimatation au froid pour compléter notre étude des lignées parentales, mais aussi d'identifier prioritairement les spots pour lesquels nous avons détecté des PQL corrélés aux QTL de tolérance au gel.

La poursuite de la recherche des PQL serait à réaliser. Les échantillons de tiges et de racines des 41 RIL (utilisées pour notre étude préliminaire sur les feuilles) sont disponibles. Mais il faudra désormais augmenter le nombre de RIL pour confirmer l'existence des PQL déjà détectés et continuer leur étude. Ceci nous permettra de regrouper un grand nombre d'informations sur le pois dont la carte génétique continue d'être alimentée en marqueurs. Plus le nombre de marqueurs sera élevé, plus la localisation des QTL et PQL sera précise et permettra la recherche de gènes candidats potentiels.

En parallèle, la synténie existant entre le pois et *Medicago truncatula* pourrait être exploitée pour obtenir la position des gènes de structure des protéines dont les PQL sont colocalisés avec les QTL de tolérance au gel. Une fois un gène identifié, des amorces pourraient être synthétisées à partir des séquences de *Medicago* pour rechercher ce gène chez le pois (lignées parentales) et confirmer si PQL et gène de structure de la protéine sont colocalisés ou non. De plus, si du polymorphisme est détecté chez les lignées parentales, nous pourrons nous servir de cette information pour obtenir un nouveau marqueur. Pour cela, l'ensemble des lignées recombinantes devra être génotypé pour ce marqueur avant qu'il ne soit incorporé à la carte.

Une collaboration avec l'institut Gabriel Lippmann de Luxembourg nous permettra de doser davantage de métabolites. Ces dosages seront réalisés pour les parties aériennes et racinaires des lignées recombinantes et parentales afin de continuer la recherche de QTL et d'affiner notre étude des voies métaboliques impliquées dans l'acclimatation au froid. Nous nous focaliserons sur les métabolites pouvant être reliés aux protéines impliquées dans l'acclimatation au froid que nous avons identifiées. Nous doserons ainsi différents pigments tels que les chlorophylles (Mg-chelatase subunit chII), les flavonoïdes (chalcone isomerase),

et les caroténoïdes (l'une des voies métaboliques utilisant l'alcohol dehydrogenase), mais aussi la thiamine (thiamine biosynthetic enzyme) et les tocophérols (synthétisés dans les plastoglobules). De plus des dosages de sucres seront réalisés, notamment pour le fructose et pour les sucres appartenant à la RFO (Raffinose Family Oligosaccharides) comme le stachyose, le verbascose ou le galactinol.

Une étude du transcriptome des parties aériennes des lignées Champagne et Térèse est également en cours au laboratoire. Ceci permettra de mettre en évidence l'expression différentielle de certains ARNm lors de la phase d'acclimatation au froid. Cette étude nous apportera des informations notamment sur les facteurs de transcription (dont les séquences sont présentes sur ces puces à ADN, PS6KOLI1). Ces facteurs de transcription sont peu accessibles avec notre étude pour deux raisons. Premièrement, les analyses des protéines totales permettent difficilement la détection de protéines présentes en faible quantité comme le sont les facteurs de transcription. Deuxièmement, la date de prélèvement, 5^{ème} jour de la phase d'acclimatation, est tardive par rapport au pic d'expression des CBF.

Avec ces données, nous aurons une vue d'ensemble du déroulement de la réponse de ces pois lors de la phase d'acclimatation au froid avec la modification de l'expression de gènes d'un côté (ARNm et protéines) et la réponse physiologique de la plante de l'autre. Nous pourrons ainsi déterminer si les évolutions des teneurs en protéines sont dues à des contrôles transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels. Pour les ARNm qui seront retenus grâce à l'analyse des microarrays, des PCR en temps réel pourront être réalisées sur les lignées recombinantes afin de détecter par la suite des eQTL (QTL d'expression) pour compléter nos données.

La photosynthèse est un des processus le plus touché par le stress froid. De plus, le chloroplaste est peut-être un des lieux de la perception du signal froid. Nous avons observé au cours de notre étude que 64% des protéines sélectionnées et identifiées sont localisées dans le chloroplaste. Une étude du protéome chloroplastique (lumen et stroma) de ces lignées a donc été mise en place pour compléter nos résultats.

L'ensemble des données recueillies avec ces différentes études permettra de trouver de nouvelles pistes à explorer pour mieux comprendre le phénomène d'acclimatation au froid chez le pois.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alonso-Blanco C., Gomez-Mena C., Llorente F., Koornneef M., Salinas J., Martinez-Zapater J.M. (2005). "Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*." <u>Plant physiol.</u> **139**: 1304-1312.
- Alvarez S. (2004) "Modifications du protéome et variations de la composition en métabolites : sucres solubles, amidon, acides organiques et proline, au cours de l'acclimatation au froid associées à la tolérance au gel du pois." Thèse de l'Université de Lille1.
- Amme S., Matros A., Schlesier B. et Mock H.P. (2006). "Proteome analysis of cold stress response in *Arabidopsis thaliana* using DIGE-technology." J. Exp. Bot. 57: 1529-1535.
- Anderson J.V., Li Q.B., Haskell D.W. et Guy C.L. (1994). "Structural organization of the Spinach endoplasmic reticulum-luminal 70kDa heat-shock cognate gene and expression of 70kDa heat-shock genes during cold acclimation." <u>Plant Physiol.</u> 104: 1359-1370.
- Anonyme (2002). "Des ressources en protéines à redécouvrir : les protéagineux." réalisé par le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants).

Anonyme 2 (1991). "Produire des grains oléagineux et protéagineux", Lavoisier Tec&Doc.

- Antikainen M., Griffith M., Zhang J., Hon, W.C., Yang D.S.C. et Pihakaski-Maunsbach K. (1996). "Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns and roots by tissue printing." <u>Plant Physiol.</u> **110**: 845-857.
- Artus N.N., Uemura M., Steponkus P.L., Gilmour S.J. Lin C. et Thomashow M.F. (1996).
 "Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance." <u>PNAS</u> 93: 13404-13409.
- Atici O. et Nalbantoglu B. (2003). "Antifreeze proteins in higher plants." <u>Phytochemistry</u> **64**: 1187-1196.
- Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Hénaut I., Huguet T. et Burstin J. (2006). "Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*." <u>Theor. Appl. Genet.</u> **112**: 1024-1041.

- Badawi M., Danyluk J., Boucho B., Houde M. et Sarhan F. (2007). "The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBF*s."
 Mol. Genet. Genomics 277: 533-554.
- Bae M.S., Cho E.J., Choi E.Y. et Park O.K. (2003). "Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress." <u>Plant J.</u> 36: 652-663.
- Bahrman N. et Damerval C. (1989). "Linkage relationships of loci controlling protein amounts in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.)." <u>Heredity</u> **63**: 267-274.
- Bahrman N., Zivy M., Damerval C. et Baradat P. (1994). "Organisation of the variability of abundant proteins in seven geographical origins of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.)." <u>Theor. Appl. Genet.</u> 88: 407-411.
- Bahrman N., Le Gouis J., Negroni L., Amilhat L., Leroy P., Lainé A.L. et Jaminon O. (2004).
 "Differential protein expression assessed by 2DE for 2 wheat varieties grown at 4 nitrogen levels." <u>Proteomics</u> 4: 709-719.
- Benjamini Y. et Hochberg Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J. R. Stat. Soc. B **57**: 289-300.
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." <u>Electrophoresis</u> **8**: 93-99.
- Bourion V., Lejeune-Hénaut I., Munier-Jolain N. et Salon C. (2003). "Cold acclimation of winter and spring peas : carbon partitioning as affected by light intensity." <u>Europ. J.</u> <u>Agronomy</u> 19: 535-548.
- Boyer C., Hilbert J.L. et Vasseur J. (1993). "Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in *Cichorium*." <u>Plant Sci.</u> **93**: 41-53.
- Bradford M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding." <u>Anal. Biochem.</u>
 72: 248-254.
- Breton G., Danyluk J., Ouellet F. et Sarhan F. (2000). "Biotechnological applications of plant freezing associated proteins." <u>Biotech. Ann. Rev.</u> **6**.
- Castonguay Y., Nadeau P., Lechasseur P. et Chouinard L. (1995). "Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness." <u>Crop Sci.</u> 35: 509-516.
- Chardon F., Virlon B., Moreau L., Falque M., Joets J., Decousset L, Murigneux A. et Charcosset A. (2004). "Genetic architecture of flowering time in maize as inferred

from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome." <u>Genetics</u> **168**: 2169-2185.

- Chen T.H.H. et Murata N. (2002). "Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes." <u>Curr. Opin. Plant Biol.</u> **5**: 250-257.
- Chevalier F., Martin O., Rofidal V., Devauchelle A.D., Barteau S., Sommerer N. et Rossignol
 M. (2004). "Proteomic investigation of natural variation between *Arabidopsis* ecotypes." <u>Proteomics</u> 4: 1372-1381.
- Chevallet M., Diemer H., Luche S., Van Dorsselaer A., Rabilloud T. et Leize-Wagner E. (2006). "Improved mass spectrometry compatibility is affored by ammoniacal silver staining." <u>Proteomics</u> 6: 2350-2354.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M. et Zhu J.K. (2003)."ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*." Gen. Dev. 17: 1043-1054.
- Choi H.K., Hong J.H., Ha J.O., Kang J.Y. et Kim S.Y. (2000). "ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors." J. Biol. Chem. 275(3): 1723-1730.
- Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M., Mudge J., Roel B., Ellis N., Doyle J., Kiss G.B., Young N.D. et Cook D.R. (2004). "Estimating genome conservation between crop and model legume species." <u>PNAS</u> 101(43): 15289-15294.
- Cui S., Huang F., Wang J., Ma X., Cheng Y. et Liu J. (2005). "A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings." <u>Proteomics</u> **5**: 3162-3172.
- Damerval C., de Vienne D., Zivy M. et Thiellement H. (1986). "Technical improvements in 2-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins." <u>Electrophoresis</u> 7: 52-54.
- Damerval C., Maurice A., Josse J.M. et de Vienne D. (1994). "Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression." <u>Genetics</u> 137: 289-301.
- D'Amico S., Claverie P., Collins T., Georlette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuwis M.A., Feller
 G. et Gerday C. (2002). "Molecular basis of cold adaptation." <u>Phil. Trans. R. Soc.</u> <u>Lond. B</u> 357: 917-925.
- Darvasi A., Weinreb A., Minke V., Weller J.I., Soller M. (1993). "Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map." <u>Genetics</u> **134**: 943-951.

- Dautry F. et Ribet C. (2004). "L'interférence par l'ARN : vers une génomique fonctionnelle chez les mammifères ?" m/s : médecine sciences **20**: 815-819.
- de Vienne D. et Causse M. (1998). La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. D. de Vienne (ed), INRA, Paris.
- de Vienne D., Burstin J., Gerber S., Leonardi A., Le Guilloux M., Murigneux A., Beckert B., Bahrman N., Damerval B. et Zivy M. (1999). "Two-dimensional electrophoresis of proteins as a source of monogenic and codominant markers for population genetics and mapping the expressed genome." <u>Heredity</u> 76: 166-177.
- Dexter S.T., Tottingham W.E. et Graber L.F. (1932). "Investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity." <u>Plant Physiol.</u> **7**(1): 63-78.
- Ding J.P. et Pickard B.G. (1993). "Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells." <u>Plant J. 3(1)</u>: 83-110.
- Doré C. et Varoquaux F. (2006). Le pois. Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. C. Cemagref, Ifremer, Inra.
- Druka A., Potokina E., Luo Z., Bonar N., Druka I., Zhang L., Marshall D.F., Steffenson B.J., Close T.J., Wise R.P., Kleinhofs A., Williams R.W., Kearsey M.J., Waugh R. (2008).
 "Exploiting regulatory variation to identify genes underlying quantitative resistance to the wheat stem rust pathogen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in barley." <u>Theor. Appl. Genet.</u> 117: 261-272.
- Dumoulin V., Ney B. et Etévé G. (1994). "Variability of seed and plant development in pea." <u>Crop Sci.</u> **34**(4): 992-998.
- Frank A. et Pevzner P. (2005). "PepNovo: de novo peptide sequencing via probabilistic network modeling." <u>Anal. Chem.</u> **77**: 964-973.
- Frank A., Tanner S., Bafna V. et Pevzner P. (2005). "Peptide sequence tags for fast database search in mass-spectrometry." J. Proteome Res. 4: 1287-1295.
- Fujii H., Chiou T.J., Lin S.I., Aung K. et Zhu J.K. (2005). "A miRNA involved in phosphatestarvation response in *Arabidopsis*." <u>Curr. Biol.</u> 15: 2038-2043.
- Fulton T.M., Bucheli P., Voirol E., Lopez J., Pétiard V. et Tanksley S.D. (2002). "Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato." <u>Euphytica</u> 127: 163-177.

- Gallardo K., Le Signor C., Vandekerckhove J., Thompson R.D. et Burstin J. (2003).
 "Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse metabolic processes related to reserve accumulation." <u>Plant Physiol.</u> 133: 664-682.
- Gao J.P., Chao D.Y. et Lin H.X. (2007). "Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice." J. Int. Plant Biol. **49**(6): 742-750.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. et Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In* John M. Walker (ed): The proteomics Protocols Handbook, Humana Press, pp. 571-607.
- Geldermann H. (1975). "Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods." <u>Theor. Appl. Genet.</u> **46**(7): 319-330.
- Gerhardt R. et Heldt H.W. (1984). "Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media." <u>Plant Physiol.</u> **75**: 542-547.
- Gibson S., Arondel V., Iba K. et Somerville C. (1994). "Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast w-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*." <u>Plant Physiol.</u> 106: 1615-1621.
- Gil-Agusti M.T., Campostrini N., Zolla L., Ciambella C., Invernizzi C. et Righetti P.G. (2005). "Two-dimensional mapping as a tool for classification of green coffee bean species." <u>Proteomics</u> 5: 710-718.
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M. et Thomashow M.F. (1998). "Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression." <u>Plant</u> <u>J.</u> 16(4): 433-442.
- Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D. et Thomashow M.F. (2000). "Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation." <u>Plant Physiol.</u> 124: 1854-1865.
- Gong Z., Lee H., Xiong L., Jagendorf A., Stevenson B. et Zhu J.K. (2002). "RNA helicaselike proteins as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance." <u>PNAS</u> 99(17): 11507-11512.
- Goulas E., Schubert M., Kieselbach T., Kleczkowski L.A., Gardeström P., Schröder W. et Hurry V. (2006). "The chloroplast lumen and stromal proteomes of Arabidopsis

thaliana show differential sensitivity to short- and long-term exposure to low temperature." Plant J. 47: 720-734.

- Griffith M., Ala P., Yang D.S.C., Hon W.C. et Moffatt B.A. (1992). "Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves." <u>Plant Physiol.</u> **100**: 593-596.
- Griffith M. et Yaish M.W.F. (2004). "Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. <u>Trends Plant Sci.</u> 9(8): 399-405.
- Guilioni L., Wéry J. et Lecoeur J. (2003). "High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate." <u>Funct. Plant Biol.</u> 30: 1151-1164.
- Gupta A.K. et Kaur N. (2005). "Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants." J. Biosci. **30**(5): 761-776.
- Gusta L.V., Wisniewski M., Nesbitt N.T. et Gusta M.L. (2004). "The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and non acclimated Canola leaves." Plant Physiol. **135**: 1642-1653.
- Guy C.L. (1990). "Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism." <u>Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.</u> **41**: 187-223.
- Guy C.L., Huber J.L.A. et Huber S.C. (1992). "Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature." <u>Plant Physiol.</u> **100**: 502-508.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F. et Zhang J.Z. (2002).
 "Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*." <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> 130: 639-648.
- Hajduch M., Ganapathy A., Stein J.W. et Thelen J.J. (2005). "A systematic proteomic study of seed filling in soybean establishment of high-resolution 2D reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database." <u>Plant Physiol.</u> 137: 1397-1419.
- Hanocq E., Laperche A., Jaminon O., Lainé A.L. et Le Gouis J. (2007). "Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis." <u>Ther. Appl. Genet.</u> 114: 569-584.
- Hashimoto M. et Komatsu S. (2007). "Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress." <u>Proteomics</u> 7(8): 1293-1302.
- Hecht V., Foucher F., Ferrandiz C., Macknight R., Navarro C., Morin J., Vardy M.E., Ellis N., Beltran J.P., Rameau C. et Weller J.L. (2005). "Conservation of *Arabidopsis* flowering genes in model legumes." <u>Plant Physiol.</u> 137: 1420-1434.

- Heino P., Sandman G., Lang V., Nordin K. et Palva E.T. (1990). "Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." Theor. Appl. Genet. **79**(6): 801-806.
- Herrero J., Valencia A. et Dopazo J. (2001). "A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns." <u>Bioinformatics</u> **17**(2): 126-136.
- Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C. et Yang D.S.C. (1995). "Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins." <u>Plant Physiol.</u> 109: 879-889.
- Hughes M.A. et Pearce R.S. (1988). "Low temperature treatment of barley plants causes altered gene expression in leaf meristems." J. Exp. Bot. **39**: 1461-1467.
- Huner N.P.A., Oquist G. et Sarhan F. (1998). "Energy balance and acclimation to light and cold." <u>Trends Plant Sci.</u> 3: 224-230.
- Ikka T., Kobayashi Y., Tazib T., Koyama H. (2008). "Aluminium-tolerance QTL in Columbia/Kashmir inbred population of *Arabidopsis thaliana* is not associated with aluminium-responsive malate excretion." <u>Plant science</u> **175**: 533-538.
- Imanishi H.T., Suzuki T., Masuda K. et Harada T. (1998). "Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation." <u>Sci.</u> <u>Hortic.-Amsterdam</u> 72: 255-263.
- Ishitani M., Xiong L., Lee H., Stevenson B. et Zhu J.K. (1998). "HOS1, a genetic locus involved in cold responsive gene expression in *Arabidopsis*." <u>Plant Cell</u> 10: 1151-1161.
- Jaglo K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T. et Thomashow M.F. (2001). "Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydrationresponsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species." <u>Plant Physiol.</u> 127: 910-917.
- Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O. et Thomashow M.F. (1998). "Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance." <u>Science</u> 280: 104-106.
- Jansen R.C. et Nap J.P. (2001) "Genetical genomics: the added value from segregation." <u>Trends Genet.</u> **17**: 388-391.

- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J. et Huskisson N.S. (1996). "Stress signalling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought." <u>PNAS</u> 93: 11274-11279.
- Keurentjes J.J.B., Fu J., Terpstra I.R., Garcia J.M., van den Ackerveken G., Snoek L.B., Peeters A.J.M., Vreugdenhil D., Koornneef M. et Jansen R.C. (2007) "Regulatory network construction in *Arabidopsis* by using genome-wide gene expression quantitative trait loci." PNAS **104**: 1708-1713.
- Knight H., Trewavas A.J. et Knight M.R. (1996). "Cold calcium signalling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation." <u>Plant</u> <u>Cell</u> 8: 489-503.
- Knight H., Veale E.L., Warren G.J. et Knight M.R. (1999). "The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif." Plant Cell **11**: 875-886.
- Knight M.R. (2002). "Signal transduction leading to low-temperature tolerance in Arabidopsis thaliana." <u>Phil. Trans. R. Soc. Lond. B</u> 357: 871-875.
- Knight H., Zarka D.G., Okamoto H., Thomashow M.F. et Knight M.R. (2004). "Abscisic acid induces CBF gene transcription and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element." Plant Physiol. 135: 1710-1717.
- Koyama M.L., Levesley A., Koebner R.M.D., Flowers T.J., Yeo A.R. (2001). "Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice." <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> 125: 406-422.
- Lang V., Mäntylä E., Welin B., Sundberg B. et Palva E.T. (1994). "Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*." <u>Plant Physiol.</u> 104: 1341-1349.
- Lee H., Xiong L., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B. et Zhu J.K. (2001). "The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning." <u>Gen. Dev.</u> 15: 912-924.
- Lei Z., Elmer A.M., Watson B.S., Dixon R.A., Mendes P.J. et Sumner L.W. (2005). "A 2dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of
1367 protein from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*." <u>Mol. Cell. Proteomics</u> **4**(11).

- Lejeune-Hénaut I., Bourion V., Etévé G., Cunot E., Delhaye K. et Desmyter C. (1999).
 "Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties." <u>Euphytica</u> 109: 201-211.
- Lejeune-Hénaut I., Delbreil B., Devaux R. et Guilioni L. (2004). Températures froides et fonctionnement d'un couvert de pois. Agrophysiologie du pois protéagineux. N. Munier-Jolain, I. Chaillet, J. Lecoeur and M. H. Jeuffroy. Paris, INRA-Arvalis: 184-195.
- Lejeune-Hénaut I., Hanocq E., Béthencourt L., Fontaine V., Delbreil B., Morin J., Petit A., Devaux R., Boilleau M., Stempniak J.J., Thomas M., Lainé A.L., Foucher F., Baranger A., Burstin J., Rameau C. et Giauffret C. (2008). "The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L." Theor. Appl. Genet. 116(8): 1105-1116.
- Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. New-York, Academic Press.
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Hénaut I. et Burstin J. (2005). "Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.)." <u>Theor. Appl. Genet.</u> 111: 1022-1031.
- Mackey A.J., Haystead T.A.J. et Pearson W.R. (2002). "Getting more for less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences." <u>Mol. Cell.</u> <u>Proteomics</u> 1: 139-147.
- Magome H., Yamaguchi S., Hanada A., Kamiya A. et Oda K. (2004). "*dwarf* and *delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor." <u>Plant J.</u> **37**: 720-729.
- Mahajan S. et Tuteja N. (2005). "Cold, salinity and drought stresses : an overview." <u>Arch.</u> <u>Biochem. Biophys.</u> 444: 139-158.
- Mantylä E., Lang V. et Pavla E.T. (1995). "Role of ABA in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*." <u>Plant Physiol.</u> 107: 141-148.
- Méchin V., Balliau T., Château-Joubert S., Davanture M., Langella O., Negroni L., Prioul J.L., Thévenot C., Zivy M. et Damerval C. (2004). "A two-dimensional proteome map of maize endosperm." <u>Phytochemistry</u> 65: 1609-1618.

- Minorsky P.V. (1989). "Temperature sensing by plants: a review and hypothesis." <u>Plant Cell</u> <u>Environ.</u> **12**(2): 119-135.
- Mishra N.S., Tuteja R. et Tuteja N. (2006). "Signaling through MAP kinase networks in plants." <u>Arch. Biochem.Biophys.</u> **452**: 55-68.
- Monroy A.F., Sarhan F. et Dhindsa R.S. (1993). "Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression." <u>Plant Physiol.</u> **102**: 1227-1235.
- Monroy A.F. et Dhindsa R.S. (1995). "Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of Alfalfa by calcium at 25°C." Plant Cell **7**: 321-331.
- Moriya Y., Itoh M., Okuda S., Yoshizama A. et Kanehisa M. (2007). "KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server." <u>Nucleic Acids Res.</u> 35: W182-W185.
- Morrissey J.H. (1981). "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity." <u>Anal. Chem.</u> **117**: 307-310.
- Munier-Jolain N., Turc O. et Ney B. (2004). Développement de la plante : développement reproducteur. Agrophysiologie du pois protéagineux. N. Munier-Jolain, I. Chaillet, J. Lecoeur and M. H. Jeuffroy. Paris, INRA-Arvalis: 45-50.
- Murata N. et Los D.A. (1997). "Membrane fluidity and temperature perception." <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> **115**: 875-879.
- Murata N. et Los D.A. (2006). "Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold signal transduction in cyanobacteria." <u>Physiol. Plant.</u> **126**: 17-27.
- Murfet I.C. (1973). "Flowering in *Pisum. Hr*, a gene for high response to photoperiod." <u>Heredity</u> **31**(2): 157-164.
- Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O. et Jones J.D.G. (2006). "A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling." <u>Science</u> 312: 436-439.
- Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R. et Salinas J. (2004). "CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*." <u>PNAS</u> **101**(11): 3985-3990.
- Örvar B.L., Sangwan V., Omann F. et Dhindsa R.S. (2000). "Early steps in cold sensing by plant cells : the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity." <u>Plant J.</u> 23: 785-794.

- Park K.J. et Kanehisa M. (2003). "Prediction of protein subcellular locations by support vector machines using compositions of amino acids and amino acid pairs." Bioinformatics 19(13): 1656-1663.
- Palva E.T., Htiherju S.T., Tamminen I., Puhakainen T., Laitinen R., Svensson J., Helenius E. et Heino P. (2002). "Biological mechanisms of low temperature stress response : cold acclimation and development of freezing tolerance in plants." <u>JIRCAS Working Report</u>: 9-15.
- Pearce R.S. (1999). "Molecular analysis of acclimation to cold." <u>Plant Growth Regul.</u> **29**: 47-76.
- Pennycooke J.C., Jones M.L. et Stushnoff C. (2003). "Down-regulating alpha-galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia." <u>Plant Physiol.</u> **133**(2): 901-909.
- Pilet-Nayel M.L., Muehlbauer F. J., McGee R.J., Kraft J.M., Baranger A. et Coyne J. (2005).
 "Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France." <u>Phytopathology</u> 95: 1287-1293.
- Plaxton W.C. (1996). "The organization and regulation of plant glycolysis." <u>Annu. Rev. Plant</u> <u>Physiol. Plant Mol. Biol.</u> **47**: 185-214.
- Plomion C. (1995). www.pierroton.inra.fr/genetics/cartoqtl/cartoqtl.html
- Presterl T., Ouzunova M., Schmidt W., Möller E.M., Röber F.K., Knaak C., Ernst K., Westhoff P., Geiger H.H. (2007). "Quantitative trait loci for early plant vigor of maize grown in chilly environments." <u>Theor. Appl. Genet.</u> **114**: 1059-1070.
- Przymusinski R., Rucinska R. et Gwozdz E.A. (2004). "Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses." <u>Env. Exp. Bot. **52**</u>: 53-61.
- Pudney P.D.A., Buckley S.L., Sidebottom C.M., Twigg S.N., Sevilla M.P., Holt C.B., Roper D., Telford J.H., McArthur A.J. et Lillford P.J. (2003). "The physio-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*)." <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> 410: 238-245.
- Puhakainen T. (2004). "Physiological and molecular analyses of cold acclimation of plants."Department of biological and environmental sciences, genetics. Academic dissertation, University of Helsinki.
- Puhakainen T., Li C., Boije-Malm M., Kangasjärvi J., Heino P. et Palva E.T. (2004). "Shortday potentiation of low temperature-induced gene expression of a C-repeat-binding factor-controlled gene during cold acclimation in silver birch." <u>Plant Physiol.</u> 136: 4299-4307.

- Rajashekar C.B. et Lafta A. (1996). "Cell-wall changes and tension in response to cold acclimation and exogenous abscisic acid in leaves and cell cultures." <u>Plant Physiol.</u> 111: 605-612.
- Renaut J., Lutts S., Hoffmann L. et Hausman J.F. (2004). "Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects." <u>Plant Biol.</u> **6**: 81-90.
- Ribaut J.M., Fracheboud Y., Monneveux P., Banziger M., Vargas M. et Jiang C. (2007).
 "Quantitative trait loci for yield and correlated traits under high and low soil nitrogen conditions in tropical maize." <u>Mol. Breeding</u> 20: 15-29.
- Ristic Z. et Ashworth E.N. (1993). "Changes in leaf ultrastructure and carbohydrates in Arabidospis thaliana L. (Heyn) cv. Columbia during rapid cold acclimation." <u>Protoplasma</u> 172: 111-123.
- Roberts J.K., DeSimone N.A., Lingle W.L. et Dure L. (1993). "Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos." <u>Plant</u> <u>Cell</u> 5: 769-780.
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B. et Bennett J. (2002). "A proteomic approach to analyzing drought and salt-responsiveness in rice." <u>Field Crops Res.</u> **76**: 199-219.
- Samuel M.A., Miles G.P. et Ellis B.E. (2002). "Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants." Plant J. **22**(4): 367-376.
- Sangwan V. et Dhindsa R.S. (2002). "In vivo and in vitro activation of temperatureresponsive plant map kinases." <u>FEBS Letters</u> **531**: 561-564.
- Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E. et Prat D. (2000). "Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes." <u>Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures</u> **9**(4): 311-327.
- Saranga Y., Jiang C.X., Wright R.J., Yakir D., Paterson A.H. (2004). "Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity." <u>Plant Cell Environ.</u> 27: 263-277.
- Sax K. (1923). "The association of size difference with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris.*" <u>Genetics</u> 8: 552-560.
- Sharma P., Sharma N. et Deswal R. (2005). "The molecular biology of the mow-temperature response in plants." <u>BioEssays</u> 27: 1048-1059.

- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. et Mann M. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-staining polyacrylamide gels." <u>Anal. Chem.</u> **68**: 850-858.
- Smallwood M. et Bowles D.J. (2002). "Plants in a cold climate." <u>Phil. Trans. R. Soc. Lond. B</u> **357**: 831-847.
- Sreenivasulu N., Sopory S.K. et Kishor P.B.K. (2007). "Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches." <u>Gene</u> **388**: 1-13.
- Steponkus P.L. (1978). "Cold hardiness and freezing injury of agronomic crops." <u>Adv. Agron.</u>**30**: 51-98.
- Stockinger, E.J., Gilmour S.J. et Thomashow M.F. (1997). "Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the Crepeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit." <u>PNAS</u> 94: 1035-1040.
- Storey J.D. et Tibshirani R. (2003). "Statistical significance for genome-wide experiments." <u>PNAS</u> **100**: 9440-9445.
- Strand A., Hurry V., Gustafsson P. et Gardeström P. (1997). "Development of Arabidopsis thaliana leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates."
 <u>Plant J.</u> 12: 605-614.
- Sung D.Y., Kaplan F., Lee K.J. et Guy C.L. (2003). "Acquired tolerance to temperature extremes." <u>Trends Plant Sci.</u> 8(4): 179-187.
- Sunkar R., Kapoor A. et Zhu J.K. (2006). "Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance." <u>Plant Cell</u> **18**: 2051-2065.
- Tafforeau M., Verdus M.C., Charlionet R., Cabin-Flaman A. et Ripoll C. (2002). "Twodimensional electrophoresis investigation of short-term response of flax seedlings to a cold shock." <u>Electrophoresis</u> 23: 2534-2540.
- Taji T., Ohsumi C., Iuchi S., Seki M., Kasuga M., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (2002). "Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*." <u>Plant J.</u> 29: 417-426.
- Thiellement, H., Bahrman N., Damerval C., Plomion C., Rossignol M., Santoni V., de Vienne D. et Zivy M. (1999). "Proteomics for genetic and physiological studies in plants." <u>Electrophoresis</u> 20: 2013-2026.

- Thiellement H., Zivy M. et Plomion C. (2002). "Combining proteomic and genetic studies in plants." J. Chromatogr. B **782**: 137-149.
- Thomashow M.F. (1999). "Plant cold acclimation : freezing tolerance genes and regulatory mechanisms." <u>Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.</u> **50**: 571-599.
- Toojinda T., Tragoonrung S., Vanavichit A., Siangliw J.L., Pa-In N., Jantaboon J., Siangliw M., Fukai S. (2005). "Molecular breeding for rainfed lowland rice in the Mekong region." <u>Plant Prod. Sci.</u> 8(3): 330-333.
- Tsarouhas V., Gullberg U., Lagercrantz U. (2004). "Mapping of quantitative trait loci (QTLs) affecting automn freezing resistance and phenology in *Salix*." <u>Theor. Appl. Genet.</u> 108: 1335-1342.
- Uemura M., Joseph R.A. et Steponkus P.L. (1995). "Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* : effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions." <u>Plant</u> <u>Physiol.</u> 109: 15-30.
- Uemura M., Warren G. et Steponkus P.L. (2003). "Freezing sensitivity in the sfr4 mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness." <u>Plant Physiol.</u> 131: 1800-1807.
- Wang S., Basten C.J. et Zeng Z.B. (2007). "Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. http://statgen.ncsu.edu/ qtlcart/WQTLCart.htm."
- Wang W., Vinocur B. et Altman A. (2003). "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance." <u>Planta</u> 218: 1-14.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. et Altman A. (2004). "Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response." <u>Trends Plant Sci.</u> 9(5): 244-252.
- Warren G., McKown R., Marin A. et Teutonico R. (1996). "Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." <u>Plant</u> <u>Physiol. 111</u>: 1011-1019.
- Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L. et Sumner L.W. (2003). "Mapping the proteome of barrel Medic (*Medicago truncatula*)." <u>Plant Physiol.</u> 131: 1104-1123.
- Weiser R.L., Walner S.J. et Waddel J.W. (1990). "Cell wall an extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings." <u>Plant Physiol.</u> 93: 1021-1026.

- Welbaum G.E., Bian D., Hill D.R., Grayson R.L. et Gunatilaka M.K. (1997). "Freezing tolerance, protein composition and ABA localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress." J. Exp. Bot. 48(308): 643-654.
- White P.J. (1998). "Calcium channels in the plasma membrane of root cells." <u>Ann. Bot.</u> **81**: 173-183.
- Wu J., Lightner J., Warwick N. et Browse J. (1997). "Low-temperature damage and subsequent recovery of *fab1* mutant *Arabidopsis* exposed to 2°C." <u>Plant Physiol.</u> 113: 347-356.
- Xin Z. et Browse J. (1998). "eskimo1 mutants of *Arabidopsis* and constitutively freezing-tolerant." <u>PNAS</u> **95**: 7799-7804.
- Xiong L., Lee H., Ishitani M., Tanaka Y., Stevenson B., Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M. et Zhu J.K. (2002). "Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*." <u>PNAS</u> 99(16): 10899-10904.
- Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (1994). "A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress." <u>Plant Cell</u> **6**: 251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (2005). "Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters." <u>Trends Plant Sci.</u> **10**(2): 88-94.
- Yang J., Sears R.G., Gill B.S., Paulsen G.M. (2002). "Quantitative and molecular characterization of heat tolerance in hexaploid wheat." <u>Euphytica</u> **126**: 275-282.
- Zhang Z.H., Su L., Li W., Chen W. et Zhu Y.G. (2005). "A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oriza sativa* L.)." <u>Plant Sci.</u> 168: 527-534.
- Zhu J., Chen S., Alvarez S., Asirvatham V.S., Schachtman D.P., Wu Y. et Sharp R.E. (2006).
 "Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins." <u>Plant Physiol.</u> 140: 311-325.
- Zivy M. (2006). <u>Quantitative analysis of 2D gels.</u> Totowa, New Jersey, USA, Humana Press.

Zuther E., Büchel K., Hundertmark M., Stitt M., Hincha D.K. et Heyer A.G. (2004). "The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*." <u>FEBS Letters</u> 576: 169-173.

Annexe 1 : Caractéristiques phénotypiques des lignées recombinantes

Type de feuilles (F : feuillu, af : *afila*), Nanisme (c : nain, L : normal), Rosette (o : avec, n : sans), Hr/hr (High response), Hr^* (incertain).

		рс	ort	
génotype	Feuille	nanisme	rosette	Hr
Champagne	F	С	0	Hr
LR-6	F	L	n	Hr
LR-9	af	С	0	Hr
LR-14	F	L	n	Hr
LR-16	af	с	ο	Hr*
LR-18	af	L	ο	Hr
LR-19	F	С	n	Hr
LR-20	F	L	ο	Hr
LR-21	af	L	ο	Hr
LR-22	F	с	n	Hr
LR-23	F	L	n	Hr
LR-24	af	с	ο	Hr
LR-25	F	L	ο	Hr
LR-26	F	С	ο	Hr
LR-29	F	С	ο	Hr
LR-31	af	L	ο	Hr
LR-34	F	С	n	Hr*
LR-35	af	L	ο	Hr
LR-40	F	С	ο	Hr
LR-45	af	L	ο	Hr
LR-46	F	С	n	Hr
LR-52	af	С	n	Hr
LR-60	af	с	ο	Hr*
LR-62	af	L	n	Hr*
LR-67	F	с	0	Hr
LR-70	af	L	n	Hr*
LR-74	F	с	n	Hr
LR-77	F	L	ο	Hr
LR-78	af	с	ο	Hr
LR-80	F	с	ο	Hr
LR-81	F	с	n	Hr
LR-83	F	L	n	Hr
LR-88	af	с	ο	Hr
LR-90	af	с	n	Hr
LR-91	af	с	ο	Hr
LR-92	af	L	n	Hr
LR-93	F	с	n	Hr
LR-95	F	с	ο	Hr

Annexe 2 : Protocole d'extraction des protéines.

<u>Jour 1</u> :

1- peser les Eppendorf 1,5mL

2- broyer les tissus dans un mortier avec de l'azote liquide

3- placer l'Eppendorf dans l'azote liquide pour le refroidir

4- mettre dans l'Eppendorf environ 100 à 150mg de poudre

5- ajouter 1mL de tampon de précipitation I (TCA 10%, β -mercaptoéthanol 0,07% et acétone)

6- placer les tubes à -20°C pendant 1h

7- centrifuger les tubes 20min à 4°C et 15 000g

8- éliminer le surnageant

9- ajouter au culot 1,5mL de tampon de précipitation II (β -mercaptoéthanol 0,07% et acétone)

10- homogénéiser et casser le culot avec une spatule

11- centrifuger les tubes 20min à 4°C et 15 000g

12- éliminer le surnageant

13- ajouter 1,5mL de tampon de précipitation II

14- mélanger et placer à -20°C pendant 1 nuit

<u>Jour 2</u> :

15- centrifuger les tubes 20min à 4°C et 15 000g

16- éliminer le surnageant

17- placer les Eppendorfs ouverts sous hotte pour éliminer l'acétone

18- quand les culots sont secs, peser les Eppendorfs pour en déduire la matière sèche

19- ajouter le tampon de lyse UKS (30µL par mg de matière sèche)

20- laisser les protéines se solubiliser 2h à 20-22°C au moins

21- centrifuger les tubes 20min à 22°C et 15 000g

22- récupérer le surnageant

23- faire des aliquots de 100 μ L d'échantillon avant de le conserver à –80°C (garder 2 μ L pour le dosage)

Tampon de lyse UKS (Zivy, 1986) :

Urée	9,5M
Triton 100	2%
K_2CO_3	50mM
Dithiothreitol (DTT)	30mM
SDS	1,25%

Annexe 3 : RCDC Protein Assay, BioRad.

1- Dans un Eppendorf, mettre 25 μ L d'échantillon (2 μ L précipités) à doser et préparer de la même façon la gamme de standards.

2- Ajouter dans chaque tube 125µL de solution RC1 et mélanger.

- 3- Incuber 1min à température ambiante.
- 4- Ajouter dans chaque tube 125µL de solution RC2 et mélanger.
- 5- Centrifuger 7min à 15000g et à température ambiante.
- 6- Eliminer le surnageant en retournant les tubes sur du papier absorbant.
- 7- Préparer la solution A' (5µL de solution DC S pour 250µL de solution DC A).
- 8- Ajouter 127 μ L de la solution A' et vortexer.
- 9- Incuber 5min à température ambiante (le précipité doit disparaître).
- 10- Homogénéiser puis ajouter 1mL de solution DC B et vortexer immédiatement.
- 11- Incuber 15min à température ambiante.
- 12- Lire l'absorbance à 750nm.

Annexe 4 : Composition du Laemli 2X.

20% (v/v)
100mM
10% (v/v)
0,2% (p/v)
4% (p/v)

Annexe 5 : Composition des gels d'acrylamide utilisés

Gel à 12,5% :

Acrylamide 30% 19:1	42% (v/v)
TrisHCl 1,5M pH8,8	377mM
Ammonium PerSulfate 10%	0,5% (v/v)
TEMED	0,05% (v/v)

Gel à 4% :

Acrylamide 30% 19:1	13% (v/v)
TrisHCl 0,56M pH6,8	362mM
Ammonium PerSulfate 10%	1,25% (v/v)
TEMED	0,25% (v/v)

Annexe 6 : Tampon de migration

Glycine	192mM
TrisHCl 1,5M pH8,8	25mM
SDS	0,05% (v/v)

Annexe 7 : Tampons utilisés pour l'IEF.

Tampon de réhydratation :

Urée	8M
CHAPS	4% (p/v)
DTT	20mM
Ampholytes	0,6% (4-6 : 0,4% et 5-8 : 0,2%)

Tampon d'équilibration :

Urée	6M
TrisHCl 1,5M pH8,8	0,375M
Glycérol	20% (v/v)
SDS	2% (p/v)

Annexe 8 : Coloration à l'argent

1- Après la migration, le gel est placé dans 300mL de fixateur[®] avec 0,1% de formaldéhyde 35% pendant 1h.

2- Effectuer 3 fois un rinçage de 20min dans de l'éthanol 50%.

3- Prétraitement : 1min dans 300mL de solution 1^{*}.

4- Effectuer 3 fois un rinçage de 20s dans de l'eau ultra pure.

5- Imprégnation : 20min dans 300mL de solution $2^{\text{*}}$.

6- Effectuer 2 fois un rinçage de 20s dans de l'eau ultra pure.

7- Révélation : placer le gel dans 300mL de solution 3^{*} jusqu'à ce que la révélation soit satisfaisante.

8- Effectuer un rinçage rapide dans de l'eau ultra pure puis arrêter la révélation dans le fixateur.

Fixateur :	
Acide acétique	12%
Ethanol	50%
Solution 1 :	
Thiosulfate de sodium	0,02% (p/v)
Solution 2 :	
AgNO ₃	0,1% (p/v)
Formaldéhyde 37%	0,075% (v/v)
Solution 3 :	
Thiosulfate de sodium	0,004% (p/v)
Carbonate de sodium	6% (p/v)
Formaldéhyde 37%	0,05% (v/v)

Annexe 9 : Coloration à l'argent ammoniacal.

(Chevallet et al., 2006)

1- Après la migration, le gel est placé dans 300mL de fixateur[®] pendant 1 nuit.

2- Effectuer 6 fois un rinçage de 10min dans de l'eau ultra pure.

3- Imprégnation : 25min dans 300mL de solution 1^{**}.

4- Effectuer 3 fois un rinçage de 5min dans de l'eau ultra pure.

5- Révélation : placer le gel dans 300mL de solution 2^{*} jusqu'à ce que la révélation soit satisfaisante.

6- Arrêter la révélation dans la solution 3[®].

Fixateur :

Acide acétique		10%
Ethanol		30%
2,7-naphthalene disulfoni	c acid	0,05% (p/v)
Solution 1 :		
AgNO ₃	24m	Μ
NaOH	15m	М
Ammonium hydroxide	75m	М
Solution 2 :		
Formaldéhyde 37%	0,1%	ó (v/v)
Acide citrique	0,04	1mM
Solution 3 :		
Ethanolamine	0,5%	ó (v/v)
Acide acétique	2%	

Annexe 10 : Coloration argentique de Shevchenko.

(Shevchenko et al., 1996)

1- Après la migration, le gel est placé dans 300mL d'eau ultra pure pendant 1h.

2- Placer ensuite le gel dans 300mL de fixateur[®] pendant 1 nuit

3- Effectuer un rinçage de 1h dans de l'eau ultra pure.

4- Prétraitement : 2min dans 300mL de solution 1^{*}.

5- Effectuer 2 fois un rinçage de 1min dans de l'eau ultra pure.

6- Imprégnation : 40min dans 300mL de solution 2[®] préalablement placée à 4°C.

7- Effectuer 2 fois un rinçage de 1min dans de l'eau ultra pure.

8- Révélation : placer le gel dans 300mL de solution $3^{\text{*}}$ jusqu'à ce que la révélation soit satisfaisante (minimum 15min).

9- Arrêter la révélation dans la solution 4[®].

Fixateur :	
Acide acétique	5%
Ethanol	50%
Solution 1 :	
Thiosulfate de sodium	0,02% (p/v)
Solution 2 :	
AgNO ₃	0,1% (p/v)
Solution 3 :	
Carbonate de sodium	2% (p/v)
Formaldéhyde 37%	0,014% (v/v)
Solution 4 :	
Acide acétique	1%

Annexe 11 : Coloration argentique de Morrissey.

(Morrissey et al., 1981)

1- Après la migration, le gel est placé dans 300mL de fixateur[®] pendant 1h.

2- Effectuer 3 rinçages de 20min dans de l'eau ultra pure.

3- Prétraitement : 40min dans 300mL de solution 1[®].

4- Imprégnation : 30min dans 300mL de solution $2^{\text{*}}$.

5- Effectuer un rinçage de 3min dans de l'eau ultra pure.

6- Révélation : placer le gel dans 300mL de solution $3^{\text{*}}$ jusqu'à ce que la révélation soit satisfaisante.

7- Arrêter la révélation dans la solution 4^{*} .

Fixateur :	
Acide acétique	10%
Ethanol	50%
Solution 1 :	
DTT	0,0005% (p/v)
Solution 2 :	
AgNO ₃	2,04% (p/v)
Solution 3 :	
Carbonate de sodium	327mM
Formaldéhyde 37%	0,033% (v/v)
Solution 4 :	
Acide acétique	3%

Annexe 12 : Extraction des métabolites.

1- Peser les échantillons, 100 à 150mg de matière fraîche pour avoir après lyophilisation entre 10mg à 20mg de matière sèche pour le système aérien et 5 à 15mg pour le système racinaire.

2- Extraction dans 1mL d'éthanol 80% à 60°C pendant 30min.

3- Centrifuger à 14000g pendant 15min à 4°C.

4- Récupérer le surnageant.

5- Resuspendre le culot dans 500µL d'éthanol 80%, broyer à nouveau le culot.

6- Réextraire pendant 15min à 60°C.

7- Centrifuger à 14000g pendant 15min à 4°C.

8- Récupérer le surnageant et le pooler avec le surnageant précédent.

9- Resuspendre le culot dans 200µL d'éthanol 80%.

10- Réextraire pendant 15min à 60°C.

11- Centrifuger à nouveau à 14000g pendant 15min à 4°C.

12- Récupérer le surnageant et le pooler avec les deux premiers.

14- Les 3 surnageants rassemblés sont séchés au speedvac.

15- Les extraits secs sont dissous dans 150μ L d'eau distillée pour les extraits foliaires et 100μ L pour les extraits racinaires.

16- Centrifuger 10min à 14000g et à 4°C.

17- Filtrer les surnageants à travers une membrane de 0,45µm (Alltech).

Annexe 13 : Carte génétique de Pisum sativum utilisée dans cette étude.

(Lejeune-Hénaut et al., 2008)



Annexe 14 : Liste des marqueurs de la carte génétique ayant une fonction connue. (d'après Aubert *et al.*, 2006)

Groupe de liaison	Marqueur	Identification
1	Agps2	ADP-glucose pyrophosphorylase S2
	FPBaldo	Fructose bisphosphate aldolase
	Af	Afila
2	COLb	Constans like b
	Α	Anthocyanin inhibition
	TE002011	Cell division cycle protein
	<i>TFL1c</i>	Terminal flower 1c (Floral repressor = Lf : late flowering)
	Cry2	Cryptochrome 2
	MDHc	Malate dehydrogenase
	PhyA	Phytochrome A
	PPIlike	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
	Sut1	Sugar transporter 1
	cOMT	Catechol-O-methyltransferase
3	Agpl1	ADP-glucose pyrophosphorylase L1
	RMS1	Ramosus1
	EMFa	Embryonic flower a
	EMFb	Embryonic flower b
	HR	High response
	M	Marbling
	TE002L09	Ribosomal protein S13
	Gpt	Glucose-6-P/phosphate translocator
	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
	Bfruct	β-fructofuranosidase
	Le	Brevi-internodium
4	FCA	Autonomous pathway
	Sucsyn	Sucrose synthase
	AGL20b	Agamous like 20b
5	Viola2	Violaxanthine de-epoxydase 2
	LD	luminidependens
	<i>TFL1a</i>	Terminal flower 1a (Floral repressor $=$ Lf)
	DHPS1	dihydrodipicolinate synthase 1
	AGL20a	Agamous like 20a
	Tri	Trypsin inhibitor activity
	TE002M14	Ribosomal protein L2
	Viola1	Violaxanthine de-epoxydase 1
	Gns2	β-1,3-glucanase
	COLa	Constans like a
6	Ga2ox	Gibberellin 2β-hydroxylase
	PGK2	Phosphoglycerate kinase 2
	Sus3	Sucrose synthase 3
	TE002E04	Putative N-carbamyl-L-amino acid amidohydrolase
	Gsp	Glutamine synthetase (chloroplaste)
	PI	PISTILLATA, Black hilum
7	ThaumatL	Thaumatin-like protein
	SOD9	Superoxide dismutase
	FPA	Autonomous pathway
	eEF1Bb	Translation elongation factor

Annexe 15 : Protéines identifiées dans les feuilles.

N° group	MW/pIexp	MW/pIthéo	Numéro accession	Référence	Localisation	N° KO	Fonction
F90	79796/4.9	fragment	1909352A	Heat shock protein hsp70	chl	-	chaperones and folding catalysts
F91	79611/4.9	75515/5.2	Q02028	Stromal 70 kDa heat shock-related protein	chl	-	chaperones and folding catalysts
F142	70058/4.9	61979/5.1	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F143 : L1	69733/4.9	61979/5.1	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F147	68767/5.5	62984/5.8	P08927	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	chl	-	chaperones and folding catalysts
F148	69088/5.6	62945/5.8	P08927	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta	chl	-	chaperones and folding catalysts
F152	68927/5.4	62945/5.8	P08927	RuBisCO subunit binding-protein beta subunit	chl	-	chaperones and folding catalysts
F155	68767/5.3	53708/5.3	Q95FJ6	ATP synthase beta subunit	chl		
F156	68767/5.4	53708/5.3	Q95FJ6	ATP synthase beta subunit	chl		
F161	68131/4.8	61941/5	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F167 : Lf1	67344/4.9	61941/5	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F219	61938/4.6	47522/4.4	P93508	Calreticulin precursor	RE		chaperones and folding catalysts
F260	57633/5.6	47719/5.3	Q6RIB7	Enolase	cyto		NRJ metabo : glycolyse
F267		61979/5.1	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F268		61979/5.1	P08926	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	chl	-	chaperones and folding catalysts
F314 : L2	52053/5.4	52141/6.3	Q7X9A0	RuBisCO activase alpha form precursor	chl	-	NRJ metabo : photosynthèse
F320	51309/5.8	49645/5.7	P45621	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	chl		porphyrin and chlorophylle metabolism
F323	50901/4.8	41037/4.6	Q10MB3	30S ribosomal protein S1	chl		
F324	51227/5.7	49645/5.7	P45621	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase	chl		porphyrin and chlorophylle metabolism
F326	50738/4.9	44787/5.4	P29344	30S ribosomal protein S1	chl		
F338	50174/4.8	50202/5.2	O22636	Poly(A) polymerase	cyto	-	chaperones and folding catalysts
F345 : Lf2	49221/5.5	41650/5.3	Q9M4Y1	Actin-like protein	cyto	K05692	Division cellulaire
F372	47825/5.3	48312/8.2	Q40565	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2	chl	-	NRJ metabo : photosynthèse
F374	46842/5.5	41650/5.3	Q9M4Y1	Actin-like protein, complete	cyto	K05692	Division cellulaire
F375	47902/4.7	50234/5.3	O22636	Poly(A) polymerase	cyto		
F377:L3	47673/5.4	37150/5.2	Q96483	Actin-51	cyto	K05692	Division cellulaire
F378	47978/5.6	42286/5.7	Q9LKJ2	Cytosolic phosphoglycerate kinase	cyto	K00927	NRJ metabo : carbon fixation
F381	47673/5	45871/5.5	P93162	Magnesium-chelatase subunit chll	chl	K03405	porphyrin and chlorophylle metabolism
F384 : L4	47293/5	45871/5.5	P93162	Magnesium-chelatase subunit chll	chl	K03405	porphyrin and chlorophylle metabolism
F390 : L5	46992/5.3	47901/7.5	O98997	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	chl	-	NRJ metabo : photosynthèse
F391 : L6	46767/5.1	45871/5.5	P93162	Magnesium-chelatase subunit chll	chl	K03405	porphyrin and chlorophylle metabolism
F394	47067/4.5	38402/4.6	Q9ZP40	Plastoglobulin-1	chl		
F395 : Lf3	46767/4.5	38378/4.4	Q9ZP40	Plastoglobulin-1	chl	-	
F416	45514/5.4	40492/5.4	P38661	Probable protein disulfide-isomerase A6 precursor	RE	-	chaperones and folding catalysts
F425	44153/5.6	44114/6	P27774	Phosphoribulokinase	chl		Calvin cycle

Annexe 15 (suite)

N° group	MW/pIexp	MW/pIthéo	Numéro accession	Référence	Localisation	N° KO	Fonction
F428	44294/5.2	42387/6.2	P46283	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	chl	K01100	carbohydrate metabo : carbone fixation
F432	44649/6.1	40/43/6.5	QISUH8	Pyridoxal-5-phosphate-dependent enzyme, beta subunit	chl	K01/38	NRJ metabo : sulfur metabo / amino acid metabo : cysteine metabo
F436	43801/5.3	42054/5.8	O20252	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	chl	K01100	carbohydrate metabo : carbone fixation
F437	44294/5.5	47901/7.6	O98997	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	chl		NRJ metabo : photosynthèse
F452 : Lf4	43383/6.5	35854/8.8	O48904	Malate dehydrogenase precursor	mito	K00026	Metabo : carboh metabo : citrate cycle, pyruvate metabo / NRJ metabo : carbon fixation
F484	41551/6.2	37826/5.4	Q01517	Fructose-bisphosphate aldolase 2	chl		NRJ metabo : glycolyse
F488 : L7	41485/5.7	40986/8.4	Q9ZUC1	At1g23740/F5O8_27	chl	-	oxidative phosphorylation
F491	40892/6	37826/5.4	Q01517	Fructose-bisphosphate aldolase 2	chl		NRJ metabo : glycolyse
F507	40373/4.7	31294/4.9	NP_564010.1	Unknown protein			
F515	40244/4.6	25307/4.4	Q6SZ89	Translational elongation factor 1 subunit Bbeta	RE	K03232	metabo : protein biosynthesis
F522 : Lf5	39669/6.3	37826/5.4	Q01517	Fructose-bisphosphate aldolase 2	chl		NRJ metabo : glycolyse
F539	38360/4.8	34119/4.9	Q2HTH4	PAP fibrillin			
F543 : L8	37752/5.1	37224/5.4	Q7XXS4	Thiamine biosynthetic enzyme	chl	K03146	-
F556	36976/4.6	31294/5	Q9FZ47	At1g16880 uridylyltransferase-related	chl		
F564	36623/5.3	40243/5.2	Q9AT39	SHOOT1 protein			
F577	35306/5.4	37224/5.4	Q7XXS4	Thiamine biosynthetic enzyme	chl	K03146	Thiamin biosynthesis
F584	35408/4.5	32150/4.8	O24306	33 kDa ribonucleoprotein	chl		mRNA processing
F606 : L11	34230/5.2	34871/6.3	P14226	Oxygen-evolving enhancer protein 1	chl	K02716	NRJ metabo : photosynthèse
F607 : L9	34563/6.4	28861/5.8	Q8H0D9	Alcohol dehydrogenase	mito	K09841	secondary metabo : carotenoïd biosynthesis
F611	34396/5	34871/6.3	P14226	Oxygen-evolving enhancer protein 1	chl	K02716	NRJ metabo : photosynthèse
F613 : L10	34396/5.8	46111/8.4	O04873	L-ascorbate peroxidase	chl		Detoxification
F620	34098/5.3	34871/6.3	P14226	Oxygen-evolving enhancer protein 1	chl	K02716	NRJ metabo : photosynthèse
F641 : L12	33251/4.7	23619/10.4	P28644	28 kDa ribonucleoprotein	chl		mRNA processing
F647	33251/4.4	25470/4.4	Q8L7U4	AT4g02450/T14P8_5			
F649 : L13	32995/4.7	31294/4.9	Q9FZ47	At1g16880	chl	-	
F656	32835/4.7	25231/4.4	P28644	28kD RNA binding protein			
F673	32206/6.3	35199/7.8	P43394	Fruit protein PKIWI502	chl		
F680	31896/5.6	27200/5.8	Q5JZZ3	Triose phosphate isomerase	cyto	K01803	NRJ metabo : carbon fixation
F681	31866/6.3	37749/8.2	Q9THX6	Putative ascorbate peroxidase	chl		Detoxification
F704 : L14	31104/5.5	31274/9.1	Q65XW4	Putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase	chl		Steroid synthesis
F718 : L15	30538/4.9	30863/6.5	Q8RU73	Ribose-5-phosphate isomerase precursor	chl	K01807	NRJ metabo : carbon fixation
F720 : Lf6	30508/5.9	20254/8.8	Q39852	Putative ATP synthase subunit	chl		
F723:L16	30391/5.2	28534/8.2	Q8LJP9	Dehydroascorbate reductase	cyto	K01873	amino acid metabo : valine, leucine and isoleucine biosynthesis
F734 : L17	30011/5.6	20540/5.2	P48493	Triose phosphate isomerase	cyto	K01803	NRJ metabo : carbon fixation
F739 : L18	29837/4.8	28733/5.7	Q94IC4	Ferritin 2	chl	-	stockage Fer

Annexe 15 (suite)

N° group	MW/pIexp	MW/pIthéo	Numéro accession	Référence	Localisation	N° KO	Fonction
F748:L19	29351/5.6	25234/5.9	Q84VH2	Glutathione S-transferase	cyto	-	Metabo : carboh metabo
F768	28628/5.9	26562/6.8	Q9M5A8	Chaperonin 21 precursor	chl	-	chaperones and folding catalysts
F785	27767/4.9	28863/5.9	Q93X25	2-Cys peroxiredoxin	chl		Detoxification
F817:L20	25179/5.8	28030/8.4	P16059	Precursor for 23-kDa protein of photosystem II OEE2	chl	K02717	NRJ metabo : photosynthèse
F850	21367/5.6	26547/8.6	Q41651	Cyclophilin	chl		chaperones and folding catalysts
F876	19808/4.7	24684/9.1	Q949U7	Peroxiredoxin-like protein	chl		Detoxification
F877	19704/4.8	24684/9.1	Q949U7	Peroxiredoxin-like protein	chl		Detoxification
F879 : L22	19580/5.3	17488/5.1	Q1T055	Bet v I allergen	cyto	-	défense
F880 : L21	19663/4.5	17676/5.1	Q4LAP1	Glycine decarboxylase multi-enzyme complex, H subunit	mito	K02437	Glycine degradation
F882:Lf7	19314/4.6	17676/5.1	P16048	Glycine cleavage system H protein	mito	K02437	Glycine degradation
F888 : Lf8	19233/5.7	20626/5.9	P11964	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	chl		Detoxification
F903	18343/4.4	11486/4.6	Q3HVP0	60s acidic ribosomal protein			
F914	17477/6.1	16000/6.2	P82323	Unknown protein	chl	-	
F916	17385/4.4	17154/5	P16002	Plastocyanin	chl	K02638	NRJ metabo : photosynthèse (transport e-)
F917	16987/4.4	17154/5	P16002	Plastocyanin	chl	K02638	NRJ metabo : photosynthèse (transport e-)
F925 : L24	16321/6.6	20218/9.3	P07689	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3A	chl	K01602	carbohydrate metabo : carbone fixation
F926 : L25	16219/6.2	20231/9.5	P00869	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 3C	chl	K01602	NRJ metabo : carbon fixation
F939	13850/5.3	14410/8.9	NP_001065426.1	Cpn10	chl ou mito	-	chaperones and folding catalysts
F958	69410/5.7	61130/6.2	Q05046	Chaperonin CPN60-2	mito	K04077	chaperones and folding catalysts
F974 : L23	18635/4.4	17143/4.9	P16002	Plastocyanin	chl	K02638	NRJ metabo : photosynthèse (transport e-)

Annexe 16 : Concentration moyenne des métabolites dans les parties aériennes des plantes soumises à la phase d'acclimatation au froid (3 répétitions biologiques).

T1 : après 10 jours de nurserie, T _A 3 : après 10 jours d'acclimatation au	froid
Raf : raffinose, Sac : saccharose, Glc : glucose et Cit : citrate ; "." : don	née manquante

	PARTIES AERIENNES										
		T1				T _A 3					
génotype	Raf	Sac	Glc	Cit	Raf	Sac	Glc	Cit			
Champagne	0.013	1.913	3.685	0.713	0.205	7.769	4.510	2.138			
LR-6	0.000	1.857	4.977	0.907	0.273	6.773	6.850	2.533			
LR-9	0.073	2.137	5.160	0.467	0.030	5.140	4.920	0.700			
LR-14	0.023	2.457	4.947	0.813	0.123	10.295	6.715	3.275			
LR-16		2.350	3.560	0.493	0.037	3.797	2.740	0.873			
LR-18	0.110	2.497	5.557	0.803	0.027	5.307	5.157	0.763			
LR-19	0.015	2.097	2.933	0.933	0.203	7.123	5.217	3.030			
LR-20	0.007	1.763	4.847	0.793	0.240	4,447	5.915	2.065			
LR-21	0.000	1.920	6.467	0.747	0.033	5.230	6.503	2.210			
LR-22	0.000	1.743	3.080	0.927	0.335	4.130	3.270	1.387			
LR-23	0.000	2,383	5.687	1.093	0.210	8,730	6.947	3.203			
LR-24	0.013	1 793	5 127	0 797	0 150	4 783	6.060	2 465			
LR-25	0.000	2 633	6.013	0.927	0.210	8 620	7 100	2 763			
LR-26	0.000	2 557	4 040	0.580	0.050	6 707	3 743	1 900			
LR-29	0.070	2 107	3 793	0.000	0.000	9.077	4 507	2 760			
LR-31	0.070	2.107	6 503	1 040	0.013	5.050	6.000	1 940			
LR-34	0.010	1 617	2 320	0.490	0.040	3 790	1 757	1.040			
LR-35	0.010	1.577	5 857	0.400	0.000	5.073	6.020	1.010			
LR-40	0.040	1.877	3.547	0.680	0.000	0.070	4 703	3 025			
LR-45	0.007	1 712	5.047	0.000	0.150	3.000 4.627	5.620	1 707			
LR-46	0.017	1.713	3.540	0.307	0.170	6 257	3.020	2.540			
LR-52	0.010	2 150	1 227	0.202	0.303	6 470	3.900 4.670	2.540			
LR-60	0.000	2.150	4.307	0.505	0.100	2 227	2 270	0.940			
LR-62	0.010	1 902	4.303	0.455	0.033	3.221	2.370	0.000			
LR-67	0.010	1.003	3.310	0.720	0.007	3.003	2.007	0.900			
LR-70	0.017	2.030	3.510	0.903	0.323	1./1/	4.107	2.565			
LR-74	0.010	1.907	4.050	0.523	0.027	4.007	3.713	0.990			
LR-77	0.015	1.703	2.007	0.410	0.197	9.017	4.277	2.023			
LR-78	0.017	1.000	4.017	0.040	0.177	4.347	4.413	1.000			
LR-80	0.010	2.487	3.640	1.037	0.133	5.090	4.190	1.133			
LR-81	0.000	2.073	4.907	0.863	0.540	6.357	5.420	2.400			
LR-83	0.010	1.963	2.310	1.017	0.463	5.850	3.683	1.327			
LR-88	0.017	2.167	3.320	0.530	0.073	7.613	4.360	1.723			
LR-90	0.020	2.547	2.930	0.560	0.217	5.150	3.787	1.183			
LR-91		2.323	3.223	0.757	0.060	5.383	3.920	1.253			
LR-92	0.050	2.237	4.443	0.430	0.010	4.957	4.787	1.040			
LR-93	0.015	2.167	4.090	0.720	0.067	6.673	5.067	1.847			
LR-95		2.340	3.113	0.810	0.337	8.043	4.953	1.817			
LR-96	0.015	2.140	2.877	1.410	0.220	8.890	3.740	1.810			
LR-101	·	2.727	3.217	1.080	0.037	4.883	4.063	1.113			
LR-102	0.080	2.467	5.467	0.433	0.047	9.973	5.130	3.005			
LN-102		1.193	1.513	1.513	0.283	5.743	4.103	1.500			

Annexe 16 (suite)

-	PARTIES AERIENNES									
-		T1				T _A 3				
génotype	Raf	Sac	Glc	Cit	Raf	Sac	Glc	Cit		
LR-103	0.043	1.960	5.157	0.350	0.050	4.947	4.860	0.643		
LR-106	0.077	2.317	5.403	0.420	0.043	9.873	6.673	1.390		
LR-109	0.010	2.450	3.717	0.687	0.237	11.230	5.417	2.063		
LR-114	0.020	1.680	3.557	0.960	0.213	6.307	7.125	3.100		
LR-115	0.020	2.107	3.490	0.437	0.117	9.147	5.240	1.487		
LR-118	0.000	1.777	4.023	1.240	0.307	4.745	4.603	1.573		
LR-119	0.035	2.577	3.875	0.997	0.020	4.590	4.270	1.227		
LR-121	0.010	2.355	2.767	0.437	0.137	5.120	4.027	1.157		
LR-123	0.010	2.373	2.813	1.180	0.457	6.063	3.337	1.370		
LR-130		1.560	3.757	0.860	0.027	1.903	1.943	0.783		
LR-134	0.057	1.900	3.407	0.410	0.060	7.573	4.957	1.180		
LR-138	0.010	2.017	3.027	0.433	0.080	4.267	2.927	1.017		
LR-145	0.040	1.727	4.700	0.333	0.017	5.733	5.497	1.007		
LR-146	0.013	1.887	2.487	0.580	0.150	4.737	2.253	1.110		
LR-149	0.010	1.897	3.343	0.500	0.030	3.267	2.920	0.790		
LR-150	0.005	1.203	2.190	0.260	0.040	5.727	5.290	1.090		
LR-152	0.010	2.037	2.873	0.810	0.053	2.533	1.643	0.693		
LR-156	0.010	2.273	3.283	0.577	0.177	4.157	2.217	0.927		
LR-160	0.000	1.277	2.793	0.757	0.123	2.627	2.840	1.057		
LR-163	0.017	1.777	2.800	1.230	0.270	6.977	3.767	3.283		
LR-164	0.015	1.710	4.540	0.797	0.023	3.850	4.417	1.080		
LR-165	0.023	2.167	4.197	0.363	0.073	10.587	7.457	1.653		
LR-167	0.010	1.333	2.770	0.687	0.077	3.983	2.847	1.310		
LR-178	0.000	1.503	3.453	0.877	0.120	2.233	2.047	0.810		
LR-180	0.000	1.943	3.890	0.943	0.143	6.823	4.093	2.555		
LR-181	0.000	1.650	4.480	0.980	0.043	2.470	2.557	0.893		
LR-183	0.010	1.707	2.170	0.517	0.093	3.343	1.547	0.590		
LR-186	0.010	2.165	2.427	0.400	0.067	2.310	1.733	0.577		
LR-187	0.013	1.573	4.173	0.310	0.027	6.373	5.527	1.070		
LR-190	0.010	2.350	4.370	0.637	0.117	7.810	3.313	1.517		
LR-194	0.013	1.773	3.670	0.460	0.043	9.960	3.573	1.980		
LR-196	0.020	2.173	5.190	0.453	0.050	8.000	6.170	1.110		
LR-200		1.603	2.557	0.490	0.080	4.163	2.977	1.183		

Annexe 17 : Concentration moyenne des métabolites dans les racines des plantes soumises à la phase d'acclimatation au froid (3 répétitions biologiques).

T1 : après 10 jours de nurserie, T_A3 : après 10 jours d'acclimatation au froid	
Raf : raffinose, Sac : saccharose, Glc : glucose et Cit : citrate ; "." : donnée manquan	te

_	Racines									
		T1				T _A 3	6			
génotype	Raf	Sac	Glc	Cit	Raf	Sac	Glc	Cit		
Champagne	0.098	12.171	10.907	4.049	0.159	43.316	32.403	14.836		
LR-6		9.320	22.740	10.523	0.203	32.437	57.477	13.530		
LR-9	0.203	14.690	20.560	3.320	0.070	27.947	31.043	7.337		
LR-14		8.757	23.857	9.263	0.070	30.497	42.567	12.517		
LR-16	0.035	16.000	22.470	2.833	0.143	24.197	28.200	8.503		
LR-18	0.225	12.130	17.420	2.983	0.107	26.577	29.297	8.747		
LR-19	0.050	10.673	24.117	12.630	0.000	33.610	57.663	16.507		
LR-20	0.020	3.997	12.750	3.397	0.150	28.620	25.837	9.757		
LR-21		9.653	30.570	10.280	0.110	28.357	50.870	11.627		
LR-22	·	4 955	19.500	4 347	0 150	14 455	17 850	10 153		
LR-23	·	7 627	23 210	10 025	0 160	50 383	51 565	17.387		
LR-24	•	7.870	27 975	11 730	0.000	27 960	30 703	16 587		
LR-25	0 160	10 370	16 255	7 080	0.000	48 430	48 437	6 950		
LR-26	0.100	15 140	17 722	2 1 9 2	0.425	20 202	40.407	7 200		
LR-29	0.193	15.140	26.002	2 617	0.145	29.293	40.400	12 247		
LR-31	0.107	10.923	20.003	3.017	0.073	40.790	00.937	13.247		
LR-34	0.070	1.191	10.470	3.935		33.003	30.070	10.950		
LR-35	0.140	12.177	14.710	2.247	0.110	27.500	30.880	10.867		
LR-40	0.163	12.267	9.030	2.223	0.080	27.903	34.577	6.567		
LR-45	0.060	9.813	20.387	4.170	•	37.217	57.397	21.560		
LR-46		8.495	26.020	6.135	•	25.160	30.883	15.380		
LR-52	0.100	7.990	23.260	3.425		28.217	40.710	15.703		
LR-60	0.160	12.027	10.747	2.087	0.230	44.410	125.070	35.875		
LR-62	·	16.093	20.430	2.353	0.113	24.230	24.570	6.367		
LR 02	0.050	15.047	18.237	2.883	0.127	22.173	23.220	9.100		
		10.510	28.623	11.530	0.157	41.870	52.480	4.713		
	0.030	16.610	17.653	2.790	0.143	18.240	26.037	7.647		
LR-74	0.020	21.677	20.407	1.943	0.180	50.993	38.717	13.467		
	•	5.997	15.967	5.417	0.173	32.710	29.600	10.173		
LR-78	0.050	24.320	26.890	4.853	0.070	37.953	25.313	11.787		
LR-80	0.070	9.793	24.457	10.155	0.345	37.830	42.270	10.780		
LR-81	0.045	19.863	21.320	3.297	0.685	52.843	40.770	16.670		
LR-83	0.030	23.590	26.267	3.900	0.207	38.767	30.363	11.087		
LR-88	0.030	27.470	25.960	6.417	0.117	29.387	24.697	8.133		
LR-90		18.783	17.210	2.390	0.073	27.583	19.380	7.420		
LR-91	0.167	11.167	17.070	2.157	0.220	22.310	32.813	5.623		
LR-92	0.060	15.997	21.767	3.423	0.217	26.557	26.410	9.553		
LR-93	0.045	21.450	16.037	2.417	0.143	34.697	30.343	9.237		
LR-95	0.030	26.867	22.330	3.683	0.360	75.810	37.033	17.693		
LR-96		18.637	17.947	2.397	0.043	21.060	13.700	5.187		
LR-101	0.210	13.773	21.520	2.167	0.025	48.007	51.635	10.883		
LR-102	0.040	21.537	21.267	3.560	0.133	24.107	17.757	6.580		

Annexe 17 (suite)

-	RACINES										
-		T1				T _A 3					
génotype	Raf	Sac	Glc	Cit	Raf	Sac	Glc	Cit			
LR-103	0.140	12.200	9.183	2.153	0.120	20.590	14.845	4.685			
LR-106	0.237	15.167	18.260	3.323	0.200	39.557	39.233	7.793			
LR-109	0.057	16.723	22.913	2.580	0.227	33.440	27.150	7.740			
LR-114		5.650	13.650	5.677	0.100	26.920	27.757	8.693			
LR-115		20.915	25.330	2.020	0.223	32.427	33.270	8.740			
LR-118		9.883	31.463	11.593	0.313	21.693	40.950	11.910			
LR-119		22.610	20.895	2.600	0.030	25.373	19.520	8.633			
LR-121		19.933	22,883	2.350	0.063	24.427	23.803	7,757			
LR-123	0.040	19.253	26.347	2.190	0.513	45.910	33.133	11.513			
LR-130		8.100	18,240	6.957	0.080	20.630	17,793	10.590			
LR-134	0 167	9.567	11 843	1 893	01000	30,320	30 843	8 870			
LR-138	0.101	11 225	13 133	2 217	0 153	29 840	26 620	9 733			
LR-145	0.055	9 940	11 190	1 767	0.025	30 907	25.875	7 947			
LR-146	0.000	17 537	17 100	3 880	0.020	0.055	40 453	12 033			
LR-149	0.000	19 250	25 713	4 497	0.147	22 525	15 960	10 453			
LR-150	0.040	9 263	11 047	1 983	0.100	31 920	27 173	0 343			
LR-152	0.007	10 800	17 823	4 230	0 160	23 937	21.175	7 817			
LR-156	0.040	22 /33	1/ 213	3 860	0.100	0 185	21.040	0.233			
LR-160	0.030	7 740	15 510	4 723	0.240	10 767	14 590	7 967			
LR-163	0.030	8 200	23 507	9.025	0 280	30 763	43.467	16 443			
LR-164	0.000	6 713	18 / 27	6 803	0.200	23.640	38 105	12 130			
LR-165	0.160	0.710	8 000	2 560	0.050	23.040	47 113	10.010			
LR-167	0.100	6 100	13 3/0	6 377	0.050	25 3/3	21 177	0.853			
LR-178	•	4 457	10.843	4 633	0.000	25.345	21.177	10 347			
LR-180	•	4.407 8.607	18 810	4.000	0.477	25.300	20.700	16 /53			
LR-181	•	6 863	18 957	5 703	0.020	1/ 5/3	20 710	10.400			
LR-183		20.003	20.200	3.400	0.020	21 072	10 860	6 970			
LR-186	0.090	20.203	20.200	3.490	0.090	21.073	19.000	0.070			
LR-187	0.040	0 167	7 277	3.327	0.050	10.097	14.203	5.755			
LR-190	0.000	0.107	1.211	1.///	0.050	21 027	15 070	0.103			
LR-194	0.030	21.09/	22.123	3.013	0.053	∠1.03/ 0.125	10.970	10 047			
LR-196	0.050	20.390	20.440	4.307	0.150	0.100	44.000 29.105	12.017			
LR-200	0.140	0.407	7.107	1.700		00.000	20.190	9.000			
	0.063	19.257	21.050	4.090	0.053	22.630	17.183	1.131			

Annexe 18 : Tableau récapitulatif des PQL détectés pour chaque spot.

Les lignes surlignées correspondent aux spots identifiés.

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R^2	а
F64	1	3.28	4	3	Sucsyn	6.134	27.3	0.007
F83	0	4.23						
F89	1	4.13	7	8	AB133	4.131	18.81	-0.028
F90	0	4.01						
F91	1	3.78	3	28	Y15.1050	4.214	32.26	0.074
F95	0	3.81						
F97	1	3.5	3	16	V17.1400	3.59	39.99	0.014
F99	1	3.54	7	26	AA07.170	4.71	29.14	0.014
F103	1	3.22	3	45	R13.850	4.637	20.38	-0.039
F109	1	4.35	6	2	Y15.550	5.704	26.67	0.015
F110	0	3.83						
F113	2	3.59	3	34	Gpt	4.385	20.01	-0.011
		3.59	7	18	AB136	5.944	30.19	0.012
F120	0	4.21						
F121	3	3.09	3	46	bfruct	3.194	16.15	-0.018
		3.09	5	20	Viola1	3.193	15.34	-0.017
		3.09	6	4	PGK2	4.066	23.32	0.022
F124	0	3.69						
F131	0	3.95						
F132	2	4.08	3	13	G09.1100	4.196	22.34	0.024
		4.08	5	15	Tri	5.443	31.14	-0.024
F142	0	4.06						
F143	2	3.46	3	28	Y15.1050	6.025	31.42	0.088
		3.46	4	1	AA386	4.54	21.59	0.054
F145	0	3.45						
F147	2	3.37	3	12	Z03.1500	4.87	24.38	0.133
		3.37	5	17	AA163.2	4.675	27.27	-0.134
F148	1	3.48	7	12	AD146	4.916	24.22	-0.169
F151	1	3.25	3	7	E16.650	3.563	20.67	0.04
F152	3	3.68	3	12	Z03.1500	10.398	55.45	0.184
		3.68	3	16	V17.1400	3.767	22.45	-0.118
		3.68	4	7	G16.1000	3.777	14.51	0.079
F155	0	3.33						
F161	1	3.44	7	11	V12.700	6.306	31.62	-0.036
F164	0	3.31						
F167	1	3.83	4	1	AA386	5.231	26.91	0.055
F168	0	3.76						
F173	3	3.74	3	40	AA355	4.106	12.06	-0.029
		3.74	4	24	N14.950	14.024	62.77	0.062
		3.74	5	5	LD	6.838	20.35	-0.039
F185	1	3.55	2	29	E12.490	3.781	23.24	-0.018
F191	1	3.71	5	15	Tri	4.733	27.59	-0.082
F192	0	3.53						
F193	1	4.06	4	1	AA386	5.21	28.25	0.023
F204	1	2.81	6	27	AC76a	3.511	21.19	0.043
F207	1	3.51	6	7	O04.850	3.829	17.97	0.065

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R^2	а
F218	3	3.07	3	9	HR	4.321	50.92	0.114
		3.07	3	16	V17.1400	5.206	26.29	0.074
		3.07	6	12	AD159	6.557	48.73	-0.274
F220	1	3.54	1	16	D21	4.861	32.15	0.265
F245	4	3.12	4	20	AB45	4.109	18.64	0.032
		3.12	6	1	Ga2ox	3.416	15.14	-0.031
		3.12	6	7	O04.850	5.125	25.46	0.039
		3.12	7	14	D24	3.515	15.38	0.029
F246	1	3.5	7	8	AB133	5.554	31.58	0.071
F252	3	3.81	3	10	M	8.3	43.16	0.076
. 202	Ū	3.81	4	25	S04.750	4,194	17.43	-0.045
		3.81	5	10	O09.800	7.212	35.8	-0.063
F257	3	3.93	4	6	V12 1600	4 569	27 79	-0.068
1207	0	3 93	5	15	Tri	4.005	25.4	-0.058
		3.93	3 7	13	AA160	3 933	20.4	-0.053
E259	2	3.92	1	10	AC75	4 193	24.65	0 1744
1200	2	3.92	3	q	HR	6 198	24.00 40 71	0.1744
E260	2	3.28	2	9	C20a	4 972	30.9	0.16
1200	2	3.28	6	6	K16.450	5.624	34.77	0.202
F264	2	2.82	2	9	C20a	2 835	14.57	-0.046
. 20 .	-	2.82	-	11	13.1000	5.62	35.08	0.09
F265	1	3 23	3	7	E16.650	6.336	49.68	0.071
F266	1	3.45	5	5		3 672	10 10	0.008
F260	2	3.61	1	16	D21	17 7/8	/1 31	0.000
1203	2	3.61	3	۱0 ۵	ЦР	18 707	38.05	0.270
E270	1	3.84	1	13	AB28	5 262	43.68	-0.050
F272	2	3 /0	1	16	D21	10 3/2	45.00	0.000
1212	2	3 49	3	9	HR	12 025	61 42	0.34
F276	1	3.06	1	4	AA121	5 119	31.68	0.079
F280	0	3.62	I	-	70(121	0.110	01.00	0.070
F289	3	3 41	2	18	AB100	4 189	21	0.03
1 200	U	3 41	2	31	COMT	5 149	27.31	0.035
		3.41	_ 4	19	AA122	4 653	27.05	-0.035
F294	3	2 74	1	15	R11 730	3 266	21.81	-0.612
1204	0	2.74	3	9	HR	12 232	40.69	0.24
		2.74	5	16	AD79	4 121	29.04	-0.063
F305	2	3.08	3	11	13 1000	3 451	20.64	0.053
	-	3.08	5	17	AA163.2	4.529	23.01	-0.053
F309	1	3.61	2	22	PhyA	3.624	27.05	0.013
F310	1	3.8	1	4	AA121	5.956	36.95	0.059
F315	0	4.41		•		0.000	00.00	0.000
F316	1	3 91	4	25	S04 750	6 384	45 42	0.0317
F320	1	3 94	6	22	TE002E04	3.902	19.38	0.061
F324	1	3.1	5	17	AA163.2	4 957	40.44	0 144
F326	2	3.96	2	24	Sut1	4 689	30.15	-0.073
1 020	2	3.96	6	23	Gsp	3.808	23.78	0.064
F334	2	3 42	3	7	E16 650	3 423	25.75	0.056
1 004	L	3 42	7	, 6	Thaumati	3 791	23.7	-0 035
F335	1	3.71	. 1	16	D21	6.906	41.53	0.096
F338	3	3.59	3	37	AD174	4.044	20.9	-0.018
. 000	Ŭ	3,59	4	25	S04.750	3.96	17.98	0.017
		3.59	6	9	E12.900	3.701	16.86	-0.018
		0.00	v	v	12.000	0.101	.0.00	0.010

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	marqueur		LOD	R^2	а
F339	4	3.84	2	29	E12.490	4.198	31.57	0.058
		3.84	4	18	F08.200	5.243	22.66	0.05
		3.84	5	15	Tri	7.171	34.96	-0.066
		3.84	7	13	AA160	4.326	17.66	-0.045
F343	0	3.03						
F345	1	3.59	3	37	AD174	3.658	26.14	-0.281
F347	1	3.61	1	7	R13.1800	5.243	40.57	-0.214
F348	3	4.21	3	17	L13.920	9.659	52.81	-0.067
		4.21	3	25	TE002L09	7.021	29.19	0.053
_		4.21	3	35	N01.720	4.708	20.33	-0.038
F349	2	2.93	6	11	AA200	2.945	18.55	-0.005
		2.93	6	16	AD59	4.77	27.18	0.007
F351	3	2.65	2	23	PPIlike	3.147	19.81	0.047
		2.65	3	39	PGK1	3.535	20.85	-0.057
		2.65	4	8	AA285	3.037	17.36	0.041
F354	0	3.9						
F355	1	3.99	3	16	V17.1400	6.632	52.23	0.023
F365	2	3.69	5	11	AA99	5.272	32.11	-0.043
		3.69	6	13	AD60	6.39	31.37	-0.039
F367	2	3.3	3	12	Z03.1500	4.277	20.16	0.046
_		3.3	5	9	AB47	4.3	20.64	0.037
F370	3	3.71	3	12	Z03.1500	4.2	24.9	0.145
		3.71	5	24	AD175	4.173	24.37	0.136
_		3.71	7	10	N14.1500	5.662	35.87	-0.169
F372	0	3.64						
F374	2	3.52	2	22	PhyA	3.664	26.18	-0.531
		3.52	7	2	Y02.650	3.67	24.35	-0.409
F377	3	3.77	1	7	R13.1800	3.755	17.93	0.166
		3.77	5	6	AA497	3.724	18.15	0.17
		3.77	5	23	Gns2	4.357	21.57	0.158
F378	1	3.75	3	11	L13.1000	3.97	29.8	0.22
F382	0	3.77						
F384	1	3.73	6	8	H11.750	3.55	20.39	0.044
F385	1	3.45	3	10	М	4.47	21.09	0.33
F387	1	4.07	2	23	PPIlike	4.363	25.92	0.077
F389	2	3.05	1	16	D21	5.225	33.48	0.04
		3.05	7	13	AA160	3.833	21.83	0.017
F390	2	3.51	2	22	PhyA	5.324	27.61	-0.172
		3.51	4	21	AC22	3.611	15.94	0.13
F391	1	3.32	4	1	AA386	4.435	24.92	0.028
F392	0	3.18						
F398	0	3.05						
F403	0	3.53						
F406	2	4.16	2	23	PPIlike	6.979	45.76	0.24
		4.16	3	45	R13.850	4.375	29.42	-0.186
F408	3	2.84	3	4	RMS1	3.541	17.36	0.063
		2.84	6	11	AA200	3.726	18.48	-0.058
		2.84	7	1	AA456	2.884	13.6	-0.041
F414	1	3.85	5	5	LD	4.566	25.89	0.054
F416	1	3.74	4	13	AA92	5.452	24.57	-0.01
F425	0	4.09						

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R^2	а
F428	2	4.12	4	16	Q08.950	5.068	36.49	0.189
		4.12	6	7	O04.850	3.871	27.79	0.167
F429	1	3.79	7	5	AA416	4.52	24.42	-0.114
F430	1	3.13	3	39	PGK1	4.966	29.26	-0.018
F431	0	3.47						
F432	2	3.75	1	16	D21	7.097	39	0.029
		3.75	3	11	L13.1000	6.311	34.89	0.018
F436	1	3.01	2	31	cOMT	6.276	29.89	-0.39
F437	2	3.89	2	6	AD148	3.645	20.14	0.033
		3.89	4	24	N14.950	4.47	26	-0.039
F439	1	3.9	3	38	AB140	3.969	27.83	-0.06
F443	1	3.21	3	11	L13.1000	3.478	23.44	0.023
F449	0	3.83						
F451	0	3.82						
F452	1	3.72	1	16	D21	3.683	28.55	0.337
F460	3	3.78	2	12	TE002011	3,799	17.8	0.044
	Ū	3.78	-	23	AA278	4.454	22.05	0.047
		3.78	3	48	AB64	4.268	20.83	-0.047
F461	0	3.75	0	10	7.201		20.00	0.0 11
F469	0	3.5						
F470	1	3.32	3	9	HR	5 403	27 75	0 219
F478	0	3.64	0	0		0.100	21.10	0.210
F484	0	3.66						
F487	2	2 38	3	19	E16 550	4 683	21.28	0.043
1407	2	2.30	5	5	L 10.550	73	12 05	-0.043
F/88	1	3.82	3	11	1 13 1000	1.002	23.8	0.067
F/01	2	3.73	3	12	703 1500	8 318	57.07	0.443
1431		3.73	3	16	V17 1400	4.81	36.66	-0 319
F492	1	4.04	2	33	V02 1200	4 287	27.21	-0.019
F495	1	4.04	1	16	D21	4 644	27.52	0.013
E400	0	2.54	1	10	DZT	4.044	21.52	0.114
E500	1	3.04	7	22	101 750	4.066	30.65	-0.020
F510	2	3.00	1	5	C20b	4.000	34.33	0.166
1310	2	3.22	1	10	AC75	4.405	25 34	-0.214
EE20	2	3.22	2	13	A073	5.012	20.04	0.025
F320	2	2.95	5	43	AD33 A A 102	2.013	JZ.17 15.9	0.035
E522	2	2.95	2	20	111 1000	2.945	17.40	0.675
1 522	5	3.63	5	24 A	ΔΔ81	4 962	21.3	-0.231
		3.63	5	15	Tri	7 572	/3.61	-0.201
F525	2	3.65	3	10	E16 550	4 798	25.62	0.08
1 020	2	3.65	7	24	ET0.550	4 208	20.02	-0.075
E533	1	3.61	3	11	113 1000	3 782	20.57	-0.058
F537	0	3 53	5		E13.1000	5.702	20.07	0.000
E542	1	3.33	6	1	PCK2	6 711	11 15	0.036
E542	1	3.70	6	4	H11 750	1 159	27.72	0.10
E5/7	1	3.10	2	0 0	ΔΔ175	4.100	26.24	0.13
F347		3.40	3	0	AA175	4.23	20.24	0.173
F330	0	3.70						
F304	0	4.17	1	1	0.0404	ΛΕΛΓ	24.00	0.407
F3//	2	3.78	2	4	AA121	4.545	21.99	0.107
EE00	0	3.78	3	10	V17.1400	3.781	33.1	0.12
F582	2	3.74	2	16	AA233	3.894	15.7	-0.038
		3.74	2	27	001.450	4.759	20.23	-0.042

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R^2	а
F606	2	3.99	3	11	L13.1000	8.41	63.04	-0.547
		3.99	3	13	G09.1100	4.307	25.19	0.374
F607	0	3.43						
F609	0	3.75						
F611	2	3.71	2	12	TE002011	4.446	27.57	-0.157
		3.71	4	5	AD186.2	4.025	24.31	0.138
F620	0	4.01						
F621	0	3.4						
F627	1	3.41	7	26	AA07.170	5.761	29.66	-0.015
F634	1	3.4	7	8	AB133	3.515	19.27	-0.045
F636	2	2.95	1	16	D21	3.414	28.95	0.068
		2.95	3	9	HR	5.01	30.79	0.058
F639	1	3.2	5	11	AA99	3.435	21.64	-0.011
F644	1	3.71	3	37	AD174	3.987	26.13	-0.01
F650	2	4.07	2	22	PhvA	6.117	38.72	0.04
		4.07	7	25	AB60	4.341	27.41	-0.036
F652	1	3.42	3	8	AA175	4.145	22.46	0.045
F656	0	3.08	-	-				
F662	1	3.82	3	19	E16.550	4.385	22.85	0.131
F663	1	3.67	7	6	ThaumatL	4.273	26.76	-0.02
F664	2	2.81	1	14	Y02.1500	3.176	22.56	-0.011
		2.81	5	15	Tri	4.436	28.95	-0.013
F665	1	3.59	1	17	AA258	8.689	41.33	0.082
F672	0	3.99						
F673	2	3.21	3	11	L13.1000	7.059	47.1	0.021
		3.21	4	2	FCA	6.062	34.16	0.019
F678	1	3.84	3	8	AA175	9.842	49.48	0.091
F679	2	3.32	3	35	N01.720	5.412	38.26	-0.047
		3.32	5	19	Y02.900	4.543	46.21	-0.047
F680	2	3.91	5	15	Tri	6.189	25.96	-0.014
		3.91	7	4	J04.900	3.776	25.25	0.016
F681	1	3.56	4	20	AB45	5.173	26.77	-0.023
F686	2	3.63	2	8	X02.700	4.698	25.54	-0.032
		3.63	5	26	COLa	4.242	22.45	-0.027
F695	0	3.99						
F696	1	3.16	7	13	AA160	3.523	21.04	-0.042
F699	1	3.47	3	42	AD270	4.166	33.34	-0.028
F704	1	3.74	2	27	O01.450	3.771	20.91	0.035
F708	1	3.58	1	2	FPBaldo	4.774	32.28	0.158
F712	1	3.82	1	13	AB28	4.199	25.34	-0.0317
F718	1	3.42	3	28	Y15.1050	3.73	27.14	-0.155
F720	3	4.05	2	23	PPIlike	4.197	21.71	0.081
		4.05	3	11	L13.1000	4.035	29.39	0.097
		4.05	7	7	C01.730	4.038	20.42	-0.09
F723	0	4.43						
F726	1	3.86	3	9	HR	7.079	37.59	0.456
F727	3	3.24	2	13	AA303	3.424	17.46	0.105
	-	3.24	3	8	AA175	3.958	22.74	0.277
		3.24	5	16	AD79	4.022	21.34	-0.115
F728	0	3.93						

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R ²	а
F731	2	3.35	3	36	G04.750	4.2	27.78	-0.063
		3.35	5	5	LD	4.128	28.77	-0.081
F732	2	3.46	4	2	FCA	4.036	25.1	-0.098
		3.46	5	15	Tri	5.164	31.6	-0.098
F733	2	3.48	5	15	Tri	5.018	30.3	-0.17
		3.48	6	15	AD141	7.83	34.74	0.202
F734	1	3.7	3	9	HR	3.521	21.39	0.283
F741	0	3.26						
F746	0	3.51						
F748	0	3.88						
F749	2	3.22	3	8	AA175	3.346	15.17	0.085
		3.22	5	15	Tri	3.501	16.01	-0.045
F750	0	3.53						
F751	0	3.92						
F753	1	3.56	3	28	Y15.1050	5.305	32	-0.139
F755	0	4.23	-	-			-	
F757	0	2.84						
F767	2	3.39	1	16	D21	9.871	24.37	0.023
1101	-	3.39	3	9	HR	26.25	40.92	0.025
F768	2	3.67	4	26	AA349	3.896	20.97	-0.125
		3.67	5	12	AA475	5 137	30.86	-0.163
F774	0	3 94	Ŭ		,	0.101	00.00	000
E775	1	2.67	5	20	Viola1	3 117	21 57	0.061
F778	0	4 33	0	20	Viola I	0.117	21.07	0.001
F779	2	3.76	5	15	Tri	6.031	28.87	-0 092
1775	2	3.76	6	16	4059	5.69	36.67	0.002
F785	0	3.81	U	10	11000	0.00	00.07	0.1
F789	0	3.56						
F701	2	3.30	3	47		1 326	22.03	-0.04
1751	2	3.7	5	47 6	ΔΔ497	5 809	22.33	-0.04
E802	1	3 70	6	16	AD59	1 724	23.14	0.07
F807	0	3.75	0	10	AD00	7.727	20.14	0.000
E808	0	3.4						
E910	2	3.4	1	16	D21	2 912	26.29	0.217
1010	2	3.22	6	20	G04 950	J.012	23.05	-0.145
E012	2	3.22	2	7	E16 650	12 240	60.7	0.140
1013	2	3.5	5	10	AD51	10.402	26.47	0.400
E81/	3	3.04	1	16	D21	3.8/3	20.47	0.036
1014	5	3.04	2	10	D21 A A 332	3 1/3	16 00	0.030
		3.04	2	+ 14	AA332 AA107	<i>4 4</i> 13	27 73	0.013
E815	0	<u> </u>		17	AND	4.410	21.15	0.015
F817	0	3.51						
E920	1	3.51	2	40	A A 255	4 564	26 59	0.295
F020	1	J.00	3	40	ACI 204	5 522	20.00	0.200
F023	1	4.19	4	20		0.002	33.00	0.029
F824	1	4.09	4	10	008.1050	4.289	33.03	0.053
F826	2	3.80	3	9		4.581	19.22	0.119
F007	0	3.86	4	17	AD186.D	5.243	18.85	0.035
<u>F02/</u>	0	3.82		40	D04	0 770	40.40	0.00
F829	2	3.73	1	16	D21	6.773	49.43	0.06
		3.73	6	23	Gsp	4.195	32.01	0.028

Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	m	arqueur	LOD	R^2	а
F836	3	3.61	4	17	AD186.b	4.089	16.38	0.009
		3.61	7	16	AB36	7.392	36.32	-0.017
		3.61	7	26	AA07.170	4.134	17.07	0.01
F837	1	3.76	3	9	HR	5.886	34.57	0.081
F841	2	3.62	1	16	D21	7.635	47.31	0.058
		3.62	3	19	E16.550	3.873	21.34	0.024
F846	0	3.39	-				-	
F847	0	3.3						
F849	0	4 24						
F850	1	3.77	4	24	N14,950	4,155	21.46	0.284
E852	2	3.56	2	29	F12 490	3 579	32.65	-0 217
1002	-	3 56	6	5	AC74	4 552	20.42	0.165
F873	2	3.01	5	12	AA475	3 316	25.2	0.25
10/0	2	3.01	6	6	K16 450	3 027	17 71	0.203
E876	2	3.76	1	17	A A 258	4.643	22.55	0.200
1070	2	3.76	7	3	A A 90	4.68	22.00	0.32
E977	1	3.70	5	21	AA90	4.00	20.61	0.110
E970	2	2.16	1	12	C16 1200	6.074	29.01	-0.211
F0/9	2	3.10	6	12	G10.1200	5.004	25.6	0.201
E990	1	3.10	2	12	C00 1100	2.004	14.02	0.23
	2	2.11	3	10	G09.1100	4 70	21.07	0.143
F001	2	3.99	1	10	D21	4.79	21.97	0.35
5000	0	3.99	3	12	203.1500	4.103	20.00	0.224
F882	2	3.82	1	1	Agps2	4.081	26.79	-0.462
5000		3.82	1	19	SOD9	4.841	29.69	0.484
F888	2	3.46	3	11	L13.1000	5.749	34.88	0.278
5000	4	3.46	4	8	AA285	4.096	25.25	0.224
F889	1	3.40	3	10		5.14	37.05	0.2
F893	2	3.69	2	6	AD148	4.506	16.44	0.022
		3.69	4	4	N13.600	4.376	15.83	0.022
F905	3	4.07	4	11	AD249C	7.749	33.69	0.115
		4.07	5	13	DHPS1	6.539	26.46	-0.092
		4.07	6	/	004.850	6.799	30.32	0.121
F906	1	3.75	1	5	C20b	3.795	22.84	-0.064
F913	1	4.27	3	41	V12.1400	4.311	24.96	0.197
F914	1	3.53	6	26	G09.700	3.884	26.19	0.179
F916	1	2.79	1	16	D21	9.436	34.21	1.087
F917	2	3.83	2	26	X02.450	5.74	34.38	-0.856
		3.83	6	14	E16.1630	5.308	38.57	-1.056
F921	1	3.29	6	4	PGK2	3.712	24	0.032
F925	2	3.79	5	14	AGL20a	7.606	38.62	-0.489
		3.79	6	12	AD159	5.635	24.72	0.39
F926	2	3.67	3	11	L13.1000	4.253	30.34	0.389
		3.67	3	27	X02.1500	3.7	20.88	0.313
F929	1	3.9	3	16	V17.1400	5.729	37.82	0.016
F931	0	4.15						
F939	2	3.76	3	38	AB140	4.612	24.14	0.067
		3.76	6	5	AC74	3.875	19.43	0.056
F958	1	3.47	3	12	Z03.1500	8.494	35.94	0.049
F965	0	3.49						
F974	0	3.42						
F976	2	3.91	1	11	AA67	4.628	28.74	0.046
		3.91	4	24	N14.950	4.609	28.37	0.049
Spot	nb PQL	LOD seuil	chr	marqueur		LOD	R^2	а
-------	--------	-----------	-----	----------	----------	--------	-------	--------
F978	2	3.71	1	6	H11.1640	5.75	34.52	-0.032
		3.71	3	33	AB30	6.729	37.18	0.036
F987	2	2.44	3	24	J11.1000	2.791	17.69	-0.086
		2.44	3	27	X02.1500	4.517	31.79	0.115
F990	2	3.91	1	16	D21	7.402	33.73	0.154
		3.91	7	10	N14.1500	4.064	24.44	-0.067
F1021	1	3.77	4	19	AA122	3.84	26.29	-0.057
F1024	3	4.05	1	13	AB28	5.619	16.67	-0.011
		4.05	5	15	Tri	9.317	35.24	-0.014
		4.05	6	4	PGK2	11.056	44.89	0.016
F1035	0	3.73						
F1056	0	3.8						
F1057	0	3.24						
F1062	1	3.28	1	9	PSU81288	4.354	28.55	-0.03
F1063	1	3.46	1	7	R13.1800	3.786	25	-0.066
F1065	2	3.88	2	23	PPIlike	6.065	51.38	0.106
		3.88	3	3	AB25	3.98	22.4	-0.089
F1069	0	3.98						
F1071	2	3.75	3	11	L13.1000	4.02	29.91	0.029
		3.75	5	15	Tri	4.99	27.43	-0.028
F1131	3	3.05	2	23	PPIlike	3.386	17.39	0.056
F1131	3	3.05	3	15	AD57	6.68	41.26	0.085
F1131	3	3.05	3	29	G10.1000	4.5	24.32	0.085
F1148	0	4.13						
F1185	2	3.36	5	5	LD	6.717	50.75	0.107
		3.36	5	16	AD79	5.677	28.31	-0.08
F1201	1	3.67	3	16	V17.1400	5.448	32.64	0.029
F1229	2	4	1	19	AC75	5.288	30.97	0.189
		4	3	15	AD57	4.143	24.26	0.1537
F1257	0	3.71						
F1261	1	3.08	6	24	PI	4.495	27.48	-0.161
F1292	2	3.73	2	24	Sut1	4.115	25.83	0.067
		3.73	3	40	AA355	4.57	29.48	-0.07
F1301	0	4.05						
F1306	0	3.4						

Annexe 19 : Position des 315 PQL détectés sur les 7 groupes de liaison pour les feuilles.

La ligne en pointillés indique la présence de hot spots





GL2

215

Annexes



GL3 a

Annexes





GL4

Annexes

218

0.0 -- Viola2 C07.2000 16.1 L522_fru 44.6 - 50.5 -- N01.1500 72.9 -- LD L791 H2 L377_actin AA497 TFL1a Y15.200 AB47 O09800 A499 AA475 / DHPS1 AGL20a Tri AD79 AA163.2 944 960 1009 1034 1087 1196 1273 1449 1457 1487 1487 14545 L324_gl 1522 Ø ₽ ₽ ₽ L147 Ø 5 000 - TE002M14 171.6 eBindingBeta **≩H** le2, 1aminomutase Y02.900 193.0 -- Viola1 - AA399 221.0 -228.6 -L377_actin R04.950
Gns2
AD175
AC58
COLa 247.0 248.6 250.6 254.8 257.4 1370 888 **8** 274.4 - AA460

GL5

Annexes





Annexes

Annexe 20 : Localisation des hot spots sur les 7 groupes de liaison.

Représentation graphique (en bleu) de la somme des probabilités d'avoir un PQL à une position donnée P(x,x+0.5) pour chaque groupe de liaison. La droite (en rouge) correspond à U(x) calculé pour 315 PQL et une longueur totale de la carte de 1491 cM.



GL1

Annexes







GL6



GL4

