



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

**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**

par Sophie ALVAREZ

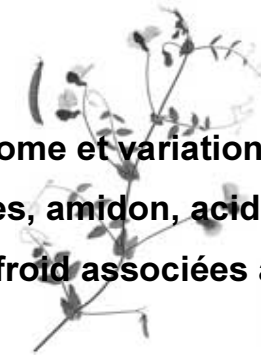
Thèse dirigée par les co-directeurs :
Jean-Louis HILBERT et Bruno DELBREIL
Soutenue le 24 septembre 2004

Jury :

E. Teoule	Maître de conférences, Université de Paris VI	Rapporteur
M. Zivy	Chargé de recherches, CNRS, Ferme du Moulon	Rapporteur
I. Lejeune-Hénaut	Chargé de recherches, INRA Mons-Péronne	Examinateur
J-L. Hilbert	Professeur, Université de Lille1	Examinateur
B. Delbreil	Maître de conférences, Université de Lille1	Examinateur

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



**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**

par Sophie ALVAREZ

Travaux réalisés au

Laboratoire de la Physiologie de la Différenciation Végétale Bat. SN2, Université des
Sciences et Technologies de Lille, UPRES-EA 3569, IFR 118, ERT 1316, 59655 Villeneuve
d'Ascq cedex, France.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes que j'ai rencontré ces dernières années en adressant mes plus vifs remerciements à :

Jacques Vasseur qui a accepté en septembre 1999 que je réalise mon DEA au sein de son laboratoire intitulé alors Laboratoire de la Morphogenèse et de la Différenciation Végétale et qui m'a confié l'initiation de l'approche protéomique de l'acclimatation au froid chez le pois. Ainsi que Jean-Louis Hilbert qui en tant que successeur a accepté d'être mon co-directeur de thèse et a permis le bon déroulement de mon travail notamment pour l'identification des protéines.

Bruno Delbrail, mon co-directeur de thèse, pour les remarques et conseils émis lors de nos discussions qui ont servi à guider mes recherches et à médier lorsque j'étais

Théo Hendriks, professeur au laboratoire, qui au cours de nombreuses discussions m'a aidé à décortiquer et à interpréter les résultats concernant l'étude des variations des métabolites.

Isabelle Lejeune-Hénaut et Martine Thomas, de l'INRA de Mons-Péronne. Isabelle, merci de m'avoir initié à la thématique froid chez le pois et d'avoir suivi l'avancée de projet. Martine, merci d'avoir assuré la culture du matériel végétal et de m'avoir toujours réservé un très bon accueil lors de mes séjours à l'INRA avec ta bonne humeur et ta fraîcheur de vivre (Bonne Chance à toi pour ta future reconversion).

Frédéric Muel et Michel Zivy qui malgré l'éloignement ont accepté de participer aux comités de thèse.

J'adresse également tous mes remerciements aux maîtres de conférences du laboratoire (qui sont trop nombreux pour tous les citer) de m'avoir fait une place au sein du laboratoire pour réaliser au mieux ma thèse. Un merci plus spécial pour Marie-Christine Quillet qui a pris le temps de m'initier aux analyses statistiques avec le logiciel SAS et pour Christophe Vuylstecker qui a participé à l'analyse des teneurs en métabolites et à l'interprétation des

résultats. Un grand merci également à Estelle Goulas qui m'a aidé à envisager et à assurer mon après thèse

Je réserve des remerciements particuliers pour tous les étudiants de thèse et de DEA, ainsi que le personnel rattaché au laboratoire que j'ai eu la chance de rencontrer dans ce laboratoire, David, Frank, Sylvain, Philippe, Mélanie, Sophie, Christelle, Clara, Valérie, Thierry, Monica et Matthieu qui m'ont apporté de nombreux conseils à chaque fois que j'en ai eu besoin. Egalement Olivier Leduc et Jean-François Tétu pour leur bonne humeur. Un très grand merci à Eric Décout, le grand manitou de la protéomique qui m'a tout appris dans ce domaine. Et je finirais par remercier deux personnes avec qui j'ai partagé des instants de complicité Lydie Batel et Fathia Bouanou.

Mes plus profonds remerciements iront à des êtres exceptionnels: tout d'abord mes parents qui se sacrifiaient tout au long de leur vie pour me garantir un bel avenir, et Mickaël pour avoir toujours été à mes côtés

RESUME	7
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1. ACCLIMATATION AU FROID	16
1.1. Conséquences physiologiques de la baisse des températures et du gel	16
1.2. Mécanismes de tolérance au gel mis en place pendant l'acclimatation au froid	17
1.3. Transduction du signal « basses températures » et expression spécifiques des gènes de réponse au froid	24
2. LA PROTEOMIQUE	35
2.1. Evolution des outils de la protéomique	35
2.2. Applications de la protéomique au monde végétal	38
3. CADRE DE LECTURE	40
3.1. Description du pois	40
3.2. Historique	41
3.3. Etudes en cours sur la tolérance au gel du pois	42
3.4. Démarche et objectif de notre étude	43
MATERIEL ET METHODES	45
1. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS EXPERIMENTALES	45
1.1. Présentation des génotypes et méthodes d'évaluation de la tolérance au gel	45
1.2. Protocole expérimental	45
2. ANALYSE DU CONTENU EN COMPOSES CARBONES	48
2.1. Mesure de la matière fraîche et de la matière sèche	48
2.2. Dosage des sucres solubles et des acides organiques	48
2.3. Dosage de l'amidon	49
2.4. Dosage de la proline	49
2.5. Analyse statistique	49
3. ANALYSE DU PROTEOME	50
3.1. Extraction et dosage des protéines	50
3.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle	50
3.3. Traitement informatique des données	52
3.4. Identification des protéines	53
PARTIE 1 – ACCUMULATION DES METABOLITES ASSOCIEE A L'ACQUISITION DE LA TOLERANCE AU GEL	55
1. RESULTAT ET DISCUSSION	55

1.1. Variation de la composition en métabolites chez Champagne et Tère	
Au cours de l'expérimentation en conditions contrôlées	55
1.2. Variation de la composition en sucres solubles chez Champagne et Tère	
cultivés en champ	66
1.3. Variation de la composition en sucres solubles chez les lignées recombinantes	
cultivés en champ	69
2. CONCLUSION	72
<u>PARTIE 2 – EXPRESSION DE PROTEINES SPECIFIQUES DE L'ACCLIMATATION</u>	
<u>AU FROID CHEZ CHAMPAGNE</u>	<u>73</u>
1. RESULTAT ET DISCUSSION	73
1.1. Expression différentielle des protéines	73
1.2. Similarité des séquences	78
1.3. Réponse organo-spécifique de l'acclimatation au froid	89
1.4. Les fonctions des protéines exprimées au cours de l'acclimatation au froid	
impliquées dans le réajustement du métabolisme	90
1.5. Induction de la synthèse de cryoprotecteurs au cours de l'acclimatation au froid	92
1.6. Activation du <i>turnover</i> en réponse aux basses températures	92
1.7. Inhibition du stress oxydatif induit au cours de l'acclimatation au froid	93
2. CONCLUSION	97
<u>PARTIE 3 – ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DES</u>	
<u>PROTEINES COLOREES AU SYPRO RUBY ET NITRATE D'ARGENT</u>	<u>99</u>
1. RESULTAT ET DISCUSSION	99
1.1. Analyses qualitative et quantitative de la reproductibilité des gels d'une	
expérimentation biologique et analytique	99
1.2. Comparaison des variations qualitatives et quantitatives de l'expérimentation	
biologique avec une coloration au nitrate d'argent et une coloration au Sypro Ruby	100
1.3. Comparaison de la variabilité qualitative et quantitative entre l'expérimentation	
biologique et analytique avec la coloration au Sypro Ruby	101
2. CONCLUSION	103
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	<u>104</u>
<u>REFERENCES</u>	<u>107</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>124</u>

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.

La relation entre l'acquisition de la tolérance au gel et les teneurs en sucres solubles, l'amidon, les acides organiques et la proline a été étudiée chez deux variétés de pois (*Pisum sativum* L.) : Champagne, tolérant au gel et Térèse, sensible au gel. Le contenu en saccharose et raffinose dans l'appareil aérien et racinaire de Champagne augmente significativement en réponse à l'acclimatation au froid. Cependant chez les 59 lignées recombinantes, issues du croisement Champagne et Térèse cultivées en champ, il semble que l'accumulation des sucres solubles ne garantit pas l'acquisition de la tolérance au gel. L'analyse du profil d'expression des protéines de bourgeon, feuille, tige et racine de Champagne et Térèse au cours de l'acclimatation au froid, a permis de mettre en évidence l'expression spécifique de protéines de l'antenne collectrice de lumière et de la chaîne de transport d'électron de l'appareil photosynthétique et impliquées dans l'inhibition du stress oxydatif chez Champagne.

Mots clés : acclimatation au froid - tolérance au gel – sucres solubles – protéome – *Pisum sativum* L.

Figure 1. Régulation de la photosynthèse en cas de chute des températures chez les plantes en C3.	22
Figure 2. Schéma des interactions entre le phosphate, l'acclimatation du métabolisme photosynthétique et le développement de la tolérance au gel chez les feuilles d' <i>Arabidopsis</i> .	24
Figure 3. Schéma de transduction du signal "basses températures" chez <i>Arabidopsis</i> .	29
Figure 4. Surface et rendement du pois de 1981 à 2003 en France.	41
Figure 5. Schéma de l'échelle de notation de la tolérance au gel en fonction des dégâts causés par le gel sur l'appareil aérien du pois.	45
Figure 6. Températures de l'expérimentation avec acclimatation au froid (A) et l'expérimentation contrôle (B) en fonction du nombre de degré jour.	47
Figure 7. Méthode de comparaison des profils protéiques pour chaque organe.	52
Figure 8. Evolution de la croissance des plantules de Champagne (Champ) et Térèse (Ter) au cours des deux cinétiques (expérimentation avec acclimatation au froid et expérimentation contrôle) exprimées en nombre de degré.jours cumulés.	56
Figure 9. Evolution des masses de matière sèche en grammes et de la teneur relative en eau en pourcentage de l'appareil aérien et racinaire par plante chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.	57
Figure 10. Evolution de la teneur en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose), le total des teneurs en sucres solubles, et en amidon en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil aérien chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.	60
Figure 11. Evolution de la teneur en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose), le total des teneurs en sucres solubles, et en amidon en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil racinaire chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.	62
Figure 12. Evolution des teneurs en citrate, le malate et le succinate en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil aérien et racinaire chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.	64
Figure 13. Evolution des teneurs en proline en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil aérien et racinaire chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.	65
Figure 14. Cartes de références des profils protéiques de bourgeon, de feuille, de tige et de racine de Champagne à P1 de l'expérimentation contrôle.	73
Figure 15. Cartes de références des profils protéiques de bourgeon, de feuille, de tige et de racine de Térèse à P1 de l'expérimentation contrôle.	74
Figure 16. Classification hiérarchique de l'intensité des spots au cours des expérimentations acclimatation au froid et contrôle chez Champagne et Térèse pour les organes bourgeon, feuille, tige et racine.	76
Figure 17. Distribution des protéines en fonction des 22 sous catégories définies tous organes confondus.	88
Figure 18. Distribution des protéines en fonction des 22 sous catégories définies par organes : feuille et bourgeon.	90

Figure 19. Positionnement des protéines dont l'expression d'une isoforme est spécifique de l'acclimatation au froid chez Champagne tolérant au gel dans le métabolisme de la plante.	94
Figure 20. Présentation des deux méthodologies utilisées.	99
Figure 21. Pourcentage des spots communs à 3, à 2 et spécifiques à une répétition.	101
Figure 22. Schéma récapitulatif des événements mis en évidence au cours de l'acclimatation au froid et associées à l'acquisition de la tolérance au gel.	105

Tableau 1. Banques de gels 2D créés pour certaines espèces végétales.	38
Tableau 2. Contenu en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose) en mg.g^{-1} de matière sèche chez Champagne et Tèrese pendant l'acclimatation au froid en champ et en conditions contrôlées (P3).	67
Tableau 3. Résultats du test du coefficient de corrélation de Pearson entre les teneurs en sucres (raffinose, saccharose, glucose et fructose) et la tolérance au gel des lignées recombinantes.	70
Tableau 4. Teneur en raffinose, glucose, saccharose et raffinose en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil aérien des 59 lignées recombinantes regroupées en fonction de leur note de gel.	70
Tableau 5. Description des groupes de protéines sélectionnés avec une expression spécifique de l'expérimentation acclimatation au froid chez Champagne et répartition du nombre de spots par groupe pour chaque organe.	75
Tableau 6. Récapitulatif du nombre de spots analysés au nombre de spots identifiés.	78
Tableau 7. Classement des protéines en fonction du métabolisme dans lequel elles interviennent.	80
Tableau 8. Nombre de spots détectés sur les 3 répétitions, avec la moyenne et l'écart type pour la coloration au nitrate d'argent et au Sypro Ruby.	100
Tableau 9. Moyenne des intensités des spots normalisées, leurs écart types et coefficient de variances calculés à partir des trois répétitions de gels colorés au Sypro Ruby.	102

2D-PAGE	Electrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide
ABA	Acide abscissique
ACN	Acétonitrile
AFP	Protéines antigel
ARNm	ARN messenger
ATP	Adenosine triphosphate
bHLH	basic/Helix-Loop-Helix
CAS	Cold Acclimation Specific
CBF	Facteur de fixation de CRT/DRE
CEO	Complexe évoluant l'oxygène
COR	Cold Regulated
CP	Complexe chlorophylle protéine
Cytb6F	Cytochrome b6F
CRT/DRE	C-repeat/dehydration responsive element
DGDG	Digalactosyl diacylglycerol
DREB	Drought Response Element Binding
EGTA	Ethylen Glycol Tetraacetic Acid
EREBP	Ethylen Response Element Binding Protein
ESI-Q-TOF	Electrospray Ionization -Quadripole -Time of Flight
ESK	Eskimo
Fdx	Ferredoxine
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HOS	High expression of osmotically responsive genes
Hr	High response
HSP	Heat Shock Protein
ICE	Inducer of CBF Expression
ICEr	Induction of CBF Expression région
IMP	Myo-inositol monophosphatase
IPG	Imobilized pH Gradient
ITCF	Institut Technique des Céréales et des Fourrages
ITP	Institut Technique du porc
KIN	Cold induced
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LC-ESI/IT	Liquid chromatography-electrospray ionization/ion trapp
LCHII	Light harvesting complex of photosysteme 2
Lf	Late flowering
Lhca	Light harvesting complex of photosystem 1
LOS	Low expression of osmotically responsive genes
LT ₅₀	Température pour laquelle il y a 50% de létalité
LTI	Low temperatures induced
LTRE	Low Temperature Response Element
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MIPS	Myo-inositol phosphate synthase
MM	Masse moléculaire
MRP	Matières riches en protéines
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
PAR	Photosynthetically active radiation
Pc	Plastocyanine
PC	Phosphatidyl Choline

PE	Phosphatidyl Ethanolamine
PEACI	Pea Cold Induced
Pheo	Pheophytine
pI	Point isoélectrique
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PQ	Plastoquinone
PQL	Protein quantity loci
Prx	2-Cys peroxiredoxine
PSI	Photosystème 1
PSII	Photosystème 2
PS	Position shifts
Q	Ubiquinone
QTL	Quantitatif Trait Loci
SFR	Sensitive to freezing
Thx	Thioredoxine
TFA	Acide trifluoroacétique
UNIP	Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en protéines
WCOR	Wheat Cold Responsive
WCS	Wheat Cold Specific

Dans le règne végétal, la température fait partie des contraintes environnementales les plus importantes. Elle est responsable de la distribution et de la productivité des plantes. Certaines espèces, dont la majorité des Herbacées, possèdent un métabolisme capable de s'adapter aux variations de la température, notamment aux situations les plus extrêmes, dans notre cas, le gel. La tolérance au gel de certaines plantes n'est pas toujours un phénomène constitutif mais peut-être induit en réponse à une période de basses températures restant supérieures à 0°C.

En effet, les plantes peuvent être divisées en trois catégories selon leur réponse au stress « froid » (Pearce, 1999) :

- celles sensibles au froid : endommagées par des températures inférieures à 12°C,
- celles tolérantes au froid mais sensibles au gel : capable de survivre à des températures inférieures à 12°C mais incapables de survivre en cas de gel,
- celles tolérantes au froid et au gel : capables de survivre à des températures de gelée entre -7°C et -30°C si elles sont préalablement exposées à des basses températures supérieures au gel.

Les plantes appartenant à la dernière catégorie vont mettre en place en réponse à des basses températures des mécanismes de réajustement du métabolisme et de protection leur permettant de survivre en cas de gel pendant une phase appelée « acclimatation au froid ». Cette acclimatation au froid inclut deux fonctions majeures : le réajustement du métabolisme et de la fonction cellulaire de base aux contraintes biophysiques imposées par les basses températures, et l'induction des mécanismes de tolérance au gel. La première fonction de l'acclimatation au froid différencie les espèces sensibles au froid des espèces tolérantes au froid. La deuxième fonction discrimine parmi les espèces tolérantes au froid, les espèces sensibles au gel de celles qui sont tolérantes. Les deux fonctions sont nécessaires pour développer la tolérance au gel induite par des basses températures.

L'étude des mécanismes induits par l'exposition à de basses températures a été réalisée au niveau moléculaire et a montré l'expression différentielle de gènes. Les produits des gènes induits par le stress peuvent être classés dans trois groupes : ceux qui vont agir directement contre les stress environnementaux, ceux qui régulent l'expression des gènes et la transduction du signal dans la réponse au stress, et ceux qui correspondent à une adaptation du métabolisme de base. Dans le premier groupe on peut inclure les protéines qui ont une fonction protectrice des cellules contre la déshydratation causée par le gel, comme les enzymes nécessaires à la biosynthèse de divers osmoprotecteurs, des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), des protéines antigels, des chaperonnes et des enzymes de

détoxication. Le deuxième groupe comprend les facteurs de transcription, les protéines kinases et les enzymes impliquées dans le métabolisme des phosphoinositides. Enfin le dernier regroupe notamment des enzymes du cycle du Calvin et de la biosynthèse des sucres. Cependant de nombreux gènes régulés par le froid codent des protéines dont le rôle reste encore inconnu.

L'isolement et la caractérisation de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la tolérance au gel, ainsi que l'utilisation de plantes transgéniques ont aussi permis d'identifier des gènes impliqués dans l'acclimatation au froid, et de préciser leur mode d'action. D'autre part, de nouvelles technologies comme les puces à ADN et les outils d'études du transcriptome permettent maintenant l'étude simultanée de centaines de transcrits. Cependant le turnover du produit final du gène, ainsi que les modifications post-traductionnelles ne peuvent pas être étudiés au niveau des ADNc. C'est ainsi que l'étude du protéome (Protein Expressed by a genome) est devenu complémentaire à celle du génome et du transcriptôme dans l'étude des processus physiologiques. Des études réalisées au niveau des protéines exprimées au cours de l'acclimatation au froid ont déjà été menées chez plusieurs espèces, et il a été mis en évidence des accumulations spécifiques de protéines pendant l'induction de la tolérance au gel. Et récemment, des protéines de la membrane plasmique liées à l'acclimatation au froid de feuille d'*Arabidopsis* ont été identifiées. De plus, le domaine de la protéomique évolue constamment grâce à l'amélioration de la résolution et de la reproductibilité de l'électrophorèse bidimensionnelle et la systématisation de l'identification des protéines par les techniques de spectrométrie de masse.

Après avoir défini le phénomène d'acclimatation au froid, nous allons voir en détail les modifications biochimiques induites au cours de l'acclimatation au froid. Nous aborderons également les éléments de la transduction du signal froid qui ont été identifiés principalement chez *Arabidopsis*. En deuxième partie bibliographique, nous étudierons l'évolution des méthodes liées à la protéomique. Pour finir, nous établirons le cadre de l'étude vis à vis du modèle végétal choisi, le pois, et la démarche choisie afin d'atteindre nos objectifs.

1. ACCLIMATATION AU FROID

1.1. Conséquences physiologiques de la baisse des températures et du gel

La déshydratation cellulaire

Le fluide extracellulaire (de faible concentration) qui circule par l'apoplasme possède une température de gel plus élevée que le fluide intracellulaire. Lorsque les températures deviennent inférieures à 0°C, le potentiel chimique de la glace étant inférieur à celui de l'eau, il y a formation de glace dans les espaces intercellulaires. Cela aboutit à la baisse du potentiel hydrique de la solution à l'extérieur qui va entraîner un déplacement de l'eau vers les espaces intercellulaires. Les cristaux de glace qui se forment dans les espaces intercellulaires vont s'accroître provoquant une déshydratation cellulaire (Mazur, 1963, 1969). La déshydratation induite par le gel va conduire à de multiples dommages, notamment des lyses cellulaires dues à des phénomènes d'expansion et de contraction, des fusions des membranes plasmiques avec les membranes limitant les organites intracellulaires, ainsi que des déchirures de celles-ci (Steponkus *et al.*, 1993 ; Uemura et Steponkus, 1997).

La fuite des électrolytes

Si la baisse de la température est rapide, la glace se forme à l'intérieur des cellules, et l'expansion de la glace intracellulaire serait ainsi responsable de la rupture de la membrane plasmique (Levitt, 1980). La perte de compartimentation va conduire à une fuite d'électrolytes et d'autres solutés (Zhang et Willison, 1992). Il semble que cette fuite d'électrolytes chez le prunier placé à 4°C (*Prunus davidiana* Franch) est accompagnée de l'augmentation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (enzyme de détoxification des radicaux libres) et du contenu en malondialdéhyde (produit final de la peroxydation des lipides) (Leng et Qi, 2003).

Stress oxydatif et photoinhibition

La perturbation de la fluidité membranaire est responsable de l'inhibition du transport des électrons au niveau des photosystèmes I et II (PSI et PSII) (Velitchkova *et al.*, 2001). De plus, les PSII sont connus pour être la cible privilégiée des dommages photo-oxydatifs mais aussi le site de la régulation de la photoinhibition (Barber, 1994). Une baisse de température à 5°C provoque, chez *Valonia utricularis*, une photoinhibition qui mesurée par une baisse du ratio Fv/Fm (fluorescence variable de la chlorophylle sur le maximum de chlorophylle fluorescente) s'effectue en deux phases, tout d'abord une phase rapide (la photoinhibition

dynamique) suivie d'une phase lente (la photoinhibition chronique) qui indique que les centres réactionnels de PSII endommagés se réparent en re-synthétisant la protéine D1 (Velitchkova *et al.*, 2001). Chez l'orge, à basses températures, ce sont les PSI qui sont fortement endommagés par les espèces actives d'oxygène provenant de l'inactivation du transport des électrons (Tjus *et al.*, 1998). Ceci va conduire à la réduction de l'activité photosynthétique et de la croissance mis en évidence en cas de chute des températures (Huner *et al.*, 1993).

1.2. Mécanismes de tolérance au gel mis en place pendant l'acclimatation au froid

Le terme d'acclimatation au froid est le plus souvent utilisé pour décrire l'aboutissement d'une myriade de mécanismes biochimiques et physiologiques associés à l'augmentation de la tolérance au gel. Ces modifications biochimiques et physiologiques vont conduire à la stabilisation de la membrane plasmique et des protéines, à la régulation de la pression osmotique, au réajustement du métabolisme de base et à la diminution de la sensibilité à la photoinhibition. Toutes ces modifications impliquent l'induction de la synthèse et de l'activité de protéines et d'enzymes, et l'expression de gènes spécifiques induits par l'acclimatation au froid.

Stabilisation de la membrane plasmique et des protéines

- Variation de la composition en lipides membranaires

Comme nous l'avons vu précédemment le système membranaire des cellules est le site privilégié des dommages causés par le gel. Cependant au cours de l'acclimatation au froid, il a été mis en évidence des modifications de la composition de la membrane plasmique comme chez le seigle chez qui la proportion de phospholipides de la membrane plasmique augmente (Uemura et Steponkus, 1994). Ceci ayant été également observé chez *Arabidopsis*, l'avoine (Uemura *et al.*, 1995) et le mûrier (Yoshida, 1984). L'enveloppe du chloroplaste semble également subir des modifications de la composition lipidique après une phase d'acclimatation au froid comme cela a été montré chez les feuilles de seigle (Uemura et Steponkus, 1997). Ces modifications comprennent une baisse significative de la quantité de monogalactosyl diacylglycerols dans les membranes interne et externe du chloroplaste, une augmentation de la proportion de digalactosyl diacylglycerols (DGDG) dans les membranes interne et externe et une augmentation de la quantité de phosphatidylcholine (PC) dans la membrane externe uniquement. Les DGDG et les PC étant favorables au maintien d'une

configuration lamellaire des membranes, les changements de la composition lipidique de l'enveloppe chloroplastique pendant l'acclimatation au froid suggèrent que la stabilité de la configuration lamellaire augmente.

- Insaturation des acides gras

Le degré de saturation de la membrane affecte la température seuil de changement de phase entre le stade liquide cristallin et le stade solide. Cette transition de phase explique les dommages causés aux membranes. La fluidité de la membrane plasmique est une caractéristique qui dépend du degré de saturation des acides gras des phospholipides membranaires : l'insaturation des acides gras conduit à une bonne fluidité de la membrane qui lui permettra de résister aux contraintes causées par la déshydratation cellulaire. Après acclimatation au froid, un changement du niveau de l'insaturation des lipides membranaires survient. Chez le riz (*Oryza sativa*), les proportions d'acide gras insaturés : acide linoléique (C_{18:2}) et linoléique (C_{18:3}) augmentent (Bertin *et al.*, 1998). Chez le chien-dent, la réponse au niveau du taux d'insaturation des acides gras à basses températures est différente en fonction de l'organe étudié. Ainsi c'est au niveau du collet que le taux d'insaturation des acides gras est le plus élevé (Samala *et al.*, 1998). L'expression altérée des enzymes de la voie de biosynthèse des lipides peut être à l'origine des différences membranaires entre des plantes non acclimatées et acclimatées. Le gène *FAD8* (Fatty Acid Desaturase) d'*Arabidopsis* code une désaturase qui va contribuer à augmenter la tolérance au gel en modifiant la composition lipidique (Gibson *et al.*, 1994).

- Accumulation des cryoprotecteurs

Pour beaucoup de végétaux, une exposition à des basses températures provoque l'accumulation de composés de faibles poids moléculaires ayant une activité cryoprotectrice. Steponkus (1984) suggère que l'accumulation des solutés dans le cytoplasme contribue à la survie en cas de gel, en séquestrant des ions toxiques et en protégeant les macromolécules contre la dénaturation induite par la déshydratation. *In vitro* une accumulation de sucres permet de protéger les membranes contre les dommages induits par le gel (Strauss et Hauser, 1986) et contribue à la stabilisation des structures membranaires des compartiments spécifiques (Sharkey *et al.*, 1986 ; Fowler *et al.*, 2001). Parmi ces sucres, les fructanes (polymères de fructose) dont l'accumulation a été mise en évidence au cours de l'acclimatation au froid chez l'avoine (Livingston et Henson, 1998) interagissent directement avec le membrane et la stabilisent en protégeant les PC pendant la déshydratation due au gel

(Hincha *et al.*, 2000). Le raffinose (oligosaccharide de glucose-fructose-galactose) agirait également comme un cryoprotecteur dans les plantes tolérantes au gel après acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000).

La glycine bêtaïne est aussi connue pour son action stabilisante et protectrice des protéines et des membranes dans des conditions défavorables, notamment en cas de stress thermiques (Winzor *et al.*, 1992). Rajashekar *et al.* (1999) ont montré l'augmentation simultanée des niveaux endogènes de glycine bêtaïne et de la tolérance au gel de feuilles de fraisier (*Fragaria X ananassa*) pendant les trois premières semaines de traitement au froid. L'accumulation de proline est également un phénomène commun chez les plantes en réponse au stress osmotique induit par les stress hydrique, froid et salin (Thomas et James, 1993; Hernandez *et al.*, 2000) La proline agirait comme un stabilisateur de la membrane plasmique (Liu et Steponkus, 1983).

- Synthèse de protéines cryoprotectrices

Un grand nombre de protéines possèdent également des fonctions cryoprotectrices qui contribuent à la tolérance au gel, parmi elles les HSP70 (Heat Shock Protein) d'épinard (*Spinacia oleracea*) (Anderson *et al.*, 1994) et HSP90 de colza (*Brassica napus*) (Krishna *et al.*, 1995), qui sont des chaperones participant à la stabilisation des protéines contre la dénaturation induite par le gel. Récemment, une famille de petites HSP a été mise en évidence chez la châtaigne comme jouant un rôle efficace dans la protection d'une enzyme sensible au froid, la lactate déshydrogénase, de l'inactivation induite par le gel (Lopez-Matas *et al.*, 2004).

Chez le blé, l'accumulation d'une déhydrine WCOR410 (Wheat cold responsive) à proximité de la membrane plasmique a été corrélée avec la capacité de développer une tolérance au gel (Danyluk *et al.*, 1998). Un fractionnement biochimique a permis de déterminer que WCOR410 est une protéine périphérique de la membrane impliquée dans la cryoprotection de la membrane plasmique contre les effets du gel et de la déshydratation cellulaire.

Chez le chou, il a été mis en évidence une cryoprotectine de 7 kDa activée en réponse à l'acclimatation au froid (Sieg *et al.*, 1996). Cette protéine jouerait un rôle de protection des thylakoïdes des chloroplastes contre les dommages dus à l'alternance gel et dégel.

Les AFP (protéines antigel) isolées aussi bien chez les plantes (Yu et Griffith, 1999) que chez les poissons (Fletcher *et al.*, 2001) et les insectes (Duman, 2001) inhibent la croissance des cristaux de glace en s'adsorbant grâce à des ponts hydrogènes à la surface de la

glace. Chez les plantes, de telles protéines ont été retrouvées chez le seigle d'hiver (Hon *et al.*, 1994), *Brassica oleracea* (Huang et Duman, 1995), le pêcher (Wisniewski *et al.*, 1999), le blé d'hiver (Atici et Nalbantoglu, 1999), *Arachis hypogaea* (Dave et Mitra, 1998) et *Lolium perenne* (Pudney, *et al.*, 2003). Chez le seigle acclimaté à basses températures, les AFPs s'accumulent au niveau de l'apoplasme des feuilles où la glace se forme (Pihakaski-Maunsbasch *et al.*, 1996). Ces protéines apoplasmiques réduiraient la température de nucléation de la glace (Atici et Nalbantoglu, 1999).

Régulation de la pression osmotique

- Accumulation d'osmolytes

En plus de leur rôle cryoprotecteur, les sucres peuvent avoir une fonction dans l'ajustement osmotique au moment de la déshydratation cellulaire, comme cela a déjà été montré lors de l'étude du stress hydrique chez le pois (Sanchez *et al.*, 1998). Il semble que certaines réponses aux stress hydrique et gel soient communes (Jonak *et al.*, 1996). Chez l'orge, après refroidissement du méristème apical et des racines des plantes, une augmentation de la pression osmotique dans les feuilles est due en grande partie à une accumulation de sucres : le saccharose et les fructanes, et à une accumulation d'autres solutés comme le malate et le potassium (Koroleva *et al.*, 2000, 2002). L'accumulation du saccharose serait la conséquence de l'augmentation de l'activité de la saccharose phosphate synthase également retrouvée chez le blé à basses températures (Calderon et Pontis, 1985). Chez les mutants *sfr4* d'*Arabidopsis* déficients en sucres solubles, il semble y avoir une relation entre leur sensibilité au gel et la perte d'une réponse de l'ajustement osmotique. Ce qui veut dire que la sensibilité au gel est due à la sensibilité de la réponse osmotique associée à un faible contenu en sucres dans les cellules (Uemura *et al.*, 2003). Parmi ces sucres, il semble que le galactinol (galactose-inositol) et le raffinose soient impliqués dans la réponse au stress froid et pourraient agir comme des osmorégulateurs, en plus de leur action cryoprotectrice sur les membranes (Pennycooke *et al.*, 2003).

L'accumulation de proline et de glycine bêtaïne joue également un rôle important dans le réajustement osmotique du cytoplasme des plantes en réponse aux stress osmotiques (Wyn Jones *et al.*, 1977).

- Effet de l'ABA (Acide Abscissique) sur l'expression de protéines

Chez des souches sauvages de *Betula pubescens*, la photopériode jours courts associée à des basses températures induit la déshydratation des tissus, des ajustements osmotiques et

une accumulation de protéines LEA groupe 2 et 4 alors que chez les souches déficientes en ABA sensibles au gel, il n'y a plus d'osmoregulation ni présence de protéines LEA groupe 2 (Rinne *et al.*, 1998). L'ABA induirait donc la synthèse de protéines LEA qui joueraient un rôle important dans l'osmorégulation et dans la tolérance au gel.

Réajustement du métabolisme et diminution de la sensibilité à la photoinhibition

- Synthèse d'acide aminé et de protéines

Chez le blé et le seigle, il a été mis en évidence 3 groupes de protéines LEA différentes, LEA3-L1, LEA3-L2 et LEA3-L3 ressemblant à WCS19 (Wheat Cold Specific) (Ndong *et al.*, 2002). Ces protéines s'accumulent dans le stroma des chloroplastes et semblent être associées au développement de la tolérance au gel des variétés de blé et de seigle acclimatées à basses températures. Ce qui suggère que ces protéines peuvent être corrélées, comme WCS19 chez le blé (Gray *et al.*, 1996), à l'excitation des photosystèmes II. Rinne et ses collègues (1999) ont montré par des tests d'activités enzymatiques que dans des conditions de stress hydrique, la fonction majeure des déhydrines est d'assurer les processus métaboliques requis pour la survie et le développement des plantes en cas de déshydratation cellulaire.

D'autre part, la proline qui s'accumule chez les plantes en réponse aux stress abiotiques et qui jouerait un rôle en tant qu'osmolyte et cryoprotecteur, cité précédemment, protégerait également les plantes contre les effets des radicaux libres induits par les dommages cellulaires (Matysik *et al.*, 2002).

- Effet du cycle des xanthophylles

Dans le cas de la photoinhibition évoquée dans le paragraphe 1.1, il semblerait que les pigments photoprotecteurs du cycle de la xanthophylle aient un rôle spécifique dans la réponse à l'acclimatation. Des feuilles d'épinard acclimatées à basses températures ont une sensibilité réduite à la photoinhibition alors que le pool de pigments du cycle des xanthophylles (viola-, anthera- et zeaxanthine) augmente de 50% (Krause *et al.*, 1999). Le cycle des xanthophylles joue donc un rôle critique dans la protection du lumen des thylakoïdes contre une suracidification et dans la diminution de la sensibilité de la photoinhibition des PSII (Xu *et al.*, 2000).

- Acclimatation du métabolisme photosynthétique

Un taux de photosynthèse optimal nécessite une balance appropriée entre le taux de fixation de carbone et la synthèse du saccharose. Une synthèse excessive de saccharose réduit considérablement les intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin et inhibe la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate. Au contraire, si la synthèse du saccharose est ralentie (Figure 1, étape A), cela va conduire à l'accumulation des intermédiaires phosphorylés (Figure 1, étape B) et la baisse du phosphate inorganique (Figure 1, étape C), conduisant à l'inhibition de la synthèse d'ATP (Figure 1, étape D), à l'accumulation du 3-phosphoglycérate (Figure 1, étape E) et à l'inactivation de la Rubisco (Figure 1, étape F).

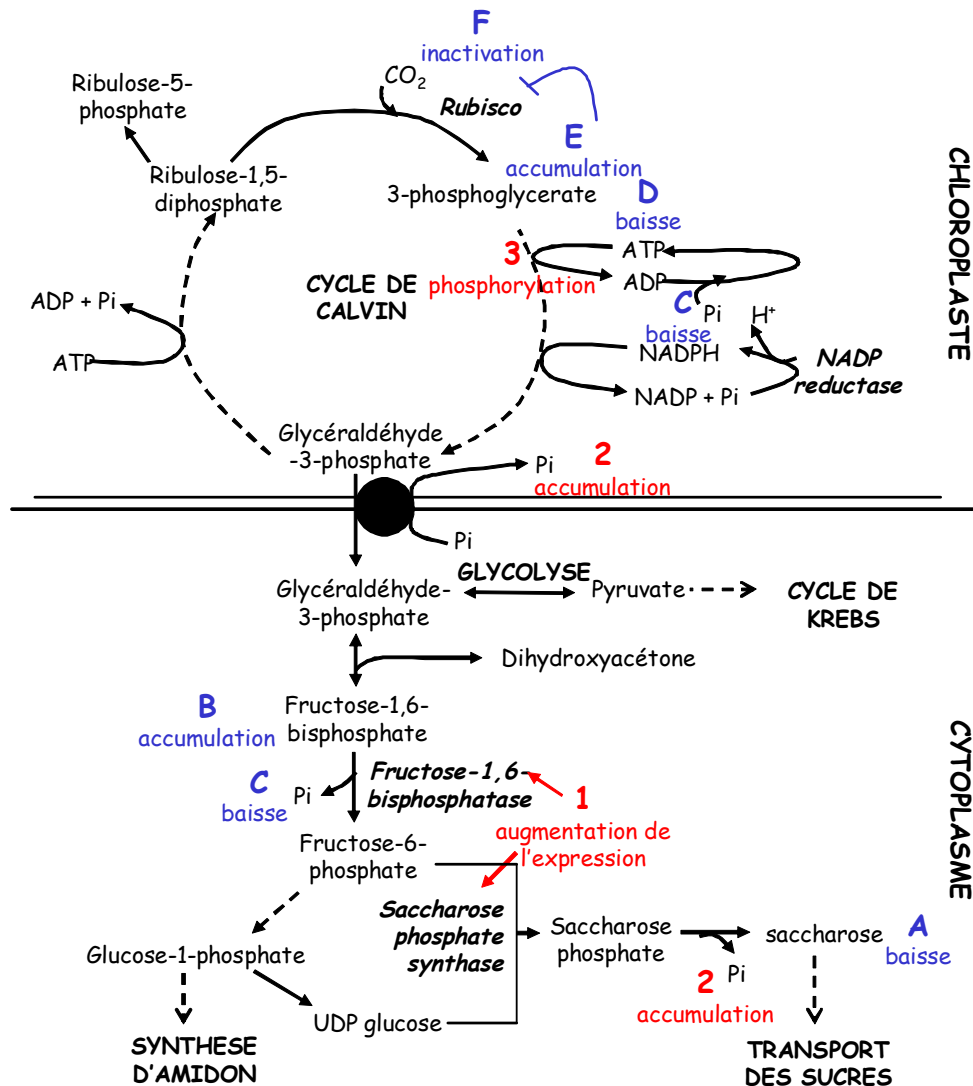


Figure 1. Régulation de la photosynthèse¹ en cas de chute des températures² chez les plantes en C3.

¹ Les chiffres correspondent aux étapes de la régulation de la photosynthèse.

² Les lettres correspondent aux étapes survenant en cas de chute des températures.

Ce dernier cas correspond à ce qui a été observé lorsque les températures chutent chez l'orge et l'épinard (Leegood et Furbank, 1986 ; Sharkey *et al.*, 1986). L'acclimatation au froid chez les céréales est associée à une élévation des taux d'assimilation du dioxyde de carbone due à l'augmentation de la capacité des enzymes du cycle de Calvin (Hurry *et al.*, 1995) et à la capacité à ajuster l'activité de la saccharose phosphate synthase (Hurry *et al.*, 1994 ; Strand *et al.*, 1999). Des études récentes chez *Arabidopsis* montrent qu'il peut y avoir réversion de l'inhibition de la synthèse du saccharose et donc de la photosynthèse lorsque les plantes s'acclimatent (Strand *et al.*, 1999 ; Hurry *et al.*, 2000). Ce rétablissement de la photosynthèse permet d'éviter la photoinhibition (Hurry *et al.*, 1994).

La synthèse du saccharose est stimulée par deux autres ajustements. Le premier est l'augmentation de l'expression des deux enzymes clés de la synthèse du saccharose : la fructose-1,6-bisphosphatase cytosolique (Figure 1, étape 1) et la saccharose phosphate synthase (Figure 1, étape 1). Le second est l'accumulation du phosphate inorganique plus importante au niveau du cytosol (Figure 1, étape 2), qui va conduire à la phosphorylation des métabolites (Figure 1, étape 3) (Hurry *et al.*, 1995 ; Strand *et al.*, 1999).

Une étude menée par Hurry et ses collègues (2000), utilisant des mutants d'*Arabidopsis* *pho1-2* et *pho2-1* qui ont respectivement un faible taux et un taux élevé en phosphate inorganique, a été réalisée pour montrer l'impact d'un faible taux de phosphate sur la tolérance au gel et le métabolisme photosynthétique. Le développement de la tolérance au gel et l'accumulation de proline et de sucres ne sont pas altérés chez les mutants *pho1-2* et au contraire inhibés chez *pho2-1*. De même, l'activité des enzymes de la biosynthèse du saccharose, de la Rubisco, des enzymes du cycle de Calvin et le taux de protéines augmentent après transfert à basses températures chez *pho1-2* et diminuent chez *pho2-1*. Un faible taux de phosphate inorganique joue donc un rôle important dans l'acclimatation au froid des feuilles d'*Arabidopsis* (Figure 2), dans la variation des activités enzymatiques du cycle de Calvin pour minimiser la séquestration du phosphate par les métabolites et dans l'augmentation de l'expression des enzymes de la biosynthèse du saccharose.

Les transcrits des gènes *COR* (Cold regulated) qui sont induits par une voie ABA indépendante sont présents à des niveaux semblables après transfert des plantes à basses températures chez les mutants *pho* et les plantes sauvages.

Le taux de phosphate inorganique n'a donc aucune influence sur l'expression des protéines induites par le froid, et la capacité des mutants à s'acclimater ou non au froid n'est pas due à une différence d'expression des gènes *COR* (Hurry *et al.*, 2000). Par contre, Gilmour et ses collègues (2000) ont montré qu'une surexpression des gènes *CBF* (*COR* binding factor) conduit à une augmentation de la synthèse de saccharose. Parmi les gènes de réponse aux basses températures, les gènes codant des enzymes impliqués dans la synthèse du saccharose ont été retrouvés (Figure 2).

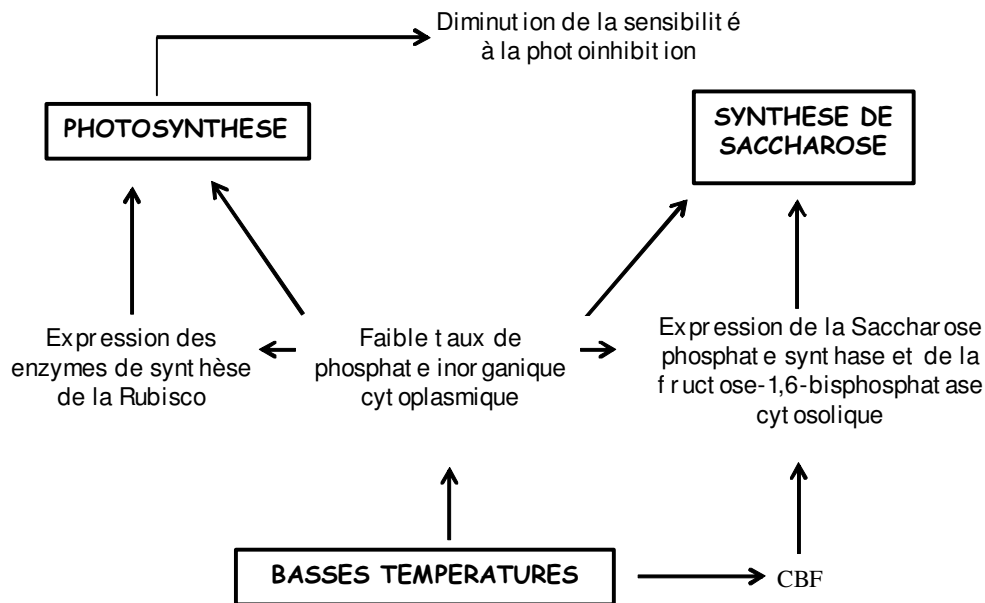


Figure 2. Schéma des interactions entre le phosphate, l'acclimatation du métabolisme photosynthétique et le développement de la tolérance au gel chez les feuilles d'*Arabidopsis*³.

1.3. Transduction du signal « basses températures » et expression spécifique des gènes de réponse au froid

L'acclimatation au froid implique de nombreux processus biochimiques décrits précédemment, mais aussi la perception du signal basses températures et la transduction de celui-ci suivies par l'induction de l'expression des gènes qui va conduire au développement de la tolérance au gel (Wanner et Juntilla, 1999). La lumière, en passant par le métabolisme de la photosynthèse, est indispensable pour fournir l'énergie nécessaire au processus de l'acclimatation au froid conduisant à l'acquisition de la tolérance au gel (Levitt, 1980). Le

³ d'après Hurry *et al.*, 2000.

signal redox chloroplastique modulé par un excès de lumière et par des basses températures va induire la transduction d'un signal conduisant à l'expression des gènes relatifs à la photosynthèse et l'expression spécifique des gènes d'acclimatation au froid. Ainsi, en plus de son rôle dans le transfert de l'énergie, l'appareil photosynthétique apparaît être aussi un détecteur des variations de l'environnement (Huner *et al.*, 1998).

Parmi les nombreux changements physiologiques qui se produisent en réponse aux basses températures, des flux d'ions calciques ont été mis en évidence quelques secondes après le transfert des plantes au froid (Knight *et al.*, 1991 ; Polisensky et Braam, 1996), et des changements de la phosphorylation des protéines après quelques minutes (Monroy *et al.*, 1993). Des variations de l'expression des gènes, comprenant des changements de l'accumulation des ARNm (Hughes et Dunn, 1996) et de l'activité enzymatique (Guy, 1990 ; Thomashow, 1990 ; Holaday *et al.*, 1992) ont eux été observés au bout de quelques heures.

Voie ABA dépendante

L'ABA est une hormone végétale qui est connue pour intervenir en réponse à différents stress. Chen *et al.* (1983) ont mis en évidence une augmentation transitoire du taux d'ABA chez *Solanum commersonii*, plante qui s'acclimata au froid en réponse à des basses températures, mais pas chez *Solanum tuberosum* qui ne s'acclimata pas au froid. D'autres part, il semble que des applications exogènes d'ABA augmentent la tolérance au gel de *S. commersonii* à basses températures. Chez les arbres comme *Betula pubescens*, les conditions climatiques en automne en champ ont permis de mettre en évidence chez des souches déficientes en ABA une tolérance au gel réduite par rapport aux souches sauvages (Rinne *et al.*, 1998). Le signal basses températures passerait donc par une hausse du taux d'ABA qui activerait l'acclimatation au froid. Les deux mécanismes possibles par lesquels l'ABA conférerait la tolérance au gel des plantes seraient le maintien d'une balance favorable à l'eau (Ristic et Cass, 1993) et l'induction de gènes spécifiques parmi lesquels ceux codant des produits protégeant contre le gel (Grossi *et al.*, 1992). Chez *Arabidopsis*, des applications exogènes d'ABA augmentent la tolérance au gel. Dans ces conditions, des gènes *COR* : *COR78*, *COR47*, *COR15a* et *COR6.6* sont hautement exprimés (Gilmour et Thomashow, 1991). Cependant ces gènes répondent également au froid chez des mutants d'*Arabidopsis* portant les mutations *abal* ou *abil* qui provoquent respectivement un blocage de la synthèse d'ABA et une insensibilité à l'ABA (Koornneef *et al.*, 1998). De même, lorsque des plantes d'*Arabidopsis* sont exposées à des basses températures, les niveaux d'ABA atteignent un maximum en 24 heures et reviennent à des niveaux normaux en 2 jours, bien que la tolérance

au gel continue à augmenter pendant une semaine, et se maintienne pendant au moins 3 semaines (Uemura *et al.*, 1995). D'après Nordin et ses collègues (1991) et Gilmour et Thomashow (1991), l'expression des gènes *COR* en réponse au froid serait le résultat d'une voie indépendante de l'ABA.

Chez le pois (Welbaum *et al.*, 1997), des résultats de test de gel et des mesures du taux d'ABA suggèrent que l'augmentation de la tolérance au gel du pois n'est pas uniquement médiée par les changements en contenu en ABA. Le mutant *wil* du pois qui produit 20% d'ABA de moins que le type sauvage (De Bruijn *et al.*, 1993) a été utilisé pour tester si l'ABA et les traitements basses températures interagissent pour augmenter la tolérance au gel. Il se trouve que la température pour laquelle le gel cause 50% de létalité (LT_{50}) est réduite de 9,3°C pour des bourgeons de plantes *wil* acclimatées au froid, ce qui démontre que le traitement par des basses températures peut augmenter la tolérance au gel chez un génotype dont la capacité à synthétiser de l'ABA est réduite.

Les études de tolérance au gel induite par l'ABA en utilisant des mutants d'*Arabidopsis* déficients et insensibles à l'ABA et ceux du pois suggèrent que le traitement basses températures et l'ABA régulent la tolérance au gel par deux voies séparées : une voie ABA indépendante et une voie ABA dépendante interagissantes entre elles (Nordin *et al.*, 1991).

Voie ABA indépendante

- Perception du signal :

Selon Murata et Los (1997), le détecteur serait situé dans un microdomaine de la membrane plasmique et serait capable de détecter des transitions de phase physique qui conduiraient à des changements conformationnels et/ou à des cycles de phospho/déphosphorylation. Monroy et Dhindsa (1995) ont les premiers pensé aux canaux calciques comme détecteur du signal basses températures. Un pic de calcium cytoplasmique a été mis en évidence après une exposition à des basses températures chez *Arabidopsis* (Knight *et al.*, 1996) et la luzerne (Monroy et Dhindsa, 1995). Cependant, le détecteur peut être un élément de régulation intervenant en amont des canaux calciques de la membrane plasmique.

Une étude sur le cytosquelette des cellules réalisée chez la luzerne a montré que la rigidification de la membrane par la cytochalasine D (un déstabilisateur des microfilaments d'actine) induit l'influx de calcium et la tolérance au gel (Orvar *et al.*, 2000). La réorganisation du cytosquelette est ainsi un élément de la transduction du signal basses températures situé entre la rigidification de la membrane et l'influx de calcium. De plus, récemment une étude a mis en évidence que l'intégration des signaux générés par la

température et la lumière est impliquée dans la transduction du signal froid (Kim *et al.*, 2002). L'expression des gènes induits par le froid chez *Arabidopsis* est fortement induite par un signal généré par la lumière. Le principal photorécepteur impliqué dans la signalisation de la lumière a été identifié comme le phytochrome B (Kim *et al.*, 2002).

- Rôle du calcium

Le calcium est un modulateur du métabolisme et du développement et sert de second messenger dans la transduction de stimuli environnementaux chez de nombreux organismes, notamment les plantes. Les parois des cellules végétales et la vacuole sont des sites de stockage du calcium, et les membranes plasmiques et le tonoplaste possèdent des canaux calciques. Les mécanismes d'activation des canaux calciques par le froid ne sont pas connus. L'étude de l'expression du gène *CAS15* (Cold acclimation specific) dont l'expression est spécifique de l'acclimatation au froid chez la luzerne a été très utilisée pour examiner le rôle du calcium et de la phosphorylation dans la transduction du signal basses températures. D'après les expériences de Monroy et Dhindsa (1995) sur la luzerne, l'utilisation de chélateurs de calcium ou d'inhibiteurs des canaux calciques diminue l'expression des gènes *CAS15*. Cependant, alors que l'EGTA (Ethylen glycol tetraacetic acid) inhibe le développement de la tolérance au gel de plus de 70%, le lanthane et le vérapamil abolissent complètement le développement de la tolérance au gel. De même l'utilisation d'un ionophore de calcium (A23187), responsable d'un influx de calcium, induit l'expression de *CAS15* à 25°C. Ainsi l'activité des canaux calciques est requise au développement de la tolérance au gel (Figure 3, étape 1).

Les étapes suivant l'influx de calcium mettrait en cause le recrutement d'une calmoduline et de protéines fixant le calcium. L'utilisation d'un antagoniste de la calmoduline inhibe complètement l'acquisition de la tolérance au gel (Monroy *et al.*, 1993).

- Régulation par phosphorylation/dephosphorylation

L'acclimatation au froid est associée à des changements rapides et réversibles de l'état de phosphorylation de protéines spécifiques préexistantes (Monroy *et al.*, 1993) et à un influx de calcium à travers la paroi cellulaire dans le cytosol (Monroy et Dhindsa, 1995). L'inhibition de l'influx de calcium ou de l'activité des protéines kinases empêche la phosphorylation des protéines induites par le froid, l'expression des gènes *CAS* et le développement de la tolérance au gel (Monroy *et al.*, 1993 ; Monroy et Dhindsa, 1995). Ainsi, il apparaît qu'une voie médiée par la phosphorylation de protéines calcium-dépendante

participe à la transduction du signal basses températures (Figure 1, étape 2). Ces protéines préexistantes participent à la régulation des gènes induits par le froid en modulant les interactions avec l'ADN ou avec d'autres protéines.

Monroy *et al.* (1998) ont rapporté qu'une PP2A (protéine phosphatase) est inactivée par les basses températures au cours de l'acclimatation au froid. D'après ces expériences, 30% de l'activité totale des phosphatases est inhibée dès 30 minutes d'acclimatation au froid, et cette inhibition persiste après la période expérimentale. Il se trouve que l'expression de *CAS* induite par les basses températures est détectée après 3 heures d'acclimatation au froid (Monroy et Dhindsa, 1995). L'inhibition de l'activité de la protéine phosphatase précède donc l'expression de *CAS15* pendant l'acclimatation au froid et PP2A est la cible principale de l'inactivation exercée par les basses températures pendant la transduction du signal. L'expression de *CAS15* n'est pas affectée par l'acide okadaïque (inhibiteur des protéines phosphatases) à 4°C, ce qui suggère la possibilité que l'activité phosphatase soit déjà inhibée à 4°C pour conduire à une induction de *CAS15*. Donc la baisse de l'activité des protéines phosphatases joue un rôle important dans la transduction du signal basses températures (Figure 3, étape 3). De plus, l'utilisation du lanthane qui empêche l'expression de *CAS15* à 4°C et l'utilisation de A23187 qui au contraire induit l'expression de *CAS15* à 25°C (Monroy et Dhindsa, 1995) ont montré dans le premier cas l'activité de PP2A et dans l'autre une inhibition de l'activité de PP2A. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de PP2A est médié par un influx de calcium. Ces mêmes auteurs ont également montré que la suppression de l'activité des phosphatases n'avait lieu ni au niveau transcriptionnel (pas de baisse des transcrits de PP2AC, sous-unité catalytique de PP2A pendant l'acclimatation au froid), ni au niveau traductionnel (pas de baisse du niveau protéique), mais au niveau post-traductionnel. L'inactivation de PP2A serait associée au démasquage d'un épitope de PP2AC. La cause la plus probable du démasquage serait un changement dans les interactions de PP2AC avec d'autres protéines. L'effet du calcium sur l'activité de PP2A se fait donc à travers l'intervention d'un régulateur intermédiaire calcium-dépendant de la transduction du signal qui va aboutir à l'inhibition de PP2A. La PP2A cytoplasmique inactive les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), les récepteurs kinases et les kinases dépendantes d'un second messenger (Barnes *et al.*, 1995). L'inactivation de PP2A par les basses températures résulte dans l'augmentation de l'activité kinase, qui va faciliter la traversée du signal jusqu'au noyau (Figure 3, étape 3).

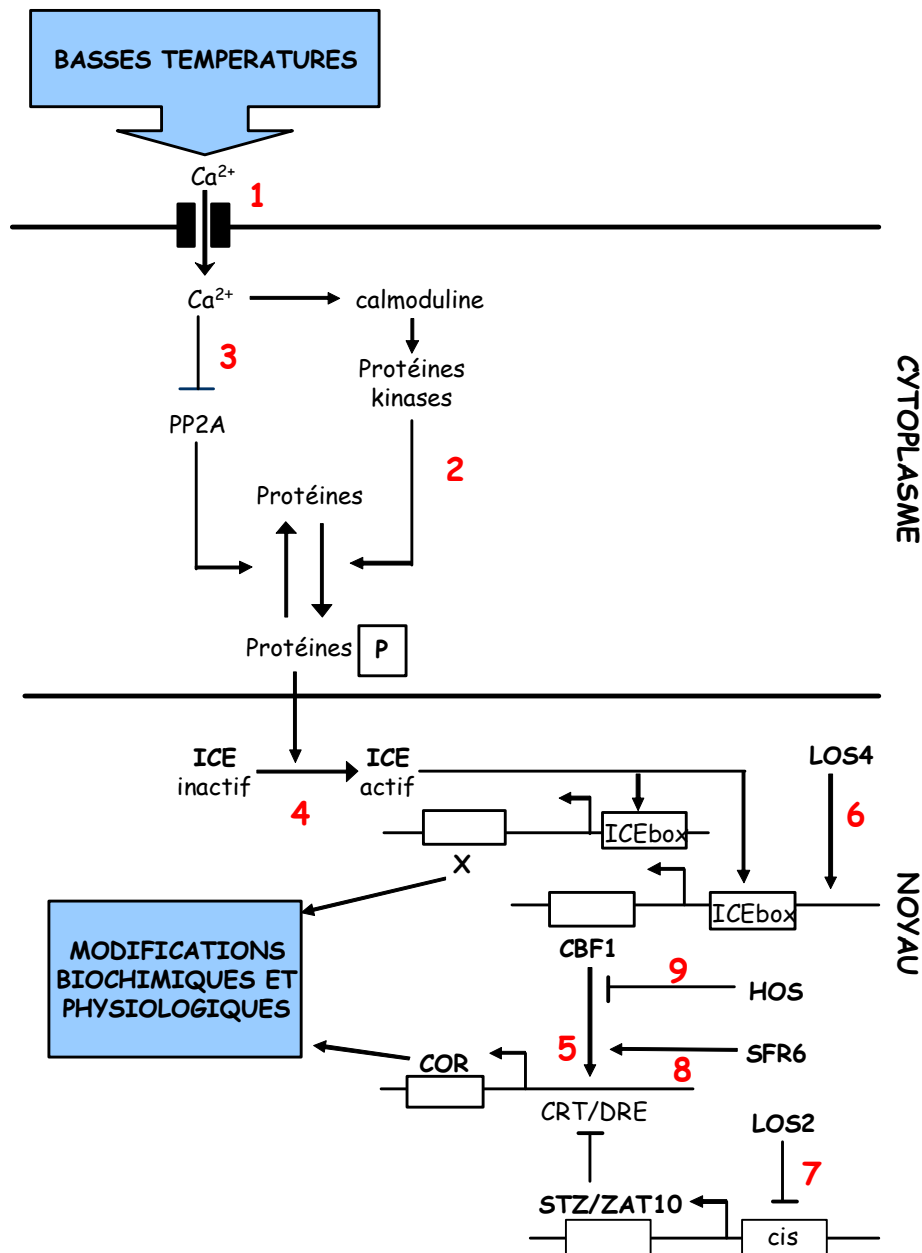


Figure 3. Schéma de transduction du signal "basses températures" chez *Arabidopsis*^{4,5}.

L'activité d'une protéine kinase sensible à la staurosporine (inhibiteur des protéines kinases) apparaît être requise pour la transduction du signal basses températures conduisant à l'expression du gène *CAS15*. L'influx de calcium étant faiblement affecté par l'inhibiteur, la protéine kinase sensible à la staurosporine agit donc après le signal calcique (Monroy *et al.*, 1998). Parmi les protéines kinases candidates, il y a les MAPK décrites par Jonak *et al.*

⁴ d'après Gilmour *et al.* 1998 et Monroy *et al.*, 1998.

⁵ Les numéros de 1 à 6 correspondent aux étapes de la transduction du signal détaillées dans le texte.

(1996), une protéine kinase S_6 ribosomiale et des protéines kinases calcium dépendantes chez *Arabidopsis* (Tahtiharju *et al.*, 1997) et chez la luzerne (Monroy et Dhindsa, 1995).

- Activation de facteurs de transcription et d'éléments de régulation

Chez les végétaux, il existe au niveau des promoteurs des gènes plusieurs éléments de réponse au froid qui possèdent une séquence commune de 5pb CCGAC : les motifs DRE (Drought Response Element ; Stockinger *et al.*, 1997 ; Gilmour *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998) ou CRT/DRE (C-repeat/dehydration responsive element) (Baker *et al.*, 1994 ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki 1994) chez *Arabidopsis*.

Un facteur de transcription appelé CBF1 pour CRT/DRE Binding Factor 1 (Stockinger *et al.*, 1997) est capable de se fixer sur les motifs CRT/DRE présents dans le promoteur des gènes *COR* notamment. Ce facteur de transcription CBF1 possède une séquence d'adressage nucléaire, une région acide qui possède un domaine d'activation de l'expression du gène, ainsi qu'un domaine AP2 (motif de 60 acides aminés) qui est présent chez de nombreuses protéines végétales et qui comprend un domaine de fixation de l'ADN (Stockinger *et al.*, 1997). CBF1 est un membre d'une petite famille de gènes codant deux autres facteurs de transcription : CBF2 et CBF3, qui possèdent également le domaine AP2 (Médina *et al.*, 1999).

Il se trouve que l'élément de réponse CRT/DRE de séquence TACCGAC ressemble à l'élément de réponse EREBP (Ethylen Response Element Binding Protein): GGCCGAC. Selon Stockinger *et al.* (1997), il existerait une superfamille de protéines de fixation à l'ADN reconnaissant une famille d'éléments de *cis* régulation porteurs de la séquence commune CCGAC. Les séquences différentes entourant ce noyau permettraient le recrutement distinct de différentes protéines porteuses du domaine AP2 intégrées dans la voie de transduction des signaux environnementaux et hormonaux. A basses températures, le niveau de transcrits des trois CBF augmentent significativement au bout de 30 minutes, atteignant un maximum au bout d'une heure, ceci étant suivi par une accumulation des transcrits des gènes *COR* (Médina *et al.*, 1999) (Figure 3, étape 5).

Les protéines CBF sont donc des facteurs de transcription qui contrôlent le niveau d'expression des gènes *COR* à basses températures et qui initient la tolérance au gel médiée par une voie ABA indépendante (Médina *et al.*, 1999). De plus, le récepteur de la température et le transducteur du signal, toujours d'après ces expériences, seraient déjà présents dans des conditions de température non inductibles.

Selon Gilmour *et al.* (1998), un facteur de transcription exprimé constitutivement reconnaîtrait le promoteur des gènes *CBF*, il s'agit de ICE (Inducer of CBF Expression) qui se fixerait sur un élément de régulation : « ICE Box » présent sur le promoteur des gènes *CBF*. A température normale, ICE serait inactif. Plusieurs hypothèses, i) il serait séquestré dans le cytoplasme par une protéine de régulation négative, ii) il se présenterait sous une forme incapable de se fixer sur l'ADN, iii) il n'activerait pas de façon efficace la transcription (Figure 3, étape 4). Des récents travaux (Chinnusamy *et al.*, 2003) confirment l'existence chez *Arabidopsis* d'un facteur de transcription ICE1 de type MYC-like bHLH (basic/Helix-Loop-Helix) qui régule la transcription des gènes *CBF3* en se fixant sur les séquences MYC présentes dans le promoteur de *CBF3*. A basses températures, ce facteur de transcription serait activé et induirait l'expression des gènes *CBF*, mais il est probable qu'il active d'autres gènes intervenant dans l'acclimatation au froid (Figure 2). De même, sur le promoteur du gène *CBF2* chez *Arabidopsis*, ont été identifiées deux séquences de fixation de ICE appelées ICER1 et ICER2 (Induction of CBF Expression région 1 et 2). Les deux séquences sont indispensables pour l'expression des gènes induits par le froid (Zarka *et al.*, 2003).

Un autre régulateur des gènes *CBF3* a été mis en évidence chez des mutants *los4* (Low expression of osmotically responsive genes) d'*Arabidopsis* qui sont sensibles au froid et n'expriment plus les gènes régulés par le froid. Le gène *LOS4* a été identifié comme codant une ARN hélicase nucléaire activatrice de l'expression des gènes *CBF* (Figure 3, étape 6) (Gong *et al.*, 2002). Grâce à cette mutation, ils ont montré l'importance de la régulation des gènes et du régulateur des gènes *CBF* en cas de stress froid. Un autre mutant d'*Arabidopsis*, *los2* chez qui la transcription des gènes de réponse au froid est inhibée, a été mis en évidence (Lee *et al.*, 2002). *LOS2* code une énoïase de la glycolyse qui est capable de se fixer sur les éléments en *cis* du promoteur du gène *STZ/ZAT10* et de réprimer l'expression de ce facteur de transcription en doigt de zinc normalement induit chez les plantes sauvages d'*Arabidopsis* (Figure 3, étape 7) et empêchant l'expression des gènes de réponse aux basses températures.

La régulation de l'expression des gènes *COR* activés par CBF intervient également une fois les gènes *CBF* exprimés. En effet, Warren et ses collègues (1996) ont montré chez des mutants *sfr6* (Sensitive to freezing) d'*Arabidopsis*, que les transcrits des gènes régulés par CBF ne s'accumulent pas normalement pendant l'acclimatation au froid. Ceci explique que ces mutants ne soient pas tolérants au gel. Cependant, il n'a pas encore été déterminé comment SFR intervient. Il ne s'agit pas d'un défaut de réponse au niveau des gènes *CBF* car les transcrits sont présents chez les mutants *sfr6* en réponse aux basses températures. SFR6 agirait donc quelque part entre les transcrits de CBF et l'induction de CBF au niveau des

régulons CBF des gènes *COR* (Figure 3, étape 8). De la même façon, Knight et ses collègues (1999) ont montré que les mutants *sfr6* sont déficients dans l'expression des gènes *KIN1* (Cold induced), *COR15a* et *LT178* (Low temperatures induced), qui possèdent tous des motifs CRT/DRE dans leurs promoteurs. Mais au contraire, l'expression des gènes *CBF*, qui ne possèdent pas de motif CRT/DRE, n'était pas affectée. Ils suggèrent que les protéines se fixant aux motifs CRT/DRE, comme CBF, doivent être activées pour jouer leur rôle dans la transcription et que SFR6 est l'élément essentiel de leur activation. Une autre mutation isolée également chez *Arabidopsis* : *hos1-1* (High expression of osmotically responsive genes ; Ishitani *et al.*, 1998) altère la température à laquelle le promoteur de *COR15a* est activé. Chez des plantes sauvages, ce promoteur est inactif pour des températures supérieures à 10°C, alors que chez les mutants, l'induction de ce promoteur peut être détectée à 19°C. De plus à basses températures, la mutation est responsable d'une « super-induction » des gènes *COR47* et *COR15a*. Le gène *HOS1* coderait donc un régulateur négatif de la transduction du signal basses températures (Figure 3, étape 9). Le produit du gène *HOS1* possède un motif « RING finger » avec une activité ubiquitine E3 ligase, ce qui implique un rôle dans la dégradation des protéines lors de la transduction du signal au froid (Lee *et al.*, 2001).

- Induction et rôle des gènes *COR* via le régulon porteur de CRT/DRE.(le « CBF regulon ») (Gilmour *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998)

Des expériences menées par Jaglo-Ottenson *et al.* (1998) ont montré que l'expression de l'ensemble des gènes *COR* chez des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* qui expriment constitutivement les gènes *CBF* augmente la tolérance au gel sans induction par des basses températures. Les polypeptides *COR* ont de grandes similitudes avec des protéines cryoprotectrices qui protègent les thylakoïdes des chloroplastes de la déstabilisation membranaire due au froid. Le gène *COR15a* mis en évidence chez *Arabidopsis*, code une protéine de 15kD dont le lieu final de résidence se trouve être le chloroplaste où elle est maturée en une protéine de 9,4kD appelée COR15am (Lin et Thomashow, 1992). L'expression constitutive de cette protéine chez des plantes transgéniques non acclimatées permet d'augmenter la tolérance au gel. Ce polypeptide jouerait un rôle dans la stabilisation de la membrane, en diminuant la transition de phase de la membrane plasmique qui est responsable des phénomènes de fusion membranaire (Steponkus *et al.*, 1998).

L'augmentation constitutive de la tolérance au gel chez les mutants *eskimo* d'*Arabidopsis* (Xin et Browse, 1998), comme chez les plantes transformées d'*Arabidopsis* surexprimant les protéines de fixation aux éléments de réponse CBF/DRE (Gilmour *et al.*,

2000), est corrélée à une augmentation de la teneur en sucres. A l'opposé, quand l'acclimatation au froid est altérée comme chez des mutants *sfr* d'*Arabidopsis*, la teneur en sucres est plus faible que chez les plantes sauvages (McKown *et al.*, 1996). Ces observations indiquent que les voies métaboliques affectées par ces mutations altèrent directement ou non les concentrations en sucres. Par ailleurs, Liu et ses collègues (1998) ont montré que l'induction du régulon CRT/DRE augmente également la tolérance à la sécheresse, ce qui veut dire que ce régulon permet la protection des cellules contre la déshydratation cellulaire en général. Les gènes *CBF* seraient responsables de l'activation de l'ensemble des éléments qui répondent à l'acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000).

Cette voie de transduction semble être conservée chez d'autres plantes qu'*Arabidopsis*. *Brassica napus* possède des gènes *CBF*-like dont les transcrits s'accumulent rapidement en réponse à des basses températures suivie par l'expression des gènes *Bn115* (Jaglo-Ottensen *et al.*, 2001). Le système des gènes *COR* est également conservé chez les monocotylédones comme le blé où a été mise en évidence l'expression de gènes possédant des séquences CRT/DRE. L'expression du facteur de transcription TaDREB1 est fortement associée à l'expression de WCS120 qui possède des séquences DRE sur son promoteur (Shen *et al.*, 2003). Le produit du gène *WCOR15* qui possède au moins 3 séquences CRT/DRE s'accumule dans les cellules de garde des chloroplastes (Takumi *et al.*, 2003).

Chez le pois, la littérature concernant les gènes induits au cours de l'acclimatation au froid est pauvre. Kung et ses collègues (1998) ont mis en évidence l'accumulation du transcrit *peaci11.8* (Pea Cold Induced) dès les 6 premières heures du traitement au froid et celle-ci reste élevée jusqu'au 10^{ème} jour. Le produit du gène *PEACIII.8* possède une séquence NTS (Nuclear Targeting Signal) qui supposerait son transport vers le noyau et des séquences homologues aux protéines LEA.

Comme nous venons de le voir, la réponse cellulaire à basses températures a été principalement étudiée au niveau de la régulation de l'expression des gènes et au niveau physiologique. Cependant, le nombre de métabolites trouvés dans une espèce excède le nombre de gènes impliqués dans la synthèse de ces métabolites. En effet, il existe plusieurs mécanismes qui permettent d'obtenir plusieurs transcrits à partir d'un gène, plusieurs protéines à partir d'un transcrit et plusieurs produits à partir d'une protéine. C'est ainsi que de nouveaux domaines d'analyse se sont développés. L'analyse du transcriptome, c'est à dire de l'ensemble des ARNm présents à un stade donné, a déjà été réalisée dans des conditions de stress (froid, salinité et osmolarité) chez *Arabidopsis* (Kreps *et al.*, 2002). Les résultats

montrent que 2409 gènes (30% du transcriptome) ont une expression qui varie de plus de 2 fois en réponse aux 3 types de stress, et que la majorité des changements est spécifique au stimulus. Une analyse transcriptomique chez *Arabidopsis* (Fowler et Thomashow, 2002) a mis en évidence que l'expression des gènes *CBF* était également responsable de la répression de l'expression de huit gènes au cours de l'acclimatation au froid, indiquant ainsi qu'en plus de l'induction de gènes, une répression de gènes jouerait aussi un rôle important au cours de l'acclimatation au froid. De plus, cette même étude a montré que 28% des gènes induits par l'acclimatation au froid n'étaient pas régulés par les facteurs de transcriptions *CBF*, ce qui suggère que ces gènes sont des membres de régulons différents. Provar et ses collègues (2003) ont réalisé une autre étude transcriptomique de la sensibilité aux basses températures chez *Arabidopsis*. Cette étude a montré que 20% des transcrits des 8000 gènes analysés s'accumulaient en réponse au froid. Les 634 gènes identifiés sont impliqués dans le métabolisme lipidique, le fonctionnement du chloroplaste, le métabolisme des carbohydrates et la détoxification des radicaux libres. Une étude similaire a été réalisée chez la canne à sucre exposée au froid pendant 48h. Trente quatre gènes induits par le froid ont été identifiés, ainsi que 25 gènes sous-exprimés pendant l'exposition au froid (Nogueira *et al.*, 2003).

L'analyse du profil métabolique chez les végétaux nécessite une haute technologie car le nombre de métabolites synthétisés est estimé entre 90 000 à 200 000. L'identification *de novo* utilisant de nouvelles technologies de spectrométrie de masse couplées aux banques de données a déjà montré son efficacité sur des extraits de feuilles d'*Arabidopsis* (^aFiehn *et al.*, 2000). De plus, les profils de 326 métabolites issus de 2 écotypes d'*Arabidopsis* ont été comparés avec 2 mutants pour un gène. Une classification hiérarchique a révélé distinctement des phénotypes métaboliques différents pour chaque génotype (^bFiehn *et al.*, 2000).

Pour identifier les mécanismes moléculaires et biochimiques impliqués dans la réponse aux basses températures chez le pois, nous avons choisi une approche protéomique, c'est à dire l'identification des protéines présentes spécifiquement pendant l'acclimatation au froid. Les modifications qualitatives et quantitatives des protéines peuvent être le reflêt soit du métabolisme des plantes qui croissent à des basses températures, soit spécifique du processus d'acclimatation au froid. Uemura et Yoshida (1984) ont montré que des protéines du plasmalemme de plantes non acclimatées diminuent et même disparaissent, alors que de nouvelles protéines sont synthétisées au cours de l'acclimatation. L'apparition d'un nouveau peptide peut cependant être la conséquence de la dégradation d'une protéine ou d'une modification post-traductionnelle différente de la protéine (Johnson-Flanagan et Singh, 1988). De même, la quantité d'une protéine dans une cellule donnée résulte de l'effet combiné de

plusieurs facteurs contrôlant l'expression des gènes : la transcription et l'épissage des gènes, les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, la maturation et la dégradation des protéines.

2. LA PROTEOMIQUE

Le protéome est un terme utilisé pour la première fois en 1995 par Wasinger pour désigner l'ensemble des produits fonctionnels exprimés par un génome à un moment précis en réponse à un environnement donné.

Les trois raisons principales qui justifient l'étude du protéome sont les suivantes.

- le protéome, contrairement au génome, n'est pas fixe pour un organisme. Il change selon le stade de développement, le tissu ou les conditions environnementales. Chaque type cellulaire ou tissulaire a son propre protéome, et cela ne représente qu'une part du génome.
- il y a plus de protéines dans le protéome que de gènes dans le génome, spécialement pour les eucaryotes. Le paradigme un gène- une protéine est dépassé. Un ARNm non mature peut conduire à plusieurs ARNm matures, de même qu'une protéine peut subir des modifications post-traductionnelles différentes.
- il n'y a pas toujours de corrélation entre l'abondance des ARNm et la quantité des protéines correspondantes dans la cellule (Anderson et Seilhamer, 1997). Une protéine peut être synthétisée sans que l'ARNm soit présent longtemps, et on peut avoir beaucoup d'ARNm et pas de traduction en protéine.

2.1. Evolution des outils de la protéomique

Electrophorèse bidimensionnelle

L'étude du protéome (protéomique) dépend essentiellement d'une technique : l'électrophorèse en gel bidimensionnelle des protéines qui permet d'étudier l'expression de plusieurs centaines de gènes et de comparer les profils protéiques entre différents génotypes, conditions environnementales, étapes de développement, ou états physiopathologiques...

Traditionnellement lors de la première dimension, le gradient de pH de l'isoélectrofocalisation est établi en utilisant les ampholytes. Cependant, les protéines étant elles-mêmes des particules chargées, en fonction de la quantité et de l'ionisation des protéines, celles-ci vont affecter le gradient de pH qui se forme au cours de l'électrophorèse, ce qui rend difficile l'obtention d'une bonne reproductibilité entre les gels. L'importance grandissante de l'étude du protéome a conduit au développement d'une nouvelle méthode

d'isoelectrofocalisation plus performante qui utilise des gels à gradient de pH immobilisé appelés gels IPG (Imobilized pH Gradient) (Görg, 1993). Ces gels présentent plusieurs avantages : une grande reproductibilité de la séparation en fonction de la charge, la capacité à séparer de grandes quantités de protéines, la possibilité de focaliser pendant des temps très important sans effet d'électroendosmose, la capacité d'utiliser un gradient de pH plus étroit et de séparer les protéines sur des gels pouvant aller de 18 à 24cm. La seconde dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle a également été améliorée afin de diminuer les variations expérimentales liées à la fabrication des gels et aux paramètres électriques de migration. Ainsi, on peut trouver dans le commerce des gels pré-coulés de 26x20cm à partir de la même solution et il est possible de faire migrer jusqu'à 12 gels dans une même cuve de migration (EttanTM DALT Large Vertical System d'Amersham).

Détection des protéines

La coloration au nitrate d'argent permet la détection des protéines avec une sensibilité d'environ 0,1 à 10 ng de protéines (Görg *et al.*, 2000 ; Corthals *et al.*, 2000). Il existe une relation linéaire entre l'intensité du spot et la concentration en protéine à partir de 0,02 ng/mm² de protéine. Cependant les concentrations en protéines supérieures à 2 ng/mm² provoquent généralement la saturation des images à l'argent et la coloration classique au nitrate d'argent n'est pas compatible avec les techniques de spectrométrie de masse. Le bleu de Coomassie R-250 compatible avec le MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight) est capable de détecter jusqu'au µg de protéines, mais il est de moins en moins utilisé au profit du bleu de Coomassie colloïdal G-250, plus sensible qui peut détecter jusqu'à 50 ng de protéines et pour lequel une relation linéaire entre l'intensité d'un spot et la quantité de protéines est validée jusqu'à 1000 ng (Nishihara et Champion, 2002).

Les colorations fluorescentes les plus récentes tel que Sypro apportent certains avantages techniques par rapport aux colorations à l'argent ou au bleu de Coomassie. La coloration au Sypro fixe les protéines de façon non covalente (Steinberg *et al.*, 1996), ce qui permet de réaliser par la suite des transferts de membrane et cette révélation se fait en peu de temps (30 minutes). De plus, la coloration avec le Sypro Ruby a une plus grande sensibilité que la coloration au bleu Coomassie colloïdal G-250, plus faible que celle au nitrate d'argent mais compatible avec la spectrométrie de masse (Berggren *et al.*, 2000). La relation linéaire entre l'intensité d'un spot et la quantité de protéines est quand à elle constante jusqu'à 1000ng comme pour le bleu de Coomassie colloïdal G-250 (Nishihara et Champion, 2002).

Analyse informatique des gels 2D

L'analyse des gels se fait à l'aide de logiciels d'analyse d'images qui n'ont cessé de se développer pour rendre l'analyse plus automatique et conviviale. Ces logiciels vont permettre d'assigner chaque polypeptide individuel, de les comparer et de les quantifier. Les logiciels les plus commercialisés sont Image Master 2D Platinum (Amersham), PDQuest (BioRad®) et Progenesis (PerkinElmer).

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse utilisant le MALDI-TOF permet l'acquisition de la masse de la protéine ou de peptides résultant d'une hydrolyse enzymatique ou chimique. Cependant, lorsque le modèle est peu référencé dans les bases de données, les masses des peptides ne suffisent pas à identifier les protéines. La spectrométrie de masse en tandem, comme le ESI-Q-TOF (Electrospray ionization quadripole time of flight) ou la trappe ionique, autorise une analyse plus fine permettant de réaliser des séquençages de peptides, ainsi que l'identification des modifications post-traductionnelles qui peuvent influencer la charge, l'hydrophobicité, la conformation et la stabilité de la protéine. Les modifications post-traductionnelles sont le plus couramment responsables de la localisation finale et de la fonction des protéines. L'analyse des modifications post-traductionnelles par spectrométrie de masse consiste à déterminer la nature, la position et le nombre des protéines et d'identifier des interactions entre une protéine et d'autres protéines, ou avec des ligands ou de l'ADN. Leur détermination peut permettre de retrouver la fonction d'une protéine et d'identifier les voies métaboliques dans lesquelles elle est impliquée (Lewis *et al.*, 2000). Ces données, enrichies d'autres paramètres comme le pI (point isoélectrique), sont traitées au moyen de programmes bio-informatiques qui vont cribler des banques de données et mettre à la disposition de tous des informations concernant les différentes propriétés physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques, génétiques, biologiques, immunologiques, architecturales, etc..., des protéines.

Bases de données de gels 2D

Il existe maintenant des banques de données 2D-PAGE (Electrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide) qui propose des banques d'images de gel 2D qui peuvent servir de gel référence. Elles fournissent des informations concernant l'identification des spots (masse moléculaire, point isoélectrique, nom de la protéine, méthode d'identification, références bibliographiques et des références concernant d'autres banques de données). SWISS-2DPAGE (Hoogland *et al.*, 2000) est une banque qui contient 1265

protéines identifiés sur 34 cartes de référence provenant de l'homme, de la souris, de *Dicotyostelium discoideum*, de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Arabidopsis thaliana*. Le tableau 1 résume quelques adresses de banques de données concernant uniquement les protéines des végétaux. Ces banques de données incluent des comparaisons des profils de polypeptides de plusieurs organes (racine, feuille, bourgeon, semence) de plantes ou de plusieurs tissus (cal, xylème, phloème) ou entre génotypes. De plus, des données physiologiques peuvent être accessibles tels que les effets des variations de saisons ou du déficit hydrique, aussi bien que des données génétiques telle que la localisation des gènes correspondants sur une carte génétique de liaison.

Adresses	Espèces
www.expasy.org/cgi-bin/map2/def?ARABIDOPSIS	<i>Arabidopsis thaliana</i>
www.rs.noda.sut.ac.jp/kamom/2de/2d.html	<i>Arabidopsis thaliana</i>
www.pierroton.inra.fr/genetics/2D/	<i>Pinus pinaster</i>
www.moulon.inra.fr/imgd/	<i>Zea mays</i>
semele.anu.edu.au/2d/2d.html	<i>Medicago trunculata</i>
	<i>Oryza sativa</i>
www.noble.org/2dpage/intro.asp	<i>Medicago trunculata</i>
	<i>Medicago sativa</i>
	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	<i>Lycopersicon annum</i>
	<i>Nicotiana tobacum</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	<i>Festuca arundinacea</i>

Tableau 1. Banques de gels 2D créés pour certaines espèces végétales.

2.2 Applications de la protéomique au monde végétal

L'analyse différentielle du protéome a déjà été fortement exploitée pour l'étude des réponses aux stress environnementaux chez les végétaux afin de mieux comprendre les mécanismes de défense contre les stress abiotiques tels que l'effet de la sécheresse (Salekdeh *et al.*, 2002) et de l'ozone (Agrawal *et al.*, 2002) sur des feuilles de riz, l'effet d'un stress salin sur les racines de blé (Majoul *et al.*, 2000) et sur les feuilles de riz (Abbasi et Komatsu, 2004), l'effet de l'anoxie sur des racines de maïs prétraitées pendant 2 à 4 heures avec un environnement pauvre en oxygène (Chang *et al.*, 2000), l'effet de la compression du bois chez le pin maritime (Plomion *et al.*, 2000) et les stress biotiques comme l'effet d'éliciteurs bactériens ou fongiques sur la phosphorylation des protéines végétales (Peck *et al.*, 2001 ;

Xing *et al.*, 2002). L'étude du protéome a également été utilisée pour étudier des processus physiologiques spécifiques des végétaux, comme par exemple la germination chez *Arabidopsis* (Gallardo *et al.*, 2002), les phénomènes de symbioses entre les légumineuses et les microorganismes (Bestel-Corre *et al.*, 2002 ; Morris et Djordjevic, 2001), la sénescence des feuilles chez le trèfle blanc (Wilson *et al.*, 2002), le passage de la germination au développement des graines de *Ricinus communis* au niveau du reticulum endoplasmique (Maltman *et al.*, 2002), la caractérisation des protéines d'anthères chez le riz (Imin *et al.*, 2001), l'utilisation de l'azote chez plusieurs variétés de blé (Bahrman *et al.*, 2004), l'étude de l'embryogenèse somatique chez asperge (Dupire *et al.*, 1999) et chez *Medicago truncatula* (Imin *et al.*, 2004). L'étude différentielle du protéome a été entreprise pour étudier les différences entre les principales voies métaboliques caractéristiques des organes : les feuilles, les racines et les graines chez le riz (Koller *et al.*, 2002), les aiguilles et le xylème chez le pin maritime (Costa *et al.*, 1999).

Une étude (Mathesius *et al.*, 2002) a permis de mettre en évidence l'intérêt de la protéomique pour les comparaisons entre espèces. Cette comparaison de protéomes entre des espèces différentes et des genres d'une même famille de plante a permis chez les Brassicacées (Marquès *et al.*, 2001) d'établir des distances génétiques entre les genres et de construire ainsi des arbres phylogéniques. Ceci peut permettre de raccourcir le passage entre le modèle et l'espèce d'intérêt agronomique. Une étude du protéome sur les graines de blé a été réalisée afin de permettre une identification plus rapide et efficace des cultivars (Skylas *et al.*, 2001). Pour la génétique moléculaire quantitative, la protéomique peut être utilisée pour cartographier les gènes et loci contrôlant l'expression des protéines responsables de la variation de caractères phénotypiques complexes. Quand on compare les profils protéiques de deux lignées différentes, on peut observer des déviations de position de protéines appelées PS (position shifts). L'explication des PS est que deux spots correspondent à des formes alléliques de la même protéine (Touzet *et al.*, 1995). Les PS sont causées par le polymorphisme des gènes codant des protéines différentes, les loci des PS sur les cartes génétiques correspondent à la localisation des gènes structuraux des protéines. L'électrophorèse bidimensionnelle peut être utilisée pour trouver des gènes candidats responsables de la variation quantitative d'un caractère par l'identification des protéines qui sont régulées par des variations physiologiques ou du développement et par la cartographie des facteurs contrôlant la quantité de la protéine codée nommée PQL (Protein quantity loci) (Damerval *et al.*, 1994).

Des exemples de fractionnement tissulaire ont eu lieu dans l'analyse protéomique de plantes. La plupart des études ont commencé par séparer la plante en au moins 3 tissus majeurs : le système foliaire, le système racinaire et la graine (Porubleva *et al.* 2001 ; Mathesius *et al.*, 2001 ; Gallardo *et al.*, 2002). Bien que les tissus proviennent de la même plante, ils produisent un très grand nombre de profils protéiques différents. Afin de réduire la complexité des échantillons, l'étape suivante a consisté à isoler des fractions subcellulaires en utilisant une combinaison de techniques biochimiques standards et des méthodologies protéomiques. Cela a déjà été rapporté pour différentes organelles comme la caractérisation protéomique de la mitochondrie pour étudier les voies métaboliques au cours du développement des plantes chez le pois (Bardel *et al.*, 2002) et chez *Arabidopsis* (Kruft *et al.*, 2001 ; Millar *et al.*, 2001), du chloroplaste (Peltier *et al.*, 2000), de la membrane chloroplastique (Seigneurin-Berny *et al.*, 1999), et de la matrice extracellulaire sur des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* (Ndimba *et al.*, 2003).

Tout récemment, une étude protéomique sur l'acclimatation au froid (Kawamura et Uemura, 2003) a été réalisée sur les membranes chloroplastiques d'*Arabidopsis*. Trente huit protéines dont l'expression quantitative est modifiée au cours de l'acclimatation au froid dès le premier jour ont été identifiées. Parmi ces protéines, on retrouve celles associées à la réparation des membranes plasmiques et à leur protection contre les stress osmotiques, mais aussi à l'augmentation de la fixation du CO₂ et de la protéolyse.

3. CADRE DE L'ETUDE

3.1. Description du pois

Le pois (**Embranchement** : *Spermatophyta* ; **Sous embranchement** : *Magnoliophyta* ; **Classe** : *Magnoliopsida* ; **Famille** : *Papilionaceae* ; **Genre et espèce** : *Pisum sativum*) est une plante annuelle cultivée essentiellement dans le Midi et l'Ouest de la France. Il existe plusieurs types et utilisations différentes du pois, parmi lesquels on retrouve :

➤ **le pois fourrager** : ces variétés produisent une quantité élevée de matière verte à l'hectare mais très peu de graines et les gousses sont petites. Elles sont cultivées pour une production de fourrage vert destiné à l'alimentation animale après ensilage. Ces variétés présentent des caractéristiques morphologiques particulières liées à une certaine résistance au gel.

➤ **le pois protéagineux** : il est utilisé en grain sec dans l'alimentation animale. Il constitue un apport protéique (25% de protéines) et énergétique (50% d'amidon).

Le pois, riche en énergie, en protéines et en lysine, est particulièrement bien adapté à l'alimentation des porcs.

3.2. Historique

L'augmentation régulière de la consommation de viande et de produits animaux furent les principales raisons du développement de l'élevage français, et de son industrialisation. Dans ces conditions, les fourrages et les céréales ne suffisaient plus à assurer les besoins protéiques des animaux qui doivent recevoir en supplément un aliment composé de matières riches en protéines (MRP) pour lesquelles la France reste déficitaire et donc dépendante vis à vis de l'étranger (92% des tourteaux de soja consommés sont importés des Etats-Unis). En 1973, cette dépendance en MRP s'est faite ressentir suite à l'embargo des Etats-Unis. Un programme de recherche visant à développer des plantes riches en protéines adaptées aux conditions agroclimatiques françaises a été mis en place. Le pois fait parti des plantes possédant ces critères intéressants.

Cependant, jusqu'à aujourd'hui les rendements de la culture de pois sont variables (Figure 4). Aussi, les sélectionneurs ont eu l'idée de créer un type « hiver » chez le pois protéagineux avec un semis d'automne. La précocité du semis va conduire à une augmentation de la production de la biomasse due à l'allongement de la durée du cycle végétatif, et le gain de la précocité à la floraison permettra d'éviter les stress hydriques, thermiques (sécheresse et chaleur liées à la fin de cycle) et parasitaire responsables de la baisse du rendement. D'autre part, le semis d'automne présente d'autres avantages agricoles, économiques et environnementaux. Il permet d'éviter de semer le pois dans des terres difficiles à travailler au printemps (terres lourdes, argileuses et battantes), d'assurer la couverture du sol durant l'hiver, et donc de limiter les risques de lessivage d'azote.

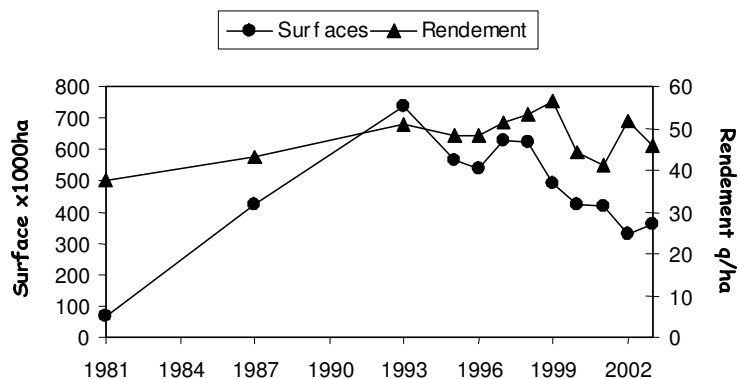


Figure 4. Surface et rendement du pois de 1981 à 2003 en France⁶.

⁶ Sources : Commission UE - UNIP, d'après sources professionnelles et nationales (pour 1996 à 2003).

Un semis d'automne implique que le pois d'hiver présente une résistance aux stress biotiques (maladies), mais surtout abiotiques, notamment face au gel au cours de l'hiver. C'est ainsi qu'au début des années 70, l'INRA a obtenu la première variété de pois d'hiver résistant au froid : Frimas ; issue d'un croisement entre Champagne (pois fourrager) et Vitalis (pois potager). Dans les années 90, l'INRA a maintenu un programme d'amélioration variétale, accompagné de la recherche d'outils de sélection pour la résistance au gel.

3.3. Etudes en cours sur la tolérance au gel du pois

Un programme de recherche sur l'étude de la tolérance au gel chez le pois a été mis en place afin de caractériser les mécanismes qui surviennent au cours de l'acclimatation au froid et qui confèrent une tolérance au gel. L'ensemble des études repose essentiellement sur 2 variétés de pois, Champagne, pois fourrager tolérant au gel après acclimatation au froid, et Tèrese, pois protéagineux, sensible au gel même après une exposition à des basses températures, ainsi que sur des lignées recombinantes F9 issues du croisement Champagne x Tèrese.

Une des études incluse dans le programme d'amélioration végétale a pour but d'identifier les locus impliqués dans la résistance au gel et dans la précocité de floraison. En effet, l'initiation florale est responsable d'une augmentation de la sensibilité des plantes au gel. Ainsi le principal objectif de cette étude est de sélectionner des génotypes ayant une initiation florale retardée tout en gardant une précocité de floraison suffisante pour éviter les stress hydriques et thermiques de fin de cycle, préjudiciable au rendement. Les deux gènes majeurs contrôlant le maintien à l'état végétatif chez le pois sont *Lf* (Late flowering) qui détermine la précocité intrinsèque des variétés et *Hr* (High response) qui amplifie la sensibilité à la photopériode et bloque le passage des bourgeons à l'état reproducteur en jour court (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). Le génotypage pour le locus *Hr* a été réalisé pour 146 lignées F9 et a permis de localiser le gène *Hr* sur la carte génétique des lignées recombinantes. De plus, 4 QTL (Quantitatif trait loci) déterminant le niveau de résistance au gel chez le pois ont pu être localisés et le QTL le plus significatif colocalise avec le locus *Hr*. De même, 4 autres QTL liés au début de floraison et à la durée de la floraison ont été mis en évidence.

Ainsi, pour permettre de localiser les QTL représentatifs des fonctions mises en place au cours de l'acclimatation au froid et d'identifier les gènes candidats correspondants, d'autres études menées en parallèle en collaboration avec l'INRA de Péronne, l'Université de Jules Verne et l'ISA de Beauvais, et l'USTL ont été mises en œuvres. Elles concernent

l'étude de l'expression des ARNm (le transcriptome) et des protéines (le protéome) au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne et Tèreè, mais également, des mesures de la pression osmotique, de la conductimétrie, de la teneur en solutés, de l'activité des enzymes de la photosynthèse et de la composition et fluidité des membranes.

3.4. Démarche et objectif de notre étude

Notre participation dans ce programme de recherche a consisté en l'étude des variations de la composition de certains métabolites connus pour s'accumuler au cours de l'acclimatation au froid et des variations du protéome au cours de l'acclimatation au froid chez le pois.

Notre travail concernant le dosage des métabolites, détaillée dans la partie 1, repose sur l'étude de la répartition du carbone chez plusieurs variétés de pois réalisée par Bourion et ses collègues (2003) qui a mis en évidence une accumulation des sucres solubles 3 fois plus élevée chez Champagne que chez Tèreè au cours de l'acclimatation au froid. Les objectifs de notre travail ont été : i) d'identifier les sucres solubles responsables de l'accumulation du contenu en sucres solubles, ii) de mettre en évidence l'accumulation d'autres métabolites au cours de l'acclimatation au froid iii) de déterminer une relation entre l'accumulation des sucres solubles et des métabolites et l'acquisition de la tolérance au gel après acclimatation au froid. Pour réaliser cette étude, les deux génotypes extrêmes pour leur réponse à l'acclimatation au froid, Champagne, tolérant au gel et Tèreè sensible au gel ont été utilisées, ainsi que 59 lignées recombinantes issues du croisement des deux génotypes. Pendant les différents phases du développement en condition de culture contrôlée, les contenus en saccharose, glucose, fructose, raffinose et stachyose ont été déterminés dans l'appareil aérien et racinaire de Champagne et Tèreè, ainsi que les contenus en amidon, en acides organiques (malate, citrate et succinate) et en proline. En conditions de culture en champ, les contenus en sucres solubles ont été également déterminés chez Champagne et Tèreè et les 59 lignées recombinantes.

Le travail réalisé sur l'étude des modifications du protéome au cours de l'acclimatation au froid a consisté à la mise en oeuvre d'une méthode d'analyse des variations du profil protéique, présentée en partie 2. Nous avons focalisé ce travail sur l'analyse des variations qualitatives (présence/absence) afin: i) de mettre en évidence les variations de l'expression des protéines spécifiques de l'acclimatation au froid, ii) d'identifier ces protéines et les métabolismes dans lesquels elles sont impliquées et iii) de déterminer les mécanismes qui interviennent au cours de l'acclimatation au froid et qui sont critiques pour l'acquisition

de la tolérance au gel. Cette étude a été réalisée à partir de la même expérimentation en condition de culture contrôlée mise en place pour l'étude des métabolites

Le travail décrit dans la dernière partie du manuscrit, aborde une étude technique réalisée afin d'évaluer les variations expérimentales survenant lors d'une analyse des variations quantitatives du protéome. Cette étude compare deux méthodes de coloration (nitrate d'argent et Sypro Ruby) et deux méthodes de constitution des échantillons.

1. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS EXPERIMENTALES

1.1. Présentation des génotypes et méthode d'évaluation de la tolérance au gel

Les deux génotypes utilisés sont :

- Champagne, pois fourrager, résistant au gel après la phase d'acclimatation.
- Tèrese, pois protéagineux, sensible au gel (ne survit pas) après la phase d'acclimatation.

Ces deux génotypes ont été croisés et les individus issus de la F2 ont été utilisés pour obtenir par autofécondations successives 164 lignées recombinantes en F9.

Afin d'étudier le phénomène d'acclimatation au froid nécessaire à l'induction de la tolérance au gel du pois cultivé en champ pendant l'hiver, la mise au point d'un test de gel à -8°C après une phase d'acclimatation a été réalisé sur une douzaine de génotypes par l'équipe d'Amélioration génétique des plantes de l'INRA de Mons-Péronne. Ce test de gel a nécessité la mise en place d'un système de notation des dégâts (Figure 5) du gel pour permettre de caractériser la réponse au gel des génotypes.

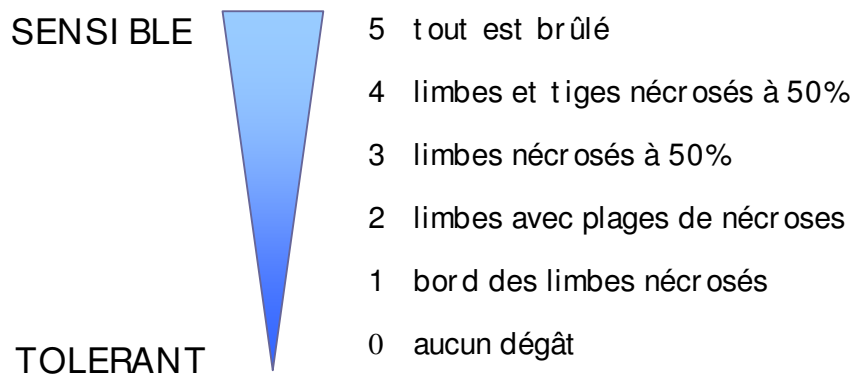


Figure 5. Schéma de l'échelle de notation de la tolérance au gel en fonction des dégâts causés par le gel sur l'appareil aérien du pois.

1.2. Protocole expérimental

Conditions de culture et prélèvement des plantules en conditions contrôlées (Figure6)

La croissance des plantes est réalisée à température contrôlée dans une chambre de culture de la station INRA de Génétique et d'Amélioration des Plantes localisée à Mons-Péronne en France. Le nombre de PAR (Photosynthetically active radiation) reçu par les plantes est de $\sim 250 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$. La lumière artificielle est émise par des lampes

fluorescentes (Flou compactes®, Philips; Fluora® and Biolux®, OSRAM). Les graines sont mises à germer en terrines avec des températures de 19°C le jour et 12°C la nuit pendant 11 jours avec une photopériode de 10 heures de lumière. Les plantes sont ensuite soumises à 10 jours d'acclimatation au froid avec 10°C le jour et 2°C la nuit. Des plantes contrôles (non acclimatées) sont conservées à 19°C le jour et 12°C la nuit jusqu'à 15 jours de croissance. Toutes les plantes (dont les plantes contrôles) vont ensuite subir pendant 4 jours une période de gel à -8°C la nuit et 6°C le jour et 8 heures de lumière. Finalement les plantes sont replacées à 16°C le jour et 5°C la nuit pendant 8 jours afin de constater les effets du gel sur les deux géotypes après ou non une phase d'acclimatation. Les températures et les photopériodes des phases d'acclimatation, du stress gel et du réchauffement correspondent aux températures moyennes et aux photopériodes rencontrées respectivement en Novembre-Décembre, en Janvier et en Mai dans le nord de la France (Lejeune *et al.*, 1999). Trois répétitions de 5 et 10 plantes ont été réalisées respectivement pour l'étude des métabolites et du protéome pendant les quatre phases de l'expérimentation.

Le choix des dates de prélèvements a été fait en fonction du nombre de degré jour reçu par les plantes en utilisant 0°C comme température de base (Etévé *et al.*, 1982).

Cinq prélèvements ont été réalisés (Figure 6):

- après 149 degrés jours de culture (P1).
- après 190 degrés jours de culture pour les plantes acclimatées (P2).
- après 217 degrés jours de culture pour les plantes contrôles et acclimatées (P3).
- après 222 degrés jours de culture pour les plantes contrôles et acclimatées (P4).
- après 299 degrés jours de culture pour les plantes contrôles et acclimatées (P5).

À chaque stade de prélèvement, une notation, qui correspond au nombre de feuilles complètement développées est réalisée afin d'évaluer le stade de développement des plantes, ce qui permet ainsi de suivre le rythme de croissance des plantes au cours de la phase d'acclimatation pour chaque géotype.

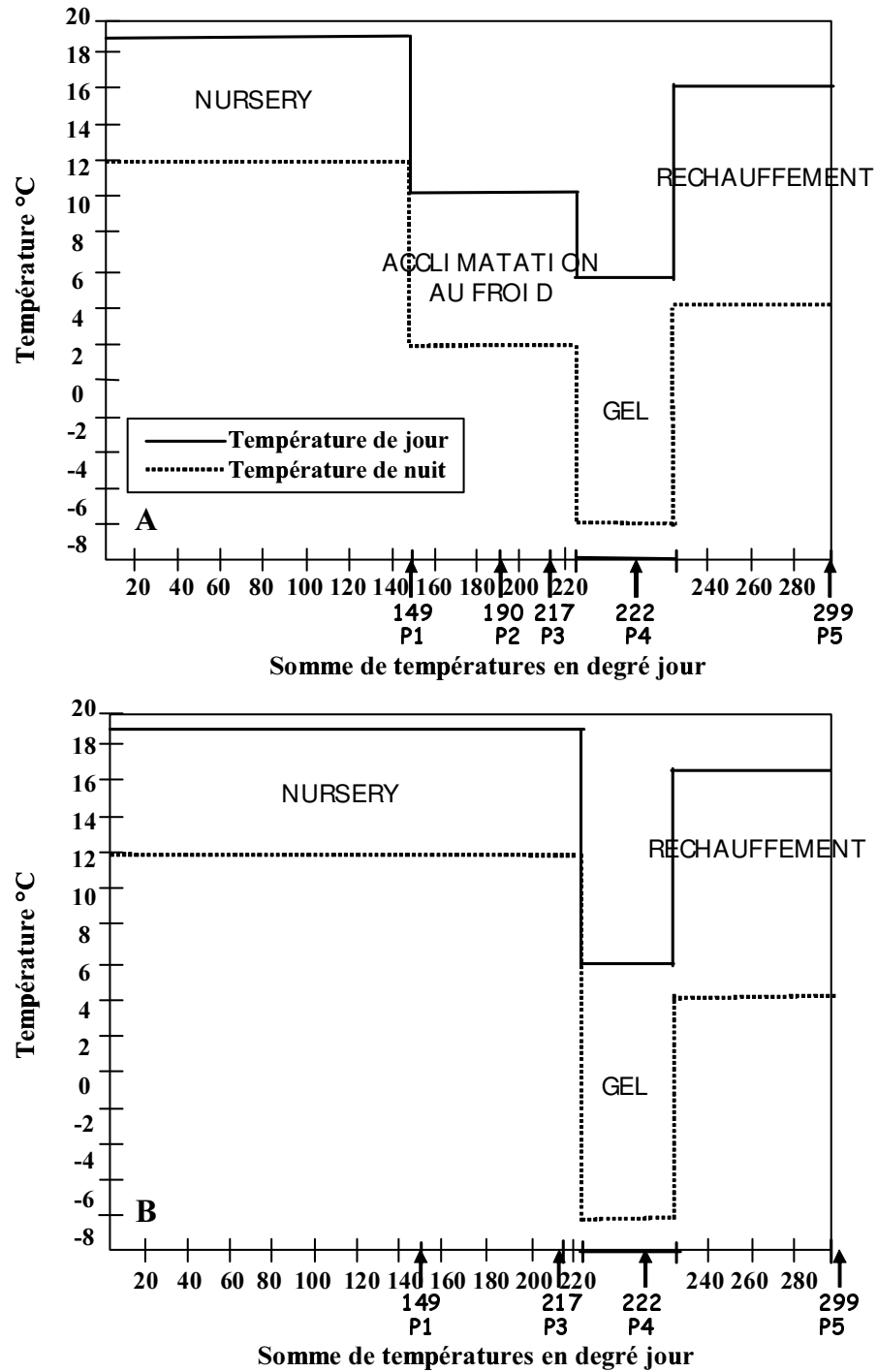


Figure 6. Températures de l'expérimentation avec acclimatation au froid (A) et l'expérimentation contrôle (B) en fonction du nombre de degré jour⁷.

⁷ Les stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5 avec la somme de températures correspondante sont indiqués par une flèche.

Conditions de culture et prélèvements des plantules en champ.

Les géotypes Champagne et Tèreèse et les 59 lignées recombinantes ont été cultivés en champ à l'INRA de Theix. Les graines ont été semées le 27 octobre 2002. Les températures dans l'air et le sol ont été mesurées avec des sondes dispersées dans la parcelle de l'expérimentation. Trois répétitions de l'appareil aérien de 5 plantes ont été prélevées le 3 décembre 2002, pendant une période de basses températures non gélives. Dans le but d'évaluer les dommages causés par le gel, l'expérimentation a été maintenue jusqu'au 20 janvier 2003 et s'est terminée par la notation de la tolérance au gel des plantes en utilisant l'échelle de notes prédéfinie.

2. ANALYSE DU CONTENU EN COMPOSES CARBONES

L'étude du contenu en composés carbonés a été réalisée sur l'appareil aérien et racinaire de Champagne et Tèreèse en chambre climatisée pour les différents stades de prélèvement P1 à P5 (moins P2) et sur l'appareil aérien de Champagne, Tèreèse et 59 des lignées recombinantes cultivés en champ et prélevés pendant une période de basses températures non gélives.

2.1. Mesure de la matière fraîche et de la matière sèche

Les appareils aérien et racinaire des plantules sont dissociés. La matière fraîche est rapidement pesée et lyophilisée pendant 48 heures. Le matériel séché est pesé et le contenu en eau déterminé.

2.2. Dosage des sucres solubles et des acides organiques

Les échantillons foliaires et racinaires de chaque stade sont broyés dans l'azote liquide et lyophilisés. Dix à 20 mg de matériel foliaire et racinaire broyés sont extraits dans de l'éthanol 80% à 70°C pendant 30 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 3500 g. Le surnageant est prélevé et conservé à 4°C pour l'extraction de l'amidon. Le culot est resuspendu dans de l'éthanol 80% et placé à 70°C pendant 15 min. L'extraction à chaud est à nouveau répétée. Les trois surnageants sont mélangés et séchés au speed vac. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans 100 à 150 µL d'eau distillée, puis filtré avec des filtres de 0,45 µm. Vingt µL de chaque échantillon sont analysés par HPLC utilisant une colonne IOA-1000 (Alltech) et un détecteur par réfractométrie (Refractomonitor IV). Pour séparer tous les pics de sucres et d'acides organiques, deux injections pour chaque échantillon sont réalisées. Pour la première injection, la température de la colonne est de 40°C et le flux de la phase

mobile, une solution d' H_2SO_4 (0.0085N), est de 0,4 mL/min. Pour la deuxième injection, la colonne est placée à une température de 25°C et le flux de la phase mobile est élevé à 0,6 mL/min. Une gamme étalon de standards de chaque sucre et acide organique ainsi qu'un mélange sont réalisés afin d'identifier et de quantifier les sucres et les acides organiques séparés par la colonne en comparant les temps de rétention et les aires des pics.

2.3. Dosage de l'amidon

Pour déterminer la concentration en amidon, les surnageants obtenus après extraction des sucres, ont été séchés. Le protocole de dosage du kit Enzymatic BioAnalysis de R-Biopharm a été suivi. Le culot obtenu est resuspendu dans 100 μL d'une solution d' HCl (32%) et placé à 60°C pendant 1 heure. Le pH est ensuite ajusté à 4,5 avec une solution de NaOH 5 M. Cent μL d'amyloglucosidase sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite placés à 60°C pendant 30 min. Les tubes sont centrifugés à 2000 g pendant 15 min, et le surnageant est évaporé jusqu'à réduction à 100 μL d'échantillon. La quantité d'amidon correspond au dosage du glucose contenu dans le surnageant.

2.4. Dosage de la proline

Le dosage de la proline a été réalisé selon le protocole décrit par Bates et ses collègues (1973). Cinquante mg de matière sèche de chaque échantillon sont broyés puis extraits avec 2 mL d'acide sulfosalicylique 3% et ensuite centrifugés à 14 000 g pendant 10 min. Un mL de surnageant est ajouté à 1 mL d'une solution d'acide ninydrique et 1 mL d'acétique acétique glacial. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure dans un bain d'eau bouillante, puis refroidis dans la glace. Les échantillons sont ensuite mélangés avec 2 mL de toluène. Après séparation des phases, l'absorbance de la phase organique est mesurée à 520 nm et comparée avec la courbe étalon d'une gamme de proline.

2.5. Analyse statistique

Les teneurs des éléments dosés ont été soumis à une analyse statistique pour tester les différences entre les stades et les génotypes. Pour cela, une analyse de variance utilisant une procédure GLM a été réalisée à partir de SAS (SAS Institute Inc. 1989). Les différences significatives des moyennes ont été testées avec le test de Student-Newman-Keuls avec un indice de confiance 95%. Un test de corrélation de Pearson a été réalisé afin de déterminer les corrélations entre les teneurs en sucres et les notes de tolérance au gel au seuil de 0.01.

3. ANALYSE DU PROTEOME

L'étude du contenu protéique de Champagne et de Tèreè est réalisée séparément pour le bourgeon apical, le système foliaire (stipules et folioles pour Champagne, stipules et vrilles pour Tèreè), la tige et le système racinaire, aux différents stades de la cinétique des plantes contrôles et des plantes endurecies. Cela correspond à 60 conditions différentes à analyser. De plus 3 répétitions de 10 plantules pour chaque condition ont été prélevées. Par répétition les plantules ont été mélangées afin de constituer un échantillon protéique.

3.1. Extraction et dosage des protéines

L'extraction des protéines est réalisée selon le protocole décrit par Boyer *et al.* (1993). Les tissus conservés à -80°C sont broyés dans un mortier avec de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre. Les protéines sont extraites dans 1 mL de tampon d'extraction 1 (Annexe 1) et précipitées à -20°C pendant au moins 45 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 25 000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est repris dans 1mL de tampon d'extraction 2 (Annexe 1) et les protéines sont précipitées à nouveau pendant 45 min à -20°C . Après centrifugation à 4°C pendant 20 min, l'étape de précipitation est répétée une nouvelle fois. Après élimination du surnageant, le culot est séché à température ambiante. Les protéines sont solubilisées pendant au moins deux heures à température ambiante ($20-22^{\circ}\text{C}$) à une concentration finale de $60 \mu\text{L.mg}^{-1}$ dans un tampon de solubilisation (Annexe 1). Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du Kit BioRad® Dc Protein Assay.

3.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

Séparation en fonction du pI par isoélectrofocalisation avec immobilines

La première dimension a été réalisée sur des gels IPG (BioRad®, 170 mm, linéaire pH 4 à 7) en utilisant le système PROTEAN® IEFCell de BioRad®. L'IEF est précédée par une réhydratation des gels. Quatre-vingt μg de protéines sont mélangées au tampon de réhydratation (Annexe 2). Une réhydratation active (avec passage d'une tension de 50 V) est appliquée pendant 16 heures. A la fin de la réhydratation du gel, des mèches de papier absorbant imbibées d'eau sont placées entre les extrémités du gel et les électrodes.

La focalisation qui se fait en trois étapes est ensuite réalisée: montée progressive à 250 V pendant 1heure, montée rapide à 8000 V pendant 5 heures et application de 8000 V jusqu'à atteindre 150000 Vh. A la fin de la focalisation les gels IPG sont conservés à -80°C dans un tampon d'équilibration avant de réaliser la seconde dimension.

Pour une électrophorèse préparative, la quantité d'échantillon déposée en 1^{ère} dimension est plus importante, jusqu'à 250 µg de protéines tout en respectant le volume maximum de 400 µL et le rapport 1 volume d'échantillon pour au moins 4 volumes de tampon de réhydratation.

Séparation en fonction de la masse moléculaire par électrophorèse SDS PAGE

Les gels IPG sont préalablement équilibrés avec un tampon d'équilibration 1 dénaturant (Annexe 2) pendant 15 minutes puis à nouveau 15 minutes dans un tampon d'équilibration 2 (Annexe 2). Les gels de 2^{ème} dimension (200 x 185 x 1 mm) à 11% (Annexe 2) sont montées sur un support (Protean II xi Cell) et réfrigéré à 10°C pendant la migration. Les gels IPG sont déposés au sommet des gels de 2^{ème} dimension dans une solution d'agarose LMP (Low melting point) 0,5% préparée dans le tampon de migration. La migration est réalisée par application d'une tension de 50 V pendant une heure puis de 350 V. La migration prend fin lorsque le front de migration, mis en évidence par le bleu de bromophénol, atteint le bas du gel.

Méthodes de coloration des protéines

Pour réaliser l'étude analytique des variations de l'expression des protéines, la méthode de coloration des protéines utilisée est celle de Blum et *al.* (1987) qui est basée sur la réduction ionique de l'argent. A la fin de la migration, les gels sont placés dans une solution fixatrice (Annexe 3) pendant 2 heures. Après fixation des protéines, le gel est rincé trois fois dans l'éthanol 50% (v/v) pendant 20 min, puis plongé dans une solution de prétraitement (Annexe 3) pendant une minute. Le gel est ensuite rincé trois fois à l'eau ultrapure pendant 20 secondes puis placé pendant 20 min dans la solution d'imprégnation du nitrate d'argent (Annexe 3) nitrate d'argent 0,1% et formaldéhyde (37%) 0,075%. Après deux lavages rapides à l'eau ultrapure les gels sont révélés avec une solution de révélation (Annexe 3). La réaction est stoppée par remplacement de la solution de révélation par la solution fixatrice (sans formaldéhyde). Les gels sont ensuite conservés dans l'éthanol 50% jusqu'au moment du scan.

Pour la réalisation des gels préparatifs, à la fin de la seconde dimension, les protéines sont fixées pendant deux heures dans 300 mL par gel d'une solution d'éthanol 40% et d'acide acétique 10%. Les gels sont ensuite incubés dans 300 mL de Sypro Ruby toute une nuit. Puis ils sont rincés, tout d'abord pendant deux heures dans 300 mL d'éthanol 30% et acide acétique 7%, puis au moins deux heures dans l'eau distillée.

3.3. Traitement informatique des données

Analyse qualitative des données protéiques

L'analyse et la comparaison des gels révélés s'effectuent à l'aide du logiciel 2D Analyser (Bioimage®) à partir d'une station SUN® Sparcstation 20. Avant séchage, les gels sont numérisés avec un scanner Sharp JX-330. La quantification de spots requiert la calibration du scanner à l'aide d'une gamme d'intensités standard connues. La détection des spots est suivie par une correction visuelle. L'analyse qualitative est basée sur l'intensité intégrée de la gaussienne de chaque spot, qui représente le volume de chaque spot calculée par la somme de chaque pixel à l'intérieur du contour du spot (air x hauteur) moins le bruit de fond. Au moment de la comparaison des gels entre eux, une normalisation de l'intensité des spots est réalisée en utilisant le rapport de l'intensité du spot et l'intensité total des spots présents sur le gel. L'alignement des gels est réalisé grâce à la sélection de 15 à 20 spots comme marqueurs. La comparaison est réalisée selon le schéma décrit dans la Figure 7.

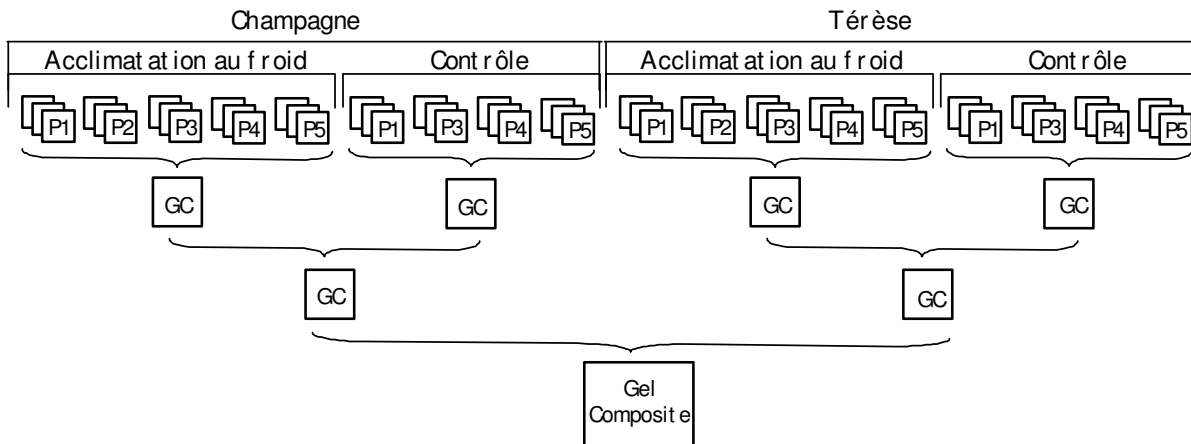


Figure 7. Méthode de comparaison des profils protéiques pour chaque organe⁸.

Un gel composite à partir de l'alignement des gels a été construit (nombre de gels = 3 répétitions x 2 génotypes x 7 échantillons = 42 pour les organes feuille, bourgeon, et tige ; nombre de gels = 3 répétitions x 2 génotypes x 9 échantillons = 54 pour l'organe racine), contenant tous les spots observés pour chaque organe séparément.

Les gels colorés au Sypro Ruby pour l'étude de la reproductibilité qualitative et quantitative réalisée dans le chapitre 3, sont scannés avec le système d'acquisition d'images

⁸ Pour chaque stade de prélèvement, pour les deux expérimentations et les deux génotypes, trois répétitions de la migration des protéines ont été réalisées. Chaque répétition correspond à l'extraction des protéines d'un mélange de 10 plantes.

TYPHOON (APBiotech) et analysés avec le logiciel Progenesis Workstation Version 2003.01 (APBiotech). La détection automatique des spots pour chaque gel est suivie d'une correction manuelle. Le gel ayant le plus grand nombre de spots détectés est choisi comme gel de référence. La soustraction du bruit de fond est réalisée et les spots sur le gel de référence sont appariés aux spots présents sur les autres répétitions en utilisant la méthode combinant le « warping » et l'appariement. Une vérification et une correction manuelle des spots appariés sur les gels sont réalisées. L'intensité des spots de chaque gel est normalisée et est utilisée pour les calculs statistiques des niveaux d'expression des protéines.

Classification hiérarchique

Seuls les spots présents sur les trois répétitions des conditions où ils apparaissent sont utilisés pour réaliser l'analyse de l'expression différentielles des protéines. Pour réaliser la classification hiérarchique des protéines en fonction de leur expression quantitative au cours de la cinétique contrôle (sans acclimatation) et la cinétique avec acclimatation, nous avons utilisé deux logiciels, le premier nommé Cluster sert à normaliser les valeurs du tableau et à calculer les distances, et le second nommé Tree permet de visualiser la classification hiérarchique des données (ces deux logiciels sont téléchargeables sur rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm). La méthode de classification utilise des algorithmes standards pour ranger les protéines en fonction de la similarité de leur profil d'expression. L'algorithme de la classification hiérarchique est basé sur la méthode de liaison moyenne de Sokal et Michener (1958). Les relations entre les protéines sont représentées par un arbre dont la longueur des branches reflète le degré de similarité entre les protéines. A chaque date de la cinétique, une couleur est associée à chaque protéine en fonction de son expression quantitative et qualitative (Eisen *et al.* 1998).

3.4. Identification des protéines

Digestion des protéines

Les spots découpés sur les gels sont déshydratés avec 100 µL d'acétonitrile (ACN) pendant 1 heure. La digestion est réalisée automatiquement par le système ProGest (Genomic Solutions). Les spots d'intérêts découpés sont placés dans des microplaques de 96 puits adaptées au système de digestion. Un morceau de gel dépourvu de spots est également découpé pour servir de témoin négatif au moment de l'analyse. Les spots sont rincés trois fois avec une solution d'acide acétique 10% et éthanol 40% pendant 15 min suivie par 4 cycles de

lavages à l'ACN et au NH_4HCO_3 50 mM pendant 30 min. Les protéines sont ensuite digérées dans un tampon de trypsine modifiée (Promega) pendant 4 h 30 à 37°C, pH 7,5. Les peptides générés sont extraits du gel avec un tampon TFA (acide trifluoroacétique) 0,5% et ACN 10% pendant 20 min suivi par un tampon TFA 0,2% et ACN 83% pendant 20 min. Les échantillons sont séchés au speed vac et solubilisés dans une solution tampon (TFA 0,08%, HBFA (acide heptafluorobutyrique) 0,02%, ACN 3%).

Couplage chromatographie liquide capillaire/spectrométrie de masse en tandem

Cinq microlitres d'échantillon sont injectés dans la chromatographie liquide capillaire (LC packing, Dionex). Les échantillons sont tout d'abord préconcentrés dans une colonne capillaire en phase reverse (Pepmap C18, 75 μm x 13 cm) avec un tampon d'acide formique 0,1% et d'ACN 5% à un débit de 220 nL/min. Avant injection dans l'ESI/IT (Electrospray ionization/ion trap ; Lcq Deca, ThermoFinnigan), les échantillons sont séparés dans une colonne SCX 1000A (5 μm x 2,5 cm) avec un gradient linéaire de 0 à 45% d'acide formique et d'ACN 95% à un débit de 200 nL/min.

Recherche dans les bases de données.

Les spectres obtenus après analyse des échantillons par LC-ESI/IT (Liquid chromatography-electrospray ionization/ion trap) sont soumis à un logiciel de recherche BioWorks (ThermoFinnigan). La base de donnée protéique NCBI nr (non redondante) et une base de donnée comprenant 41 562 et 2 338 EST de *Medicago truncatula* et de *Glycine max* respectivement (PlantGDB, www.plantgdb.org/download.php?dir=/PlantTUGs) ont été utilisées pour l'identification des protéines. Le contenu des bases de données génère des séquences qui s'apparient ou non avec les séquences des peptides déduites des spectres générés par ESI/IT. Les critères permettant de valider l'identification des protéines sont : au moins deux séquences peptidiques par protéine, obtenues par LC-ESI/IT, doivent s'apparier à la protéine identifiée en premier choix, et le Xcorr (valeur de corrélation croisée entre les spectres expérimentaux et les spectres théoriques générés à partir des peptides candidats dans la base de donnée) de chacune de ces séquences doit être supérieur à 1,7.

1. RESULTAT ET DISCUSSION

Afin de déterminer les modifications critiques du métabolisme pour l'acquisition de la tolérance au gel et celles résultant de l'adaptation de la croissance en condition basses températures, la réponse à une acclimatation au froid de deux génotypes de pois, Champagne (tolérant au gel) et Tèrese (sensible au gel) a été comparée. Les paramètres de croissance (matière sèche et contenu en eau) et les contenus en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose, raffinose et stachyose), en amidon, en acides organiques (citrate, malate et succinate) et en proline ont été mesurés dans les appareils aérien et racinaire des plantes soumises ou non à l'acclimatation au froid. L'accumulation des métabolites au cours de l'acclimatation au froid associée à l'acquisition de la tolérance au gel pourrait être utilisée comme bio-indicateur de l'acquisition de la tolérance au gel chez les lignées recombinantes issues du croisement Champagne par Tèrese.

1.1. Variation de la composition en métabolites chez Champagne et Tèrese au cours de l'expérimentation en conditions contrôlées.

Observation de la croissance des plantules et évaluation de la tolérance au gel

En condition basses températures, la croissance des plantules de Champagne et de Tèrese est ralentie. En effet, le stade de développement « 3 feuilles », correspondant à l'obtention de 3 étages foliaires complètement développés, est obtenu après 21 jours alors que dans des conditions de température témoins, il ne faut que 14 jours (Figure 8) mais avec une somme de températures identique ($217^{\circ}\text{jours} = P3$). Nous pouvons constater que malgré une différence morphologique importante entre des deux génotypes, la vitesse de développement est similaire (Figure 8).

A la fin de l'expérimentation en conditions contrôlées, la tolérance au gel des plantes a été évaluée par la constatation des dommages causés par le gel sur l'appareil aérien des plantes en utilisant l'échelle de notation décrite dans la partie 'Matériel et Méthodes', et ce sur une moyenne de 20 plantes. Dans l'expérimentation contrôle, les appareils aériens de Champagne et Tèrese sont totalement nécrosés (Figure 8), ils obtiennent une note de 5. A la fin de l'expérimentation avec acclimatation au froid, l'appareil aérien de Tèrese, noté 4, est moins touché par le gel que dans l'expérimentation contrôle, alors que celui de Champagne, noté 3, montre une plus grande tolérance au gel que Tèrese (Figure 8). Le matériel aérien restant après réchauffement des plantes n'est cependant pas suffisant pour permettre un prélèvement et une extraction, ce qui explique dans nos figures et tableaux, l'absence de

résultats à la date P5 pour l'appareil aérien. L'appareil racinaire étant moins touché par le gel car il se trouve à l'abri dans le sol, a été prélevé à la date P5 et les dosages des métabolites ont pu être réalisés.

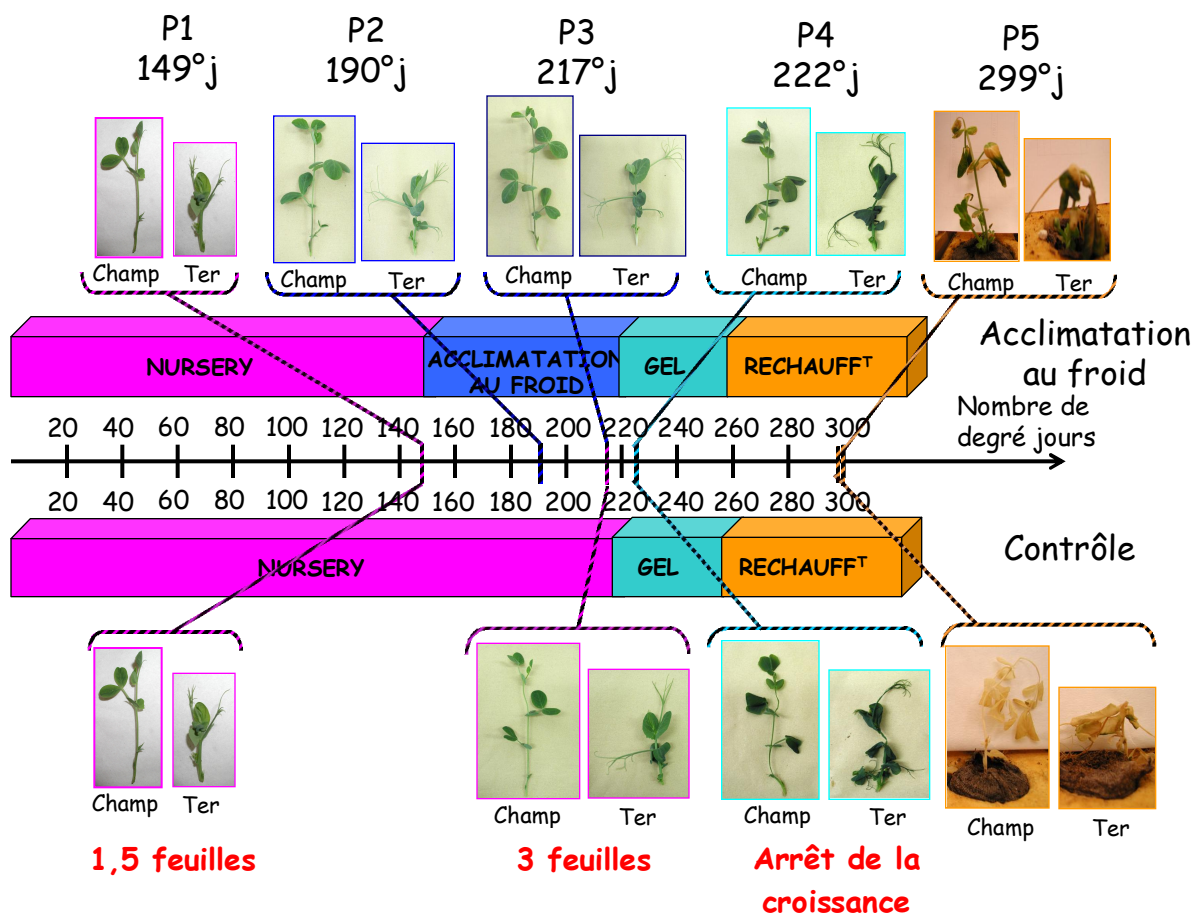


Figure 8. Evolution de la croissance⁹ des plantules de Champagne (Champ) et Tèrese (Ter) au cours des deux cinétiques (expérimentation avec acclimatation au froid et expérimentation contrôlée) exprimées en nombre de degré.jours cumulés.

L'émergence de nouvelles ramifications à partir des premiers nœuds a été observée uniquement chez Champagne à P5, à la fin de l'expérimentation avec acclimatation au froid. La tolérance au gel de Champagne se traduit ici, non seulement par une étendue moins importante des dégâts causés par le gel, mais surtout par la reprise de la croissance des plantes à partir de ces nouvelles ramifications après avoir été replacé en serre dans des conditions de températures normales. Les plantes de Tèrese placées dans les mêmes conditions meurent.

⁹ Les stades de développement qui ont été évalués en fonction du nombre d'étages foliaires développés sont notés en dessous des photos.

Evolution des masses de matière sèche et du contenu en eau

A P1, la masse de matière sèche de Champagne et Tèreèse est identique. Une accumulation de matière sèche est observée à la fin des deux expérimentations pour les deux génotypes (Figure 9A). Cette accumulation est plus importante lorsque les plantes sont soumises à des basses températures lors de l'expérimentation avec acclimatation au froid.

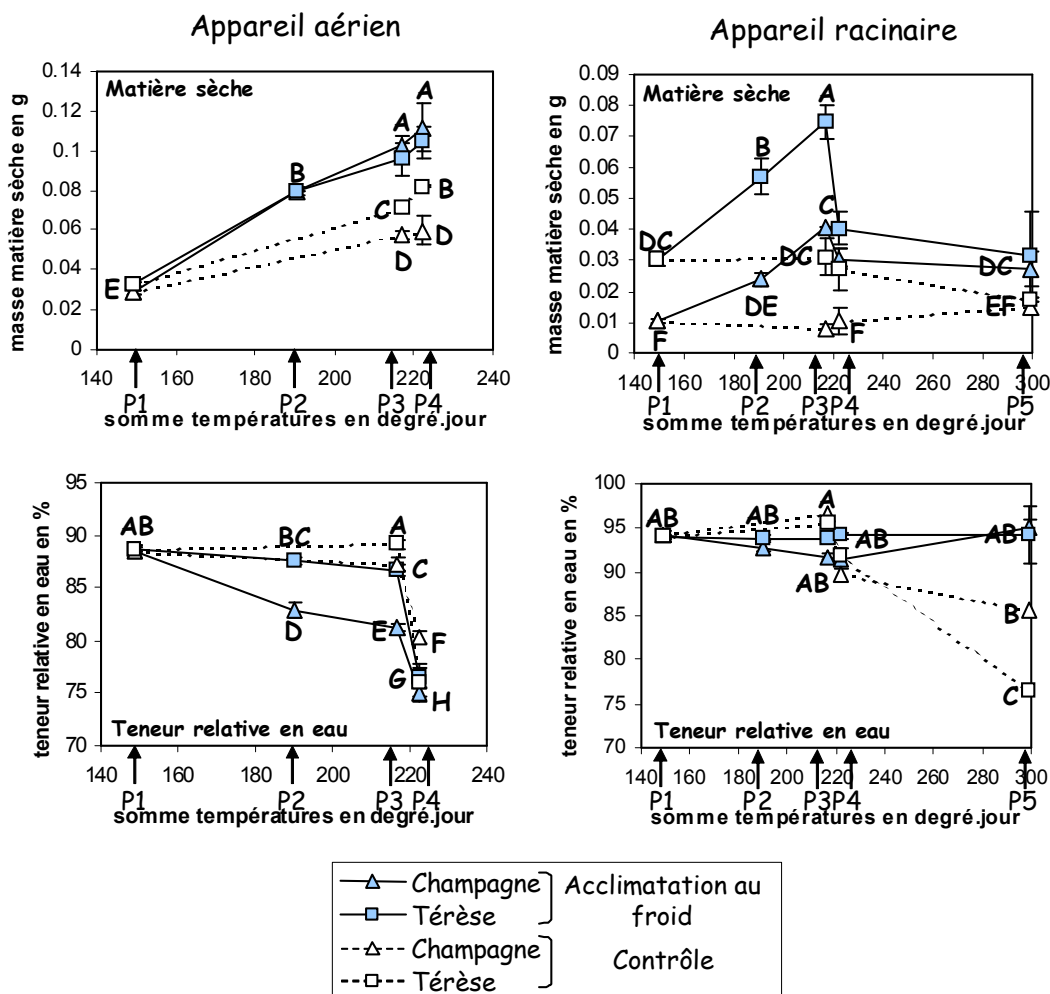


Figure 9. Evolution des masses de matière sèche en grammes et de la teneur relative en eau en pourcentage de l'appareil aérien et racinaire par plante chez Champagne et Térèse acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.¹⁰

¹⁰ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions de 5 plantes différentes avec les écarts types correspondants représentés par les barres verticales. Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Nous retrouvons à P4, après acclimatation au froid, une teneur en matière sèche similaire pour Champagne et Tèreèse (Figure 9A). Toutefois, l'accumulation de matière sèche est 1,9 fois plus importante pour Champagne et 1,3 fois pour Tèreèse par rapport à celle des plantes de l'expérimentation contrôle à P3 (Figure 9A).

En ce qui concerne l'appareil racinaire, la masse de matière sèche des racines est plus élevée à P1 chez Tèreèse que chez Champagne (Figure 9B). Dans l'expérimentation contrôle, la masse de matière sèche des racines de Champagne et Tèreèse reste stable ou diminue légèrement. Alors qu'à basses températures, la masse de matière sèche augmente significativement pour les deux génotypes jusqu'à P3 en comparaison avec l'expérimentation contrôle.   P3, la masse de matière sèche est 5 fois plus importante dans les racines de Champagne acclimatées que dans celles non acclimatées et 2,5 fois pour les racines de Tèreèse (Figure 9B). Nous retrouvons une accumulation relative de matière sèche plus importante pour Champagne que pour Tèreèse au cours de l'expérimentation avec acclimatation au froid.

Les appareils aérien et racinaire de Champagne accumulent significativement de la matière sèche en réponse aux basses températures, de façon concomitante avec l'acquisition de la tolérance au gel. Ceci avait déjà été observé dans l'étude menée par Bourion et collègues (2003). Cette accumulation de matière sèche pourrait correspondre à une accumulation de métabolites plus importante chez Champagne que chez Tèreèse au cours de l'acclimatation au froid, critique pour l'acquisition de la tolérance au gel.

L'évolution de la teneur relative en eau dans l'appareil aérien, quant à elle, reste stable dans l'expérimentation contrôle entre les phases P1 et P3 chez Tèreèse et se trouve affectée par le gel avec une diminution de 13% (Figure 9C). Chez Champagne, au cours de l'expérimentation contrôle, la teneur relative en eau diminue légèrement entre P1 et P3 puis de 7%   P4. En conditions d'acclimatation au froid, la teneur relative en eau diminue progressivement pour les deux génotypes, mais 3,6 fois plus pour Champagne que pour Tèreèse   P3 (Figure 9C). Nous constatons que pendant le gel, la teneur relative en eau des deux génotypes diminue fortement (Figure 9C). La déshydratation chez Champagne acclimaté au froid se fait de façon plus progressive que chez Tèreèse et que lorsque les plantes ne sont pas acclimatées. Ce phénomène a déjà été observé chez *Lonicera* (Imanishi, *et al.*, 1998) chez lequel l'accumulation de sucres est associée à une diminution du contenu en eau. Cette déshydratation qui a lieu avant les périodes de gel réduirait les risques de dommages des membranes par la diminution de formation de cristaux de glace au moment du gel.

Dans l'appareil racinaire, les modifications de la teneur relative en eau pour les deux génotypes ne sont pas importantes (Figure 9D). Néanmoins nous remarquons qu'après

acclimatation au froid, la teneur relative en eau des racines reste stable pendant le gel alors que dans les plantes non acclimatées, nous retrouvons une forte déshydratation des racines (Figure 9D). Cette déshydratation est certainement la conséquence de la désagrégation des racines des plantes non acclimatés que nous avons pu observer après le gel.

Evolution des teneurs en composés carbonés dans les appareils aérien et racinaire

La teneur en glucose dans l'appareil aérien diminue chez Champagne et Tèrese au cours de l'expérimentation contrôle alors qu'elle augmente lorsque les plantes sont soumises à de basses températures (Figure 10A). Il semble que l'accumulation de glucose soit une réponse aux basses températures. En ce qui concerne la variation du contenu en fructose, les deux génotypes se distinguent (Figure 10B). La teneur en fructose chez Champagne augmente progressivement au cours des deux expérimentations. Chez Tèrese, elle diminue jusque P3 puis augmente pendant le gel (P4) quel que soit l'expérimentation. Il n'y a pas de relation entre la variation de la teneur en fructose et l'acquisition de la tolérance au gel chez Champagne.

Le contenu en saccharose ne varie pas chez les plantes au cours de l'expérimentation contrôle et est semblable entre les deux génotypes, par contre il augmente significativement chez Tèrese et Champagne acclimatés (Figure 10C). La teneur en saccharose entre P1 et P3 augmente de plus de 10 fois chez Champagne et de 2 fois pour Tèrese. La différence d'accumulation de saccharose entre les deux génotypes étant importante au cours de l'acclimatation au froid, cela suggère que cette accumulation serait liée à l'acquisition de la tolérance au gel chez Champagne.

Le raffinose, qui n'est pas détecté chez Champagne et Tèrese pendant l'expérimentation contrôle (Figures 10D), apparaît en réponses aux basses températures à partir de P2 chez Champagne et de P4 chez Tèrese. La teneur en raffinose culmine à P4 chez Champagne acclimaté et est 3,6 fois plus élevée que chez Tèrese (Figure 10D). Le raffinose, comme le saccharose, semble lié à l'acquisition de la tolérance au gel. Le stachyose, lui, n'a pas été détecté au cours des expérimentations chez les génotypes.

Lorsque l'on regarde la totalité des sucres solubles dosés (Figure 10E), chez Champagne acclimaté il apparaît le même profil de variation que celui du saccharose qui correspond à 70% des sucres totaux à P4. Ainsi, l'accumulation des sucres solubles qui avait été mise en évidence par Bourion et ses collègues (2003) chez Champagne correspond surtout à une augmentation du saccharose.

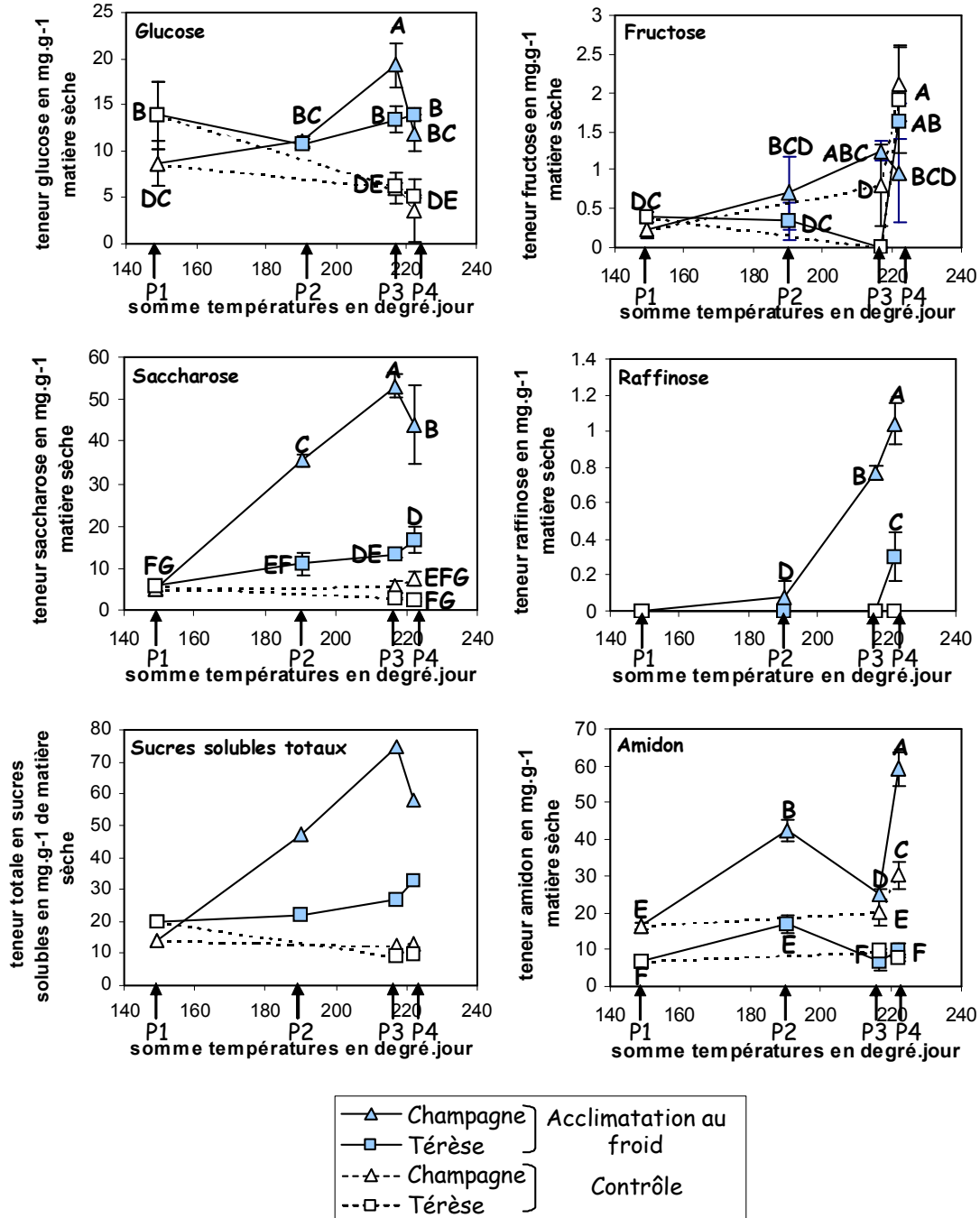


Figure 10. Evolution de la teneur en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose), le total des teneurs en sucres solubles, et en amidon en mg.g^{-1} de matière sèche de l'appareil aérien chez Champagne et Térésé acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.¹¹

¹¹ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions de 5 plantes différentes avec les écarts types correspondants représentés par les barres verticales. Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

La quantité d'amidon contenue à P1 chez Champagne est le double de celle trouvée chez Tèreèse (Figure 10F). Au cours de l'expérimentation avec acclimatation au froid, le profil de variation est le même pour les deux génotypes. La teneur en amidon augmente à P2 puis diminue à nouveau à P3. La différence de quantité d'amidon entre les deux génotypes reste identique aux dates P1 et P3. Chez Tèreèse il n'y a pas de différence entre les deux expérimentations pendant le gel. Par contre nous remarquons chez Champagne acclimaté, une accumulation d'amidon importante par rapport à l'expérimentation contrôle (Figure 10F). Ce qui suggère qu'une période de basses températures induit une accumulation d'amidon pendant la période de gel chez Champagne.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le glucose synthétisé au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne est converti en saccharose qui peut alors jouer un rôle i) en tant qu'osmorégulateur et/ou cryoprotecteur, ii) dans le transport des sucres dans la plante entière pour assurer la croissance à basses températures, ou iii) dans la synthèse du raffinose qui s'accumule également au cours de l'acclimatation au froid. Une partie du glucose synthétisé serait mise en réserve sous forme d'amidon pour assurer un apport d'énergie pour une reprise de la croissance après gel.

Evolution des teneurs en composés carbonés dans l'appareil racinaire

Dans l'appareil racinaire, la variation de la teneur en glucose chez Tèreèse ne se distingue pas entre les deux expérimentations (Figure 11A). Par contre chez Champagne, il semble qu'il y ait une augmentation de la teneur en glucose à P3 et P4 au cours de l'expérimentation avec acclimatation au froid en comparaison avec l'expérimentation contrôle. En ce qui concerne le fructose, la variation de la teneur se distingue entre les deux expérimentations (Figure 11B), avec des teneurs plus élevées pour Champagne et Tèreèse lorsqu'ils sont soumis à des basses températures. Toutefois les variations de teneur en glucose et fructose au cours de l'acclimatation au froid ne sont pas liées au niveau de tolérance au gel des deux génotypes .

Les profils de variation des teneurs en saccharose et en raffinose retrouvés dans l'appareil racinaire sont quasi similaires à ceux obtenus dans l'appareil aérien (Figures 12C et 12D).

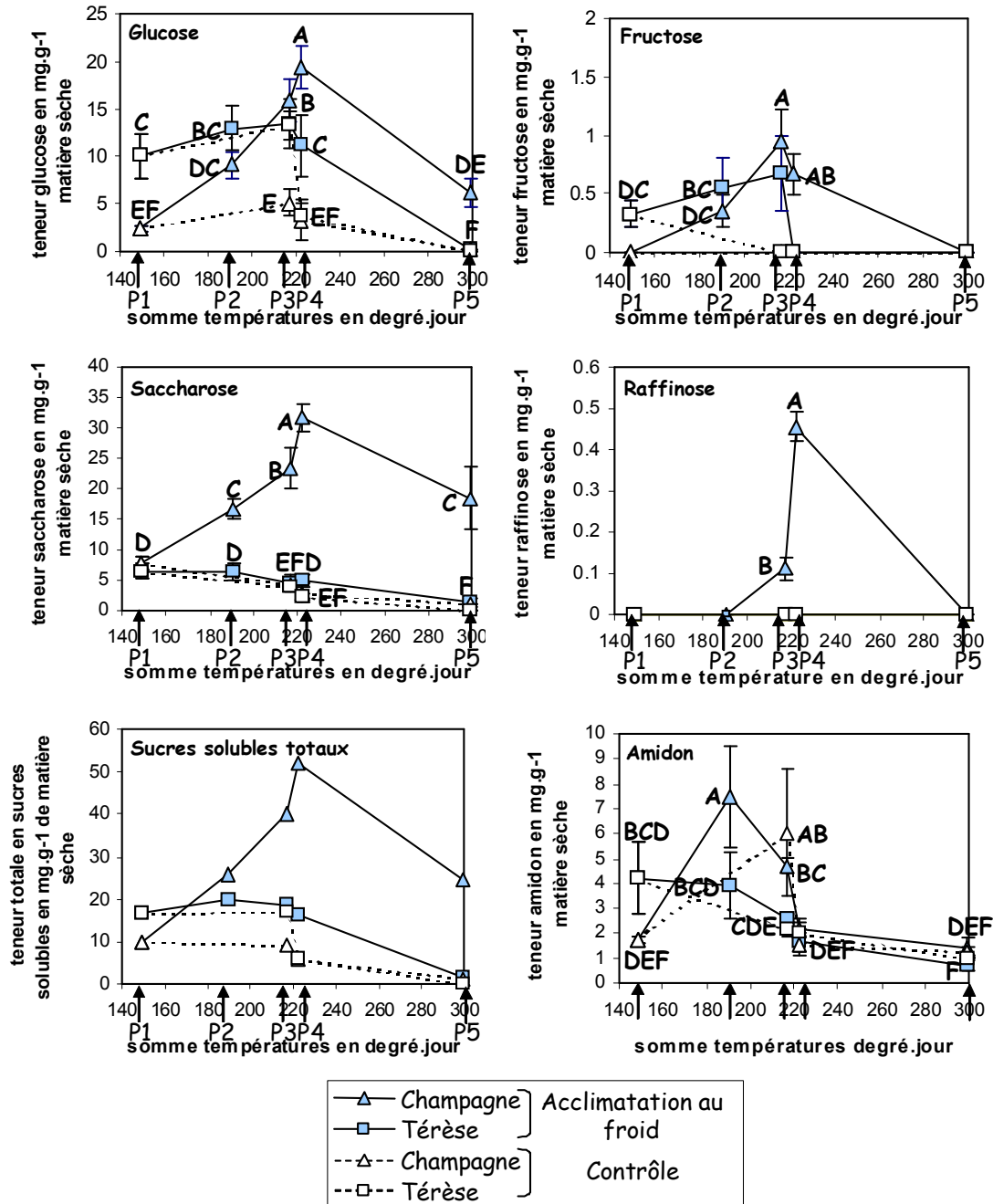


Figure 11. Evolution de la teneur en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose), le total des teneurs en sucres solubles, et en amidon en mg.g⁻¹ de matière sèche de l'appareil racinaire chez Champagne et Tèrese acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.¹²

¹² Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions de 5 plantes différentes avec les écarts types correspondants représentés par les barres verticales. Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Lorsque nous observons la variation de la totalité des sucres solubles dosés (Figure 11E), nous remarquons une nette accumulation de sucres chez Champagne acclimaté pendant la période de basses températures jusqu'au gel. Puis la teneur en sucres solubles diminue après réchauffement des plantes. Chez Tèreèse acclimaté et pour les plantes non acclimatées, la teneur en sucres diminue au cours des expérimentations.

En ce qui concerne la variation de l'amidon dans l'appareil racinaire (Figure 11F), il est difficile de tirer des conclusions. La teneur en amidon est cette fois-ci 2 fois plus élevée chez Tèreèse que chez Champagne à P1. Mais cette différence n'est pas maintenue au cours des expérimentations.

Il semble que seule l'accumulation de saccharose et de raffinose soit aussi liée à l'acquisition de la tolérance au gel dans l'appareil racinaire de Champagne. Cette accumulation de sucres dans les racines doit provenir du transport des sucres synthétisés au niveau de l'appareil aérien. Ceci pourrait conforter le rôle de l'accumulation du saccharose comme forme transportée des sucres.

Evolution des teneurs en acides organiques dans l'appareil aérien et racinaire.

Lorsque nous observons les variations des teneurs en acides organiques dans l'appareil aérien (Figures 12A, 12C et 12E) et racinaire (Figures 12B, 12D et 12E), la teneur en citrate augmente significativement au cours de l'expérimentation avec acclimatation au froid chez Champagne, de dix fois entre P2 et P3 dans l'appareil aérien (Figure 12A), et de six fois entre P1 et P4 dans l'appareil racinaire (Figure 12B). En ce qui concerne les autres acides organiques : la teneur en malate augmente pendant l'expérimentation acclimatation au froid mais on ne distingue pas de grandes différences entre les deux génotypes aussi bien pour l'appareil aérien que pour l'appareil racinaire (Figures 12C-12D). Le profil de variation de la teneur en succinate ne semble pas être associé à l'acquisition de la tolérance au gel dans l'appareil aérien (Figure 12E). Par contre au niveau de l'appareil racinaire, le succinate est détecté à P4, pendant le gel après acclimatation au froid chez Champagne et Tèreèse (Figure 12F). Ce qui suggère que l'apparition du succinate dans l'appareil racinaire correspond à une réponse aux basses températures mais n'est pas associée à la tolérance au gel de Champagne. Au contraire, l'accumulation du citrate au cours de l'acclimatation au froid est associée à l'acquisition de la tolérance au gel. L'accumulation de malate en conditions de basses températures mise en évidence chez l'orge semble en partie responsable de l'augmentation de la pression osmotique (Koroleva *et al.*, 2000), ce qui n'est pas notre cas.

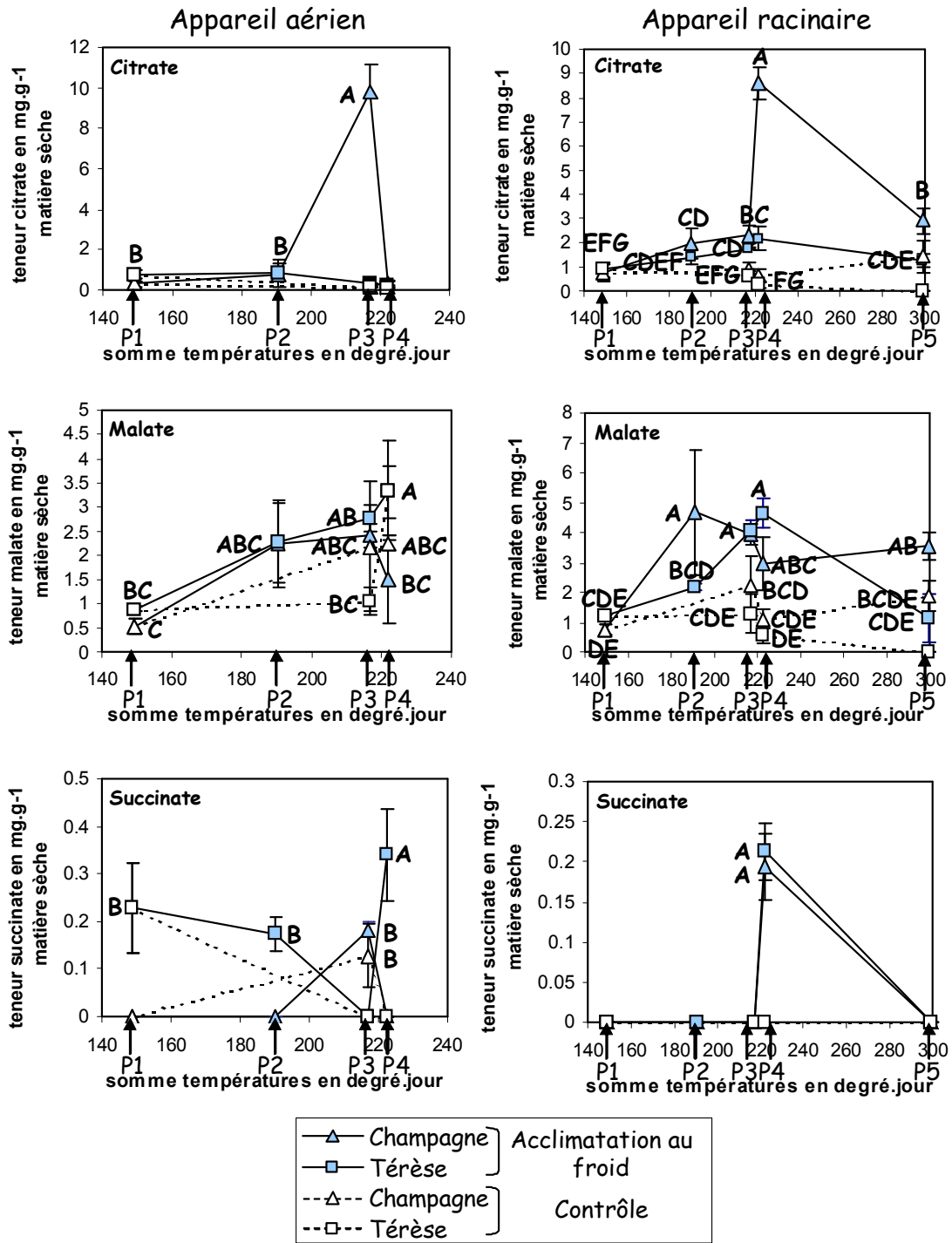


Figure 12. Evolution des teneurs en citrate, le malate et le succinate en mg.g⁻¹ de matière sèche de l'appareil aérien et racinaire chez Champagne et Tèrese acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.¹³

¹³ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions de 5 plantes différentes avec les écarts types correspondants représentés par les barres verticales. Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Ce rôle pourrait être tenu par l'accumulation du citrate ou celui-ci participerait à la régulation allostérique des enzymes de la glycolyse. En effet, cette accumulation pourrait être la conséquence d'une activité importante des enzymes de la glycolyse ou d'un ralentissement en aval du cycle de Krebs. L'excès du citrate en association avec un excès d'ATP conduirait à l'inhibition de l'activité de la phosphofructokinase afin de ralentir la glycolyse et de favoriser au contraire la gluconéogenèse afin de produire du glucose. Ceci pourrait ainsi expliquer l'accumulation de sucres solubles au cours de l'acclimatation au froid. A notre connaissance, c'est la première fois que l'aptitude à la tolérance au gel est reliée spécifiquement à l'accumulation de citrate

Evolution des teneurs en proline dans l'appareil aérien et racinaire.

Au premier stade de prélèvement (P1), nous détectons 2,2 et 2,3 mg de proline par g de masse de matière sèche dans les feuilles de Champagne et Tèrese respectivement (Figure 13A). La teneur en proline diminue pour les deux génotypes pendant les deux expérimentations (Figure 13A).

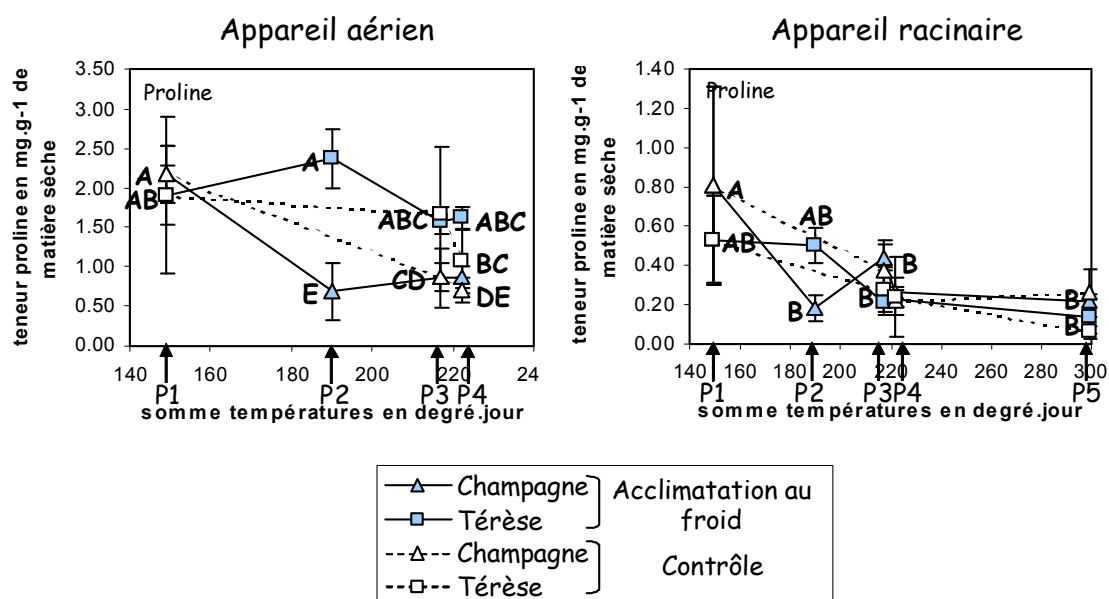


Figure 13. Evolution des teneurs en proline en mg.g⁻¹ de matière sèche de l'appareil aérien et racinaire chez Champagne et Tèrese acclimatés et non acclimatés aux différents stades de prélèvements P1, P2, P3, P4 et P5.¹⁴

¹⁴ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions de 5 plantes différentes avec les écarts types correspondants représentés par les barres verticales. Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions. Les moyennes des répétitions avec des lettres différentes sont significativement différentes avec un risque de 5%.

Une évolution similaire du contenu en proline est observée dans les racines dans lesquelles la teneur en proline est 3 à 4,5 fois plus faible que dans l'appareil aérien de Champagne et Tère à P1. Dans notre cas, le contenu en proline diminue en réponse aux basses températures à la fois chez Champagne et Tère alors que celui-ci est connu pour s'accumuler en réponse au stress osmotique. Ainsi la proline ne peut pas être utilisée comme bio-indicateur de l'acquisition de la tolérance au gel chez le pois.

L'étude des profils de variation des métabolites chez Champagne et Tère soumis ou non à une période d'acclimatation au froid a permis de mettre en évidence parmi les sucres solubles, une accumulation significative de saccharose et de raffinose chez Champagne, ainsi que d'un acide organique, le citrate, dans les appareils aérien et racinaire. Par contre il semble que la proline ne s'accumule pas de façon spécifique chez Champagne au cours de l'acclimatation au froid. L'accumulation de sucres aurait un rôle de protection des membranes et des protéines contre les effets du gel et de la déshydratation qui survient au cours du gel, et servirait de réserves afin de permettre la reprise de la croissance après gel, notamment à partir des nouvelles ramifications développées par Champagne.

Dans un second temps, nous avons choisi de vérifier les résultats de teneurs en sucres solubles sur les lignées recombinantes afin de tester l'utilisation du saccharose et du raffinose en tant que bio-indicateurs de l'acquisition de la tolérance au gel.

1.2. Variation de la composition en sucres solubles chez Champagne et Tère cultivés en champ

Les teneurs en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose) ont été dosées dans l'appareil aérien de Champagne et Tère et celui des lignées recombinantes issues du croisement des deux génotypes, cultivés en champ à une date où les températures sont assez basses pour induire une acclimatation au froid avant le gel.

Analyse du contenu en sucres solubles chez Champagne et Tère en fonction de leur tolérance au gel.

Après la période de gel, l'évaluation de la tolérance au gel indique que les plantes de Champagne, avec une note de gel de 0, ont une tolérance au gel plus élevée qu'en conditions contrôlées. Ceci peut résulter d'un gel moins sévère en champ, ou d'un gel appliqué sur des

plantes avec un stade de développement plus âgé que celui en conditions contrôlées. Au contraire, les plantes de Tèreè avec une note de 4 restent sensibles au gel.

Le contenu en saccharose de Champagne est similaire à celui mesuré à P3 en conditions contrôlées (Tableau 2) alors que celui de Tèreè est 3 fois plus élevé en champ qu'en conditions contrôlées (Tableau 2). Cependant la différence du contenu en saccharose entre Champagne et Tèreè reste significative (Tableau 2). Le contenu en raffinose mesuré chez Champagne en champ est 10 fois plus élevé que celui en conditions contrôlées (Tableau 2). Par contre le raffinose est détecté chez Tèreè en champ avec 3 mg.g^{-1} de matière sèche alors qu'il ne l'était pas en conditions contrôlées. Toutefois le contenu en raffinose chez Champagne pendant l'acclimatation au froid reste significativement plus élevée que chez Tèreè (Tableau 2).

Les différences en teneurs de saccharose et raffinose entre les deux géotypes en conditions contrôlées sont donc retrouvées en champ. Cependant il faut remarquer que la teneur en glucose est plus élevée chez Champagne en condition de culture au champ qu'en conditions contrôlées alors que ce n'est pas le cas chez Tèreè (Tableau 2).

Géotype	Condition	glucose	fructose	saccharose	raffinose	total
Champagne	Conditions contrôlées	19 d	1,2 ef	53 b	0,8 ef	74
	Champ	36 c	5,7 ef	62 a	8,5 def	112,2
Tèreè	Conditions contrôlées	13 de	0 f	13 de	0 f	26
	Champ	13 de	3,6 ef	41 c	3 ef	60,6

Tableau 2. Contenu en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose) en mg.g^{-1} de matière sèche chez Champagne et Tèreè pendant l'acclimatation au froid en champ et en conditions contrôlées (P3)^{15,16}.

Les différences retrouvées entre le métabolisme de Champagne et Tèreè en champ et en conditions contrôlées peuvent provenir des différences de conditions environnementales comme les températures de la phase d'acclimatation et l'intensité de la lumière. De plus, le développement des plantes lors du prélèvement en champ n'était pas le même qu'en conditions contrôlées car dans l'expérimentation au champ nous avons dû attendre une

¹⁵ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions d'appareil aérien de 5 plantes différentes.

¹⁶ Les lettres correspondent aux résultats d'une analyse de variance effectuée sur les valeurs des répétitions : 3 répétitions pour les plantes cultivées en conditions contrôlées et 8 répétitions pour celles cultivées en champ, avec un indice de confiance de 95%

période de basses températures. Ainsi, les plantes prélevées en champ pendant la période d'acclimatation au froid sont plus âgées que les plantes prélevées en conditions contrôlées et donc probablement mieux préparées à la chute des températures.

Rôle putatif du saccharose et du raffinose dans l'acquisition de la tolérance au gel.

La teneur en saccharose chez Champagne est aussi élevée en champ qu'en conditions contrôlées et ce même quand la teneur total de sucres solubles analysées est 1,5 fois plus importante en champ qu'en conditions contrôlées (Tableau 2). Dans les conditions de culture en champ, le glucose, le fructose et le raffinose semblent s'accumuler aux dépens du saccharose au cours de l'acclimatation au froid. Ceci suggère que le saccharose joue essentiellement un rôle de mise en réserve et de transport des sucres pour assurer la croissance de la plante à basses températures. Le saccharose assure un apport en glucose afin de produire de l'énergie pour assurer la croissance des plantes à basses températures et un apport en raffinose. A partir de ces résultats, il semble que l'accumulation de saccharose ne peut pas être utilisée comme bio-indicateur de la tolérance au gel chez le pois.

Nous avons montré que la teneur en raffinose est liée à la tolérance au gel chez le pois comme cela a été montré chez la luzerne (Castonguay *et al.*, 1995). Cette accumulation semble indispensable dans la tolérance au gel mais le rôle du raffinose semble multiple. A côté de son rôle dans la mise en réserve et le transport des sucres (Sprenger et Keller, 2000), les autres fonctions du raffinose dans le cas d'un stress froid restent mal définies. Des données expérimentales suggèrent que le raffinose agirait comme un cryoprotecteur dans les plantes tolérantes au gel après acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000). Chez le pois, l'accumulation de raffinose a déjà été observée pendant la maturation de la graine (Peterbauer *et al.*, 2001) et a été associée à l'acquisition de la tolérance à la déshydratation (Corbineau *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, il a été mis en évidence une accumulation de galactinol et de raffinose dans des plantes traitées au froid (Taji *et al.*, 2002). De plus, des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant le gène de la galactinol synthase (*Gols*), la première enzyme de la voie de biosynthèse du raffinose et une des cibles de CBF3, accumulent le galactinol et le raffinose et sont plus tolérantes au stress hydrique que les plantes sauvages (Taji *et al.*, 2002). Parmi les 3 gènes *Gols* de réponse au stress d'*Arabidopsis*, *AtGols3* est le seul induit par le froid (Taji *et al.*, 2002). De plus, l'activité de la galactinol synthase augmente chez les graines de haricot nain exposées au froid (Liu *et al.*, 1998). Des expériences réalisées sur des protoplastes isolés à partir d'embryons de pois (Xiao *et al.*, 2001) ont montré qu'en utilisant un mélange de saccharose 500 mM et de raffinose 500

mM, un maximum de survie des protoplastes (75%) était obtenu. Ces auteurs suggèrent que le raffinose est impliqué dans la stabilisation des membranes des cellules en condition de stress par des interactions directes entre les sucres et la membrane comme l'a également montré l'étude des effets du raffinose sur la fusion et les transitions de phase des lipides de liposomes pendant la déshydratation (Hincha *et al.*, 2003). Comme les stress hydriques et gel ont des réponses métaboliques communes (Jonak *et al.*, 1996; Taji *et al.*, 2002), il est possible que le raffinose agisse plus comme un cryoprotecteur des membranes cellulaires dans la tolérance au gel chez le pois que comme un osmorégulateur dans l'ajustement de la pression osmotique. En effet l'accumulation du raffinose de $0,8 \text{ mg.g}^{-1}$ de matière sèche à P3 dans l'appareil aérien de Champagne correspond à une augmentation de la pression osmotique de $0,3 \text{ mOsmol.kg}^{-1}$, en prenant en compte un coefficient osmotique de 1 pour les sucres solubles et basée sur une teneur en eau de $0,85 \text{ mL.g}^{-1}$ de matière fraîche. Il semble que la contribution du raffinose dans l'osmorégulation soit faible.

1.3. Variation de la composition en sucres solubles chez les lignées recombinantes cultivés en champ

La capacité des 59 lignées recombinantes à tolérer des températures de gel en condition de culture au champ a été mesurée en utilisant notre échelle de note. Leur contenu en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et raffinose) dans l'appareil aérien a également été déterminé. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la teneur en saccharose des lignées recombinantes et leur tolérance ou sensibilité au gel (Tableau 3). Par contre la teneur en raffinose est corrélée significativement à l'acquisition de la tolérance au gel (Tableau 3). Cependant les résultats des teneurs en raffinose, dans les lignées recombinantes cultivées en champ, révèlent qu'elles ne se divisent pas en deux groupes distincts selon leur tolérance ou leur sensibilité au gel. Ceci indique que le raffinose n'est pas le seul élément impliqué dans l'acquisition de la tolérance au gel et que d'autres sucres solubles interagiraient avec lui pendant l'acclimatation au froid chez le pois. Dans notre étude, la teneur en glucose est aussi corrélée avec l'acquisition de la tolérance au gel dans les lignées recombinantes (Tableau 3).

	raffinose	saccharose	glucose	fructose	tolérance au gel
raffinose	1	0,20673 0,1162	0,56297 < 0,0001	0,26107 0,0458	-0,5014 < 0,0001
saccharose		1	0,50755 < 0,0001	0,25405 0,0522	0,04459 0,7374
glucose			1	0,37975 0,003	-0,55109 < 0,0001
fructose				1	-0,16768 0,2043
tolérance au gel					1

Tableau 3. Résultats du test du coefficient de corrélation de Pearson¹⁷ entre les teneurs en sucres (raffinose, saccharose, glucose et fructose) et la tolérance au gel des lignées recombinantes.

Les lignées recombinantes possédant des fortes teneurs en raffinose et en glucose sont aussi plus tolérantes au gel (Tableau 4). Cependant, les autres sucres solubles sont également impliqués puisque le test de Pearson indique une corrélation entre les teneurs en glucose et celles du saccharose, du fructose et du raffinose (Tableau 3). Le métabolisme des sucres pendant l'acclimatation au froid semble être en équilibre entre les monosaccharides, glucose et fructose, et les oligosaccharides comme le raffinose.

Numéro	note	raffinose	glucose	saccharose	fructose	total
Champagne	0	8,5	36,2	61,8	5,7	112,3
98	0	7,1	34,5	51,8	5,3	98,8
13	1	10,1	30,0	49,5	8,1	97,7
82	1	8,9	41,5	60,8	7,1	118,2
186	1	8,6	44,8	63,0	6,8	123,2
9	1	8,2	27,7	62,6	5,3	103,8
14	1	7,2	22,2	41,5	5,1	76,0
80	1	6,9	32,1	46,2	7,6	92,8
118	1	6,8	19,6	33,8	5,2	65,5
103	1	6,1	33,8	62,8	5,2	107,9
200	1	5,8	27,8	50,0	3,4	87,0
41	1	5,4	24,5	55,0	3,0	88,0
123	1	4,5	12,0	32,1	2,2	50,9

Tableau 4. Teneur en raffinose, glucose, saccharose et raffinose en mg.g⁻¹ de matière sèche de l'appareil aérien des 59 lignées recombinantes regroupées en fonction de leur note de gel¹⁸.

¹⁷ avec un indice de confiance de 95%

Numéro	note	raffinose	glucose	saccharose	fructose	total
130	1	4,4	16,8	39,5	4,1	64,8
78	2	9,8	24,3	53,1	5,1	92,4
1	2	8,7	23,5	54,9	3,2	90,2
190	2	8,7	27,9	66,6	6,6	109,8
150	2	8,4	23,0	47,1	4,5	83,0
88	2	8,2	33,2	43,5	4,3	89,1
121	2	6,6	20,7	45,0	4,4	76,7
40	2	5,8	22,5	44,8	6,5	79,6
90	2	5,6	29,4	56,6	3,5	95,2
83	2	4,9	21,9	52,8	6,8	86,4
92	2	4,5	30,6	60,2	6,0	101,2
112	3	9,3	26,2	32,2	4,6	72,3
151	3	8,0	23,6	48,3	6,6	86,5
26	3	8,0	22,6	57,0	11,3	98,9
31	3	7,3	24,6	58,9	3,4	94,1
21	3	6,1	26,7	55,9	3,0	91,7
106	3	5,5	30,4	78,6	6,1	120,6
20	3	4,9	25,2	49,6	4,0	83,7
35	3	4,0	22,5	46,8	2,5	75,8
16	3	3,3	15,4	32,3	4,0	55,0
18	4	8,5	25,0	57,6	3,4	94,5
175	4	7,1	19,6	56,4	7,3	90,5
154	4	7,1	14,6	37,7	2,3	61,7
30	4	6,5	17,4	51,8	3,7	79,4
85	4	6,3	22,7	47,5	4,8	81,4
38	4	5,5	13,2	39,1	3,4	61,3
192	4	5,1	18,6	54,6	2,9	81,2
3	4	4,9	14,9	41,4	5,2	66,3
162	4	4,4	21,7	45,4	4,2	75,7
142	4	4,1	26,3	61,9	7,9	100,3
182	4	4,0	15,9	50,1	4,1	74,1
53	4	3,8	13,5	48,7	2,7	68,7
137	4	3,6	22,1	43,0	8,0	76,6
191	4	3,6	20,9	44,5	5,8	74,9
Terese	4	3,1	13,1	41,2	3,6	60,9
94	4	3,1	11,2	37,4	4,6	56,3
27	4	2,0	20,9	47,9	5,3	76,2
56	5	7,0	24,1	57,9	5,8	94,8
131	5	7,0	21,9	68,4	5,5	102,7
177	5	6,9	29,9	66,0	4,2	107,1
39	5	6,1	18,8	48,1	5,2	78,2
184	5	5,7	20,7	48,8	3,0	78,1
104	5	4,5	12,1	34,0	4,1	54,8
122	5	4,5	15,6	67,3	4,1	91,6
108	5	3,7	16,2	39,2	3,0	62,0
17	5	3,3	14,4	59,1	5,2	82,1
161	5	2,0	19,2	63,5	3,3	88,1
168	5	1,9	13,2	41,3	4,8	61,2

¹⁸ Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions d'appareil aérien de 5 plantes différentes.

D'autre part nous avons remarqué que certaines lignées dérogent à cette règle. Ainsi des lignées, comme le numéro 123, avec de faibles teneurs en sucres solubles sont capables de tolérer le gel, et au contraire des lignées, comme le numéro 177, avec de fortes teneurs en raffinose et en glucose ne résistent pas au gel (Tableau 4). L'accumulation de sucres solubles, notamment du glucose et du raffinose ne semble pas exclusivement déterminante dans l'acquisition de la tolérance au gel, d'autres composés que les sucres solubles doivent intervenir. Chez *Arabidopsis*, l'augmentation de la tolérance au gel est associée à l'accumulation des sucres solubles et de la proline (Wanner et Juntila, 1999). L'étude de Champagne et Tèreze en conditions contrôlées a montré que la proline ne s'accumulait pas chez Champagne au cours de l'acclimatation au froid, mais celle-ci a mis en évidence une accumulation du citrate. Ainsi, le dosage de ces composés chez les lignées recombinantes serait intéressant pour déterminer les autres composants qui sont explicatifs de l'acquisition de la tolérance au gel.

2. CONCLUSION

Les résultats du premier test sur l'utilisation du contenu en sucres comme indicateur de l'acquisition de la tolérance au gel en condition d'acclimatation au froid a permis de confirmer que les différences entre Champagne et Tèreze ne sont pas déterminées uniquement par les différences dans le contenu en sucres solubles. La tolérance au gel est un caractère complexe déterminé par l'induction de nombreux gènes (Jaglo-Ottensen *et al.*, 1998). Il faut donc rester prudent sur l'utilisation des sucres solubles comme bio-indicateurs afin de déterminer la tolérance au gel des lignées recombinantes. Cependant il est possible que les différences entre les conditions de culture au champ et les conditions contrôlées soient responsables des différences de teneurs en sucres solubles et doivent être prises en compte. Pendant la culture en champ, les conditions climatiques sont relativement plus douces en comparaison aux conditions contrôlées, en particulier pendant la période de gel. De plus, les plantes soumises au gel sont plus âgées et ont eu une période d'acclimatation plus longue. Nous nous proposons donc d'analyser le contenu en métabolites des lignées recombinantes mais cette fois cultivées en conditions contrôlées.

1. RESULTAT ET DISCUSSION

1.1. Expression différentielle des protéines

Une carte de référence du profil protéique coloré au nitrate d'argent des deux génotypes a été obtenue avant le traitement froid (P1) pour chaque organe (bourgeon, feuille, tige et racine) (Figures 14 et 15).

Les profils obtenus à chaque stade de l'expérimentation pour les deux génotypes ont été comparés à la carte de référence et ont servi à la constitution d'un gel composite.

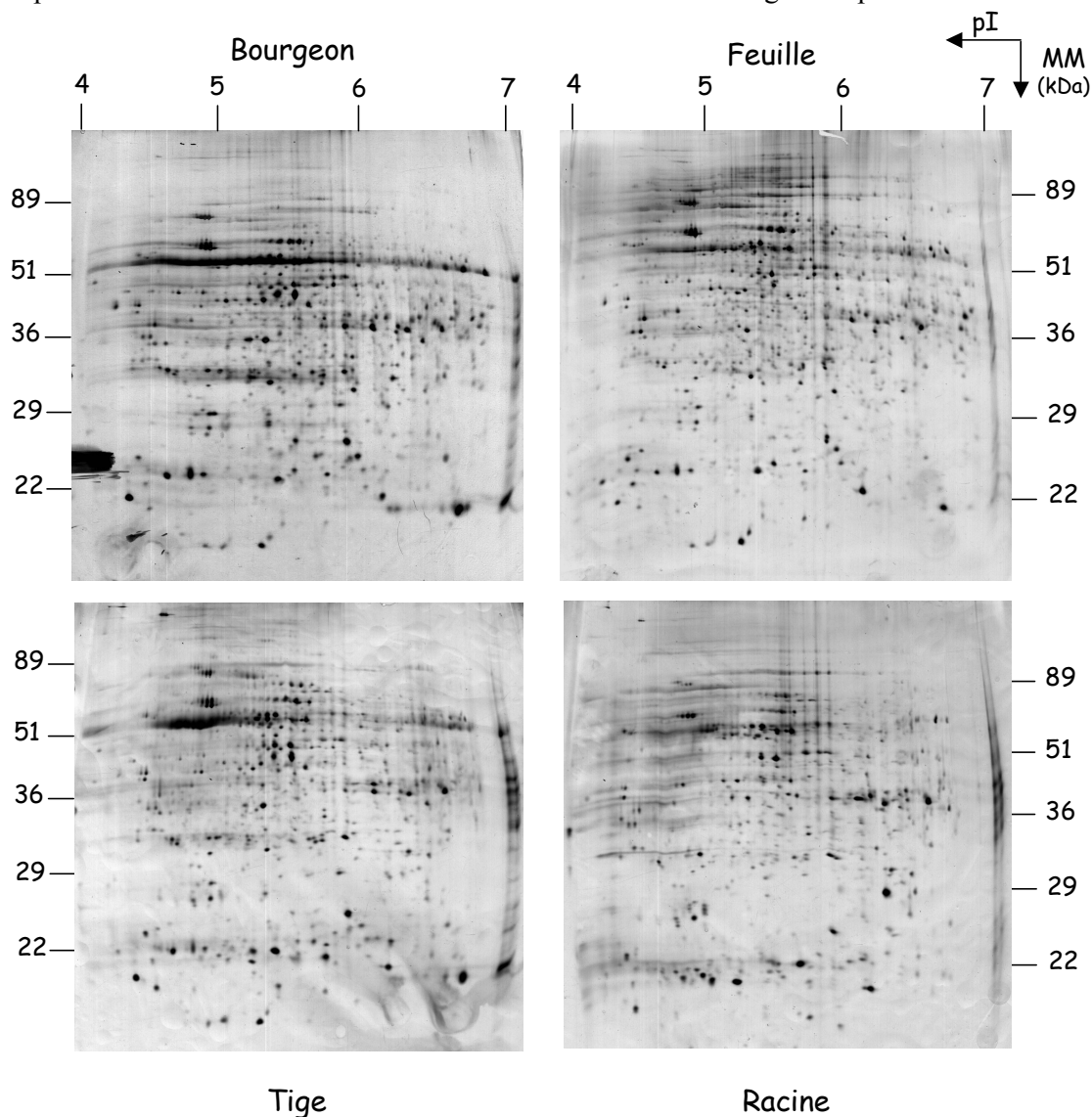


Figure 14. Cartes de références des profils protéiques de bourgeon, de feuille, de tige et de racine de Champagne à P1 de l'expérimentation contrôlée.

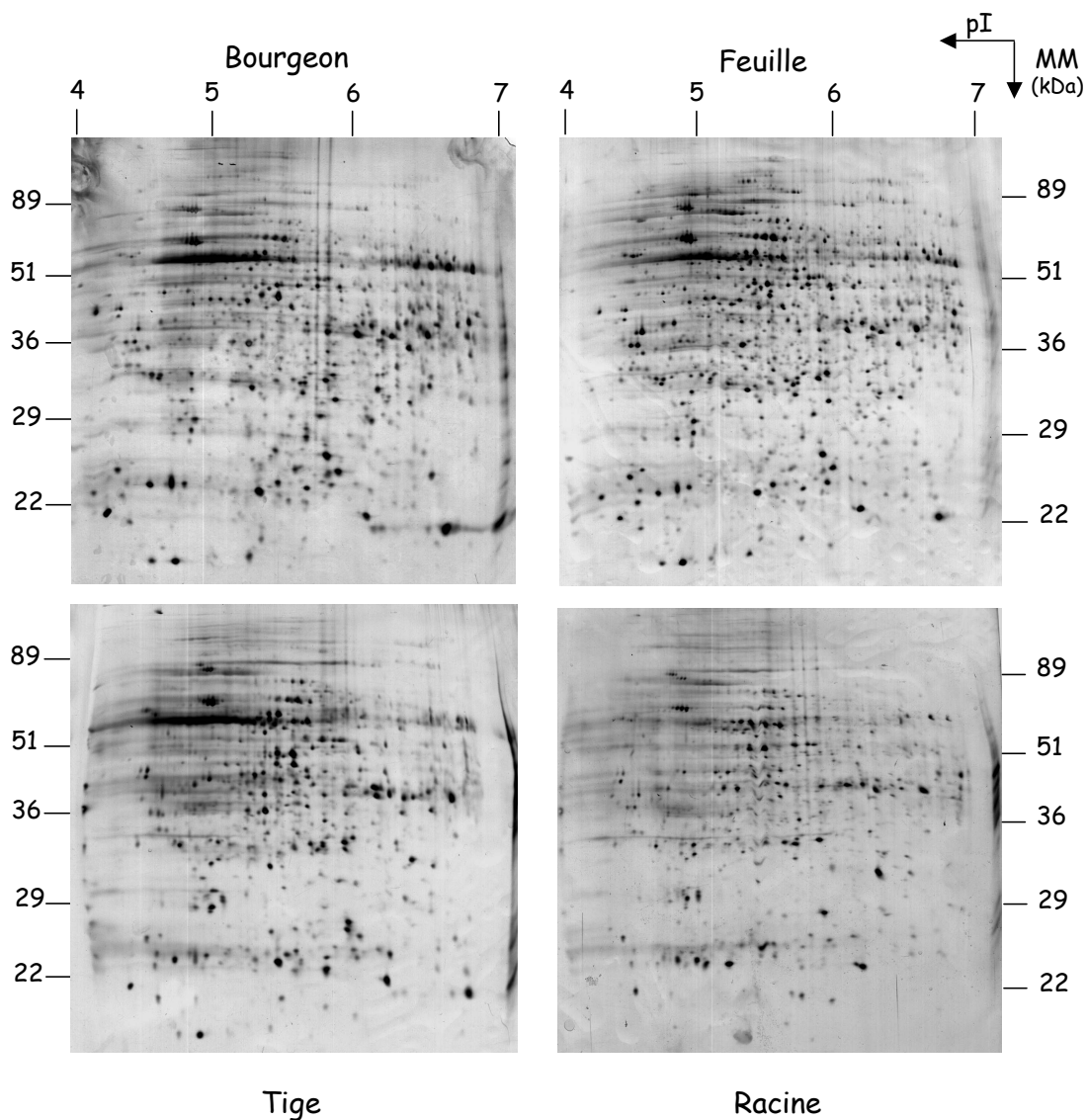


Figure 15. Cartes de références des profils protéiques de bourgeon, de feuille, de tige et de racine de Tèrese à P1 de l'expérimentation contrôlée.

Après comparaison, le nombre total de spots, répartis sur une gamme de pI de 4 à 7 et de MM (masse moléculaire) de 10 à 89 kDa apparaissant au cours des deux expérimentations pour les deux génotypes sur les gels composites, atteint 884 spots pour le bourgeon, 855 spots pour la feuille, 902 spots pour la tige et 727 spots pour la racine.

Une méthode de classification hiérarchique a été utilisée pour organiser les données qualitatives et quantitatives des spots et pour sélectionner les protéines associées à l'acquisition de la tolérance au gel chez Champagne. Un arbre a été obtenu pour chaque organe (Figure 16).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de focaliser notre intérêt sur les protéines qui s'expriment pendant l'acclimatation au froid uniquement chez Champagne et qui sont absents chez les plantes contrôles et chez Tère. Huit groupes différents correspondant à des variations différentes du profil protéique corrélées avec l'acclimatation au froid chez Champagne ont été sélectionnés (Tableau 5).

Groupes	Stades ¹⁹	Bourgeon	Feuille	Tige	Racine
1	P2	67	62	12	16
2	P3	11	38	16	22
3	P4	25	0	11	0
4	P2/P3	2	11	0	0
5	P3/P4	27	11	9	0
6	P2/P3/P4	6	8	20	73
7	P1/P2	0	8	4	14
8	P1/P2/P3	0	3	28	0
Total		138	141	100	125

Tableau 5. Description des groupes de protéines sélectionnés avec une expression spécifique de l'expérimentation acclimatation au froid chez Champagne et répartition du nombre de spots par groupe pour chaque organe.

Le nombre de protéines d'intérêts pour chaque organe détecté sur les gels colorés à l'argent a été déterminé (Figure 16) et reporté dans le Tableau 6. Un nombre important de protéines est observé avec une expression différentielle associée à Champagne acclimaté au froid : 138 spots pour le bourgeon, 141 spots pour la feuille, 100 spots pour la tige et 125 spots pour la racine (Tableau 6). Ceci correspond à une moyenne de 15% des spots présents sur les gels composites. Si on regarde en détail les groupes retrouvés en fonction des organes (Tableau 5), le groupe n°1 (spots présents à P2 uniquement chez Champagne acclimaté) est celui qui regroupe le plus grand nombre de spots pour les organes bourgeon et feuille. Dans le cas des organes tige et racine, ce sont les groupes n°8 et 6 respectivement qui comptabilisent la majorité des spots d'intérêts.

¹⁹ Stades pour lesquels les protéines s'expriment.

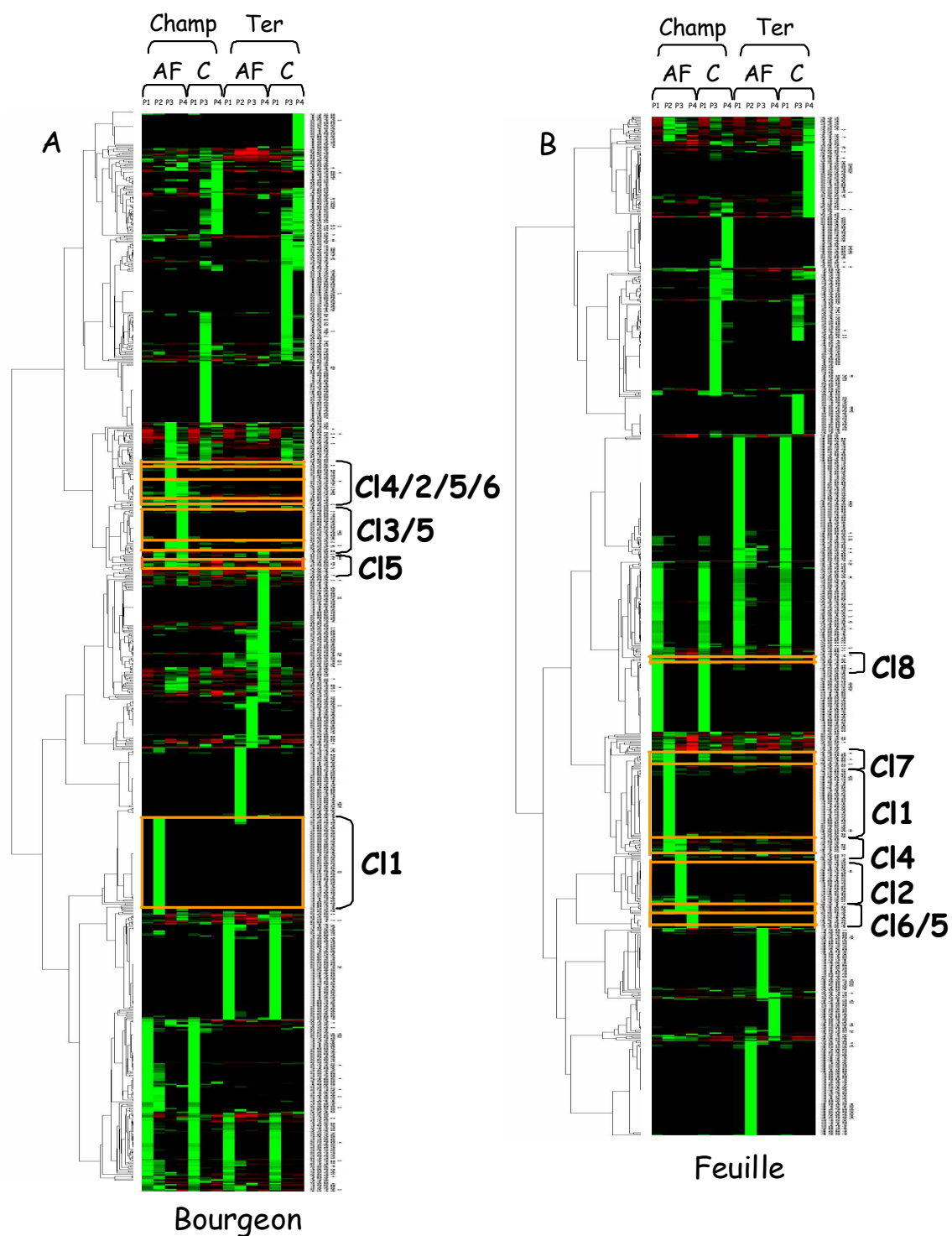
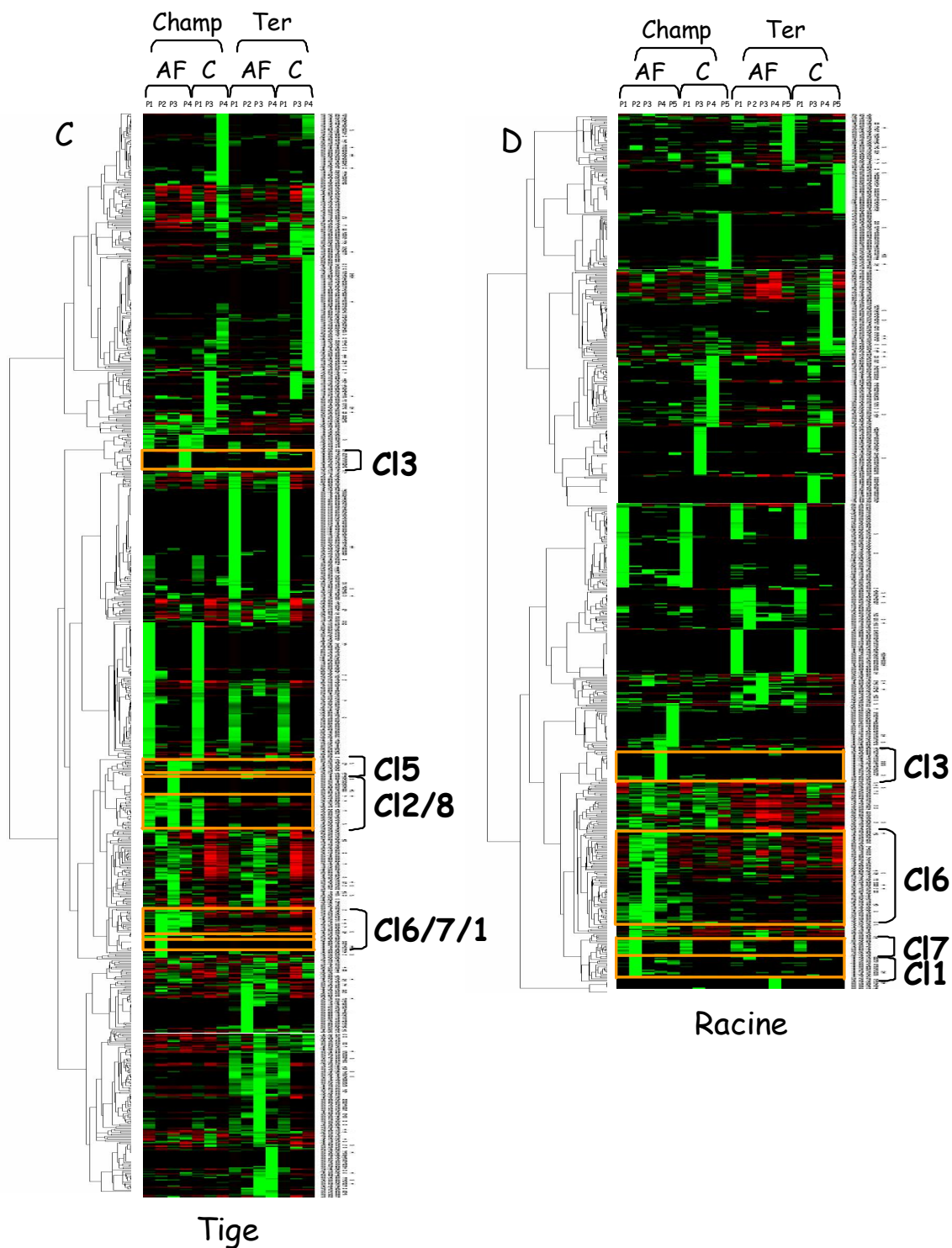


Figure 16. Classification hiérarchique de l'intensité des spots²⁰ au cours des les organes bourgeon, feuille, tige et racine.

²⁰ La couleur verte représente une augmentation relative de l'expression, alors que le rouge représente une diminution. L'échelle de couleur s'étend d'un ratio égal à $\log 3$ à $-\log 3$. Chaque ligne correspond à une protéine,



expérimentations acclimatation au froid et contrôle chez Champagne et Tèrese pour

chaque stade de prélèvement (P1, P2, P3, P4 et P5) des deux expérimentations (AF=Acclimatation au froid ; C=Contrôle) pour les deux génotypes (Champ=Champagne ;Ter=Tèrese) est représenté par une colonne. Les groupes de spots d'intérêts sont encadrés et numérotés en fonction de leur profil de variation.

Pour réaliser l'identification des protéines par LC-ESI/IT, les échantillons protéiques de Champagne aux stades P2, P3 et P4 de l'expérimentation acclimatation au froid ont migrés une nouvelle fois et les protéines ont été colorées au Sypro Ruby, colorant compatible avec la spectrométrie de masse. Le nombre de protéines soumis à l'identification par LC-ESI/IT correspond au nombre de spots d'intérêts détecté à la fois sur les gels colorés au nitrate d'argent et au Sypro Ruby. A cause des différences de révélation des protéines dues à l'utilisation d'un autre colorant, le Sypro Ruby, le nombre de spots d'intérêts diminue de 2 fois pour l'organe feuille à 9 fois pour l'organe tige (Tableau 6).

Organes	Bourgeon	Feuille	Tige	Racine
Nombre de spots d'intérêts	138 (16%)	141 (17%)	100 (11%)	125 (17%)
Nombre de spots détectés	38 (28%)	60 (42%)	11 (11%)	21 (17%)
Nombre de spots identifiés	30 (79%)	45 (75%)	7 (63%)	8 (38%)

Tableau 6. Récapitulatif du nombre de spots analysés au nombre de spots identifiés.

Par conséquent, un nombre important de variations de l'expression protéique associées à l'augmentation de la tolérance au gel est perdu avec la coloration au Sypro Ruby. Cent trente spots ont ainsi été soumis à la LC-ESI/IT. Le nombre de spots identifiés pour chaque organe est reporté dans le Tableau 6. Quarante-vingt dix protéines ont été identifiées avec succès, ce qui correspond à 70% des spots soumis à la LC-ESI/IT (Tableau 6). En ce qui concerne les protéines non identifiées, les séquences en acides aminés pour ces protéines ne présentent pas de régions conservées de protéines déjà caractérisées ou des produits de nouveaux gènes. De plus, le pourcentage d'identification le plus faible est retrouvé pour les racines (38% contre 79% pour le bourgeon) comme cela a également été montré lors de l'analyse du protéome de racine de *Medicago trunculata* où 37% des protéines analysées ont été identifiées, même avec l'utilisation d'une base de données d'EST (Mathesius *et al.*, 2001). Cela est certainement dû au faible nombre d'études portant sur les mécanismes des racines.

1.2. Similarité des séquences

Parmi les protéines identifiées reportées dans le Tableau 7, 31 (34%) ont déjà été identifiées chez le pois, 59 (66%) ont été identifiées grâce à une forte homologie avec des protéines séquencées chez d'autres espèces végétales. Dans 70% et 55% des cas

respectivement, les valeurs de la masse moléculaire et du point isoélectrique théorique ne varient pas de plus de 15% des valeurs de la masse moléculaire et du point isoélectrique de la protéine de référence.

L'identification des protéines a été réalisée avec deux bases de données: la NCBI non redondante et une banque d'EST compilant des EST de *Medicago trunculata* et de *Glycine max*. Trente huit (42%) protéines ont été identifiées à la fois avec les bases de données nr et EST, 12 (14%) protéines ont été identifiées uniquement grâce à la base nr et 40 (44%) protéines grâce à la banque d'EST. Si nous avons utilisé uniquement la banque d'EST pour réaliser les identifications, 78 protéines soit 60% des protéines analysées par LC-ESI/IT auraient été identifiées. Nous montrons ainsi que l'utilisation d'une banque d'EST pour un modèle végétal dont le génome n'a pas été entièrement séquencé est un outil puissant pour réaliser l'identification des protéines à partir de séquences obtenues par LC-ESI/IT.

L'identification des fonctions des protéines nous a permis de classer les protéines en trois catégories majeures décrites par Sarry et ses collègues (2004): le métabolisme énergétique, le métabolisme général et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Tableau 7). Nous avons défini deux catégories supplémentaires: une regroupant les protéines intervenant dans le *turnover* des protéines et la seconde qui regroupe le reste des fonctions des protéines qui ont été identifiées. Chaque catégorie regroupe plusieurs sous catégories de fonctions (Tableau 7).

Deux malate déshydrogénases s'exprimant dans la racine, deux actines et deux enzymes de synthèse de la thiamine dans le bourgeon ont été retrouvées avec le même poids moléculaire et des points isoélectriques successifs chez Champagne, ces protéines correspondent à des isozymes.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	Nbr seq ²¹	Nom et fonction de la protéine	Bases de données	Espèces Numéro d'accèsion ²²	Organe	Groupe	
3466	30/6.4	35/7.0	3	ENERGIE – UTILISATION CARBONE carbonic anhydrase, chloroplaste precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 115471	Feuille	2
25771	26/4.8	21/6.7	6	ENERGIE – TRANSPORT ELECTRONS ATP synthase delta' chain, mitochondrial precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 2493047	Bourgeon	5
1869	53/6.1	58/6.9	2	putative cytochrome P450 protein	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 20259299	Racine	1
4416	52/5.1	48/5.6	2	ENERGIE - GLYCOLYSE/GLUCONEOGENESE enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)	nr	<i>Ricinus communis</i> 1169534	Feuille	6
4012	43/4.4	50/8.5	2	phosphoglycerate kinase, cytosolic	EST	<i>Pisum sativum</i> 9230771	Feuille	2
4145	42/5.7	39/5.8	4	fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 399024	Feuille	2
4023	39/6.6	38/6.4	10	fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1	nr	<i>Pisum sativum</i> 1168408	Feuille	2
448	42/5.5	38/5.5	2	fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplast	nr	<i>Pisum sativum</i> 461501	Feuille	1
4217	45/5.0	44/8.8	4	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 120658	Feuille	1
4407	31/5.8	27/5.5	4	triosephosphate isomerase, cytosolic	EST	<i>Coptis japonica</i> 136057	Feuille	5
390	36/6.4	36/6.4	4	ENERGY - ORGANIC ACID PATHWAY probable malate dehydrogenase	nr	<i>Pisum sativum</i> 7488830	Racine	6

Tableau 7. Classement des protéines en fonction du métabolisme dans lequel elles interviennent.

²¹ Nbr seq = nombre de séquences d'acides aminés similaires à la protéine identifiée en premier choix.²² Le numéro d'accèsion correspond au numéro Gi de la banque NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/queri.fcgi?CMD=search&DB=protein)

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Experimentale	pM (kDa) / pI Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Spèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
17201	36/6.3	36/6.4	3	malate déshydrogenase, cytosolic	EST	<i>Glycine max</i> 42521311	Racine	1
3756	33/4.8	29/5.7	3	ENERGIE - PHOTOSYNTHESE - CYCLE DE CALVIN putative ribose 5-phosphate isomerase	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 6175179	Feuille	2
4164	47/5.5	39/5.4	4	Phosphoribulokinase	nr	<i>Pisum sativum</i> 7434255	Feuille	6
3501	29/6.4	30/8.3	5	ribulose- phosphate 3-epimerase, chloroplast precursor	nr	<i>Spinacia oleracea</i> 2833386	Feuille	4
4381	50/5.7	51/5.4	9	rubisco activase large isoform precursor	EST	<i>Oryza Sativa</i> 8918359	Feuille	1
4526	62/6.7	53/6.2	7	rubisco large subunit	nr	<i>Perovskia abrotanoides</i> 671595	Feuille	4
3566	30/5.2	28/5.2	2	ENERGIE - PHOTOSYNTHESE – CHAINE THYLAKOIDIENNE probable chlorophyll a/b-binding protein type III, chloroplast precursor	EST	<i>Pisum sativum</i> 7443229	Feuille	1
2612	26/5.5	28/8.3	8	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 131390	Bourgeon	1
43771	25/5.9	28/8.3	12	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 131390	Feuille	6
821	27/5.3	26/5.8	2	photosystem I light-harvesting	EST	<i>Nicotiana tabacum</i> 493723	Feuille	6
3460	25/4.0	22/9.8	4	photosystem I reaction center subunit II, chloroplast precursor	nr	<i>Nicotiana sylvestris</i> 131167	Feuille	2
3007	22/4.1	17/5.0	14	plastocyanin, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 130275	Feuille	1
3153	24/6.1	24/8.6	2	cytochrome B6-F complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 136707	Feuille	1

Tableau 7. Suite.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	pM (kDa) / pI Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Spèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
2595	23/6.6	24/8.6	2	cytochrome B6-F complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 136707	Bourgeon	1
3292	27/6.1	28/5.2	3	probable chlorophyll a/b-binding protein type III, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 7443229	Feuille	1
4113	40/5.7	33/5.6	2	quinone oxidoreductase-like protein At1g23740	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 12230542	Feuille	5
METABOLISME GENERAL								
214	78/6.3	61/6.5	2	adenosine monophosphate binding protein 5 AMPBP5	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 20799719	Racine	6
3724	35/5.1	32/5.1	5	phosphoglycolate phosphatase, putative	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 30692947	Feuille	1
2099	47/5.5	48/7.2	2	putative acyl CoA thioesterase	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 26449786	Tige	2
METABOLISME - ACIDE AMINES								
43931	55/5.4	47/6.2	4	Glutamine synthetase leaf isozyme, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 121344	Feuille	2
4095	38/6.2	41/5.5	2	plastidic cysteine synthase 1	EST	<i>Solanum tuberosum</i> 12081919	Feuille	1
4367	60/5.8	43/5.5	3	S-adenosylmethionine synthetase	EST	<i>Brassica juncea</i> 10443981	Feuille	2
3455	70/6.1	63/6.6	2	ketol-acid reductoisomerase, chloroplast precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 6225542	Bourgeon	2
4586	62/5.9	54/6.2	13	putative alanine aminotransferase	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21537112	Feuille	1
METABOLISME - LIPIDES								
1492	40/5.2	47/5.0	2	fatty acid elongase-like protein (cer2-like)	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21594424	Tige	2
3019	39/6.6	42/8.9	3	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) precursor	nr	<i>Brassica napus</i> 99805	Bourgeon	1

Tableau 7. Suite.

Niméro Spot	pM (kDa) / pI Expérimental	Nbr seq Théorique	Nom et fonction de la protéine	Base de données	de Espèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
2814	67/5.5	56/5.3	4 myo-inositol-1-phosphate synthase	EST	<i>Glycine max</i> 14764466	Feuille	2
3475	60/5.4	56/5.4	5 myo-inositol-1-phosphate synthase	nr	<i>Spirodela polyrrhiza</i> 1170568	Bourgeon	1
17152	29/5.9	25/9.4	2 similar to phosphatidylserine synthase-2	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 22136302	Tige	1
3330	29/5.1	22/5.4	METABOLISME - NUCLEOTIDE adenine phosphoribosyltransferase	Nr	<i>Brassica napus</i> 32492063	Feuille	2
427	37/5.1	38/5.3	3 adenosine kinase	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 18377468	Racine	1
335	50/4.5	47/6.4	2 senescence-related protein	EST	<i>Pyrus pyrifolia</i> 6177796	Tige	6
2749	27/5.9	25/7.1	2 chalcone-flavonone isomerase	nr	<i>Pisum sativum</i> 729104	Racine	6
3517	32/5.9	27/6.0	2 putative 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase protein	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21537410	Feuille	5
491	40/5.0	37/5.8	4 thiamin biosynthetic enzyme	nr	<i>Glycine max</i> 6552395	Bourgeon	5
3098	40/5.1	37/5.8	10 thiamin biosynthetic enzyme	nr	<i>Glycine max</i> 6552395	Bourgeon	2
3027	40/6.6	37/5.1	2 putative GDP-mannose pyrophosphorylase	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 23197830	Bourgeon	1
668	32/4.2	28/7.7	2 TRANSPORT / REPLEIEMENT DES PROTEINES HCF106	nr	<i>Pisum sativum</i> 15277532	Bourgeon	4

Tableau 7. Suite.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	pM (kDa) / pI Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Espèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
2512	20/5.9	15/4.9	3	At2g07350/T13E11.12	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 20334838	Bourgeon	1
2917	30/4.8	33/6.3	2	chaperone GrpE-like protein	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21554173	Bourgeon	1
2804	29/5.4	26/7.8	3	cp10-like protein	EST	<i>Gossypium hirsutum</i> 21780187	Bourgeon	1
2624	26/6.4	25/6.5	2	cyclophilin-like protein	nr	<i>Triticum aestivum</i> 37788308	Bourgeon	1
2567	23/6.4	18/8.7	2	CYP1	EST	<i>Vigna radiata</i> 18146786	Bourgeon	1
3167	24/5.6	26/9.0	2	Cyclophilin	EST	<i>Vicia faba</i> 499693	Feuille	6
782	41/5.1	44/6.8	2	photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136)	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 15237225	Tige	8
44032	45/5.1	44/6.8	5	photosystem II stability/assembly factor, chloroplast (HCF136)	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 15237225	Feuille	1
3126	15/4.4	12/4.3	2	TRADUCTION/SYNTHESE PROTEINES 60s acidic ribosomal protein	EST	<i>Prunus dulcis</i> 24473796	Feuille	2
25742	25/4.8	23/5.9	2	plastid ribosomal protein S6, putative	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21553658	Bourgeon	5
2935	37/4.3	25/4.4	5	translational elongation factor 1 subunit Bbeta	nr	<i>Pisum sativum</i> 38232568	Bourgeon	1
2665	25/4.7	25/4.4	2	translationally controlled tumor protein homolog (TCTP)	EST	<i>Pisum sativum</i> 2507443	Bourgeon	1
651	28/5.3	19/4.7	2	translationally controlled tumor protein homolog (TCTP) PROTEOLYSE	nr	<i>Pisum sativum</i> 2507443	Tige	8
17811	30/4.6	26/4.7	5	20S proteasome subunit PAE1	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 6056394	Tige	1

Tableau 7. Suite.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Espèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
247	47/5.0	38/6.1	2	gamma-glutamyl hydrolase [imported]	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 25355558	Racine	7
2861	32/6.1	27/5.8	11	proteasome subunit alpha type 6	nr	<i>Glycine max</i> 12229897	Bourgeon	5
3467	31/6.4	18/6.1	2	putative alpha3 proteasome subunit	nr	<i>Nicotiana tabacum</i> 14594915	Feuille	2
1913	60/4.7	58/4.9	3	putative ubiquitin protein	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 23296306	Racine	1
3195	21/4.5	18/8.5	2	REPONSE AU STRESS- GENERALE putative ABA-induced guard cell protein	EST	<i>Vicia faba</i> 6665807	Feuille	4
3883	37/5.7	27/5.5	3	REPONSE AU STRESS – STRESS OXYDATIF	nr	<i>Spinacia oleracea</i> 7433003	Feuille	2
3345	28/4.8	29/5.9	2	L-ascorbate peroxidase	nr	<i>Pisum sativum</i> 15131688	Feuille	2
2541	23/5.7	18/6.6	4	Cu/Zn superoxide dismutase II	nr	<i>Pisum sativum</i> 20900	Bourgeon	5
3434	29/4.8	28/5.7	2	Ferritin	nr	<i>Medicago sativa</i> 4469288	Feuille	2
3586	32/4.9	27/5.2	5	glutathione S-transferase	nr	<i>Pisum sativum</i> 37051105	Feuille	1
3972	39/4.7	34/5.7	3	plastoglobules associated protein	EST	<i>Capsicum annuum</i> 1296480	Feuille	1
3766	35/4.3	38/4.6	2	plastoglobule associated protein PG1 precursor	nr	<i>Pisum sativum</i> 4105180	Feuille	5
2528	20/5.2	20/9.2	2	putative thioredoxin m2	nr	<i>Pisum sativum</i> 15594012	Bourgeon	1

Tableau 7. Suite.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	pM (kDa) / pI Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Espèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
2727	34/5.5	35/5.8	2	thioredoxin reductase (NADPH) 2	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 7270497	Bourgeon	1
4272	50/4.2	20/5.1	2	REPONSE AU STRESS – STRESS HYDRIQUE dehydration stress-induced protein	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 21553555	Feuille	2
3500	60/4.2	64/5.4	2	REPONSE AU STRESS - BLESSURE putative terpene synthase	EST	<i>Citrus x paradisi</i> 19880625	Bourgeon	1
3308	50/5.5	42/5.3	4	AUTRES – DIVISION CELLULAIRE actin 75	nr	<i>Solanum tuberosum</i> 231501	Bourgeon	1
2461	50/5.3	42/5.2	5	Actin	nr	<i>Glycine max</i> 71638	Bourgeon	1
3006	35/4.5	29/4.7	4	AUTRES – TRANSDUCTION DU SIGNAL 14-3-3-like protein	EST	<i>Pisum sativum</i> 4850247	Bourgeon	1
3599	32/4.7	36/4.6	2	AUTRES - TRANSCRIPTION 31 kDa ribonucleoprotein, chloroplast precursor	nr	<i>Nicotiana sylvestris</i> 133248	Feuille	6
2925	34/4.5	16/7.9	11	RNA-binding protein	nr	<i>Pisum sativum</i> 7446357	Bourgeon	6
3583	31/5.2	31/4.8	2	homeodomain-leucine zipper protein 56	EST	<i>Glycine max</i> 6091551	Feuille	1
3550	30/5.5	35/8.8	2	putative bHLH transcription factor	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 20197757	Feuille	1
3701	35/5.4	20/5.5	2	similar to transcription factor TINY	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 9665142	Feuille	1

Tableau 7. Suite.

Numéro Spot	pM (kDa) / pI Expérimentale	pI Théorique	Nbr seq	Nom et fonction de la protéine	Base de données	Espèces Numéro d'accession	Organe	Groupe
3020	41/6.6	43/8.2	10	transcription factor g5bf	nr	<i>Arabidopsis thaliana</i> 2765081	Bourgeon	1
752	25/5.7	20/5.1	4	PROTEINES NON CLASSEES At1g24050/T23E23_11	EST	<i>Arabidopsis thaliana</i> 22137114	Bourgeon	5
2723	29/6.4	26/5.1	4	albumin 2	nr	<i>Pisum sativum</i> 113570	Bourgeon	1

Tableau 7. Suite.

L'identification des protéines nous montre que différentes catégories de protéines (acides, basiques, membranaires, solubles) ont été retrouvées. Ceci nous permet de supposer que les protéines détectées au Sypro et identifiées sont représentatives de l'ensemble des protéines ayant un profil d'expression associé à l'acclimatation au froid chez Champagne. La majorité des spots identifiés (30%) et associés à l'acquisition de la tolérance au gel est impliquée dans le métabolisme énergétique (E) comprenant l'utilisation du carbone (1,1%), le transfert d'électron (2,2%), la glycolyse/gluconéogenèse (7,8%), la voie des acides organiques (2,2%), le cycle de Calvin (5,6%) et l'appareil thylakoidien (11,1%) de la photosynthèse (Figure 17). Les protéines impliquées dans les voies du métabolisme général (M) sont comprises dans la seconde catégorie, la plus représentée avec 23,4% des protéines identifiées et exprimées au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne. Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés (5,6%), des lipides (5,6%), des nucléotides (3,3%) et dans le métabolisme secondaire (5,6%) (Figure 17). Le *turn over* des protéines (T) comprenant la traduction, le repliement, le transport et la dégradation des protéines correspondent à 21,2% des protéines identifiées (Figure 17). Les protéines de réponse aux stress (S) représentent 13,3% des protéines identifiées induites par l'acclimatation au froid chez Champagne (Figure 17).

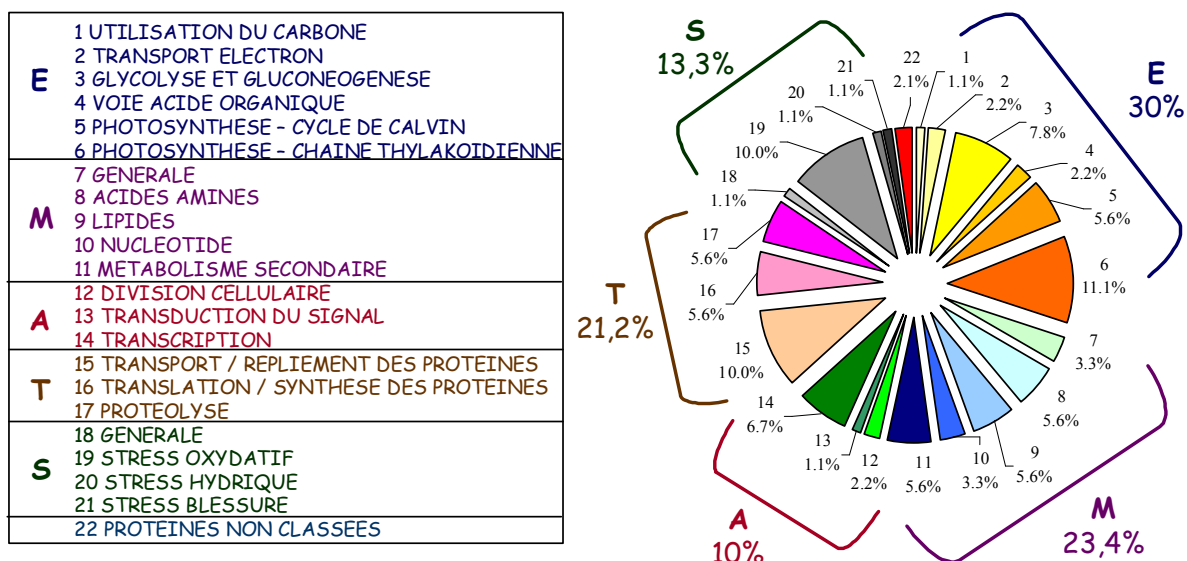


Figure 17. Distribution des protéines en fonction des 22 sous catégories définies tous organes confondus²³.

²³ E = métabolisme énergétique ; M = métabolisme général, A = Autres ; T = Turnover des protéines ; S = réponse aux stress.

1.3. Réponse organo-spécifique de l'acclimatation au froid

Seules 6 protéines s'exprimant en réponse aux basses températures sont communes à différents organes (Tableau 7). Une isoforme du cytochrome B6-F est exprimée spécifiquement chez Champagne au stade P2 dans les organes feuille et bourgeon. L'expression d'isoformes d'une sous-unité du PSII et d'une cyclophiline a été détectée dans le bourgeon à P2 et dans la feuille de P2 à P4. Celle d'une myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) dans le bourgeon à P1 et dans la feuille à P2. Un facteur d'assemblage du PSII (HCF136) et un facteur de transduction (TCTP) sont exprimés au cours de l'acclimatation au froid dans la tige. Le premier est également retrouvé dans la feuille et le second dans le bourgeon avec une expression transitoire de P2. Comme nous pouvons le constater le nombre de protéines d'intérêt communes à plusieurs organes est faible, il représente 6,5% des protéines identifiées. La majorité des protéines ainsi exprimées spécifiquement au cours de l'acclimatation au froid est différente en fonction des organes. Ceci permet de suggérer une réponse organo-spécifique aux basses températures qui traduit des besoins différents des organes.

De plus, nous pouvons constater que la répartition des 5 catégories des fonctions protéiques est variable en fonction de l'organe analysé (Figure 18). Ici, seuls les organes feuille et bourgeon ont été analysés séparément car les organes tige et racine ne comptabilisent pas assez de protéines identifiées. La catégorie du « métabolisme énergétique » représentent 46,9% des protéines identifiées dans les feuilles (Figure 18), la majorité des protéines étant impliquées dans la photosynthèse (17,9%) et la glycolyse (15,6%), contre 10,1% pour le bourgeon (Figure 18). Le maintien de l'activité de la photosynthèse par les feuilles au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne semble essentiel dans l'acquisition de la tolérance au gel. Chez les bourgeons, la majorité des protéines identifiées sont impliquées dans le *turnover* des protéines, 33,2% contre 8,8% pour les feuilles. Comme le bourgeon est un lieu de division cellulaire important, nous pouvons suggérer que les protéines identifiées permettent d'assurer la synthèse des protéines pour le fonctionnement des cellules.

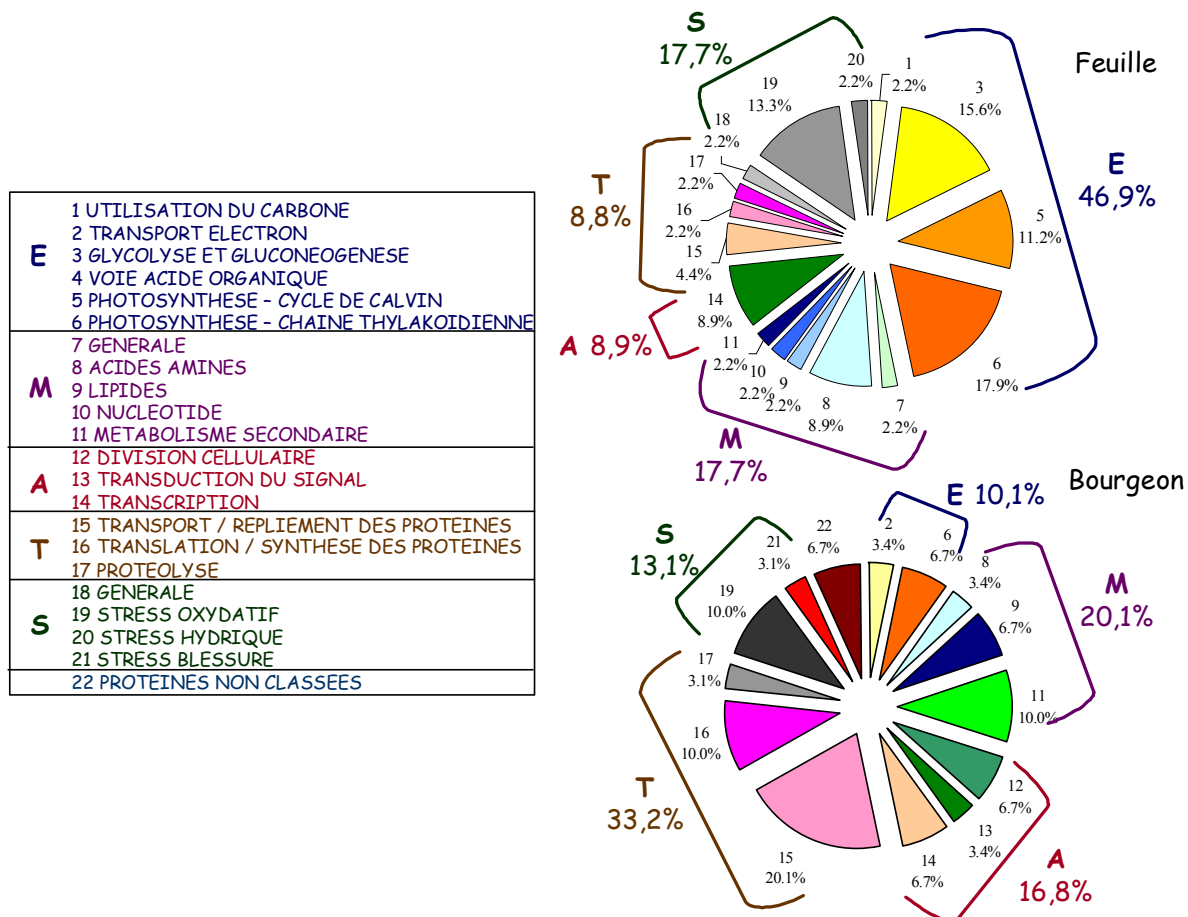


Figure 18. Distribution des protéines en fonction des 22 sous catégories définies par organes : feuille et bourgeon²⁴.

1.4. Les fonctions des protéines exprimées au cours de l'acclimatation au froid impliquées dans le réajustement du métabolisme

L'exposition des plantes aux basses températures semble induire une baisse de l'activité de la photosynthèse (Huner *et al.*, 1993). Cependant nous avons retrouvé une majorité de protéines impliquées dans la synthèse de la chaîne photosynthétique avec 11,1%. Les protéines identifiées impliquées dans la photosynthèse sont des protéines de réception de l'énergie lumineuse de l'appareil thylakoidien : les protéines du PSI (sous-unité 2 du centre réactionnel, la protéine fixant la chlorophylle a/b de type III) et du PSII (protéine de fixation de l'oxygène dans les organes feuille et bourgeon); et du transport d'électrons : le cytochrome B6-F (une isoforme dans la feuille et une autre dans le bourgeon) et la plastocyanine (Tableau 7, Figure 19). Chez *Arabidopsis*, il a été montré qu'une augmentation du taux de transcrits du gène de la chlorophyll a-b binding protein dans les feuilles développées à 5°C est associée à une augmentation de la photosynthèse (Strand *et al.*, 1997).

²⁴ E = métabolisme énergétique ; M = métabolisme général, A = Autres ; T = Turnover des protéines ; S = réponse aux stress.

Ainsi, l'expression de certaines isoformes de la chaîne thylakoïdienne de la photosynthèse spécifique de l'acclimatation au froid chez Champagne suggère une augmentation du *turnover* des protéines de la chaîne de transport des électrons et de l'antenne collectrice de lumière qui permettrait à Champagne une récupération de la photosynthèse inhibée par la chute des températures comme cela a été montré chez *Arabidopsis* (Hurry *et al.*, 2000).

De la même façon, toujours chez *Arabidopsis*, il a été observé une augmentation de l'activité des enzymes du cycle de Calvin (Strand *et al.*, 1999). Dans notre étude, nous avons trouvé l'expression d'isozymes du cycle de Calvin (grande sous-unité de la rubisco, rubisco activase, phosphoribulokinase, ribose 5-phosphate isomerase et ribulose 3-phosphate epimerase) dans les feuilles de Champagne à basses températures (Tableau 7, Figure 19), ce qui suggère que la photosynthèse n'est pas inhibé au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne. De plus, l'augmentation des activités des enzymes du cycle de Calvin, dans les feuilles d'*Arabidopsis* développées à basses températures, qui permettrait d'augmenter la capacité d'assimilation du CO₂ (Hurry *et al.*, 2000) est associée avec une augmentation des enzymes de la synthèse du saccharose (Strand *et al.*, 1999). Il semble que l'accumulation des sucres solubles à basses températures ne soit pas associée à la suppression de la photosynthèse ou à l'expression des gènes dont les produits sont impliqués dans la photosynthèse (Strand *et al.*, 1997). Dans notre étude, nous pouvons observer l'expression d'isozymes de la glycolyse et de la gluconéogenèse (enolase, aldolase1 cytoplasmique, phosphoglycerate kinase, glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogenase et triosephosphate isomerase) dans les feuilles de Champagne acclimaté au froid (Tableau 7, Figure 19). Ces enzymes sont communes aux voies de la glycolyse et de la gluconéogénèse. Cependant les deux voies sont régulées de telle sorte que l'une est inhibée lorsque l'autre est activé et *vice versa*. Le principal signal qui contrôle cette régulation est le rapport ATP/AMP. En cas d'excès d'ATP, le cycle de Krebs ralentit et l'accumulation de citrate va conduire à l'inhibition de la glycolyse au profit de la gluconéogénèse. Ainsi, en condition de basses températures l'accumulation de citrate mis en évidence chez Champagne, activerait la voie de la gluconéogénèse afin de mettre en réserve l'énergie sous forme de saccharose dont l'accumulation a été également mis en évidence chez Champagne au cours de l'acclimatation au froid. Le saccharose peut ensuite s'engager dans des voies différentes en fonction des besoins de la plante, à savoir, i) l'apport de glucose pour produire de l'énergie afin d'assurer le métabolisme, ii) le transport des sucres vers d'autres organes, et iii) la synthèse d'autres sucres solubles dont le raffinose. Aucune enzyme de la biosynthèse du saccharose comme la fructose-1,6-bisphosphatase et la saccharose phosphate

synthase n'a été identifié chez Champagne au cours de l'acclimatation au froid. Cependant ces enzymes font peut être parties des protéines non détectées sur les gels colorés au Sypro.

1.5. Induction de la synthèse de cryoprotecteurs au cours de l'acclimatation au froid

Dans notre étude, l'expression d'enzymes (la glutamine synthétase et la cystéine synthase), impliquées dans la synthèse de deux acides aminés, la glycine et la cystéine, a été mise en évidence dans les feuilles de Champagne à basses températures (Tableau 7). La synthèse d'isoformes de la glutamine synthase et de la cystéine synthase induites par les basses températures, suggère l'accumulation de glycine et de cystéine au cours de l'acclimatation au froid. L'augmentation du contenu en acides aminés a été mis en évidence en réponse aux basses températures ; par exemple, les acides aminés glutamine, alanine et aspartate s'accumulent dans les feuilles de blé (Naidu *et al.*, 1991) et l'arginine chez *Poa annua* L. (Dionne *et al.*, 2001). Comme nous pouvons le constater, les données concernant les acides aminés qui s'accumulent en condition d'acclimatation au froid sont souvent contradictoires, cela est probablement due aux différences de conditions basses températures, du matériel végétal et des méthodes d'analyses. De même, l'accumulation de la proline en réponse à la déshydratation induite par le froid a été observée chez *Arabidopsis* (Wanner et Juntilla, 1999), mais l'implication de la proline dans l'acquisition de la tolérance au gel chez le pois n'a pas été mise en évidence ni au niveau du dosage ni au niveau de l'expression d'enzymes de synthèse de la proline au cours de l'acclimatation au froid. Ainsi, le mécanisme et le rôle de l'accumulation d'acides aminés spécifiques au cours de l'acclimatation au froid ne sont pas très clairs.

1.6. Activation du *turnover* des protéines en réponse aux basses températures

Il a été mis en évidence dans le bourgeon de Champagne l'expression de plusieurs protéines impliquées dans le repliement des protéines comme la protéine chaperone GrpE, une cyclophiline et une protéine HCF106 (High-chlorophyll fluorescent) intervenant dans le transport des protéines (Tableau 7). L'expression de la cyclophiline a déjà été montrée comme étant induite par les stress biotiques et abiotiques, notamment dans le cas d'un choc froid (Godoy *et al.*, 2000). Chez des mutants de maïs déficients en HCF106 (Barkan *et al.*, 1986), la photosynthèse est inhibée. Il a ainsi été suggéré que HCF106 était nécessaire pour l'assemblage des protéines des thylakoïdes (PSI, PSII et le cytochrome f/b6). HCF106 participerait chez Champagne à la réparation des protéines des thylakoïdes endommagées par

le stress basses températures ou alors contribuerait au repliement des protéines nouvellement synthétisées de la chaîne de transport d'électrons dont certaines isoformes s'expriment spécifiquement.

Plusieurs protéines impliquées dans la traduction des protéines ont été mises en évidence dans les bourgeons de Champagne : l'expression de deux facteurs d'élongation de la traduction et d'une protéine ribosomale au cours de l'acclimatation. Dans les racines, l'expression spécifique d'isoformes de plusieurs protéasomes indique que la voie de la protéolyse semble être active.

1.7. Inhibition du stress oxydatif induit au cours de l'acclimatation au froid

Le peroxyde d'hydrogène s'accumule à basses températures sous l'action d'une superoxyde dismutase, et pour lutter contre cela le cycle du glutathion impliqué dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène est activé au cours de l'acclimatation au froid (Kocsy *et al.*, 2001). L'expression des protéines qui inhibent le stress oxydatif est fortement représentée dans la catégorie des protéines de réponse aux stress. Nous avons mis en évidence l'expression d'isoformes de la glutathion S-transferase, de la L-ascorbate peroxydase et de la 2-Cys peroxyredoxine dans les feuilles, de la Cu/Zn superoxyde dismutase II et la thioredoxine reductase dans les bourgeons (Tableau 7, Figure 19). Ainsi, les basses températures induisent chez Champagne l'expression de la L-ascorbate peroxydase impliquée dans le cycle de l'ascorbate-glutathion qui participe à la détoxification du peroxyde d'hydrogène. De même, pour la glutathion S-transferase qui catalyse la conjugaison du glutathion avec des substrats comme l'hydroxyperoxydase participe à la régulation de la peroxydation des lipides de la membrane à basses températures (Roxas *et al.*, 1997).

L'expression de la thioredoxine m2 et de la thioredoxine reductase a été mise en évidence dans les bourgeons de Champagne (Tableau 7, Figure 19). La thioredoxine est un élément connu pour interagir avec la 2-Cys peroxyredoxine (Broin *et al.*, 2002) dont l'expression a été trouvée dans les feuilles de Champagne. Le rôle des protéines de la famille des peroxydases thioredoxine-dépendante est de réduire le taux de peroxyde d'hydrogène en transférant les électrons vers des résidus sulfhydriques (Chae *et al.*, 1994) et de protéger l'appareil photosynthétique contre les dommages oxydatifs (Baier and Dietz, 1999).

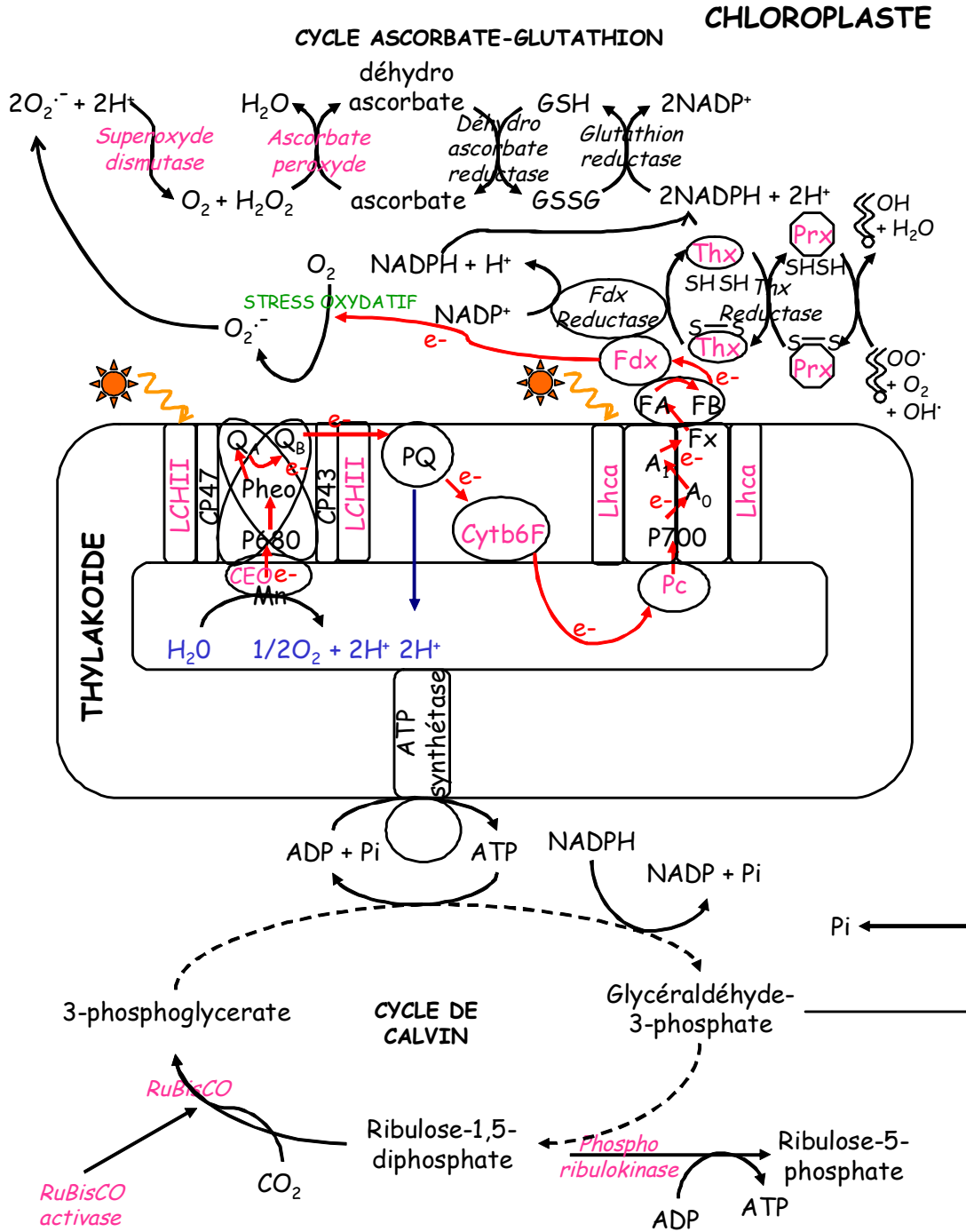
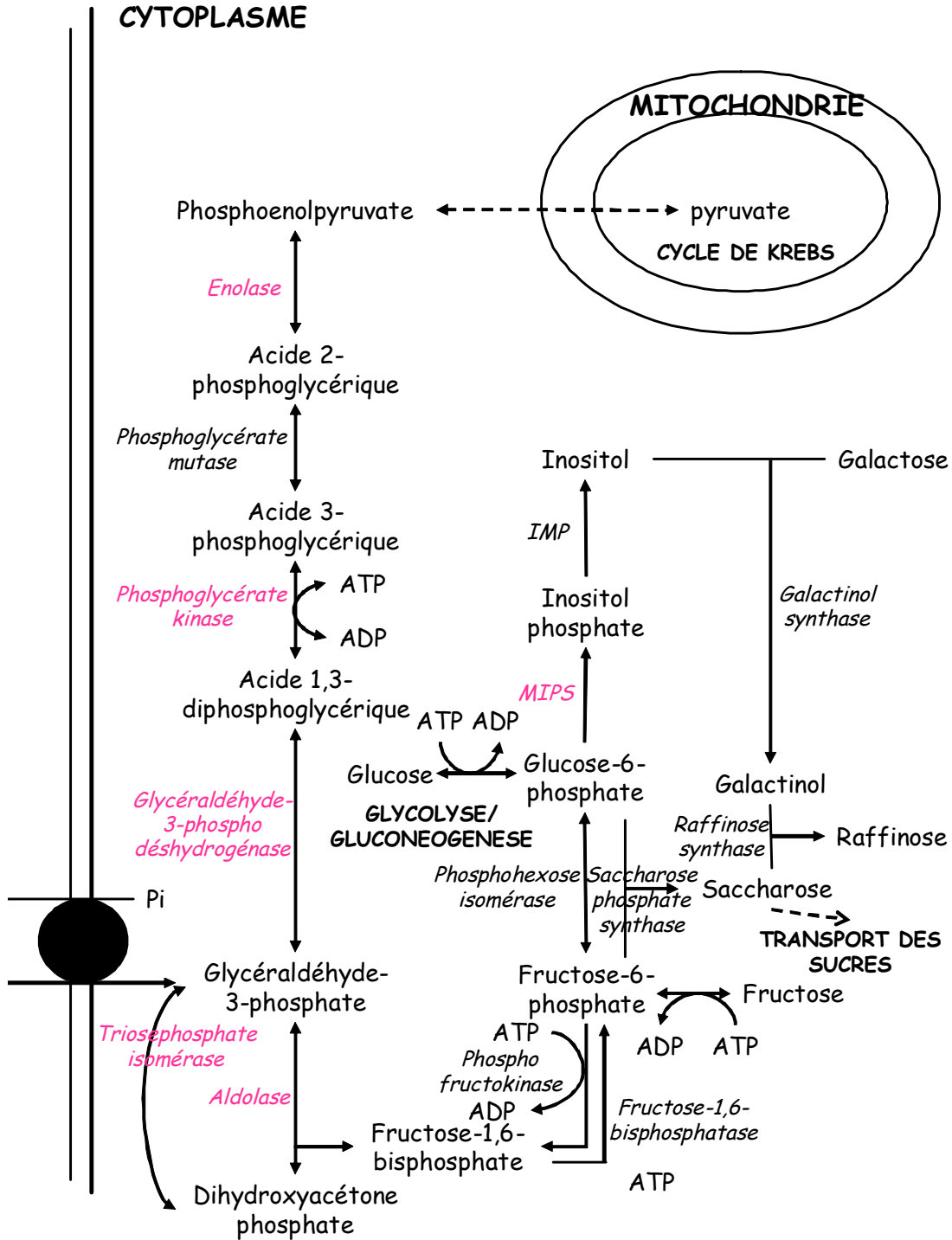


Figure 19. Positionnement des protéines²⁵ dont l'expression d'une isoforme est métabolisme de la plante.

²⁵ ATP = Adenosine triphosphate ; CEO = complexe évoluant l'oxygène ; CP = complexe chlorophylle protéine ; Cytb6F = cytochrome b6F ; Fdx = Ferredoxine ; GSH = glutathion réduit ; GSSH = glutathion oxydé ; LCH = light harvesting complex of photosystem II ; Lhca = light harvesting complex of photosystem I ; Mn = manganèse ;



spécifique de l'acclimatation au froid chez Champagne tolérant au gel dans le

IMP = myo-inositol monophosphatase ; NADP = Nicotinamide adenosine dinucléotide phosphate ; Pc = plastocyanine ; Pheo = pheophytine ; PQ = plastoquinone ; Prx = 2-Cys peroxiredoxine ; QA = ubiquinone A ; QB = ubiquinone B ; Thx = thioredoxine. Les protéines et les enzymes écrites en rose sont les protéines exprimées chez Champagne acclimaté.

La thioredoxine serait un composant important pour le transfert du pouvoir réducteur vers les 2-Cys peroxyredoxines (Broin *et al.*, 2002). La thioredoxine serait à son tour réduite par une ferredoxine-thioredoxine réductase, qui est connue pour diriger le flux d'électrons de la chaîne d'électrons de la photosynthèse vers la thioredoxine m et f (Jacquot *et al.*, 1997). Ceci suggère que chez le pois, les basses températures induiraient un stress oxydatif comme cela a déjà été montré chez le maïs (Prasad *et al.*, 1994). Chez Champagne, la période d'acclimatation au froid induit la synthèse de protéines permettant de diminuer les dommages liés à ce stress causé par la chute des températures, ce qui permet d'augmenter la tolérance à la photoinhibition dans les feuilles comme cela a déjà été montré chez *Arabidopsis* (Gray *et al.*, 2003).

D'autres facteurs mis en évidence dans notre étude participent également à l'inhibition du stress oxydatif. Une accumulation de MIPS, enzyme intervenant dans la synthèse de l'inositol, a été observée dans les feuilles de Champagne après 10 jours à basses températures (Tableau 7, Figure 19). Les transcrits et les protéines MIPS ont déjà été observés comme sur exprimés en réponse au stress salin (Nelson *et al.*, 1998) et au contraire sous exprimés en réponse à des conditions défavorables pour la photosynthèse (Keller *et al.*, 1998). Dans la tolérance au gel, le rôle de l'inositol serait de protéger les structures cellulaires de l'effet des espèces réactives d'oxygènes et de maintenir le contrôle de la pression osmotique des cellules (Nelson *et al.*, 1998).

L'expression de la MIPS suggère que l'inositol s'accumule au cours de l'acclimatation au froid pour protéger les cellules contre les effets du stress oxydatif, diminuant ainsi la photoinhibition de la photosynthèse. Cependant, la MIPS est également impliquée dans la synthèse du raffinose qui s'accumule spécifiquement chez Champagne au cours de l'acclimatation au froid comme nous l'avons observé dans la Partie 1. Des expérimentations réalisées sur des protoplastes isolés à partir d'embryons de pois (Xiao *et al.*, 2001) suggèrent que le raffinose est impliqué dans la stabilisation des membranes cellulaires dans des conditions de stress en interagissant directement avec la membrane.

L'expression de l'enzyme de synthèse de la thiamine et la GDP-mannose pyrophosphorylase (Tableau 7) suggère la synthèse des vitamines B et C en réponse aux basses températures dans les bourgeons de Champagne. Le rôle possible des vitamines en cas de gel n'a pas encore été étudié. Par contre on sait que la vitamine C agit comme un antioxydant potentiel pour éliminer les différentes espèces réactives d'oxygènes (Smiroff, 1996). De même, l'expression de deux enzymes, la chalcone-flavonone isomerase dans les racines et la 3-beta hydroxysteroid déshydrogenase/isomerase dans les feuilles, impliquées

respectivement dans la synthèse de flavonoïdes et des stéroïdes (Tableau 7) est spécifiquement détectée au cours de l'acclimatation au froid chez Champagne. Ces deux composés doivent jouer un rôle dans l'acquisition de la tolérance au gel chez Champagne mais leur synthèse en réponse aux stress n'a pas été étudiée, à notre connaissance. Cependant les flavonoïdes sont connus pour agir comme des antioxydants dans l'alimentation humaine (Miranda *et al.*, 1999).

2. CONCLUSION

Nos recherches ont montré que la majorité des protéines et enzymes identifiées et s'exprimant spécifiquement en réponse aux basses températures dans l'organe feuille de Champagne acclimaté au froid, est impliquée i) dans le réajustement du métabolisme, plus particulièrement de la photosynthèse, dans la synthèse de sucres solubles, ii) dans l'inhibition du stress oxydatif causé par la chute des températures et iii) dans la diminution de la sensibilité à la photoinhibition. Le fonctionnement de la photosynthèse et la détoxification des radicaux libres sont deux événements qui ont déjà été mis en évidence au niveau transcriptomique lors d'une étude portant sur l'expression des gènes en réponse aux basses températures chez *Arabidopsis* (Provart *et al.*, 2003). Comme suggéré par Huner et ses collègues (1998), l'appareil photosynthétique pourrait intervenir dans la perception des variations de l'environnement et induire la transduction du signal basses températures conduisant ainsi à l'expression des gènes relatifs à l'activité de la photosynthèse et spécifiques de l'acclimatation au froid. De plus, le maintien de la photosynthèse permettrait la production d'énergie nécessaire aux modifications physiologiques survenant lors de l'acclimatation au froid (Levitt, 1980) et critiques pour l'acquisition de la tolérance au gel.

Cette étude a ainsi été réalisée sur les variations qualitatives (présence/absence) de l'expression des protéines au cours de l'acclimatation au froid spécifique de Champagne acclimaté. Dans le but d'étendre l'analyse aux variations quantitatives (surexpression ou répression de l'expression), il est nécessaire de mettre en évidence le taux de variation quantitative des spots due aux variations expérimentales et notamment du mode de coloration car l'utilisation du nitrate d'argent sature la coloration des spots quantitativement majoritaires. Dans la partie suivante, nous avons réalisé l'étude des variations qualitatives et surtout quantitatives liées à l'utilisation de deux types de coloration, celle au nitrate d'argent et celle au Sypro Ruby, et quantifié cette variation expérimentale dans le cadre de notre laboratoire. Par la même occasion, nous avons comparé deux méthodes de préparation des échantillons

qui vont nous permettre d'évaluer la variation analytique uniquement due à l'expérimentation et la variation biologique lorsque plusieurs plantes sont comparées séparément.

1. RESULTAT ET DISCUSSION

1.1. Analyses qualitative et quantitative de la reproductibilité des gels d'une expérimentation biologique et analytique.

Chez les végétaux, des plantes d'une même lignée homozygote soumises aux mêmes conditions de culture peuvent exprimer des différences de l'expression quantitative des protéines. Ces différences ont pour origine des différences existantes dans le microenvironnement des plantes, des petites variations génotypiques ou des différences dans la distribution des isoformes produites par les modifications post-traductionnelles. Cette variation biologique estimée sur les variations quantitatives des protéines entre 10 plantes similaires de luzerne a été évaluée à 24,2% (Asirvatham *et al.*, 2002).

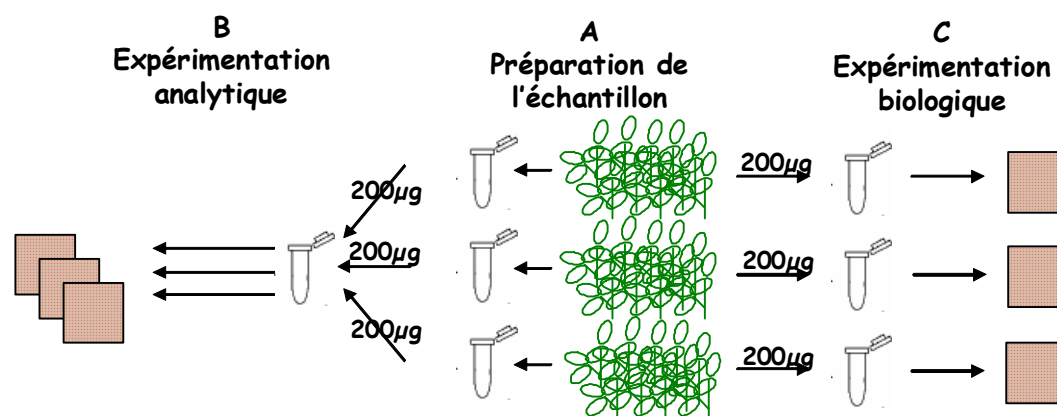


Figure 20. Présentation des deux méthodologies utilisées²⁶.

Pour déterminer une variabilité biologique et analytique, 3 répétitions de 10 plantes de pois avec un développement similaire ont été prélevées après la phase de nursery (Figure 20A). Un mélange des 3 extractions protéiques obtenues a été appliqué sur 3 gels bidimensionnels afin de séparer les protéines pour l'expérimentation analytique (Figure 20B). Parallèlement, chaque échantillon a été appliqué sur 3 gels différents pour l'expérimentation biologique (Figure 20C). Tous les échantillons ont été soumis simultanément à une même migration sur des gels IPG provenant du même lot pendant 166 kVh et les gels de deuxième dimension réalisés dans une multicuve de 6 plaques pour minimiser les variations. Toutes les images sont scannées après coloration au nitrate d'argent ou au Sypro Ruby. Trois répétitions

²⁶ Pour la préparation des échantillons en A, 3 extractions à partir de 3 lots de 10 plantes sont réalisées. Pour l'expérimentation analytique en B, un mélange des 3 extractions est préparé et migre sur 3 gels différents. Pour l'expérimentation biologique en C, les 3 échantillons migrent séparément.

sont réalisées pour quantifier la variabilité comme montré par Choe et ses collègues (2003). Afin de comparer les variations qualitatives et quantitatives entre les deux expérimentations, le mode de coloration a d'abord été testé afin de choisir la coloration la plus reproductible.

1.2. Comparaison des variations qualitatives et quantitatives de l'expérimentation biologique avec une coloration au nitrate d'argent et une coloration au Sypro Ruby

L'expérimentation biologique est utilisée pour comparer les deux modes de coloration car elle comprend la variabilité quantitative de l'expression des protéines d'une répétition à une autre en plus de la variabilité analytique.

Le nombre de spots détectés à l'aide du logiciel Progenesis dans chaque lot de gels des deux expérimentations est reporté dans le tableau 8. Pour l'expérimentation biologique, 454 spots sont détectés en moyenne avec la coloration au Sypro Ruby contre 546 spots avec la coloration au nitrate d'argent. Cette dernière reste donc plus sensible que la coloration au Sypro Ruby (Tableau 8). La différence du nombre de spots détectés a été statistiquement testée par une analyse de variance avec un risque de 5%. Aucune différence significative n'a été retrouvée entre le nombre de spots détectés par la coloration à l'argent et la coloration au Sypro Ruby.

Coloration	Expérimentation	Nombre de spots	Moyenne	Ecart type
Argent	Biologique	588 – 634 - 418	546	114
Sypro Ruby	Biologique	434 – 475 - 452	454	21
	Analytique	428 – 437 - 426	430	6

Tableau 8. Nombre de spots détectés sur les 3 répétitions, avec la moyenne et l'écart type pour la coloration au nitrate d'argent et au Sypro Ruby.

Tous les spots appariés sur les gels ont été manuellement examinés afin de vérifier les appariements entre tous les gels des deux expérimentations et de corriger les erreurs d'appariements. La comparaison du nombre de spots appariés a été réalisée (Figure 21). Seuls 27% des spots sont communs aux 3 répétitions avec une coloration au nitrate d'argent. La majorité des spots (45%) sont détectés uniquement sur un gel. Le reste des spots (28%) se trouve sur deux des trois répétitions (Figure 21). Avec la coloration au Sypro Ruby, le nombre

de spots détectés sur les trois répétitions augmente à 50%, mais le nombre de spots présents sur un seul gel reste élevé avec 38% des spots (Figure 21).

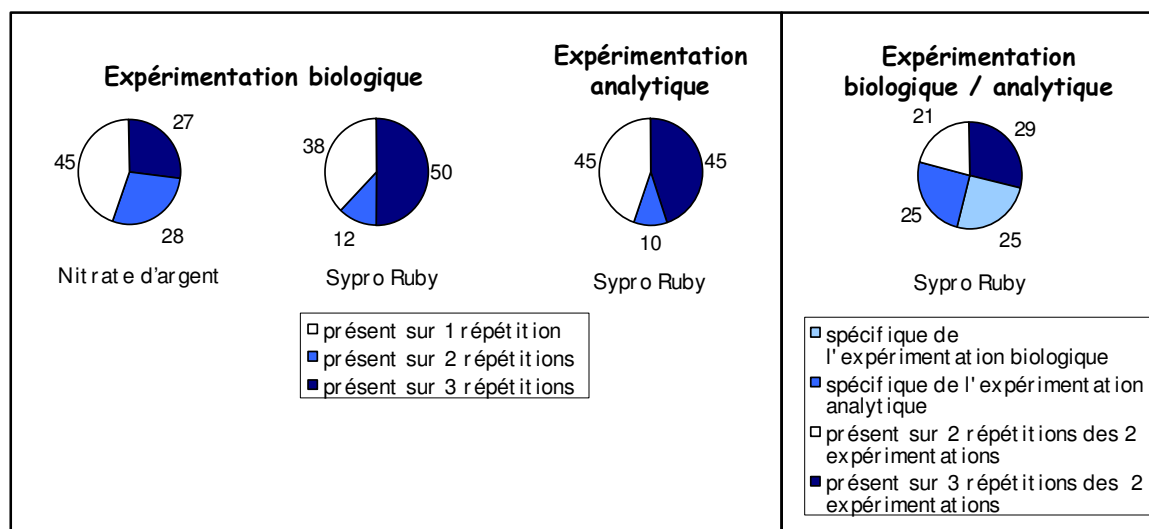


Figure 21. Pourcentage des spots communs à 3, à 2 et spécifiques à une répétition.

L'analyse quantitative a été réalisée avec les spots communs aux trois répétitions. Les coefficients de variation (CV) de l'intensité normalisée de chaque spot ont été calculés. La moyenne des CV de l'expérimentation biologique a été déterminée à 29,7% avec la coloration au Sypro Ruby et à 63,5% avec la coloration au nitrate d'argent. Il avait déjà été montré que le nitrate d'argent était responsable d'une grande variabilité de l'intensité des spots (Voss et Haberl, 2000). Comme la coloration au Sypro Ruby donne une meilleure reproductibilité qualitative et quantitative que celle à l'argent, elle a été utilisée pour réaliser l'expérimentation analytique.

1.3. Comparaison de la variabilité qualitative et quantitative entre l'expérimentation biologique et analytique avec la coloration au Sypro Ruby

Le nombre de spots détectés dans l'expérimentation biologique (454) est plus élevé que celui de l'expérimentation analytique (430) (Tableau 8). Cependant l'écart type est aussi plus important dans l'expérimentation biologique que dans l'expérimentation analytique (Tableau 8).

Comme précédemment, 50% des spots sont communs aux 3 répétitions pour l'expérimentation biologique, alors que dans le cas de l'expérimentation analytique, cela concerne 45% des spots (Figure 21). La reproductibilité qualitative est similaire pour les deux

expérimentations avec la coloration Sypro Ruby. Seuls 249 spots (29%) sont communs aux deux expérimentations. Chaque expérimentation apporte approximativement 25% de spots non retrouvés dans l'une ou l'autre des expérimentations (Figure 21). Les variations d'un gel à un autre peuvent être dues aux variations expérimentales causées par des pertes de protéines pendant l'étape de réhydratation, d'équilibration des gels et de transfert entre la première et la deuxième dimension (Zuo et Speicher, 2000). Par ailleurs, nous pouvons considérer que les protéines en quantité minoritaire spécifiques à chaque lot de plantes sont fortement diluées quand les trois échantillons provenant des trois lots de plantes sont mélangés pour tester la variabilité analytique. Au contraire, les protéines minoritaires communes aux trois lots de plantes sont fortement représentées dans le mélange et dans l'expérimentation analytique. Ceci peut expliquer pourquoi le nombre de spots dans les deux expériences reste similaire mais que le profil des spots soit différent.

L'analyse quantitative a été réalisée en considérant les 249 spots communs aux trois répétitions dans les deux expérimentations. Les CV de l'intensité normalisée des spots ont été calculés. La moyenne des CV pour les 249 spots des deux expérimentations a été calculée afin d'évaluer la variabilité intra-quantitative de l'intensité des spots (variations de la quantification des spots pour chaque expérimentation). Alors que le CV biologique est de 29,7%, le CV analytique est de 29,8% (Tableau 9). Une analyse de variance réalisée sur la moyenne des CVs comme facteur avec un risque de 5% montre qu'il n'y a pas de différence significative entre le CV biologique et le CV analytique. Les CVs biologique et analytique de 29,7% et 29,8% sont similaires à la variation technique moyenne obtenue pour une séparation et une détection quantitative en électrophorèse bidimensionnelle (Molloy *et al.*, 2003).

Expérimentation	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation
Biologique	0.4	0.1	29.8
Analytique	0.4	0.1	29.7

Tableau 9. Moyenne des intensités des spots normalisées, leurs écart types et coefficient de variances calculés à partir des trois répétitions de gels colorés au Sypro Ruby.

Les intensités normalisées des 249 spots communs à tous les gels ont été comparées individuellement pour chaque spot avec un test d'analyse de variance entre les deux

expérimentations pour évaluer la variabilité inter-quantitative (variation des intensités des spots entre les deux expérimentations). Avec un risque de 5%, pour les 249 spots, seuls 9 montrent une différence significative entre les deux expérimentations.

Ces résultats confirment que (i) les préparations de plusieurs échantillons de plusieurs plantes mélangées n'apportent pas plus de variabilité dans l'intensité des spots que l'utilisation d'une préparation d'un seul échantillon, (ii) des lots de plusieurs plantes équilibrent la variabilité biologique et (iii) une variabilité quantitative de l'intensité des spots d'environ 30% est encore présente même avec une coloration au Sypro Ruby.

2. CONCLUSION

Les différences qui ont été observées après l'appariement des gels indiquent une variabilité technique du système de l'électrophorèse bidimensionnelle ou du système d'analyse. Ces différences sont marquées par des spots absents de certaines répétitions et des spots dont l'intensité varie. Le type d'analyse d'image et le degré d'automatisation ont un impact sur le niveau de signification qui peut être attribué à une variation spécifique d'un processus. C'est pourquoi, il est important de faire attention aux résultats d'une analyse différentielle des variations quantitatives à partir des gels d'électrophorèse bidimensionnelle. L'étude réalisée par Phadke *et al.* (2001) propose que les niveaux d'expression des protéines sur gels bidimensionnels entre différentes conditions doivent différer de plus de $3,92\sigma$ (en dehors de la distribution gaussienne normale associée à une erreur aléatoire) pour être significatifs avec un risque de 5% où σ correspond à la moyenne du CV. Cette approche suggère que la différence d'expression protéique dans les conditions utilisées dans notre laboratoire avec une coloration au Sypro Ruby doit être supérieure à 116% ($3,92 \times 29,7$) pour être significative avec un risque de 5%. Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation d'une coloration au nitrate d'argent nécessite d'augmenter les niveaux d'évaluation des critères de l'analyse statistique. Dans ce cas, pour affirmer que la différence dans l'expression protéique est significative, la variation quantitative doit être supérieure à 249% ($3,92 \times 63,5$) pour le même échantillon dans les mêmes conditions du laboratoire. La comparaison des cartes protéiques utilisant une détection manuelle et un appariement dans le cas d'une expérimentation type biologique (utilisant des mélanges de plusieurs plantes pour un échantillon) permet une analyse quantitative de l'expression des protéines. Ainsi dans le cadre de la poursuite de l'analyse différentielle des protéines au cours de l'acclimatation au froid, il faudra tenir compte de ce facteur pour réaliser l'analyse au niveau des variations quantitatives.

L'approche protéomique révèle que certains métabolismes sont liés à l'acquisition de la tolérance au gel lors de l'acclimatation au froid. L'expression spécifique de certaines isoformes des protéines de la chaîne de transport des électrons et de l'antenne collectrice de la lumière, ainsi que des isozymes du cycle de Calvin au cours de l'acclimatation au froid (Figure 22) indique que l'appareil photosynthétique est le métabolisme clé de l'acquisition de la tolérance au gel chez le pois. L'expression de ces protéines contribuerait au réajustement de la photosynthèse dont l'activité chute normalement en conditions de basses températures. Le maintien de la photosynthèse au cours de l'acclimatation au froid permettrait de garantir une synthèse de sucres solubles, dont l'accumulation a été mise en évidence chez Champagne acclimaté, par l'activation de la voie de la gluconéogenèse dont l'expression de certaines isozymes est retrouvée spécifiquement chez Champagne. Toutefois comme nous l'avons observé dans les lignées recombinantes cultivées en champ, l'accumulation de sucres solubles n'est pas exclusive pour l'acquisition de la tolérance au gel des lignées. D'autres composés non identifiés dans l'étude des lignées recombinantes contribueraient de façon majeure à l'acquisition de la tolérance au gel. Cependant le maintien de la photosynthèse est également obtenu par l'expression, au cours de l'acclimatation au froid, de protéines de réponse au stress oxydatif intervenant dans le cycle ascorbate-glutathion ainsi que dans la synthèse de certains composés comme la vitamine C ou les flavonoides vont permettre d'éliminer les espèces réactives d'oxygènes afin de diminuer les effets de la photoinhibition de la photosynthèse (Figure 22).

Plusieurs études en cours vont venir compléter nos résultats. Une première étude consiste à mesurer l'activité d'enzymes du cycle du carbone (RuBisCO, Glycéraldéhyde-6-phosphodéshydrogénase et la pyruvate kinase) qui complétera nos résultats sur l'expression spécifique des protéines dans le métabolisme de la photosynthèse. La mesure de la pression osmotique au cours de l'acclimatation au froid permettra elle de déterminer la contribution de l'accumulation des sucres dans l'osmorégulation.

Une seconde étude porte sur l'analyse du transcriptome réalisé dans le cadre d'un programme Génoplante (PeaB 2000-2004). Les résultats de cette étude seront confrontés à nos résultats d'expression des protéines afin de mettre en évidence les points communs et les différences entre les fonctions des protéines identifiées et si des événements de régulation post-transcriptionnelles surviennent lors de l'acclimatation au froid.

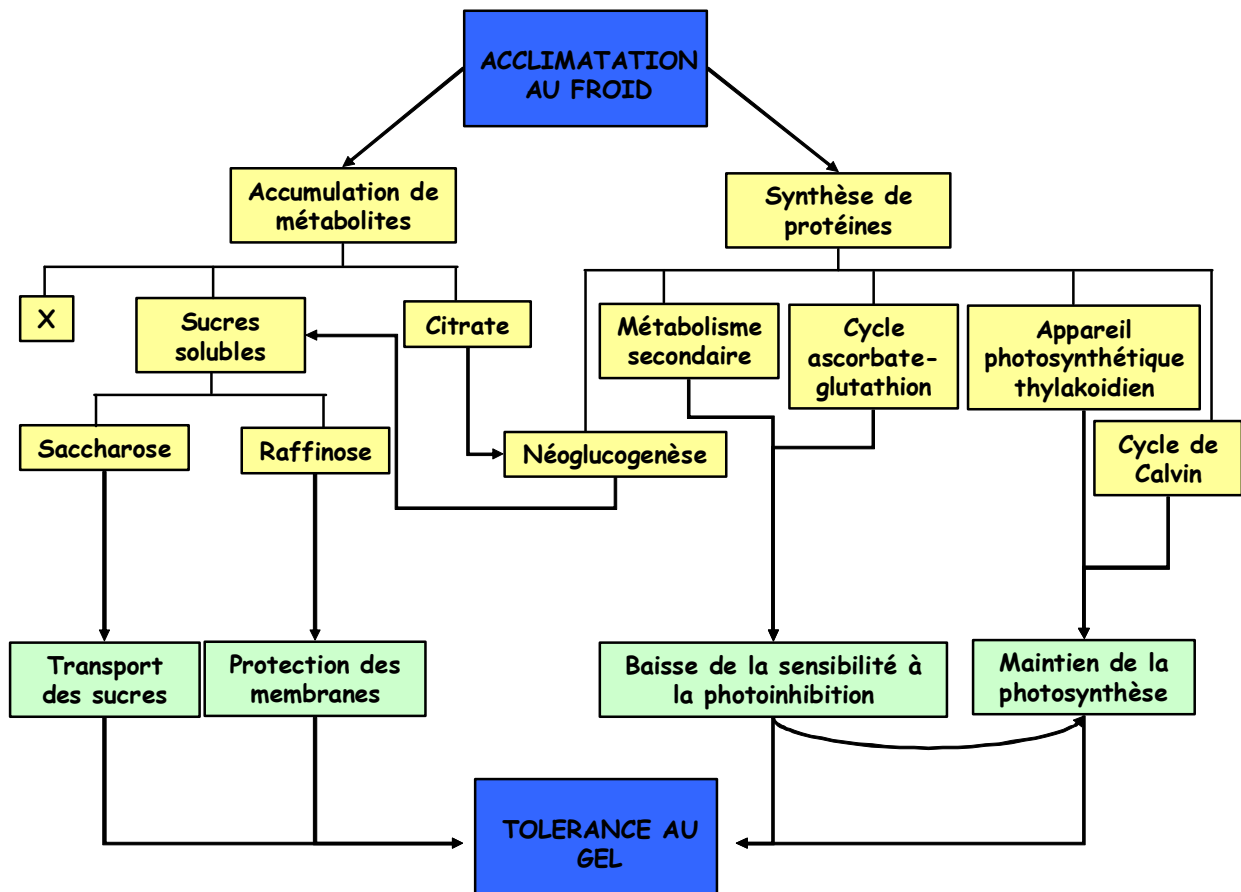


Figure 22. Schéma récapitulatif des évènements mis en évidence au cours de l'acclimatation au froid et associées à l'acquisition de la tolérance au gel.

Les résultats de l'ensemble de ces études va servir, au niveau génétique, à la sélection de marqueurs des gènes de synthèse d'enzymes impliquées dans les métabolismes que nous avons mis en évidence et à déterminer d'éventuels co-localisation avec les QTL de teneurs en sucres et les QTL de tolérance au gel. Ce travail à long terme a pour objectif de mettre en évidence des gènes majeurs de l'acquisition de la tolérance au gel.

L'analyse du protéome va être poursuivi par plusieurs travaux : i) l'amélioration de la méthode de détection des protéines non révélées par le Sypro Ruby en utilisant d'autres colorants comme par exemple le Deep Purple (Amersham), ii) l'analyse des protéines dont le profil d'expression est spécifique de Tèrese, c'est à dire qui disparaissent pendant l'acclimatation au froid chez Champagne, et iii) l'analyse des variations quantitatives des spots en tenant compte du facteur de variation expérimentale déterminée précédemment. Cela

permettra d'amplifier les résultats obtenus et d'appréhender toutes les facettes de l'expression protéique lors de l'acclimatation au froid.

Ce travail réalisé sur les deux variétés Champagne et Tèrese va être poursuivi sur les lignées recombinantes. En effet, afin de corréler l'expression des protéines identifiées avec l'acquisition de la tolérance au gel de Champagne ou responsable de la sensibilité de Tèrese, une recherche de ces protéines sera réalisée chez les lignées recombinantes et lorsqu'elles seront à notre disposition chez les lignées isogéniques. De plus, la compréhension plus fine du rôle des sucres sera entreprise par l'analyse des lignées recombinantes en conditions de culture contrôlées.

- Abbasi, F.M. et Komatsu, S. 2004. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* 4: 2072-2081.
- Agrawal, G.K., Rakwal, R., Yonekura, M., Kubo, A. et Saji, H. 2002. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics* 2: 947-959.
- Atici, Ö. et Nalbantoğlu, B. 1999. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry* 50: 755-761.
- Anderson, J.V., Li, Q.B., Haskell, D.W. et Guy, C.L. 1994. Structural organization of the spinach endoplasmic reticulum-luminal 70-kilodalton heat-shock cognate gene and expression of 70-kilodalton heat shock genes during cold acclimation. *Plant Physiol.* 104: 1359-1370.
- Anderson, L. et Seilhamer, J. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533-537.
- Asirvatham, V.S., Watson, B.S., Sumner, L.W. 2002. Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago trunculata* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2: 960-968.
- Bahrman, N., LeGouis, J., Negroni, L., Amilhat, L., Leroy, P., Laine A.L. et Jaminon, O. 2004. Differential protein expression assessed by two-dimensional gel electrophoresis for two wheat varieties grown at four nitrogen levels. *Proteomics* 4: 709-719.
- Baier, M. et Dietz, K-J. 1999. Alkyl hydroperoxyde reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 4: 166-168.
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S. et Thomashow, M.F. 1994. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought-, and ABA-regulated gene expression. *Plant. Mol. Biol.* 24: 701-713.
- Barber J. 1994. Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 201-208.
- Bardel, J., Louwagie, M., Jaquinod, M., Jourdain, A., Luche, S., Rabilloud, T., Macherel, D., Garin, J. et Bourguignon, J. 2002. A survey of the plant mitochondrial proteome in relation to development. *Proteomics* 2: 880-898.
- Barkan, A., Miles, D. et Taylor, W.C. 1986. Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J.* 5: 1421-1427.
- Barnes, G.N., Slevin, J.T. et Vanaman, T.C. 1995. Rat brain protein phosphatase 2A: an enzyme that may regulate autophosphorylated protein kinases. *J. Neurochem.* 64: 340-353.
- Bates, L., Waldren, R.P. et Teare, J.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.

- Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H. et Kemper, C. 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21: 2509-2521.
- Bertin, P., Bullers, P., Bouharmont, J. et Kinet, J.M. 1998. Somaclonal variation and chilling tolerance improvement in rice: changes in fatty acid composition. *Plant Growth Regul.* 24: 31-41.
- Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinot, V., Dieu, M., Dierick, J.F., Van Tuinen, D., Remacle, J., Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi, S. 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago trunculata* Gaertn. By two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 23: 122-137.
- Bourion, V., Lejeune-Hénaut, I., Munier-Jolain, N. et Salon, C. 2003. Cold acclimation of winter and springs peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *Eur. J. Agron.* 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*. *Plant Sci.* 93: 41-53.
- Broin, M., Cuiné, S., Eymery, F. et Rey, P. 2002. The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* 14: 1417-1432.
- Calderon, P. et Pontis, H.G. 1985. Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after a chilling shock. *Plant Sci.* 42: 173-176.
- Castonguay, Y., Nadeau, P., Lechasseur, P. et Chouinard, L. 1995. Differential accumulation of carbohydrates in alfalfa cultivars of contrasting winterhardiness. *Crop Sci.* 35: 509-516.
- Chae, H.Z., Chung, S.J. et Rhee, S.G. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* 269: 27670-27678.
- Chang, N.W.P., Huang, L., Shen, M., Webster, C., Burlingame, A.L. et Roberts, J.K.M. 2000. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. *Plant Physiol.* 122: 295-317.
- Chen, T.H., Gusta, L.V. et Fowler, D.B. 1983. Freezing injury and root development in winter cereals. *Plant Physiol.* 47: 164-167.

- 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*. *Genes Dev.* 15: 1043-1054.
- Choe, L.H. et Lee, K.H. 2003. Quantitative and qualitative measure of intralaboratory protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load and image analysis. *Electrophoresis* 24: 3500-3507.
- Corbineau, F., Picard, M.A., Fougereux, J-A., Ladonne, F. et Côme, D. 2000. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Sci. Res.* 10: 294-298.
- Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F. et Sanchez, J.C. 2000. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 21: 1104-1115.
- Costa, P., Pionneau, C., Bauw, G., Dubos, C., Barhmann, N., Kremer, A., Frigerio, J.M. et Plomion, C. 1999. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. *Electrophoresis* 20: 1098-1108.
- Damerval, C. 1994. Quantification of silver-stained proteins resolved by two-dimensional electrophoresis genetic variability as related to abundance and solubility in two maize lines. *Electrophoresis* 15: 1573-1579.
- 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. *Genetics* 137: 289-301.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. et Sarhan, F. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10: 623-638.
- Dave, R.S. et Mitra, R.K. 1998. A low temperature induced apoplastic protein isolated from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* 49: 2207-2213.
- De Bruijn, S.M., Buddendorf, C.H. et Vreugdenhil, D. 1993. Characterization of the ABA-deficient *Pisum sativum* "wilty" mutant. *Acta Botanica Neerlandica* 42: 491-503.
- Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. et Desjardins, Y. 2001. Amino acid and protein changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. *Crop Sci.* 41: 1862-1870.
- Duman, J.G. 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 327-537.

- Dupire, L., Decout, E., Vasseur, J. et Delbreil, B. 1999. Histological and 2D protein patterns comparisons between a wild type and a somatic embryogenic mutant of *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci.* 147: 9-17.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. et Botstein, D. 1998. Cluster analysis and display of genome wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14863-14868.
- Etévé, G. et Derieux, M. 1982. Variabilité de la durée de la phase végétative chez le Pois (*Pisum sativum* L.). Applications à la sélection de type résistant à l'hiver et à la détermination de la date de semis. *Agronomie* 2: 813-817.
- ^aFiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R.N. et Willmitzer, L. 2000. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 3573-3580.
- ^bFiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. et Willmitzer, L. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18: 1157-1161.
- Fletcher, G.L., Hew, C.L. et Davies, P.L. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 359-370.
- Fowler, S. et Thomashow, M.F. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14: 1675-1690.
- Fowler, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S. et Sarhan, F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol.* 127: 1676-1681.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, M., Vandekerckove, J. et Job, D. 2002. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* 129: 823-837.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. et Sommerville, C. 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3- desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106: 1615-1621.
- 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 change associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124: 1854-1865.
- 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. *Plant J.* 16: 433-442.

- Gilmour, S.J. et Thomashow, M.F. 1991. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 17: 1233-1240.
- Godoy, A.V., Lazzaro, A.S., Casalongue, C.A. et San Segundo, B. 2000. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci.* 152: 123-124.
- Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B. et Zhu, J-K. 2002. RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11507-11512.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. et Weiss, W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053.
- Görg, A. 1993. Two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 130-132.
- Gray, G., Hope, B.J., Qin, X., Taylor, B.G. et Whitehead, C.L. 2003. The characterization of photoinhibition and recovery during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana* using chlorophyll fluorescence imaging. *Physiol. Plant.* 119: 365-375.
- Gray, G.R., Savitch, L.V., Ivanov, A.G. et Huner, N. 1996. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition (II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye). *Plant Physiol.* 110: 61-71.
- Grossi, M., Cattivelli, L., Terzi, V. et Stanca, M. 1992. Modification of gene expression induced by ABA in relation to drought and cold stress in barley shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 97-103.
- Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 41: 187-223.
- Hernandez, S., Deleu, C. et Larher, F. 2000. Proline accumulation by leaf tissues of tomato plants in response to salinity. *Plant Biol. Pathol.* 323: 551-557.
- Hinch, D.K., Zuther, E. et Heyer, A.G. 2003. The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochem. Biophys. Acta* 1612: 172-177.
- Hinch, D.K., Hellwege, E.M., Heyer, A.G. et Crowe, J.H. 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *Eur. J. Biochem.* 267: 535-540.
- Holaday, A.S., Martindale, W., Alred, R., Brooks, A.L. et Leegood, R.C. 1992. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiol.* 98: 1105-1114.

- Hon, W.C., Griffith, M., Chong, P. et Yang, D.S.C. 1994. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.). *Plant Physiol.* 104: 971-980.
- Hoogland, C., Sanchez, J.C., Tonelle, L., Binz, P.A., Bairoch, A., Hochtrasser, D.F. et Appel, R.D. 2000. The 1999 SWISS-2DPAGE database update. *Nucleic Acids Res.* 28: 286-288.
- Huang, T. et Duman, J.G. 1995. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from cold-acclimated kale, *Brassica oleracea*. *Cryobiology* 32: 577-581.
- Hughes, M.A. et Dunn, M.A. 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp. Bot.* 47: 291-305.
- Huner, N.P.A., Oquist, G. et Sarhan, F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3: 224-230.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S. et Griffith, M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynth. Res.* 37: 19-39.
- Hurry, V.M., Strand, A., Furbank, R. et Stitt, M., 2000. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24: 383-396.
- Hurry, V.M., Strand, A., Tobiaeson, M., Gardeström, P. et 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.
- Hurry, V.M., Malmberg, G., Gardeström, P. et Oquist, G. 1994. Effects of a short-time shift to low temperature and a long-term cold hardening on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and sucrose phosphate synthase activity in leaves of winter wheat (*Secale cereale* L.). *Plant Physiol.* 106: 983-990.
- Imin, N., De Jong, F., van Noorden, G., Saeed, N.A., Wang, X-D., Rose, R.J. et Rolfe, B.G. 2004. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 4: 1883-1896.
- Imin, N., Kerim, T., Weinman, J.J. et Rolfe, B.G. 2001. Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics* 1: 1149-1161.
- Imanishi, H.T., Suzuki, T., Masuda, K. et Harada, T. 1998. Accumulation of raffinose and stackyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. *Sci. Hortic.* 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*. *Plant Cell* 10: 1151-1161.

- Jacquot, J-P., Lancelin, J-M. et Meyer, Y. 1997. Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* 136: 543-570.
- Jaglo-Ottensen, K.R., Klett, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T. et Thomashow, M.F. 2001. Components of the *Arabidopsis* C Repeat/Dehydration Responsive Element Binding Factor cold response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* 127: 910-917.
- Jaglo-Ottensen, 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. *Science* 280: 104-106.
- Johnson-Flanagan, A.M. et Singh, J. 1988. Protein synthesis and freezing tolerance in plants cells. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 7: 279-302.
- Jonak, C., Kieged, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S. et Hirt, H. 1996. Stress signalling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11274-11279.
- Kawamura, Y. et Uemura, M. 2003. Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J.* 36: 141-154.
- Keller, R., Brearley, C., Trethewey, R. et Muller-Rober, B. 1998. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase. *Plant J.* 16: 403-410.
- Kim, H.J., Kim, Y.K., Park, J.Y. et Kim, J. 2002. Light signaling mediated by phytochrome plays an important role in cold induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29: 693-704.
- Knight, H., Veale, E.L., Warren, G.J. et Knight, M.R. 1999. The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low temperature induction of genes dependant on the CRT/DRE sequence motif. *Plant Cell* 11: 875-886.
- Knight, H., Trewavas, A.J. et Knight, M.R. 1996. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell* 8: 489-503.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. et Trewavas, A.J. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526.

- Kocsy, G., Galiba, G. et Brunold, C. 2001. Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.* 113: 158-164.
- Koller, A., Washburn, M.P., Lange, B.M., Andon, N.L., Deciu, C., Haynes, P.A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wei, J., Wolters, D. et Yates III, J.R. 2002. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11969-11974.
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J. et Soppe, W. 1998. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 345-370.
- Koroleva, O.A., Tomos, A.D., Farar, J. et Pollock, C.J. 2002. Changes in osmotic and turgor pressure in response to sugar accumulation in barley source leaves. *Planta* 215: 210-219.
- Koroleva, O.A., Farar, J.F., Tomos A.D. et Pollock, C.J. 2000. Solute patterns in individual mesophyll, bundle sheath and epidermal cells of barley induced to accumulate carbohydrate. *New Phytol.* 136: 97-104.
- Krause, G.H., Carouge, N. et Garden, H. 1999. Long-term effects of temperatures shifts on xanthophyll cycle and photoinhibition in spinach (*Spinacia oleracea*). *AJPP* 26: 125-134.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X. et Harper, J.F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiol.* 130: 2129-2141.
- Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J.F. et Hill, S. 1995. Cold induced accumulation of hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* 107: 945-923.
- Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W. et Braun, H-P. 2001. Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 1694-1710.
- Kung, C.C.S., Yeh, K.W., Lin, C.Y. et Chen, Y.M. 1998. Characterization of a pea gene responsive to low temperature. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 9-15.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B. et Zhu, J-K. 2002. *LOS2*, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 21: 2692-2702.
- 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. *Genes Dev.* 15: 912-924.
- Leegood, R.C. et Furbank, R.T., 1986. Stimulation of photosynthesis by 2% oxygen at low temperatures is restored by phosphate. *Planta* 168: 84-93.

- Lejeune-Hénaut, I., Bourion, V., Etévé, G., Cunot, E. et Delahaye 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.
- Leng, P. et Qi, J.X. 2003. Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress. *Sci. Hort.* 97: 27-39.
- Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses Vol1 Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. New York Academic pp497 2nd ed.
- Lewis, T.S., Hunt, J.B., Aveline, L.D., Lonscher, K.R., Louie, D.F., Yeh, J.M., Nahreini, T.S., Resing, K.A. et Ahn, N.G. 2000. Identification of novel MPA kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Molecular Cell* 6: 1343-1354.
- Lin, C. et Thomashow, M.F. 1992. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *COR15* and characterization of the COR15 polypeptide. *Plant Physiol.* 99: 519-525.
- Livingstone, D.P. III et Henson, C.A. 1998. Apoplastic sugars fructans, fructan exohydrolase and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiol.* 16: 403-408.
- Liu, J.J.L., Krenz, D.C., Galvez, A.F. et de Lumen, B.O. 1998. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Sci.* 134: 11-20.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H. et Miura, S. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Liu, Y.L. et Steponkus, P.L. 1983. Influence of proline on the tolerance of isolated protoplasts to osmotically induced contraction/expansion. *Plant Physiol.* 72: 93.
- Lopez-Matas, M-A., Nunez, P., Soto, A., Allona, I., Casado, R., Collada, C., Guevara, M-A., Aragorçilla, C. et Gomez, L. 2004. Protein cryoprotective activity of a cytosolic small heat shock protein that accumulates constitutively in chestnut stems and is up-regulated by low and high temperatures. *Plant Physiol.* 134: 1708-1717.
- Majoul, T., Chahed, K., Zamiti, E., Ouelhazi, L. et Ghrir, R. 2000. Analysis by two dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. *Electrophoresis* 21: 2562-2565.

- Maltman, D.J., Simon, W.J., Wheeler, C.H., Dunn, M.J., Wait, R. et Slabas, A.R. 2002. Proteomic analysis of the endoplasmic reticulum from developing and germinating seed of castor (*Ricinus communis*). *Electrophoresis* 23: 626-639.
- Marquès, K., Sarazin, B., Chané-Favre, L., Zivy, M. et Thiellement, H. 2001. Comparative proteomics to establish genetic relationships in the Brassicaceae family. *Proteomics* 1: 1457-1462.
- Mathesius, U., Imin, N., Chen, H., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Natera, S.H.A., Morris, A.C., Kerim, T., Paul, S., Merzel, C., Weiller, G.F. et Rolfe, B.G. 2002. Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2: 1288-1303.
- Matysik, J., Bhalu, A.B. et Mohanty, P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Cur. Sci.* 82: 525-532.
- Mazur, P. 1969. Freezing injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20: 419-448.
- Mazur, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J. Gen. Physiol.* 47: 347-369.
- McKown, R., Kuroki, G. et Warren, G. 1996. Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *J. Exp. Bot.* 47: 1919-1925.
- Medina, J., Bargues, M., Térol, J., Pérez-Alonso, M. et Salinas, J. 1999. The *Arabidopsis* *CBF* gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.* 119: 463-465.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giegé, P. et Leaver, C.J. 2001. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127: 1711-1727.
- Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yang, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W. et Buhler, D.R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* 37: 271-285.
- Molloy, M.P., Brzezinski, E.E., Hang, J., McDowell, M.T. et VanBogelen, R.A. 2003. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics* 3: 1912-1919.
- Monroy, A.F., Sangwan, V. et Dhindsa, R.S. 1998. Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant J.* 13: 653-660.

- 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.
- Monroy, A.F., Sarhan, F., et Dhindsa, R.S. 1993. Cold induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression. Evidence for a role of calcium. *Plant Physiol.* 102: 1227-1235.
- Morris, A.C. et Djordjevic, M.A. 2001. Proteome analysis of cultivar-specific interactions between *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup. 2001. *Electrophoresis* 22: 586-598.
- Murata, N. et Los, D.A. 1997. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.* 115: 875-879.
- Naidu, B.P., Paleg, L.G., Aspinall, D., Jennings, A.C. et Jones, G.P. 1991. Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry* 30: 407-409.
- Ndimba, B.I.C., Chivasa, S., Hamilton, J.M., Simon, W.J. et Slabas, A.R. 2003. Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* 3: 1047-1059.
- Ndong, C., Danyluk, J., Wilson, K.E., Pocock, T., Huner, N.P. et Sarhan, F. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.* 129: 1368-1381.
- Nelson, D.E., Rammesmayr, G. et Bohnert, H. 1998. Regulation of cell specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *Plant Cell* 10: 753-764.
- Nishihara, J.C. et Champion, K.M. 2002. Quantitative evaluation of proteins in one-and-two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* 23: 2203-2215.
- Nogueira, F.T.S, De Rosa, V.E.J, Menossi, M., Ulian, E.C. et Arruda, P. 2003. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol.* 132: 1811-1824.
- Nordin, K., Heino, P. et Palva, E.T. 1991. Separate signal pathways regulate the expression of a low-temperature-induced gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynt. *Plant Mol. Biol.* 16: 1061-1071.
- Orvar, 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. *Plant J.* 23: 785-794.

- Peck, S.C., Nütise, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F. et Boller, T. 2001. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* 13: 1467-1475.
- Peltier, J.B., Friso, G., Kalsme, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. et van Wijk, K.L. 2000. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12: 319-341.
- Pennycooke, J.C., Jones, M.L. et Stushnoff, C. 2003. Down-regulating α -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiol.* 133: 901-909.
- Peterbauer, T., Lahuta, L.B., Blochl, A., Mucha, J., Jones, D.A., Hedley, C.L., Gorecki, R.J. et Richter A. 2001. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. *Plant Physiol.* 127: 1764-1772.
- Phadke, N.D., Molloy, N.P., Steinhoff, S.A., Ulintz, P.J., Andrews, P.C. et Maddock, J.R. 2001. Analysis of the outer membrane proteome of *Caulobacter crescentus* by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 1: 705-720.
- Pihakashi-Maunsbach, K., Griffith, M., Antikienen, M. et Maunsbach, A.B. 1996. Immunogold localization of glucanase-like antifreeze protein in cold acclimated winter rye. *Protoplasma* 191: 115-125.
- Plomion, C., Pionneau, C., Brach, J., Costa, P. et Bailleres, H. 2000. Compression wood responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* ait.). *Plant Physiol.* 123: 959-969.
- Polisensky, D.H. et Braam, J. 1996. Cold shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiol.* 111: 1271-1279.
- Porubleva, L., Vander Velden, K., Kothari, S., Olivier, D.J. et Chitnis, P.R. 2001. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22: 1724-1738.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. et Stewart, C.R. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74.
- Provar, N.J., Gil, P., Chen, W., Han, B., Chang, H.S., Wang, X. et Zhu, T. 2003. Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol.* 132: 893-906.
- Pudney, P.D., Buckley, S.L., Sidebottom, C.M., Twigg, S.N., Sevilla, M.P., Holt, C.B., Rosper, D., Telford, J.H., McArthur, A.J. et Lillford, P.J. 2003. The physico-chemical

characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). Arch. Biochem. Biophys. 15: 238-245.

- Rajashekar, C.B., Zhou, H., Marcum, K.B. et Prakash, O. 1999. Glycine betaine accumulation and induction of cold tolerance in strawberry plants. Plant Sci. 148: 175-183.
- Rinne, P.L.H., Kaikuranta, P.L.M., van der Plas, L.H.W. et van der Schoot, C. 1999. Dehydrins in cold acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration. Planta 209: 377-388.
- Rinne, P.L.H., Welling, A., et Kaikuranta, P. 1998. Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in ABA-deficient genotype. Plant Cell Env. 21: 601-611.
- Ristic, Z. et Cass, D.D. 1993. Dehydration avoidance and damage to the plasma and thylakoid membranes in lines of maize differing in endogenous levels of abscisic acid. J. Plant Physiol. 142: 759-764.
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R. et Allen, R.D. 1997. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nat. Biotechnol. 15: 988-991.
- Salekdeh, Gh. H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B. et Bennett, J. 2002. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. Proteomics 2: 1131-1145.
- Samala, S., Yan, J. et Baird, V. 1998. Changes in poplar lipid fatty acid composition during cold acclimation in Mildron and U3 Bermudagrass. Crop Sci. 38: 188-195.
- Sanchez, F.J., Manzanares, M., de Andres, E.F., Tenorio, J.L. et Ayerbe, L. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crops Res. 59: 225-235.
- Sarry, J-E., Sommerer, N., Sauvage, F-X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G. et Romieu, C. 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. Proteomics 4: 201-215.
- Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Garin, J. et Joyard, J. 1999. Differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. Plant J. 19: 217-228.
- Sharkey, T.D., Stitt, M., Heineke, D., Gerhardt, R., Raschke, K. et Heldt, H.W., 1986. Limitation of photosynthesis by carbon metabolism. II. O₂-insensitive CO₂ uptake results from limitations of triose phosphate utilization. Plant Physiol. 81: 1123-1129.

- Shen, Y.G., Zhang, W.K., He, S.J., Zhang, J.S., Liu, Q. et Chen S.Y. 2003. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theor. Appl. Genet.* 106: 923-930.
- Sieg, F., Schröder, W., Schmitt, J.M. et Hinch, D.K. 1996. Purification and characterization of a cryoprotective protein (cryoprotectin) from the leaves of cold-acclimated cabbage. *Plant Physiol.* 111: 215-221.
- Skylas, D.J., Copeland, L., Rathmell, W.G. et Weigley, C.W. 2001. The wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identification. *Proteomics* 1: 1542-1546.
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* 78: 661-669.
- Sokal, R.R. et Michener, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
- Sprenger, N. et Keller, F. 2000. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: the role of two distinct galactinol synthase. *Plant J.* 21: 249-258.
- Steinberg, T.H., Haugland, R.P. et Singer, V.L. 1996. Applications of SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains. *Anal. Biochem.* 239: 238-245.
- Steponkus, P.L., Uemera, M., Joseph, R.A., Gilmour, S.J. et Thomashow, M.F. 1998. Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 95: 14570-14575.
- Steponkus, P.L., Uemera, M. et Webb, M.S. 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. In *Advances in Low-Temperature Biology*, ed PL Steponkus, London : JAI Press, pp 211-312.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 35: 543-584.
- 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 C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardestrom, P. et Stitt, M., 1999. Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol.* 119: 1387-1397.

- 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. *Plant J.* 12: 605-614.
- Strauss, G. et Hauser, H. 1986. Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2422-2426.
- Tahtiharju, S., Sangwan, V., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S. et Borg, M. 1997. The induction of *kin* genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta* 203: 442-447.
- Taji, T., Ohsumi, C., Luchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kabayashi, 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*. *Plant J.* 29: 417-426.
- Takumi, S., Koike, A., Nakata, M., Kume, S., Ohno, R. et Nakamura, C. 2003. Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) cor genes *WCOR15* encoding a chloroplast-targeted protein. *J. Exp. Bot.* 54: 2265-2274.
- Thomas, H. et James, A.R. 1993. Freezing tolerance and solute changes in contrasting genotypes of *Lolium perenne* L. acclimated to cold and drought. *Ann. Bot.* 72: 249-254.
- Thomashow, M.F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Genet.* 28: 99-131.
- Tjus, S.E., Möller, B.L. et Scheller, H.V. 1998. Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiol.* 116: 755-764.
- Touzet, P., Morin, C., Damerval, C., Le Guilloux, M., Zivy, M. et de Vienne, D. 1995. Characterizing allelic proteins for genome mapping in maize. *Electrophoresis* 16: 1289-1294.
- 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. *Plant Physiol.* 131: 1800-1807.
- Uemura, M. et Steponkus, P.L. 1997. Effect of cold acclimation on membrane lipid composition and freeze-induced membrane destabilization. *Plant Cold Hardiness. Molecular Biology, Biochemistry and Physiology.* New York: Plenum, pp 171-179.
- Uemura, M., Joseph, R.A. et Steponkus, P.L. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect of plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions. *Plant Physiol.* 109: 15-30.

- Uemura, M. et Steponkus, P.L. 1994. A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol.* 104: 479-496.
- Uemura, M. et Yoshida, S. 1984. Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale L.* cv Puma). *Plant Physiol.* 75: 818-826.
- Velitchkova, M., Popova, A. et Markova, T. 2001. Effect of membrane fluidity on photoinhibition of isolated thylakoids membranes at room and low temperature. *Z. Naturforsch.* 56c: 369-374.
- Voss, T. et Haberl, P. 2000. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis* 21: 3345-3350.
- Wanner, L.A. et Junttila, O. 1999. Cold induced freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120: 391-399.
- Warren, G., McKown, R., Marin, A. et Teutonico, R. 1996. Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 111: 1011-1019.
- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. et Humphery-Smith, I. 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16: 1090-1094.
- Welbaum, G.E., Bian, D., Hill, D.R., Grayson, R.L. et Gunatilaka, M.K. 1997. Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. *J. Exp. Bot.* 48:643-654.
- Wilson, K.A., McManus, M.T., Gordon, M.E. et William Jordan, T. 2002. The proteomics of senescence in leaves of white clover, *Trifolium repens* (L.). *Proteomics* 2: 1114-1122.
- Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X-M. et Griffith, M. 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* 105: 600-608.
- Win Jones R.G., Storey, R., Leigh, R.A., Ahmad, N., Pollard, A. 1977. A hypothesis on cytoplasmic osmoregulation. In *Regulation of cell membrane activities in plants* (E. Maerre, O. Cifferi eds.) Elsevier, Amsterdam, pp121-136.
- Winzor, C.L., Winzor, D.J., Paleg, L.G., Jones, G.P. et Naidu, B.P. 1992. Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 102-107.

- Xiao, L. et Koster, K.L. 2001. Dessication tolerance of protoplasts isolated from pea embryos. *J. Exp. Bot.* 52: 2105-2114.
- Xin, Z. et Browse, J. 1998. *eskimo1* mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7799-804.
- Xing, T., Ouellet, T. et Miki, B.L. 2002. Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7: 224-230.
- Xu, C.C., Li, L. et Kuang, T. 2000. Photoprotection in chilling-sensitive and -resistant plants illuminated at a chilling temperature: role of the xanthophyll cycle in the protection against lumen acidification. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 669-675.
- 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. *Plant Cell* 6: 251-264.
- Yoshida, S. 1984. Chemical and biophysical changes in the plasma membrane during cold acclimation of mulberry bark cells (*Morys bombycis* Koidz. Cv Goroji). *Plant Physiol.* 76: 257-265.
- Yu, X-M. et Griffith, M. 1999. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. *Plant Physiol.* 119: 1361-1369.
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D. et Thomashow, M.F. 2003. Cold-induction of *Arabidopsis CBF* genes involves multiple ICE (Inducer of *CBF* expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol.* 133: 910-918.
- Zhang, M.I.N., et Willison, J.H.M. 1992. Electrical impedance analysis in plant tissues: *in vivo* detection of freezing injury. *Can. J. Bot.* 70: 2254-2258.
- Zuo, X. et Speicher, D.W. 2000. Quantitative evaluation of protein recoveries in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 3035-3047.

Annexe 1. Composition des solutions d'extraction des protéinesTampon d'extraction 1 :

Acide trichloroacétique	10%
β -mercaptoéthanol	0,7%
Acétone froid	

Tampon d'extraction 2 :

β -mercaptoéthanol	0,7%
Acétone froid	

Tampon de solubilisation :

Urée	9,5M
Triton X100	2%
K ₂ CO ₃	50mM
DTT	30mM
SDS	1,25%

Annexe 2. Composition des solutions de migration des protéines en 1^{ère} et 2^{ème} dimension

Tampon de réhydratation :

Urée	8M
CHAPS	4%
DTT	20mM
Ampholytes 4-6 : 5-8	(2 : 1, v/v)

Tampon d'équilibration 1 :

SDS	70mM
Glycérol	20%
Urée	6M
Tris-HCl pH 8,8 1,5M	0,375M
Bleu de bromophénol	0,6%
DTT	130mM

Tampon d'équilibration 2 :

SDS	70mM
Glycérol	20%
Urée	6M
Tris HCl pH 8,8 1,5M	0,375M
Bleu de bromophénol	0,6%
Iodoacétamide	135mM

Composition pour deux gels à 11% :

Acrylamide 40%/PDA (73% / 0,8%)	33mL
Tris-HCl pH 8,8 1,5M	22,5mL
H ₂ O	33,15mL
APS 10%	450µL
Temed	45µL

Tampon de migration :

Tris	50mM
Glycine	384mM
SDS	0,1%

Annexe 3. Composition des solutions de la coloration des protéines au nitrate d'argentSolution de fixation :

Ethanol	50%
Acide acétique	12%
Formaldéhyde (37%)	0,1%

Solution de prétraitement :

Thiosulfate de sodium	0,02%
-----------------------	-------

Solution d'imprégnation :

Nitrate d'argent	0,1%
Formaldéhyde (37%)	0,05%

Solution de révélation :

Thiosulfate de sodium	0,004%
Carbonate de sodium	6%
Formaldéhyde (37%)	0,05%