

2m11.2616.2

Université de Montréal

Caractérisation des annexines chez les plantes

par
Ghislain Breton

Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

mai, 1998

©Ghislain Breton, 1998



QH

506

454

1998

V.0 10

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Caractérisation des annexines chez les plantes.

présenté par:

Ghislain Breton

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Le processus d'acclimatation au froid est associé à l'induction de l'expression de plusieurs gènes. Il a été démontré que l'accumulation du produit de certains de ces gènes était corrélée avec la capacité de différents cultivars à développer la tolérance au gel. Les mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de ces gènes sont encore mal connus. Il semble que l'induction de certains de ces gènes est associée à une voie de transmission de signal impliquant le calcium comme messenger secondaire. Le processus qui relie l'influx de calcium à l'induction des gènes n'est pas connu. Des travaux récents indiquent que cette transmission de signal implique plusieurs protéines pouvant être modulée par le calcium et/ou les phospholipides : (protéine kinase C, phospholipase C, kinase dépendante du calcium (CDPK), etc.). Les annexines ont la propriété de lier les phospholipides en présence de calcium mais leurs fonctions exactes restent à déterminer. Dans le but de caractériser leur rôle dans le processus d'acclimatation aux basses températures, nous avons produit un anticorps contre une annexine recombinante: AnnL11 de *Lavatera thuringiaca*. Nos analyses d'immunodétection ont démontré que la famille des annexines végétales est très diversifiée. Nous avons identifié, chez la luzerne, des formes d'annexines qui ne précipitent pas avec la phase lipidique en présence de calcium. La quantité de ces formes ne varient pas au cours de l'acclimatation au froid et n'est pas corrélée avec la capacité de cultivars différents à développer la tolérance au gel. Nous avons aussi démontré que la fraction des protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC) contient des annexines de 34 et 36 kDa chez le blé et de 36 kDa chez la luzerne. Ces formes sont probablement des homologues des annexines identifiées jusqu'à maintenant chez les plantes. Malheureusement, l'irreproductibilité de la précipitation avec les phospholipides en présence de calcium nous a empêché d'étudier l'accumulation de ces formes au cours de l'acclimatation au froid. Par contre, deux polypeptides de 22,5 et 39 kDa ont été immunodéTECTÉS dans la fraction microsomale de blé. Certaines propriétés de p39 indiquent qu'il est un homologue chez le blé des annexines I ou II de mammifère. Les

homologues de ces annexines n'ont jamais été identifiés chez les plantes. Les trois annexines (p39, I et II): a) ont le même poids moléculaire, b) sont toutes présentes entre autre à la membrane plasmique, c) sont régulées par des processus impliquant un influx de calcium intracellulaire et d) ont une liaison aux membranes qui est insensible au chélateur de calcium. Une cinétique courte d'acclimatation au froid a démontré que p39 s'accumulait 22 fois dans la fraction microsomale après un jour d'acclimatation et reste stable par la suite. Il a aussi été démontré que l'augmentation de p39 dans la fraction microsomale n'est pas corrélée avec le niveau de tolérance au gel chez différents cultivars. Ces résultats suggèrent que p39 joue un rôle au niveau de la membrane plasmique. Plusieurs hypothèses basées sur les propriétés des annexines sont présentées. Parmi les plus probables, nous pouvons retenir: a) un rôle dans l'exocytose, et b) un rôle dans la transmission du signal de la basse température. Des études complémentaires seront requises afin d'évaluer lequel de ces rôles est le plus important au cours de l'acquisition de la tolérance au gel.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
I.INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
1.0 Introduction.....	1
2.0 Effets des basses températures.....	1
2.1 Effet du gel.....	2
2.2 Acclimatation au froid et tolérance au gel.....	3
2.2.1 Accumulation de certains sucres et autres osmoprotectants.....	4
2.2.2 Changement de la composition en lipides membranaires.....	5
2.2.3 Modulation de l'exocytose.....	7
2.2.4 Modifications génétiques.....	7
2.3 Perception et transmission du signal relié aux basses températures.....	9
2.3.1 Perception du signal relié aux basses températures.....	9
2.3.2 Transmission du signal relié aux basses températures.....	10
2.3.2.1 Le calcium comme messager secondaire.....	10
2.3.2.2 Phosphorylation/déphosphorylation.....	11
2.3.2.3 Autres protéines susceptibles d'être impliquées dans la transmission de signal reliée aux basses températures.....	14
3.0 Les annexines: des protéines liant les phospholipides de façon dépendante du calcium.....	16
3.1 Définitions et caractéristiques.....	16
3.1.1 Origine du nom.....	16
3.1.2 Structure secondaire.....	17
3.2 Les annexines chez les mammifères.....	18
3.2.1 Structure secondaires et tertiaires.....	18
3.2.2 Localisation tissulaire et cellulaire.....	18
3.2.3 Expression génétique des annexines.....	18
3.2.4 Hypothèses de fonction.....	19
3.2.4.1 Activité de canal ionique	19
3.2.4.2 Rôle dans le transport des vésicules (exocytose/endocytose).....	20
3.2.4.3 Inflammation, coagulation et apoptose.....	22
3.2.4.4 Rôle dans la voie de transmission des signaux mitogéniques.....	23

3.3 Les annexines chez les plantes.....	24
3.3.1 Purification et identification des annexines.....	24
3.3.2 Isolation des gènes d'annexine.....	29
3.3.3 Régulation génétique.....	33
3.3.4 Études de fonction des annexines purifiées.....	35
4.0 Problématique.....	40
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	
1.0 Plantes, croissance et traitements spéciaux.....	42
2.0 Identification d'un clone d'annexine de <i>Lavatera thuringiaca</i>	43
3.0 Analyses de type northern.....	43
3.1 Culture des bactéries et purification des plasmides contenant AnnLt1.....	43
3.2 Digestion et isolation de l'ADNc de <i>AnnLt1</i>	44
3.3 Marquage d'AnnLt1.....	45
3.4 Extraction de l'ARN.....	45
3.5 Électrophorèse des ARNs.....	46
3.6 Transfert des ARNs et hybridation avec la sonde marquée.....	46
4.0 Criblage de banques d'ADNc.....	47
4.1 Criblage d'une banque d'ADNc de blé acclimaté avec l'ADNc d' <i>AnnLt1</i>	47
4.1.1 Étalement de la banque d'ADNc.....	47
4.1.2 Criblage.....	48
4.2 Criblage d'une banque d'ADNc de blé acclimaté avec des oligonucléotides dégénérés de séquences peptidique d'annexine de plante.....	48
4.2.1 Construction des oligonucléotides dégénérés.....	48
4.2.2 Étalement de la banque et préhybridation.....	48
4.2.3 Marquage ds oligonucléotides et hybridation.....	49
4.3 Criblage d'une banque d'ADNc de blé non-acclimaté avec l'anticorps anti-AnnLt1 recombinante.....	50
5.0 Production de la protéine recombinante.....	50
5.1 Sous-clonage de l'ADNc de <i>AnnLt1</i> dans pTrcHis A.....	50
5.2 Production de la protéine recombinante AnnLt1-His.....	53
5.3 Purification sur colonne d'affinité de la protéine AnnLt1-His.....	53
5.4 Purification de la protéine par SDS-PAGE et électroélution.....	54
6.0 Production et purification des anticorps.....	54
6.1 Production de l'anticorps polyclonal.....	54
6.2 Purification de l'anticorps par colonne d'affinité.....	54
7.0 Extraction des protéines.....	55
7.1 Extraction des protéines solubles.....	55
7.2 Extraction des protéines totales.....	55
7.3 Extraction des protéines liant les phospholipides en présence de calcium.....	56
7.4 Extraction des protéines de la fraction microsomale.....	56
7.5 Extraction et purification de membranes plasmiques.....	57

8.0 Tests de protection à la protéinase K.....	58
9.0 Immunodétection de AnnLt1.....	58
III. RÉSULTATS.....	60
1.0 Analyses de northern.....	60
2.0 Criblage avec l'ADNc de <i>AnnLt1</i> et les oligonucléotides dégénérés.....	60
3.0 Production des anticorps polyclonaux anti-AnnLt1 recombinante.....	61
4.0 Criblage avec les anticorps polyclonaux.....	65
5.0 Études des protéines reconnues par l'anticorps anti-AnnLt1 recombinante.....	66
5.1 Chez la luzerne.....	66
5.1.1 Localisation tissulaire des polypeptides détectés dans les fractions solubles par l'anticorps anti-AnnLt1.....	66
5.1.2 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des protéines reconnues par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions solubles de collet.....	69
5.1.3 Effets de la composition du tampon sur la quantité de polypeptides immunodétectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction soluble de collet.....	74
5.1.4 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions des protéines liant les phospholipides de manière dépendante du calcium au cours de l'acclimatation au froid.....	77
5.2 Chez le blé.....	80
5.2.1 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions totales de feuille.....	80
5.2.2 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions des protéines de feuilles liant les phospholipides de manière dépendante du calcium au cours de l'acclimatation au froid.....	80
5.2.3 Effets de la composition du tampon sur la quantité de polypeptides immunodétectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuilles.....	85
5.2.4 Localisation tissulaire et cellulaire de p39.....	90
5.2.5 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuille lors de l'acclimatation au froid.....	93
IV. DISCUSSION.....	99
1.0 Le doublet p34/p36.....	101
1.1 Formes non-PLPLDC.....	102
1.2 Formes PLPLDC.....	103
2.0 p22,5.....	108
3.0 p50 et le doublet p56/p58 chez la luzerne.....	109
4.0 p39 chez le blé.....	110
4.1 Caractéristiques.....	110
4.2 Homologie avec les annexines I et II de mammifères.....	111
4.3 p39 comme annexine I au cours de l'acclimatation au froid.....	113
4.4 p39 comme annexine II lors de l'acclimatation au froid.....	114

V. CONCLUSION.....116
VI. BIBLIOGRAPHIE.....118
VII. ANNEXES.....134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Annexines purifiées chez les plantes.....	28
Tableau II. Annexines clonées chez les végétaux.....	31
Tableau III. Liaison aux lipides des annexines de plantes	37
Tableau IV. Polypeptides immunodéTECTÉS avec l'anticorps anti-AnnLt1.....	101
Tableau V. Résumé des annexines caractérisées chez les végétaux.....	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma représentant le sous-clonage de <i>AnnLt1</i> dans pTrcHis A	52
Figure 2. Expression et purification de la protéine recombinante AnnLt1-His dans <i>E. coli</i>	63
Figure 3. Localisation tissulaire des protéines détectées chez la luzerne avec l'anticorps anti-AnnLt1.....	67
Figure 4. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez la luzerne.....	70
Figure 5. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid avec des cultivars de luzerne de tolérance variée.....	72
Figure 6. Effet de la composition du tampon d'extraction sur la quantité de protéines immunodétectées avec l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction soluble de collet de luzerne.....	75
Figure 7. Enrichissement en protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC) chez la luzerne.....	78
Figure 8. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez le blé.....	81
Figure 9. Enrichissement en protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC) chez le blé.....	83
Figure 10. Effet de la composition du tampon d'extraction sur la quantité de protéines immunodétectées avec l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuilles de blé.....	86
Figure 11. Digestion à la protéinase K d'extrait de protéines de fractions microsomales de blé.....	88
Figure 12. Localisation tissulaire des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 chez le blé.....	91
Figure 13. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez le blé.....	95

Figure 14. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez des cultivars de blé de tolérance variée.....97

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur, le Dr. Fathey Sarhan, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour son humanisme, sa confiance et son dynamisme et pour de multiples discussions scientifiques qui m'ont donné le goût de la recherche.

L'ensemble des savants qui m'entourait, pour leurs compétences et leur soif de savoir: le Dr. Alejandro Vazquez-Tello, le Dr. Mario Houde, le Dr. François Ouellet, le Dr. Jean Danyluk et le Dr. Normand Chevrier.

Mes collègues de laboratoire, pour leur présence dans les bons et les moins bons moments: Louis-Pierre Chauvin, Eric Carpentier, Sylvain Dallaire, Goerges Delisle, Christian N'Dong, André Perron, Souad Azelmat, Stéphanie Durand, France Allard, Daniel N'Dong, Amina Zoubeidi, Catherine Gaucher, Charles Bilodeau, Christian Breton et Nathalie Gladu.

L'équipe de Louis Vézina à la station de recherche d'Agriculture Canada à Ste-Foy, pour m'avoir initié à la physiologie et à la biologie moléculaire végétales et pour les séjours très agréables passés en leur compagnie: Louis-Vézina, Jean-Marc Ferullo, Jean Langlois, Jimmy Rail, Serge Laberge et Lucien Pelletier.

Mes coloc et amis, pour m'avoir supporté, encouragé et aidé à rendre bien agréable tout ce qui entoure les études: Mario Chabot, Dominique Robert, Eric Labonté, Claudine Brunette, André Lauzon et Pierre-Jean l'Heureux.

Ma famille, pour leurs visites, leurs encouragements et leur compréhension (ce n'est pas parce que je ne vous visite pas souvent que je ne m'ennuie pas de vous): Michel Breton, Monique Breton, Eric Breton, Remi Breton et Julie Boulanger.

Enfin je remercie ma copine, Catherine Denicourt, pour avoir supporté mes stress périodiques et mes rages de boulot, pour avoir apporté un peu de douceur et de joie de vivre à mes jours et mes nuits d'apprentis chercheur.

I. INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

1.0 Introduction

Il y a plusieurs décennies que les cultivateurs et les généticiens tentent d'améliorer la tolérance au gel des espèces fourragères et des graminées d'importance économique en utilisant l'approche classique. Ceci, afin de diminuer les pertes causées par le gel et d'augmenter les rendements. L'amélioration des espèces par les méthodes de sélection classiques implique des croisements avec des espèces ou variétés possédant les caractéristiques recherchées. Cependant ces méthodes requièrent beaucoup de ressources, de temps et des espèces ayant des pools génétiques très variés. Toutefois, les barrières intergénériques et l'épuisement des pools génétiques ont rapidement montré les limites de cette technique. Récemment, différentes alternatives ont été proposées (Bartels et Nelson, 1994; Henry et Ronalds, 1994 et Vasil, 1994). La transformation des espèces végétales par manipulation génétique permet de franchir les barrières sexuelles et de transférer, chez une espèce sensible, des gènes impliqués dans l'acquisition de la tolérance au gel.

Les études physiologiques et biochimiques ont démontrées que les basses températures occasionnent d'innombrables changements chez les plantes (Guy, 1990; Lyons, 1973; Weiser, 1970; Mazur, 1969; Levitt, 1956; Siminovitch et Briggs, 1949; Harvey, 1935; et Wiegand, 1906). Afin d'établir une stratégie de transformation valable, il faut avoir un vue d'ensemble de la complexité de ces changements.

2.0 Effets des basses températures

Comme première distinction, on doit séparer les stress aux basses températures en deux catégories: le stress au froid et au gel. Le stress au froid survient lorsque les températures se situent entre 0 et 10°C tandis que le gel survient lorsque les températures

stress hydriques, thermiques et mécaniques tandis que les plantes sensibles meurent (Burke *et al.*, 1976).

La plupart des plantes qui passent l'hiver au froid, comme certaines graminées, ont développé des mécanismes de résistance aux stress causés par le gel. Ces mécanismes sont inductibles et disparaissent lorsqu'ils ne sont plus nécessaires. C'est au cours de l'automne, lorsque les températures sont encore au dessus de 0°C, que l'ensemble des mécanismes de résistance débute: c'est le processus d'acclimatation au froid.

2.2 Acclimatation au froid et tolérance au gel

L'acclimatation ou l'endurcissement au froid est le processus par lequel les plantes bisannuelles et vivaces tolérantes acquièrent une tolérance au gel leur permettant de survivre aux conditions rigoureuses de l'hiver. Guy (1990) propose deux phases à l'acclimatation. Premièrement, une phase d'ajustements métaboliques des fonctions cellulaires de base se produit et sert à ajuster la plante aux contraintes biophysiques des basses températures qui permet la tolérance au froid. La deuxième phase est l'induction des mécanismes menant à la tolérance au gel. Il n'est pas encore connu si les deux phases de l'acclimatation sont nécessaires au développement de la tolérance au gel.

Des changements physiologiques, biochimiques et moléculaires sont associés à l'acclimatation au froid et au développement de la tolérance au gel chez les espèces tolérantes. Parmi ces changements: l'accumulation de sucres, d'acides organiques et de polyamines, l'augmentation du transport vésiculaire et plusieurs changements survenant à la membrane plasmique. Il y a aussi production de nouvelles protéines donc induction de nouveaux gènes qui sont parfois spécifiques aux basses températures. Toutes ces modifications sont considérées comme faisant partie du processus d'acclimatation qui mène à la tolérance au gel (Guy, 1990).

2.2.1 Accumulation de certains sucres et autres osmoprotectants

À basse température, l'activité de certaines enzymes est augmentée dans le but de réguler le métabolisme de la cellule pour l'aider à résister aux contraintes biophysiques associées aux basses températures. Ainsi, la cellule synthétise des métabolites qui lui permettront de résister au gel (Guy, 1990).

En effet, Perras et Sarhan (1984) ont démontré que durant l'acclimatation au froid, les contenus en sucres solubles et réducteurs étaient plus élevés chez le blé tolérant que chez le blé sensible. L'accumulation de sucres, qui sont des composés énergétiques, démontre que le blé tolérant possède un statut énergétique plus élevé que son homologue sensible. D'autres recherches récentes montrent que chez les plants de blé exposés au froid, les niveaux de glucose, fructose et sucrose sont plus élevés chez les cultivars tolérants au gel (Savitch *et al.*, 1997). Chez la luzerne, l'augmentation de l'activité de la sucrose phosphate synthase et de la galactinol synthase est corrélée avec le taux de sucrose, de raffinose et de stachyose et avec le degré de tolérance au gel des différents cultivars étudiés (Castonguay et Guckert, 1996; Nadeau et Castonguay, 1997).

Salerno et Pontis (1989) ont également démontré une augmentation de l'activité de la sucrose phosphate synthase chez *Chlorella vulgaris* après un traitement aux basses températures qui résultait en une hausse de sucrose de 10 fois. De plus, Dorffling *et al.* (1993) ont démontré que des lignées de blé possédant un contenu plus élevé en proline étaient plus tolérantes au gel.

Selon Cadieux *et al.* (1988), l'augmentation en sucres participe à l'augmentation de l'osmolarité intracellulaire, ce qui abaisse le point de congélation et protège ainsi la cellule contre le gel intracellulaire. Steponkus (1984) propose aussi que les sucres ont un effet direct sur la protection de la membrane. Des sucres réducteurs, comme le tréhalose,

descendent sous zéro. Le degré de tolérance au froid et au gel est très variable chez les plantes. Il y a des plantes sensibles au froid et au gel comme le maïs; il y a des plantes tolérantes au froid mais sensibles au gel et il y a des plantes tolérantes au froid et au gel comme plusieurs graminées et les arbres. Certaines plantes peuvent acquérir un degré de tolérance supérieure au froid ou au gel après une certaine période d'acclimatation à des températures légèrement au dessus du point critique de sensibilité. Par exemple, le blé d'hiver tolère des températures de -5°C mais peut survivre à -18°C après une courte période d'acclimatation à 4°C (Sarhan *et al.*, 1997). Le maïs quant à lui est une espèce sensible au froid mais il peut devenir tolérant après un traitement de quelques jours à 14°C mais il lui est impossible de devenir tolérant au gel (Prasad *et al.*, 1994). Les espèces végétales qui sont le sujet de nos recherches font parties de la catégorie des plantes tolérantes au froid et au gel ayant la capacité s'acclimater.

2.1 Effet du gel

Le gel est dommageable car il occasionne entre autre la formation de cristaux de glace, dans le milieu extracellulaire. Ceci mène à une augmentation rapide de la concentration des solutés dans le cytosol car le volume d'eau en phase liquide diminue. Il arrive rarement que les cristaux de glace se forment en premier à l'intérieur de la cellule car l'eau intracellulaire a un point de congélation plus bas que l'eau extracellulaire et la quantité d'eau osmotiquement disponible à l'intérieur des cellules est minime comparativement à la quantité d'eau à l'extérieur (Guy, 1990). L'augmentation de la concentration des solutés résulte en une diminution rapide de la pression de vapeur de la phase liquide. Lors d'une diminution lente de la température, la pression de vapeur de la glace diminue plus vite que celle de l'eau liquide, ce qui mène à la formation d'un gradient de potentiel qui déplace l'eau liquide dans le sens du gradient. Par osmose, ce gradient pousse l'eau liquide à sortir hors de la cellule vers les cristaux de glace. On observe alors une déshydratation du protoplasme et un affaissement de la membrane plasmique. Les plantes tolérantes ou ayant acquis la tolérance au gel survivent à ces

préviendraient la fusion des membranes induites par la déshydratation en agissant comme un stabilisateur.

Dans son excellente revue de littérature, Guy (1990) recense plusieurs cryoprotectants connus: les disaccharides, les trisaccharides, les polyols, les sorbitols, la glycinebétaine, la proline et les polyamines. Il propose que ces cryoprotecteurs protégeraient les protéines en ordonnant l'eau à leur proximité lors de la déshydratation observée au cours de la période de gel. Ils accompliraient ce phénomène en diminuant le nombre d'interactions protéines-solvant de façon à ce que l'association des sous-unités et la conformation native des protéines soient maintenues dans un milieu de faible potentiel hydrique. Il ajoute que d'autres de ces composés pourraient stabiliser la membrane en faisant des interactions avec les groupements polaires des phospholipides ou en formant des interactions hydrophobes avec la membrane.

2.2.2 Changements de la composition en lipides membranaires

Lyons (1973) et Raison (1973) sont les premiers à proposer qu'une transition de phase thermotropique des lipides membranaires puisse jouer un rôle dans la sensibilité des plantes au froid. Taiz et Zeiger (1991) expliquent qu'une augmentation du nombre de lipides insaturés augmenterait la fluidité des membranes en diminuant la température de semicristallisation. Les données accumulées depuis ce temps démontrent que la membrane plasmique est le plus important site de changements structuraux au cours de l'acclimatation au froid.

C'est en 1985 que Roughan fait pour la première fois un lien entre la composition lipidique de la membrane et le degré de tolérance au gel chez les végétaux. Il a démontré que la composition en phosphatidylglycérols (PG) de 74 espèces de plantes montre une corrélation positive entre le taux d'insaturation (saturé vs trans-mono-insaturé) et la sensibilité au froid. Ces données ne démontrent pas une augmentation du degré

d'insaturation lors de l'acclimatation mais permet simplement une corrélation avec la sensibilité au froid de différentes espèces.

L'amélioration récente des techniques de purification de membranes plasmiques par fractionnement en deux phases a permis la réalisation d'études plus spécifiques. Cette technique a permis d'observer un changement de la composition en lipide durant l'acclimatation du seigle (Lynch et Steponkus, 1987 et Uemura et Yoshida, 1984). Ces changements comprennent une augmentation du taux d'insaturation des phospholipides et des stérols et une diminution du taux de cérébroside. Il est à noter que ces changements sont peut être une cause de la baisse de température et n'aident en rien la plante à tolérer le gel (Singh et Laroche, 1988). Une évidence plus convaincante a été amenée par Steponkus *et al.* en 1988. Ils ont réussi à fusionner des protoplastes de seigle avec des liposomes de différentes espèces de phosphatidylcholines (PC). Le résultat des fusions a démontré qu'une augmentation en lipides mono- et di-insaturés permettait d'imiter le comportement des protoplastes acclimatés.

La surexpression d'un gène codant pour une ω -3 désaturase chez le tabac a permis d'augmenter les niveaux en acides gras poly-insaturés et ces plants transgéniques ont démontré une résistance accrue au froid (Kodama *et al.*, 1994).

Selon Nishida et Murata (1996), le poids des évidences indique que l'insaturation des lipides membranaires est corrélée avec la sensibilité au froid chez les plantes. Les insaturations protégeraient apparemment le complexe du photosystème II de la photoinhibition en accélérant la récupération du complexe en état photoinhibé.

Selon Hughes et Dunn (1996), malgré la corrélation positive entre l'insaturation des lipides et la tolérance au gel, aucune évidence directe n'est encore disponible. De plus, elles ajoutent qu'il est surprenant qu'aucun des gènes régulés par le froid chez différentes espèces ne soient impliqués dans la biosynthèse des lipides.

2.2.3 Modulation de l'exocytose

Plusieurs études ont démontrées une augmentation du nombre de vésicules membranaires près de la membrane plasmique au cours de l'acclimatation chez des espèces arbustives (Niki et Sakai, 1983; Pomeroy et Siminovitch, 1971 et Srivastava et O'Brien, 1966) des mousses (Singh et al, 1984) et chez l'épicotyle de blé et d'orge (Singh *et al.*, 1984). Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et pourraient être, selon Singh et Laroche (1988), un moyen d'altérer la composition lipidique de la membrane lors de l'endurcissement au froid.

Niki et Sakai (1983) ont démontré que l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide chez le mûrier empêche l'induction du processus d'acclimatation et la formation des vésicules de sécrétion à partir du réticulum endoplasmique. Ils croient que les vésicules pourraient être impliquées dans l'exocytose de nouvelles protéines à la surface de la cellule.

2.2.4 Modifications génétiques

Weiser a proposé en 1970 qu'une activation de nouveaux gènes et qu'une synthèse de nouvelles protéines sont nécessaires à l'acquisition de la tolérance au gel. Plusieurs travaux ont amené Weiser à cette proposition dont ceux de Siminovitch en 1968 qui démontraient une accumulation des protéines en général lors du processus d'endurcissement au froid.

Cependant c'est Sarhan et d'Aoust (1975) qui ont amené les premiers indices qui indiquent que l'acclimatation au froid est probablement associée à l'activation de nouveaux gènes. Ils ont observé un changement de la composition en G+C des ARNs lors de l'acclimatation d'un blé tolérant alors qu'ils n'observaient aucun changement chez le blé sensible. Dix ans plus tard, Guy *et al* (1985) a démontré, par des expériences de

traductions *in vitro*, qu'il y a une altération de l'expression génétique au cours de l'acclimatation au froid chez l'épinard à 5°C. Il a identifié une protéine de bas poids moléculaire associée aux chloroplastes et trois protéines nucléaires qui augmentaient au froid. D'autres données ont confirmé indirectement l'induction de nouveaux gènes lors de l'acclimatation au froid. En effet, il a été démontré qu'il y avait une augmentation de l'activité des ARN polymérase I et II durant l'endurcissement du blé (Sarhan et Chevrier, 1985).

La deuxième hypothèse de Weiser était qu'une synthèse de nouvelles protéines était nécessaire à l'acquisition de la tolérance au gel. Rochat et Therrien (1975) ont montré une accumulation, au cours de l'acclimatation, de deux protéines hydrophiliques chez le blé tolérant qui n'étaient pas synthétisées chez le blé sensible. Plus tard, des études d'analyse électrophorétique en deux dimensions des protéines ont démontré plus finement les changements tant quantitatifs que qualitatifs des patrons de protéines au cours de l'acclimatation (Sarhan et Perras 1987). Ce même type d'études, avec des ARN_m traduits *in vitro*, ont démontré, hors de tout doute, qu'il y avait induction de nouveaux gènes reliée à l'apparition de nouvelles protéines lors de l'acclimatation au froid (Danyluk et Sarhan, 1990, Danyluk *et al.* 1991).

C'est Schaffer et Fischer (1988) qui ont cloné les premiers ADNc induits par les basses températures. Depuis ce temps, plusieurs autres ADNc induits par le froid ont été clonés. Récemment, Ouellet (1997) recense 99 gènes montrant une induction au froid et la plupart n'ont pas de fonction connue.

Une très bonne relation entre l'induction de gènes et l'augmentation de la tolérance au gel est venue des études de Danyluk *et al.* (1994), Houde *et al.* (1992) et de Zhang *et al.* (1993). Ces équipes ont démontré que l'accumulation dans le temps des transcrits des gènes qu'ils avaient isolés était corrélée avec l'augmentation au fil des jours de la capacité à tolérer les basses températures. Ils ont aussi démontré que l'accumulation

des ces transcrits à des temps donnés entre des cultivars de sensibilité au froid variable était corrélée avec leur capacité respective à s'acclimater et à développer la tolérance au gel.

2.3 Perception et transmission du signal relié aux basses températures

Comment les plantes perçoivent-elles les basses températures? Que ce passe-t-il entre la perception du signal et l'induction des phénomènes identifiés dans la section précédente?

2.3.1 Perception du signal relié aux basses températures

Les études faites sur la perception du froid avant 1989 portaient principalement sur l'électrophysiologie de baisse de température (Minorsky, 1989). Il n'y a, à ce moment-là, aucune hypothèse quant à la possibilité d'un quelconque récepteur ou groupes de récepteurs qui seraient reliés au froid. Il y a conscientisation d'une perception du froid par la plante car les gradients de potentiel électriques produits par des baisses de température sont associés à des augmentations proportionnelles de calcium cytosolique.

Des études électrophysiologiques (Minorsky et Spanswick 1989) utilisant un inhibiteur de canaux calciques (le lanthane (La^{3+})) ou un chélateur de calcium (le EGTA) ont démontré l'implication d'un canal calcique dans la perception de la température associée à l'augmentation du gradient de potentiel électrique. En 1993, Ding et Pickard ont proposé la présence, dans la membrane plasmique du bulbe de l'oignon, d'un ou de plusieurs canaux calciques mécanosensibles qui seraient induits par les basses températures. Ces auteurs émettent alors l'hypothèse que ces canaux sont impliqués dans la perception des basses températures menant à l'induction du processus d'acclimatation au froid des plantes tolérantes.

2.3.2 Transmission du signal relié aux basses températures

2.3.2.1 Le calcium comme messenger secondaire

L'entrée d'ions calcium dans la cellule lors de traitements aux basses températures a été démontré hors de tout doute par les recherches de Knight *et al.* (1991). En utilisant un plant de tabac transgénique produisant une protéine cytosolique luminescente sensible au calcium (aequorine), ils ont pu démontré *in vivo* l'augmentation de calcium cytosolique après une baisse de température.

Les premières études concernant l'implication du calcium dans le processus menant à l'acquisition de la tolérance au gel ont été effectuées par Monroy *et al.* (1993). Ils ont utilisé le chélateur de calcium EGTA et les bloqueurs de canaux calciques lanthane et vérapamil avec des cellules en suspension. Ils ont estimé la tolérance au gel en calculant le taux de survie à -8°C après 8 jours d'acclimatation à 4°C en présence de ces produits. L'EGTA inhibe le développement de la tolérance au gel de 70% et les bloqueurs de canaux calciques l'inhibent complètement. Le La³⁺ affecte aussi négativement l'accumulation des transcrits de trois gènes reliés à l'acquisition de la tolérance au gel chez la luzerne reliant ainsi l'induction des gènes à l'entrée de calcium dans la cellule.

Également, en 1995, Monroy et Dhindsa ont mis encore moins de doute dans nos esprits en démontrant que cas15, un gène relié à l'acquisition de la tolérance au gel chez la luzerne, était induit à 25°C par l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule en utilisant l'ionophore A23187. Ce même gène est aussi induit à 25°C par un agoniste des canaux calciques, le Bay K8644.

Dans le même travail, Monroy et Dhindsa ont aussi quantifié l'influx de Ca²⁺ avec du ⁴⁵Ca²⁺. L'influx à 4°C était 15 fois plus important que celui à 25°C. Ils ont aussi

démontré que le besoin de l'influx de calcium pour l'induction des gènes reliés à la tolérance était transitoire car le taux de transcrits diminuait après 24 heures de traitement avec l'ionophore et l'agoniste de canaux calciques. Ils ont proposé qu'il devait y avoir normalement d'autres mécanismes pour maintenir l'expression de ce gène. Ces mécanismes pourraient être, selon eux, d'autres voies de signalisation induites par les basses températures et qui n'impliqueraient pas le calcium. Ces voies pourraient mener à l'inhibition de RNAses ou à l'expression de protéines stabilisants les ARNm.

2.3.2.2 Phosphorylation\déphosphorylation

L'étude de la transmission des signaux chez les végétaux est très récente. Plusieurs recherches chez les animaux et les levures ont démontré que des protéines kinases et phosphatases étaient impliquées dans la signalisation cellulaire. Ces protéines servent à transmettre le signal du messenger secondaire jusqu'au noyau.

Plusieurs kinases dont les transcrits augmentent aux basses températures ont été clonées chez les végétaux. Elles font partie de trois groupes distincts: a) les kinases de la famille CaM (les protéines kinases dépendantes du calcium ou de la calmoduline et celles activées par SNF1/AMP), b) les kinases du groupe des CMGC (incluant les familles CDK, MAPK (kinases activées par des mitogènes), GSK-3 et CKII) et c) les kinases homologues à RSK (kinase S6 du ribosome)(Stone et Walker, 1995; Mizoguchi *et al.*, 1995). Les premières sont régulées chez les mammifères par des messagers secondaires, les secondes sont impliquées plus bas dans les cascades de phosphorylation et les troisièmes sont la cible des MAP kinases chez les cellules animales et phosphorylent des protéines ribosomales afin d'activer la synthèse protéique.

Zocchi *et al.* (1983) ont démontré qu'un traitement aux basses températures provoque la phosphorylation de protéines membranaires spécifiques chez les racines de maïs. Dhindsa et son équipe (Monroy *et al.*, 1993; Monroy et Dhindsa, 1995, Monroy *et*

al., 1997 et Kawczynski et Dhindsa, 1996) ont poursuivi l'étude des phénomènes de phosphorylation\déphosphorylation lors de la transmission de signal des basses températures. Monroy *et al.* (1993) ont identifié une dizaine de polypeptides dont l'état de phosphorylation augmente ou diminue lors de l'exposition de suspension cellulaire de luzerne à 4°C pendant 3 heures. Le bloqueur de canaux calciques La^{3+} inhibe presque tous ces changements de phosphorylation.

Avec le H7, un inhibiteur *in vivo* de protéines kinases dépendantes du calcium, Monroy *et al.* (1993) ont pu établir l'association entre l'accumulation de transcrits de gène reliés à l'acquisition de la tolérance au gel, l'activité kinase dépendante du calcium et l'entrée de calcium lors d'un traitement aux basses températures. Le H7 inhibe de 50% la tolérance au gel de suspension cellulaire acclimatée 8 jours à 4°C et placée à -8°C. L'inhibition de l'accumulation de trois transcrits de gènes reliés à l'acquisition de la tolérance au gel était de 50% avec le H7 suggérant une étroite association entre le niveau d'accumulation de ces transcrits et la tolérance au gel.

En 1995, Monroy et Dhindsa ont amené des indices de la présence de kinases dépendantes du calcium (CDPK) chez la luzerne. Trois transcrits hybridants avec des oligomères de CDPK du soya ont été identifiés et leur niveau varie dans les premières 24 heures de l'acclimatation. Le séquençage partiel de deux de ces transcrits (nommés MSCK1 et MSCK2) a montré une homologie avec des CDPK de plantes. Cette même année, Holappa et Walker-Simmons (1995) ont cloné une kinase de blé du groupe des kinases CaM de la sous-famille SNF1. Le transcrit de cette kinase, nommée PKABA1, augmente après une journée à 2°C et reste stable tout au long du traitement. La protéine recombinante de PKABA1 démontre une faible activité autophosphorylante donnant ainsi la première preuve d'une activité kinase probablement impliquée dans la transmission de la réponse aux basses températures. Très récemment, Berberich et Kusano (1997) ont cloné chez le maïs un gène homologue aux kinases (ZmCDPK1) de la

famille CDPK dont le transcrit augmente dans les feuilles et les racines de plantes traitées à 5°C.

En 1996, Mizoguchi *et al.* ont démontré que les transcrits de deux MAP kinases (ATMPK3 et ATMEKK1) augmente après 1 heure de traitement aux basses températures. Le transcrit d'ATMPK3 code pour une MAP kinase et celui de ATMEKK1 pour une MAP kinase kinase. Jonak *et al.* (1996) ont aussi isolé, par criblage avec une sonde amplifiée par PCR, un clone homologue aux MAP kinases chez la luzerne. La protéine recombinante, nommée MMK4, possède une activité autophosphorylante et peut phosphoryler *in vitro* MBP (la protéine de base de la myéline) et MAP2 (la protéine no 2 associée aux microtubules de bovin). Des mesures d'activité kinase *in vitro* utilisant des extraits de protéines végétales immunoprécipitées avec l'anticorps anti-MMK4 ont démontré que l'activité de cette kinase augmente après 20 minutes à 4°C et atteint un maximum à 60 minutes. Ils ont de plus démontré qu'il y avait une variation dans la mobilité du signal associé à cette kinase après immunodétection de la kinase dans des extraits acclimatés séparés par électrophorèse dénaturante. Ce changement de mobilité concorde avec l'augmentation de l'activité de la kinase et pourrait être due à la présence d'acides aminés phosphorylés sur la kinase. Comme mentionné plus haut, le transcrit de MMK4 augmente à 4°C. Le signal est visible après seulement 20 minutes de traitements et atteint son maximum après 2 heures. Par contre, le signal immunologique relié à la kinase ne varie pas au cours du traitement à 4°C.

C'est en 1995 que Mizoguchi *et al.* ont cloné et caractérisé deux kinases de la famille RSK. Les transcrits de ces deux gènes augmentent après une heure de traitements à 4°C.

Peu d'études ont été faites sur la caractérisation des protéines phosphatases au cours de l'acclimatation au froid. Monroy *et al.* (1997) ont démontré que l'activité phosphatase de suspension cellulaire de luzerne diminue de 90% à 4°C. Ils ont aussi

démontré que la phosphorylation d'une protéine identifiée PP58 n'est pas due à une augmentation d'une activité kinase, mais à la diminution de l'activité phosphatase au du froid, ce qui produit un déséquilibre phosphorylation/ déphosphorylation.

Vazquez-Tello *et al.* (1998) ont aussi relié le processus d'acclimatation au froid et l'activité phosphatase en démontrant que l'acide okadaïque (un inhibiteur des protéines phosphatases PP1 et PP2A) induisait l'expression de la protéine *wcs120* reliée à l'acquisition de la tolérance au gel chez le blé.

Ces mêmes auteurs ont démontré une relation entre les processus de phosphorylation/déphosphorylation et la capacité des facteurs nucléaires à lier le promoteur du gène *wcs120* qui est relié à l'acquisition de la tolérance au gel chez le blé. Ils ont proposé un modèle de régulation négative. En effet, les basses températures réguleraient l'expression du gène *wcs120* via la phosphorylation de répresseurs potentiels, qui se détacheraient des sites d'attachement du promoteur. Cette dérégulation pourrait permettre à la machinerie transcriptionnelle de s'assembler et d'initier la transcription. Ces résultats concordent avec l'observation que l'activité kinase tant indépendante que dépendante du calcium augmente dans le noyau des plantes acclimatées.

2.3.2.3 Autres protéines susceptibles d'être impliquées dans la transmission du signal reliée aux basses températures

Chez la cellule animale et la levure, plusieurs protéines sont impliquées dans les voies de signalisation des phosphoinositides. Cette voie de transmission implique entre autre la phospholipase C et ses produits le DAG (diacylglycérol) et l'IP3 (Inositol triphosphate). Hirayama *et al.* (1995) ont démontré qu'un transcrit de PLC augmente faiblement lors de traitements d'*Arabidopsis* aux basses températures. Quant à eux, Smolenska-Sym et Kacperska (1996) ont observé une augmentation transitoire d'IP3 lors d'une exposition aux basses températures. Cependant, Knight *et al.* (1996) ont démontré

qu'il y a une source de calcium vacuolaire impliquée dans la réponse au froid. Cette source est peut être induite par l'IP3 car un inhibiteur (néomycine) de la voie de synthèse de cette molécule inhibe l'influx de calcium détecté par une aequorine localisée à la vacuole (Knight *et al.* 1996). Thompson (1986) a observé l'activation de phospholipases sensibles au calcium et à la calmoduline chez *Tetrahymena* lors d'un choc hypothermique. Cette observation est peut être aussi relié à l'augmentation d'IP3 au cours du froid.

Monroy *et al* (1993) ont observé que le W7, un antagoniste des calmodulines et autres protéines liant le calcium, inhibe complètement la tolérance au gel des cellules en culture. Cette molécule inhibe aussi presque complètement les phosphorylations observées chez les protéines des cellules traitées autant que non-traitées à 4°C. Plus tard, Monroy et Dhindsa (1995) ont démontré que le transcrite de la calmoduline ne varie pas au cours de l'acclimatation. Pour des stress comme le toucher et le vent, Braam et Davis (1990) ont démontré que le transcrite de calmoduline augmente. Il a été démontré que ces stress impliquaient un influx de Ca^{2+} provenant d'une source intracellulaire (vacuole). Devant cet état de fait, Monroy et Dhindsa (1995) ont proposé que la calmoduline est associée spécifiquement au stress induisant un influx de calcium à partir de la vacuole.

En 1994, Jarillo *et al.* ont cloné deux gènes induit par le froid chez *Arabidopsis thaliana* qui ont une forte homologie avec la famille des protéines 14-3-3. Cette famille de protéine est probablement reliée à la régulation de protéines kinases multifonctionnelles chez les mammifères.

En résumé, le mécanisme de perception et de transmission du signal relié aux basses températures est encore mal connu. Il semble qu'un influx de calcium de source extracellulaire soit impliqué au tout premier moment du stress relié au froid. Plusieurs protéines pouvant jouer un rôle dans la transmission de ce stress ont été identifiées (kinases, phosphatases, PLC, etc.) et plusieurs autres restent à être identifiées. Ainsi,

plusieurs modèles proposent l'implication des annexines dans les processus associés aux ions calcium dans certaines voies de transmission de signal. Les annexines sont une large famille de protéine pouvant fixer les phospholipides en présence de calcium.

3.0 Les Annexines: des protéines liant les phospholipides acides de façon dépendante du calcium

Plusieurs études ont été produites depuis la découverte de la première annexine en 1978 (Creutz *et al.*, 1978). Le nombre de publications les concernant est en hausse exponentielle depuis ce temps. À titre d'exemple, entre 1994 et 1997, la banque de données *Current Contents* recensaient environ 650 articles publiés ayant pour sujet une des 10 annexines majeures. Une trentaine de revues de littérature ont été écrites depuis les dix dernières années dans le but de clarifier cette famille de protéines. Le véritable rôle des annexines, ces protéines liant les phospholipides acides de façon dépendante du calcium, reste encore difficile à cerner étant donné la nature ubiquitaire du calcium ainsi que l'implication de ce dernier dans de nombreux phénomènes cellulaires. Plusieurs laboratoires ont identifié des annexines. Ils travaillent sur la biochimie, la biologie cellulaire et la biologie moléculaire de l'exocytose, des canaux ioniques, de la coagulation, de la réception des signaux mitogéniques et de l'inflammation.

3.1 Définition et caractéristiques

3.1.1 Origine du nom

Au cours de la décennie 1980-1990, plusieurs laboratoires travaillant dans des domaines fort éloignés, ont isolé des protéines liant les phospholipides d'une façon dépendante du calcium. Devant l'observation que ces protéines étaient soit similaires ou soit de structures très rapprochées, Crumpton et Dedman ont proposé en 1990 de les rassembler sous le même nom. Elles ont été nommées annexines car elles ont toutes la

capacité de lier (to annex) les phospholipides en présence de calcium (Geisow *et al.*, 1986). On compte jusqu'à maintenant 27 sous-familles distinctes d'annexines (Morgan et Fernandez, 1997) en rassemblant celles des mammifères, des arthropodes, des nématodes, des échinodermes et des plantes. Il est à noter qu'aucune annexine n'a jusqu'à maintenant été identifiée chez les levures (Smith et Moss, 1994 et Morgan et Fernandez, 1997).

3.1.2 Structure secondaire

Les annexines sont toutes composées de quatre ou huit (Annexine VI) domaines d'environ 70 acides aminés hautement conservés. Chaque domaine contient une région de forte homologie dite *endonexin fold* avec un motif peptidique GXGTDE qui peut être un site de liaison au calcium. Les sites de liaison au calcium des annexines sont différents de ceux du type à main EF (*EF-hand*) de la calmoduline. L'extrémité carboxy-terminale de certaines des annexines semble contenir un site de liaison à l'actine (Jones *et al.*, 1992).

Les annexines se différencient entre elles par une queue amino-terminale de 1 à 160 acides aminés. Cette queue contient les sites de liaison à d'autres protéines et les sites de phosphorylation susceptibles de réguler l'activité spécifique de chacune des annexines. Il est à noter que les annexines ne contiennent aucune région très fortement hydrophobe qui leur permettrait d'être des protéines membranaires intégrales.

Les annexines clonées chez les plantes sont très différentes de celles clonées chez les mammifères car elles ne possèdent pas de queue amino-terminale. Cette particularité implique la possibilité que la ou les fonctions des annexines de plantes soient différentes de celles des annexines de mammifère.

3.2 Les annexines chez les mammifères

3.2.1 Structure secondaires et tertiaires

Les études cristallographiques des annexines V de l'humain et du poulet, de l'annexine VI de l'humain, VII et XII de l'hydre et des formes tronquées (sans queue N-terminale) des annexines I, II et III de l'humain et IV du bovin ont la même topologie (Gerke et Moss, 1997 et Benz et Hofmann, 1997). Chaque domaine de 70 acides aminés, formant cinq hélices α , est disposé de manière à former un pore hydrophile. L'ensemble forme une structure plane et légèrement incurvée avec une face convexe présentant les sites de liaison au calcium qui s'appuie contre la bicouche lipidique et une face concave rapprochant les domaines amino- et carboxy-terminaux (Chasserot-Golaz et Bader, 1997). La position de la queue amino-terminale des différentes annexines n'est pas connue (Gerke et Moss, 1997).

3.2.2 Localisation tissulaire et cellulaire

On retrouve des annexines associées à la membrane plasmique, dans le noyau, en grand nombre dans le cytoplasme, associées aux réticulum endoplasmique et au cytosquelette. On a identifié dix types d'annexines chez les mammifères mais aucune cellule ne produit les dix types simultanément, ce qui laisse croire que chaque cellule à un jeu d'annexines (Gerke et Moss, 1997). Certaines annexines sont spécifiques à certains tissus (l'intestin pour l'annexine XIIIa) ou à certaines localisations cellulaires.

3.2.3 Expression génétique des annexines

La famille des annexines est souvent considérée comme ubiquitaire mais prise individuellement, on retrouve des variations de leur niveau d'expression. Ces patrons

d'expression reflètent sûrement une importance des annexines dans les systèmes où elles sont régulées. Il n'y a encore aucune relation certaine entre l'augmentation des transcrits ou des produits de gènes des annexines et leur fonction.

3.2.4 Hypothèses de fonction

Différentes des protéines possédant un site de liaison au calcium de type à main EF, les annexines ont une faible affinité pour le calcium (K_d 25-1000 μM). Par contre, en présence de phospholipides, l'affinité peut augmentée de 100 fois (Swairjo et Seaton 1994). Cette caractéristique majeure des annexines permet une pléiade d'hypothèses au sujet de leur fonction. Plusieurs de ces hypothèses ont été testées expérimentalement mais aucune n'a été confirmées sans équivoque. Le titre de la plus récente revue de littérature sur les annexines: Annexins: what are they good for? rend bien compte de l'incertitude qui pèse sur la fonction des annexines (Mollenhauer, 1997). Les fonctions proposées sont multiples: une activité de canal ionique, la régulation du transport vésiculaire (exocytose et endocytose), l'inhibition de la coagulation, une implication dans la transmission des signaux mitogéniques et bien d'autres (Raynald et Pollard, 1994). Nous résumerons les principales.

3.2.4.1 Activité de canal ionique

La préférence pour les phospholipides chargées négativement, le caractère dépendant du calcium de la liaison aux membranes et l'hydrophilie de sa structure secondaire suggèrent une interaction de surface des annexines avec la membrane. Malgré cela, en 1987, Rojas et Pollard observent une activité de canal calcique *in vitro* dans des bicouches de phosphatidylserine avec l'annexine VII.

Cette activité a ensuite été démontrée avec les annexines I à VII (Raynald et Pollard, 1994; Berendes *et al.*, 1993; Burger *et al.*, 1996 et Benz et Hofmann, 1997). Les

annexines nécessitent la présence de calcium pour se lier à la membrane. Une fois attachées, elles sont capables de pénétrer et de former un canal qui conduit le calcium (Raynald et Pollard 1994). Cette hypothèse de pénétration des annexines dans la membrane n'est pas généralement acceptée car les annexines cristallographiées avec ou sans membranes ont la même structure. Une autre hypothèse propose que les annexines produisent un fort champ électrostatique avec la membrane. Il a déjà été observé que des champs électriques de cette intensité peuvent provoquer la formation d'un pore membranaire (Neumann, 1988). Demange *et al.* (1994) proposent que la synergie de cet effet électromagnétique, de la présence d'une tryptophane en position 187 qui pénètre la membrane et de l'interaction entre les boucles de fixation au calcium et la tête des phospholipides permet à la membrane d'être localement perméable aux ions. En 1995, Luecke *et al.* ont démontré que l'annexine XII pouvait former un canal anionique sous une forme hexamérique. Pour ce rôle des annexines, le but est maintenant de démontrer qu'elles ont une activité des canaux ioniques dans les cellules vivantes.

3.2.4.2 Rôle dans le transport des vésicules (exocytose/endocytose)

Les vésicules lipidiques ne fusionnent pas spontanément avec les membranes lors de l'exocytose. Il se pourrait que les annexines permettent le rapprochement entre les vésicules et la membrane et favorisent la fusion permettant le relargage du contenu vésiculaire. C'est probablement son association avec les ions calcium qui favorise cette hypothèse car les ions calcium sont vus comme des médiateurs de fusion. Ils permettent de contourner la répulsion électrostatique des membranes entre elles (Raynald et Pollard 1994).

La grande sensibilité de l'hétérotétramère annexine II-p11 pour le calcium fait en sorte que l'annexine II est la plus étudiée des annexines dans son rôle possible au cours de l'exocytose. C'est avec le modèle des cellules de chromaffine perméabilisées que

plusieurs tests ont été effectués (Ali *et al.*, 1989). Il a été remarqué qu'il n'y avait aucune fusion de granule sans acide arachidonique ou autres acides gras cis-insaturés.

Plusieurs groupes ont étudié le rôle de la phosphorylation de l'annexine I et II lors de l'exocytose (Donnelly et Moss, 1997). Un inhibiteur de la protéine kinase C (pkC), le H7, inhibe la phosphorylation de l'annexine I de 90% et diminue significativement la sécrétion de l'insuline (Ohnishi *et al.*, 1995). Les annexines I, II, IV et XII sont des substrats *in vitro* pour la pkC. Cette protéine kinase est spécifique pour les résidus sérine et thréonine et est dépendante du calcium et des phospholipides. Il a été démontré que la phosphorylation *in vitro* des annexines I et II inhibe leur capacité à favoriser l'aggrégation des membranes.

La capacité de l'annexine II à lier l'actine a aussi été reliée à l'exocytose. Des études de microscopie électronique de cellules sécrétrices ont montré que les granules de sécrétion étaient localisés sous les filaments d'actine et qu'elles fusionnent avec la membrane seulement où il n'y avait pas de filament d'actine. Ces observations suggèrent que l'actine doit être dissociée lors de l'exocytose (Senda *et al.*, 1994). La capacité du complexe annexine II/p11 de lier et de produire des faisceaux d'actine a amené l'hypothèse qu'en interagissant avec les protéines du cytosquelette, l'annexine II pourrait faire un passage permettant aux vésicules de se rendre à la membrane pour la fusion (Donnelly et Moss, 1997).

D'autres laboratoires étudiant l'endocytose proposent des rôles pour les annexines I, II et VI. Des extraits soniqués d'annexines II et d'endosomes fusionnent *in vitro* avec d'autres endosomes récepteurs (Gruenberg et Emans 1993). Il a été démontré que l'annexine II était localisée à la membrane plasmique dans des vésicules et aussi à la proximité des endosomes (Emans *et al.* 1993). Quant à Lin et son équipe, ils ont montré que l'absence d'annexine empêche la formation des vésicules de clathrine sur des membranes plasmiques immobilisées et que l'ajout d'annexines VI redonnait en partie

cette capacité. Cette expérience leur a permis d'émettre l'hypothèse que les annexines sont impliquées dans la formation des vésicules de clathrine. La phosphorylation des annexines I lors de l'internalisation des récepteurs du facteur de croissance épidermique permet de croire qu'elles ont un rôle dans un autre processus de l'endocytose, celui de la formation des corps multivésiculaires (Raynald et Pollard, 1994).

3.2.4.3 Inflammation, coagulation et apoptose.

A la fin des années 70, plusieurs laboratoires étudiant l'inflammation en sont arrivés à isoler une protéine nommée à l'époque lipocortine qui est maintenant identifiée comme étant l'annexine I. Cette protéine inhibait la phospholipase A_2 *in vitro*. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des eicosanoïdes au tout début de la réponse inflammatoire. Elle métabolise les phosphatidylsérines (PS) et libère l'acide arachidonique qui est ensuite métabolisé en plusieurs dérivés. Après de nombreux résultats contradictoires, il a été proposé que l'annexine I ne soit pas un inhibiteur spécifique de la PLA_2 mais que la fixation dépendante du calcium des annexines aux phospholipides empêche la plupart des PLA_2 d'accéder à leur substrat, c'est le mécanisme de déplétion du substrat. La plupart des annexines testées (I, II, III, IV, V et VI) (Raynald et Pollard, 1994) ont démontré une activité inhibitrice de PLA_2 *in vitro*. Mira *et al.* (1997) ont démontré récemment l'activité inhibitrice *in vivo* de l'annexine V sur la PLA_2 .

Si le mécanisme de déplétion des substrats est exacte, tout événement cellulaire impliquant des phospholipides acides peut être inhibés par les annexines. L'activité anticoagulante des annexines *in vitro* semble être reliée aussi à leur capacité à lier les phospholipides anioniques en présence de calcium. Les molécules de phosphatidylsérine (PS) sont normalement absentes de la surface extracellulaire de la membrane plasmique des cellules. La cellule dépense de l'énergie pour maintenir sa surface sans PS (Seigneuret et Devaux, 1984). Il a été démontré qu'un changement pathologique induit par des agonistes comme la thrombine et le collagène produisait un changement de

l'asymétrie des PS à la surface des plaquettes sanguines. Des translocases sont inhibées et des scramblases sont activées, ce qui amènent les PS à être exposés à la surface de la cellule. Les PS catalysent ensuite la cascade de réactions de la coagulation (Rosing *et al.*, 1985).

Des travaux récents ont reliés l'apoptose, l'inflammation et la coagulation aux annexines *in vivo*. En 1992, Fadok *et al.* ont démontré que les cellules en apoptose exhibent des molécules de PS à leur surface. Cette exposition de PS servirait aux cellules en apoptose à se faire reconnaître des phagocytes pour être digérées. Il a été démontré que l'annexine V se liait aux cellules ayant enclenché le processus d'apoptose (Koopman *et al.*, 1994) et que cette liaison était dépendante des PS. Il est donc probable que l'annexine V extracellulaire agisse *in vivo* comme un agent, anti-inflammatoire en inhibant l'induction de la réponse inflammatoire par inhibition de la PLA₂ et anticoagulant en masquant les PS résiduels exposés à la surface des cellules en apoptose après leur reconnaissance par les phagocytes (Reutelingsperger et van Heerde, 1997).

3.2.4.4 Rôle dans la voie de transmission des signaux mitogéniques

L'annexine I est le substrat majeur de l'activité kinase du récepteur de croissance épidermique (EGFR) et l'annexine II est le substrat majeur *in vivo* de la tyrosine kinase codé par le gène pp60v-src du virus du sarcome de Rous. Des tests *in vitro* avec les kinases purifiées ont aussi identifiés l'annexine comme un substrat majeur (Raynald et Pollard, 1994 et Gerke et Moss, 1997). Récemment, un groupe a démontré que l'annexine I était un substrat pour la tyrosine kinase associée au récepteur de l'insuline (Biener *et al.*, 1996). Chaque groupe émet ses propres hypothèses quant à la fonction des annexines dans les processus impliquant les récepteurs les phosphorylant et les voies de transmission qui y sont associées.

Futter *et al.* (1993) ont émis l'hypothèse que les annexines soient impliquées dans l'internalisation des récepteurs les phosphorylant. Les récepteurs sont des protéines membranaires qui pénètrent à l'intérieur de la membrane après fixation avec leur ligand. Cette internalisation se fait par endocytose. Il a été démontré que l'annexine I est transloquée à la membrane plasmique durant le repliement de la membrane induit par le facteur de croissance épidermique et qu'une forme de cette annexine était associée à la membrane indépendamment du calcium et seule la forme phosphorylée pouvait être détachée.

3.3 Les annexines chez les plantes

C'est en 1989 que Boustead *et al.* ont identifié pour la première fois chez les plantes une protéine immunologiquement reliée aux annexines animales. La relation a été démontrée avec un anticorps anti-annexine d'anguille. Depuis ce temps, une dizaine de laboratoire ont identifié des annexines et ont essayé de comprendre leur rôle. Ces groupes ont étudié l'exocytose, la transmission de signal, l'activité callose synthase chez le coton, le mûrissement des fruits, la formation de la vacuole, etc. Tous ces sujets de recherche ont en commun d'impliquer des ions calcium.

3.3.1 Purifications et identification des annexines

L'équipe de Bowles ont étudié les protéines impliquées dans la régulation du calcium cytosolique (Smallwood *et al.*, 1996). Leur modèle d'étude est la suspension cellulaire de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Dans le but de caractériser ces protéines, ils ont purifié une fraction enrichie en protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC). Cette fraction contient deux polypeptides majeurs de 33 et 35 kDa. La protéine de 33 kDa est reconnue par l'anticorps anti-annexine de *Torpedo marmorata* et celle de 35 kDa par l'anticorps anti-annexine p68 de bovin (Boustead et al, 1989). L'amélioration de la méthode de purification a permis à la même équipe de

démontrer plus tard que la p33 était plutôt une p35.5 et que la p35 était une p34 car seule la p35.5 réagissait avec l'anticorps de *Torpedo* comme l'ancienne p33 (Smallwood *et al.* 1990). Cette nouvelle méthode de purification a aussi permis d'obtenir des fractions suffisamment pures pour le microséquençage des polypeptides. Les patrons de digestion spécifiques ont permis de différencier les peptides p34 et p35.5. Deux peptides dérivés de p35.5 ont été séquencés ainsi que le fragment le plus abondant de la digestion de p34. Les comparaisons des séquences peptidiques ont montré des similarités substantielles entre p35.5 et p34 et la famille des annexines. Des études ultérieures ont démontré la présence de polypeptides de 34 et 35.5 kDa dans les extraits de PLPLDC de racines, de tiges et de feuilles de plants de tomate de 21 jours (Smallwood *et al.* 1992).

Dans le but d'étudier la voie de sécrétion dépendante du calcium qui est médiée par l'appareil de Golgi, Clark *et al.* (1989, 1990) ont caractérisé une p35 abondante dans une fraction de PLPLDC de plumule de pois (*Pisum sativum*). Le microséquençage de quatre fragments de la p35 a permis de l'associer à la famille des annexines (Clark *et al.*, 1992).

L'équipe de Nicholas Battey est une référence dans la recherche sur les mécanismes régissant la sécrétion vésiculaire lors de l'exocytose chez les plantes (Battey et Blackburn, 1993). Ils ont isolé une fraction de PLPLDC du coléoptile de maïs. Cette fraction contenait plusieurs polypeptides dont deux majeurs de 33 et 35 kDa. L'immunodétection de l'annexine VI du gésier de lapin avec l'anticorps dirigé contre le doublet p33/p35 de maïs a été le premier indice reliant ces polypeptides à la famille des annexines (Blackburn *et al.*, 1991). Les séquences de p35 et de p33 obtenues par microséquençage ont révélé une grande similarité avec les domaines conservés des annexines de mammifère.

C'est en étudiant le rôle de la vacuole dans l'homéostasie du calcium intracellulaire que Stephen Randall a identifié plusieurs polypeptides du tonoplaste de

céleri (*Apium graveolens*) qui pouvaient fixer le calcium (Randall, 1992). En 1994, son équipe a purifié un de ces polypeptides (Seals *et al.*, 1994). Son poids moléculaire étant de 42 kDa, ils l'ont donc nommé VCaB42 pour *Vacuole Calcium Binding protein*. La protéine est présente en grande quantité dans les extraits de protéine tonoplastique lorsque les tonoplastes sont préparés en présence de calcium alors qu'elle était pratiquement absente dans les extraits obtenus avec EGTA. Ils ont utilisé cette propriété pour purifier VCaB42 en lavant l'extrait de tonoplaste avec EGTA. Le microséquençage de trois fragments de VCaB42 a permis d'associer cette protéine à la famille des annexines. Il est à noter qu'un autre fragment, de cinq acides aminés, de l'extrémité amino-terminale a été séquencé et qu'il ne possède aucune homologie avec les annexines connues. Cette annexine végétale est la seule à avoir un poids moléculaire supérieur à celui du doublet d'environ 33/35 kDa. En plus d'être différente des autres annexines végétales, ils ont démontré que VCaB42 n'avait aucune immunogénicité avec les annexines I, II, IV, VI et VIII (Seals *et al.*, 1994).

Lors d'un stress mécanique, il y a synthèse de polymère de callose et de cellulose dans la fibre du coton (*Gossypium hirsutum*). Les enzymes impliquées dans cette synthèse sont la callose et la cellulose synthase. On croit qu'elles sont associées à la membrane plasmique des fibres du coton. Ces enzymes, normalement en latence, ont besoin de calcium et du β -glucoside pour être activées (Delmer et Amor, 1995). En 1993, Andrawis *et al.* ont observé que l'activité de l'enzyme enrichie dans les fractions microsomales est plus élevée si les membranes sont purifiées en présence d'un chélateur de calcium qu'en présence de calcium. Ils s'attendaient à obtenir l'inverse étant donné que le calcium est nécessaire à l'activité de l'enzyme. Ils ont déterminé que le facteur inhibant l'enzyme dans la fraction microsomale extraites en présence de calcium était une protéine de 34 kDa. Le microséquençage d'un fragment de cette protéine a permis de déterminer qu'elle était homologue aux annexines. Ils ont ensuite démontré qu'elle pouvait lier la callose synthase (Andrawis *et al.*, 1993).

En 1995, Hoshino *et al.* ont publié les séquences de deux peptides dérivés d'une protéine isolée du poivron (*Capsicum annum*) au stade vert de mûrissement. Cette protéine est associée à la fraction microsomale de manière dépendante du calcium. La protéine de 35 kDa nommé p35 a été identifiée comme étant une annexine.

Très récemment, Thonat *et al.* (1997) ont isolé des protéines d'une fraction de PLPLDC des entre-nœuds de *Bryonia dioica*. Deux protéines de cet extrait (p33 et p35) ont été identifiées comme étant des annexines d'après leur immunogénicité avec l'anticorps produit contre le doublet d'annexine p33/p35 de maïs. Cette équipe de recherche étudie la thigmomorphogénèse, c'est-à-dire le processus qui fait qu'après un pincement de l'entre-nœud, celui-ci réduit son élongation et augmente son expansion radiale. Dans des études d'immunofluorescence avec un anticorps anti-annexine, ils ont observé que seulement trois minutes après le stress mécanique, la fluorescence se retrouvait uniquement à la périphérie de la cellule. Ces observations permettent de supposer qu'après ce stress, les annexines du cytoplasme se relocalisent près de la membrane plasmique. Cette hypothèse a été confirmée par une analyse d'immunodétection qui démontrait une augmentation de p33 et p35 dans des aliquots de membranes plasmiques purifiées de cellules d'entre-nœud stressés versus témoin.

Nous avons vu que plusieurs équipes avaient isolé des annexines. La plupart les ont isolé à partir de fractions de PLPLDC mais deux autres les ont isolé soit en cherchant le facteur inhibant l'activité callose synthase dans une fraction microsomale extraite avec calcium ou soit en étudiant les protéines tonoplastiques liant le calcium. L'identité d'annexine a été confirmée par microséquençage ou par immunogénicité avec des anticorps anti-annexine. Le tableau I résume les points communs des annexines purifiées. Nous avons vu aussi qu'à l'exception des équipes travaillant sur l'exocytose, les domaines d'étude des différents groupes sont très variés. La variété des analyses de fonction effectuées par ces équipes reflète bien l'absence de consensus quant à la fonction précise des annexines.

Tableau I: Annexines purifiées chez les plantes

Plante (Tissu)	Nom	Anticorps la reconnaissant	pI	Fragment séquencé	Localisation et références
Tomate (suspension cellulaire)	p34	anti-p68 bovin	5.6	p16	racine, tige et feuilles de plants de 21 jours Smallwood <i>et al.</i> , 1990; Boustead <i>et al.</i> , 1989
	p35.5	anti-anx Torpedo	5.7	p28 et p18	
Pois (plumule)	p35		3 isoformes (6,5; 6,8 et 7,0)	4 fragments	Clark <i>et al.</i> , 1992
Céleri	p42			1.1; 2.1; 2.2 et 2.3	tonoplaste des cellules corticales (absence dans les cellules vasculaires). Seals <i>et al.</i> , 1994
Maïs (coléoptile)	p33 p35 p68	anti-doublet p33/p35 de maïs		p11 p16 et p12	Blackbourn <i>et al.</i> , 1991
Coton (fibres)	p34		3 isoformes (6,1 à 6,5)	p12	fraction microsomale Andrawis <i>et al.</i> , 1993
Poivron (fruit)	p35			2 fragments	fraction microsomale Hoshino <i>et al.</i> , 1995
<i>Bryonia dioica</i> (entre-nœud)	p33 p35	anti-doublet p33/p35 de maïs anti-doublet p33/p35 de maïs			Thonat <i>et al.</i> , 1997

3.3.2 Isolation des gènes d'annexine

En 1994, Pirck *et al.* ont publié la première séquence d'annexine de plante. En criblant une banque de clone d'embryon somatique de *Medicago sativa* avec un fragment de protéine phosphatase 2A amplifié par PCR, ils ont repêché une annexine. Ils ont noté qu'un transcrit est détecté à des niveaux différents dans toutes les parties de la plante examinées.

Wilkinson *et al.* (1995) ont cloné chez la fraise, un fruit non-climactérique, (*Fragaria X ananassa*) un gène ayant une forte homologie avec les annexines. C'est par PCR, avec la technique de l'exposition différentielle de populations d'ADNc de fruit mûrs (très rouges) contre des ADNc de fruits jeunes (blancs), qu'ils ont obtenu un clone d'annexine. Le transcrit de 1.2 kb n'est pas présent dans la feuille, la tige et la racine du fraisier. Proust *et al.*, (1996), une autre équipe étudiant le mûrissement d'un fruit non-climactérique (poivron), ont cloné, par criblage différentiel, le premier gène complet d'annexine de plante. Ce clone a été associé à une p32 détecté dans une fraction de PLPLDC de poivron avec l'anticorps anti-doublet p33/p35 de maïs.

Gidrol *et al.* (1996) ont isolé un clone d'annexine d'une banque d'*Arabidopsis thaliana* qui complétait un mutant OxyR d' *Escherichia coli*. Le mutant est incapable de pousser en présence de 100 μM et plus de H_2O_2 tandis que la souche sauvage tolère 350 μM . Le clone n'a aucune homologie de séquence avec le gène de OxyR. OxyR est une protéine qui, chez la levure et *E. coli*, est sensible à l'état Redox de la cellule et active la transcription des gènes de défense aux stress oxydatifs.

En 1996, Battey *et al.* ont cloné deux ADNc d'une librairie d'extrémités de racine de maïs ayant une homologie avec les annexines. Les deux clones Zmannp33 et Zmannp35 ont été associés aux annexines qu'ils avaient purifié de la fraction de PLPLDC du coléoptile de maïs (p33 et p35)(Blackbourn *et al.*, 1991).

Récemment, Potikha et Delmer (1997) ont isolé deux clones d'annexine chez le coton (AnnGh1 et 2) avec l'anticorps anti-p34 de Andrawis *et al.* (1993) dans une banque d'ADNc de fibres de coton 21 jours après l'émergence de l'anthère. Ils n'ont pas associé p34 à un des deux clones. Des analyses de type northern ont démontré que les deux gènes étaient exprimés dans les fibres et que leur niveau de transcrit était abondant durant la phase d'élongation du développement et diminuait progressivement lors de l'entrée des fibres dans la phase active de synthèse de la paroi secondaire.

Avec des recherches intensives dans les différentes banques d'acides nucléiques, Morgan et Fernandez (1997) ont trouvé plusieurs EST (*Expressed Sequence Tag*) ayant une homologie avec les annexines végétales. Les séquences se retrouvent dans le tableau II avec la source du tissu, la technique de clonage et le numéro d'accession.

Tableau II : Annexines clonées chez les végétaux

Plante (no.accession)	Méthode d'identification	Source	Commentaires, référence et numéro d'accession
Tomate	Oligos dégénérés du fragment p16 de p34	ADNg	-Voir texte (Smallwood <i>et al.</i> , 1992) (X 63996)
Luzerne	Oligos dégénérés de phosphatase PP2A	ADNc d'embryon somatique	-Expression dans toutes les parties de la plantes à différents niveaux. (Pirck <i>et al.</i> , 1994) (X74947)
Soya	Ac anti-protéines de la membrane plasmique	ADNc de protéine de membrane d'hypocotylédon étioilé	(Shi <i>et al.</i> , 1995) (T41436)
Fraisier	PCR <i>differential display</i>	ADNc de fruits mûrs (rouges) contre fruits jeunes (blancs)	-spécifique au fruit (Wilkinson <i>et al.</i> , 1995) (U19941)
Maïs	Produit de PCR obtenu avec des oligos dégénérés de p33	ADNc de l'extrémité de la racine (5mm)	-Voir texte (Battey <i>et al.</i> , 1996) (X98244)
Maïs	section d'ADNc de p33 similaire à p35	ADNc de l'extrémité de la racine (5mm)	-Voir texte (Battey <i>et al.</i> , 1996) (X98245)
Arabidopsis	n.d.	n.d.	-Induit par blessure (Mehta <i>et al.</i> , 1996)
Arabidopsis	17 ESTs au hasard	ADNc de plante entière	-Séquence consensus nommée ANX 23 de Morgan et Fernandez (1997) (Newman <i>et al.</i> , 1994) (no. d'acc.voir annexe)
Arabidopsis	6 ESTs au hasard	ADNc de suspension cellulaire et de plantes étioilées	-Séquence consensus nommée ANX 23 par Morgan et Fernandez (1997) (Hofte <i>et al.</i> , 1992) (no. d'acc. voir annexe)
Arabidopsis	2 ESTs au hasard	ADNc de suspension cellulaire et de plantes étioilées	-Séquence consensus de ANX 22 par Morgan et Fernandez (1997) (Hofte <i>et al.</i> 1992) (Z18073 et Z25968)
Arabidopsis	n.d.	n.d.	(Schantz <i>et al.</i> , 1996) (X99224)
Arabidopsis	Complémentation du mutant Δ oxyR d' <i>E. coli</i>	ADNc de plante entière	-Voir texte (Gidrol <i>et al.</i> , 1996) (U28415)

Luzerne (<i>Medicago trunculata</i>)	Criblage différentiel	ADNc de racine témoin et après 4 jours de nodulation avec <i>Rhizobium</i>	-Induit faiblement au 4 ^e jour et absent au 14 ^e de nodulation (Cullimore <i>et al.</i> , 1996) (aucun no. d'accession)
Luzerne (<i>Medicago trunculata</i>)	2 ESTs	racine en élancement	(Covitz <i>et al.</i> , 1997) (AA660909 et AA660264)
<i>Ricinus communis</i>	3 ESTs avec Ac anti-protéines de fraction microsomale	ADNc de protéines membranaires de l'endosperme	(van de Loo <i>et al.</i> 1995) (T24154, T24168 et T24170)
<i>Brassica campestris</i>	1 EST au hasard	ADNc du bouton floral	(Lim <i>et al.</i> , 1996) (L47930)
<i>Brassica napus</i>	1 EST au hasard	ADNc de la racine	(Park <i>et al.</i> , 1993) (H74681)
Raifort		ADNg	-Identifié par Morgan et Fernandez, (1997) dans une séquence génomique de peroxydase (Fujiyama <i>et al.</i> , 1990) (D90116)
Riz	1 EST au hasard	ADNc de la racine	(Sasaki <i>et al.</i> , 1994) (D39787)
Pommier	Oligos dégénérés	ADNg	(Clark et Roux, 1995a) (L41393)
Poivron	Criblage différentiel	ADNc de fruits mûrs	-Voir texte (Proust <i>et al.</i> , 1996) (X93308)
Coton	Ac anti-p34	ADNc de fibres 21 jours après l'émergence de l'anthere	-Voir texte (Potikha et Delmer, 1997) (U73747)
Coton	Ac anti-p34	ADNc de fibres 21 jours après l'émergence de l'anthere	-Voir texte (Potikha et Delmer, 1997) (U737476)
Tabac	n.d.	n.d.	(Proust <i>et al.</i> , 1997a) (Y14972)
Tabac	n.d.	n.d.	(Proust <i>et al.</i> , 1997a) (Y14973)
<i>Lavatera thuringiaca</i>	Criblage différentiel	ADNc de feuilles témoin et acclimatées	-Résultats préliminaires (induit par les basses températures.) (Vazquez-Tello et Uozumi., communication personnelle)(AF006197)

En 1996, Mehta *et al.* et Clark *et al.* ont observé qu'une étude approfondie des séquences EST d'*Arabidopsis* permet de déterminer qu'elles proviennent de deux gènes différents. Morgan et Fernandez (1997) ont fait la même étude et ont publié deux séquences hypothétiques fait à partir des EST d'*Arabidopsis*. Un survol des séquences recensées dans le tableau II nous renseigne aussi énormément sur le nombre d'annexine différentes chez les plantes. Il n'y a, jusqu'à maintenant, jamais plus de deux annexines clonées par espèce végétale. Les analyses de Southern de Battey *et al.* (1996), de Mehta *et al.* (1996), de Gidrol *et al.* (1996) et de Proust *et al.* (1996) ont aussi démontré que la famille des annexines végétales est beaucoup plus petite que la famille des annexines animales. Tout ces auteurs s'accordent pour dire que la famille comprend deux ou trois gènes.

3.3.3 Régulation génétique

Des analyses de type northern ont démontré qu'un transcrite de 1.1 Kb est présent en grande quantité dans les racines de plants de tomate de 21 jours (Smallwood *et al.*, 1992). Le transcrite est moins abondant dans la tige et absent dans les feuilles. Il n'y avait présence du transcrite dans les feuilles que des plants immatures suggérant un lien avec la différenciation cellulaire. Des résultats semblables ont été démontrés avec des extraits d'ARN de patate et d'orge. Les poids moléculaires très rapprochés de p34 et p35.5 ne permettent pas de dire si le transcrite de 1.1 kb correspond à p34 ou à p35.5 ou au deux en même temps. Les résultats obtenus avec les anticorps anti-p34 et anti-p35.5 semblent suivre l'abondance du transcrite de 1.1 kb identifié en *northern* (racine>tige>jeune feuille>feuille mature). Un polypeptide de 60 kDa des extraits de PLPLDC de suspension cellulaire et de racines de tomate a réagit avec l'anticorps anti-p34 (Smallwood *et al.*, 1992).

L'ADNc d'annexine isolé du poivron par Proust *et al.* (1996) hybridait avec un transcrite de 1.2 kb qui s'accumule lors du mûrissement du fruit. Le messenger est absent

des fruits verts très jeunes et des fruits mûrs et il est très abondant dans les fruits mûrs au stade de couleur orange et au stade très mûr de couleur rouge (3.5 fois). Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'extrémité 5' du transcrit suggérant que l'accumulation de transcrit observée correspond à celle d'un seul gène. Il est à noter que le stade des fruits verts très jeunes est associé à la phase de division et de différenciation cellulaire, que celui des jeunes fruits verts est associé à la phase d'expansion cellulaire et que le stade des fruits rouges est associé à la phase de la fin du mûrissement. Le transcrit isolé chez le fruit du fraisier n'était pas présent chez les petits fruits verts et les fruits blancs-verts mais l'était chez les fruits des deux autres stades (1/4 rouge et pleinement rouge) (Wilkinson *et al.*, 1995).

En 1996, Proust *et al.* a utilisé l'anticorps anti-doublet p33/p35 d'annexine de maïs pour identifier un homologue chez le poivron. L'anticorps a détecté une protéine d'environ 32 kDa qui est abondante dans la racine et aussi présente dans les feuilles. La protéine reconnue s'accumule fortement lors du développement du fruit (vert très jeune<vert jeune<vert<orange<rouge). Une extraction des PLPLDC du fruit vert de poivron permet d'observer trois polypeptides majeurs (p32, p35 et p38) dont un seul est reconnu par l'anticorps anti-p33/p35 de maïs. Un seul polypeptide est aussi reconnu dans l'extraction des PLPLDC de plants de poivron de 17 jours. En 1997, Proust *et al.* écrivent, dans un résumé de conférence, que le microséquençage des polypeptides p32, p35 et p38 de l'extrait de PLPLDC du poivron a permis de déterminer que p32 et p35 sont identiques tandis que p38 semble être une annexine différente. Les résultats des analyse *northern* du poivron et du fraisier semblent indiquer la présence d'annexines spécifique au fruit non-climactérique mais les immunodétections n'indiquent pas la même chose. Devant l'augmentation du transcrit au cours du mûrissement de la fraise, Wilkinson *et al.* (1995) ont proposé plusieurs hypothèses. Le mûrissement du fruit étant accompagné de changements considérables des propriétés de la membrane et de la paroi régulés par le calcium (Ferguson, 1984 et Ferguson et Drobak, 1988), ils proposent que les annexines pourraient influencer l'attachement de la membrane au cytosquelette, être

impliquées dans la sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi ou bien séquestrer les ions calcium relâchés de la paroi lors de sa dégradation.

Des analyses de Northern faites à partir des séquences 3' non-codantes de Zmannp33 et Zmannp35 du maïs et de la séquence complète de Zmannp33 ont montré un transcrit dont l'abondance augmente du premier millimètre de l'extrémité de la racine jusqu'au troisième. Le transcrit est aussi détecté en faible quantité avec le clone complet de Zmannp33 dans le coléoptile de maïs (Battey *et al.*, 1996).

Les quelques analyses de Northern effectuées avec de l'ARN de plant d'*Arabidopsis* de 4 semaines, faites avec le clone réchappant le mutant OxyR d'E. coli, ont démontré que le transcrit de 1.1 kb est plus abondant dans les racines et que la quantité était plus faible dans la tige, les feuilles et la fleur. Des résultats semblables ont été observés avec cette sonde chez le blé et le tabac. Un traitement avec du peroxyde d'hydrogène (1mM) vaporisé a démontré que le transcrit d'annexine s'accumulait 12 heures après le traitement et diminuait au troisième jour. Une forte accumulation du transcrit a aussi été observée avec un traitement avec de l'acide salicylique (10mM) vaporisé. D'autres groupes ont observé une augmentation de transcrit d'annexine. Mehta *et al.* (1996) ont noté que leur annexine d'*Arabidopsis* était inductible par la blessure, tandis que Vazquez-Tello *et al.* (1997) ont démontré qu'un transcrit d'annexine était induit par l'acclimatation au froid chez *Lavatera thuringiaca*. Avec les résultats de Thonat *et al.* (1997) sur la thigmomorphogénèse de *Bryonia dioica*, ces exemples sont les seules indices que les annexines peuvent être induites par des stress oxydatifs, mécaniques et thermiques.

3.3.4 Études de fonction des annexines purifiées

Le processus d'exocytose implique le rapprochement et la fusion de vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique. La nature première des annexines étant de fixer

les phospholipides en présence de calcium, plusieurs groupes de recherche ont effectué des analyses biochimiques pour caractériser cette liaison. La concentration de calcium nécessaire à la liaison et la spécificité de cette liaison à des liposomes constitués de différents phospholipides ont été démontré en analysant les culots lipidiques des tests après une simple centrifugation (Boustead *et al.*, 1989; Blackbourn *et al.*, 1991; Blackbourn et Battey, 1993; Hoshino *et al.*, 1995). Cette méthode a aussi permis à Blackbourn et Battey (1992) de caractériser la concentration de calcium nécessaire à la liaison à des vésicules purifiées de *Lilium longiflorum*. Hoshino *et al.* (1995) et Blackbourn et Battey (1993) ont aussi démontré que les annexines favorisent l'agrégation de liposomes. En dernier lieu, Seals *et al.* (1994) ont démontré que VCaB42 est beaucoup plus sensible à la concentration de calcium que les autres annexines. La moitié de la fraction est associé à un extrait de microsome de tonoplaste en présence de 61 nM de calcium.

L'ensemble des résultats présentés dans le tableau III démontre que la concentration en calcium nécessaire à la liaison des annexines aux phospholipides est de l'ordre de la centaine de micromolaire. Cette concentration étant supraphysiologique, les auteurs proposent que cette concentration élevée de calcium pourrait être retrouvée dans la cellule lors d'entrée de calcium dans des microdomaines très localisés (Clark *et al.*, 1995b). L'exocytose se produisant dans ces microdomaines pourraient impliquer des annexines. Certains groupes de recherche ont immunolocalisé de grandes concentrations d'annexines dans des cellules en sécrétion active comme celles de l'extrémité racinaire, du xylème et du phloème en développement, de l'extrémité du tube pollinique et de l'extrémité des rhizoïdes de fougères (Blackbourn *et al.*, 1992; Clark *et al.*, 1992, 1995b). Ces résultats sont les seuls jusqu'à maintenant pour supporter l'hypothèse d'une implication des annexines végétales dans l'exocytose (Delmer et Potikha, 1997).

Tableau III: Liaison aux lipides des annexines de plantes

Plantes	Liaison à des liposome	Absence de liaison	½ liaison	½ liaison à des vésicules de <i>L. longiflorum</i>	Agrégation de liposomes	½ agrégation de liposomes	Agrégation de vésicules de <i>L. longiflorum</i>
Tomate p34 et p35.5	PC:PS1:1 (100µM)	PC (100µM)					
Maïs p33 et p35	PC:PS 1:1 PC:PE 1:1 PC:PI 1:1 (100µM)	PC:PS 1:1 (10µM) PC (100µM)	PC:PS 1:1 p33-(120µM) à pH7,4 p35-(370µM) à pH7,4 p33-(30µM) à pH 6,0 p35-(50µM) à pH6.0 PC:PS 2:1 p33/p35 (150µM)	p33 (100µM) p35 (500µM)	PS	PS:PC 2:1 (150µM)	p33/p35 (150µM)
Poivron p35	PS (1mM) PI (1mM) PG, LPS, LPI (faiblement)	PE, PC et LPG	PS (550 µM) indépendante du pH PS:cholestérol (400 µM) PS:stigmastérol (500 µM)			PS (925 µM)	
Céleri p42				61 nM aux tonoplastes			

L'équipe de Battey (McClung *et al.*, 1994) a démontré en 1994 que leur p33 et p35 de maïs avaient une activité phosphodiesterase. Cette activité était plus forte avec l'ATP et le GTP mais l'enzyme hydrolyse aussi le CTP, l'ITP et l'UTP. Cette activité est indépendante du calcium et du magnésium. En 1996, Calvert *et al.* ont démontré que leurs annexines p33 et p35.5 de tomate possèdent aussi une activité phosphodiesterase. L'ATP était le meilleur substrat mais la réaction se produisait aussi efficacement avec le GTP et le CTP et un peu avec les autres nucléotides testées (TTP, AMP, ADP). Cette activité n'était pas affectée par la présence de chélateur de calcium. Par contre, elle était affectée par la présence de phosphatidylsérine et de calcium, suggérant ainsi une superposition des sites catalytiques et de liaison aux phospholipides et au calcium. La fraction d'annexine purifiée séparée par électrophorèse non dénaturante a permis de démontrer que l'activité était reliée à une bande de 70 kDa qui contenait les annexines p34 et p35.5 après dénaturation.

Dans le cadre des mêmes travaux, Calvert *et al.* (1996) ont aussi démontré hors de tout doute que leurs annexines p33 et p35.5 de tomate liait spécifiquement l'actine F. La liaison était dépendante du calcium et nécessite 100 μM pour p33 tandis que celle de p35.5 nécessite 300 μM . Ils ont noté que l'activité phosphodiesterase n'est pas affectée par la présence d'actine F. En utilisant une autre technique, la cosédimentation, il a été démontré que les annexines de poivron, de maïs et de coton ne lient pas l'actine F (Hoshino *et al.*, 1995; Blackbourn *et al.*, 1992 et Delmer et Potikha *et al.*, 1997).

Les résultats de Calvert *et al.* (1996) ont permis de démontrer que l'activité phosphodiesterase nucléotidique et la liaison aux membranes ne peuvent pas avoir lieu simultanément. Les annexines pourraient donc être sous une forme ayant une activité phosphodiesterase nucléotidique et pouvant lier l'actine F et sous une autre forme pouvant lier les phospholipides en présence de calcium.

En 1997, Seals et Randall ont détecté un homologue de VCaB42 de céleri avec un extrait de protéines solubles de suspension cellulaire de tabac avec leur anticorps anti-VCaB42. L'anticorps reconnaît aussi une protéine de poids moléculaire similaire (de 37.5 à 44.5 kDa) avec des extraits de protéines de membranes de faibles densités (riches en tonoplastes) de racines de carotte, de plants d' *Arabidopsis* et avec des extraits de protéines solubles de plants de pois, de soya, de maïs, d'avoine et d'embryon de coton. L'homologue de VCaB42 chez le tabac a servi à étudier VCaB42 lors de l'augmentation du volume cellulaire. La protéine était 4.5 fois enrichie lors de la purification de la vacuole des protoplastes et elle était 12 fois moins abondante dans des protoplastes évacuolés. Ces deux résultats suggèrent que VCaB42 de tabac est associée à la vacuole. Il a aussi été démontré que l'augmentation de la quantité de VCaB42 était corrélée avec l'augmentation du volume de la cellule et de la vacuole et que cette quantité était aussi reliée à l'ajout de 2,4-D qui affecte le volume de la cellule de manière inverse à sa concentration. Avec ces résultats, Seals et Randall (1997) ont proposé que VCaB42 a un rôle dans la biogenèse de la vacuole, peut être dans le transport de lipides spécifiques à cette organelle.

L'activité catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \Leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) dans le mutant OxyR secourue par l'annexine d'*Arabidopsis* est semblable à celle de la lignée parentale et augmente, comme celle de la lignée parentale, lorsque la bactérie est mise en présence de H_2O_2 (50 μM). Ces observations suggèrent qu'une activité de dégradation des peroxydes est impliquée dans le secours du mutant. L'utilisation de mutants catalases (ΔkatE ou ΔkatG) transformés avec l'annexine d'*Arabidopsis* a montré que l'annexine n'arrivait pas à rattraper totalement ces mutations. L'activité de dégradation n'étant donc pas reliée à une activité catalase, les auteurs ont alors proposé que l'annexine avait une activité peroxydase. Une recherche d'homologie de séquence utilisant 30 acides aminés de l'extrémité amino-terminale de l'annexine clonée a démontré une similarité significative avec le domaine très conservé de liaison à l'hème des peroxydases de plante. Les résultats de tests d'activité spécifique peroxydase obtenus avec la protéine recombinante

et un extrait enrichi en annexines par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-annexine recombinante a donné des valeurs similaires à celles obtenues avec la peroxydase du raifort. L'activité était spécifique à l'annexine car elle diminue en présence de l'anticorps (Gidrol *et al.*, 1996). Une autre équipe a produit une plante transgénique avec ce clone (Venkateswari, Kanrar *et al.* 1997). Ils ont transformé la moutarde indienne (*Brassica juncea*) avec ce clone en amont du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Ils ont noté que les feuilles des plantes transgéniques avaient un contenu relatif en eau plus élevé lors d'un stress hydrique que les feuilles des plantes témoins. De plus, les plantes transgéniques survivent à un stress salin (150 mM NaCl) tandis que les plantes témoins meurent au quatrième jour. Ils ont noté aussi que les plantes transgéniques montrent significativement moins de dommages cellulaires après un traitement avec le methyl viologen (herbicide) qui produit des superoxydes en présence de lumière. Il a aussi été remarqué que les lésions produites par *Alternaria brassicae* sur les feuilles des plantes transgéniques étaient plus petites que celles produites sur les feuilles des plantes témoins.

4.0 Problématique

Dans le but de caractériser les annexines végétales au cours de l'acclimatation au froid chez les plantes, nous avons produit un anticorps anti-annexine *AnnL1* recombinante de *Lavatera thuringiaca*. Deux espèces végétales ont été utilisées, une monocotylédone, le blé et une dicotylédone, la luzerne. Ces deux espèces ont la capacité de développer la tolérance au gel lors d'un traitement à 4°C.

L'anticorps a été utilisé dans des études a) d'immunolocalisation tissulaire et cellulaire, b) d'immunodétection dans des fractions dont le tampon d'extraction avait été modifié, c) de cinétique d'acclimatation au froid dont les protéines ont été extraites de différentes façons (solubles, totales, liant les phospholipides en présence de calcium,

microsomales, et de membrane plasmique) et finalement d) de protection à la protéinase K afin de déterminer la nature de la liaison des annexines aux membranes.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.0 Plantes, croissance et traitements spéciaux

Nous avons utilisé dans cette étude un génotype de blé d'hiver (*Triticum aestivum* L. cv. Fredrick LT₅₀ -16°C), un génotypes de blé de printemps (*T. aestivum* L. cv. Glenlea LT₅₀ -8°C), cinq génotypes de luzerne de tolérance variée (*Medicago sativa* L. cv. Rambler LT₅₀ -23°C, Apica LT₅₀ -19°C, CUF 101 LT₅₀ -15°C, Anik LT₅₀ -14°C et Trek LT₅₀ -9°C). Les plantes ont été mises en germination dans la vermiculite saturée d'eau pendant sept jours sous éclairage artificiel. Après 7 jours de germination, les plantes ont été arrosées à tous les trois ou quatre jours avec une solution nutritive (20:20:20, N:P:K). La température de croissance a été maintenue à 24 °C ± 1°C durant le jour (15h de photopériode à 250 mE s⁻¹ m⁻² avec des lumières fluorescentes et incandescentes) et à 20 °C ± 1 °C durant la nuit. L'humidité relative était de 70 ± 5%.

Le processus d'acclimatation au froid a été induit en plaçant les plantes (le blé après les 7 jours de germination et la luzerne après 90 jours de croissance) à des températures de 4°C le jour et 2°C la nuit avec une photopériode de 12 heures.

Les traitements à l'acide salicylique 1 mM et au peroxyde d'hydrogène 1 et 10 mM ont été faits en vaporisant des plants de luzerne cv. Trek âgés de 90 jours. Afin d'augmenter la pénétration des produits vaporisés sur les feuilles des plantes, nous avons ajouté 0,01% Triton X-100. Pour ces traitements, les témoins ont été traités avec la solution de Triton X-100 0,01%. Les protéines solubles du collet de luzerne et les fractions de PLPLDC de feuilles de blé et de luzerne ont été extraites 48 heures après la vaporisation.

2.0 Identification d'un clone d'annexine de *Lavatera thuringiaca*

L'ADNc utilisé pour cette étude provient du laboratoire du Dr. Takeshi Uozumi (Département de biotechnologie de l'Université de Tokyo). Le clone a été isolé par le Dr. Alejandro Vazquez-Tello à partir d'une banque d'ADN complémentaire de *Lavatera thuringiaca*. L'ADNc de 1112pb est cloné dans les sites EcoRI-XhoI de pBluescript (Stratagene) avec un adaptateur EcoRI (AATTCGGCACGAG et le brin complémentaire) en 5'. L'analyse et la comparaison de séquence effectuées avec le logiciel d'analyse du G.C.G. (*Genetic Computer Group de l'Université du Wisconsin*) version 6.0 ont démontré que le clone codait pour une protéine de la famille des annexines. Selon la nomenclature proposée par Pirck et al. (1994) et Potikha et Delmer (1997), le clone a été nommé *AnnLtl*. Ann signifiant: Annexine, le L majuscule signifiant: *Lavatera* et le t minuscule: *thuringiaca*. Le nombre 1 final signifie la première annexine cloné chez cette plante.

3.0 Analyses de type northern

3.1 Culture des bactéries et purification de l'ADN des plasmides contenant *AnnLtl*

Les bactéries transformées par le plasmide contenant l'ADNc d'*AnnLtl* ont été cultivées toute la nuit à 37°C dans 20 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline avec agitation à 220 rpm. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par la méthode de la lyse alcaline. 1 ml de suspension bactérienne a été centrifugé 2 minutes à 10000 g. Le culot a été resuspendu avec 100 µl de la solution A (Tris-HCl 25mM pH 8.0, glucose 50 mM et EDTA 10 mM). Ensuite, les cellules ont été lysées en ajoutant 2 volumes de la solution B (NaOH 0.2N et SDS 1%) et mélangées trois fois par inversion. Le lysat a été gardé sur glace pendant 1 minute et 1/2 volume de la solution C (acétate de potassium 3M pH 5.8) a été ajouté. Après avoir vortexé 3 secondes, le lysat a été incubé une minute sur la glace et centrifugé 5 minutes à 10000 g afin de se débarrasser des

débris cellulaires. Le surnageant a été transféré à un nouveau tube et volume égal de phénol:chloroforme (1:1) a été ajouté au surnageant. Le mélange a été centrifugé 2 minutes à 10000g à 4°C. Le surnageant a été transféré à un nouveau tube et a été extrait avec 1 volume d'une solution chloroforme:alcool isoamyl (24:1). Le mélange a été agité et centrifugé 2 minutes à 10000 g à 4°C. Finalement, 2 volumes d'éthanol 95 % ont été ajoutés à la phase aqueuse. Les acides nucléiques ont été précipités 2 heures à -80°C et centrifugés à 10000g à 4°C pendant 10 minutes. Après un lavage à l'éthanol 70 %, le culot a été resuspendu dans un tampon TE (Tris-HCl 10mM pH8.0 et EDTA 1mM).

3.2 Digestion et isolation de l'ADNc de *AnnLt1*

Un aliquot des préparations d'ADN plasmidique a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 0,5 mg/ml de bromure d'éthidium (migration dans du tampon TBE (TE + acide borique 10 mM)) afin d'estimer la qualité et la quantité d'ADN des échantillons. Une fraction de l'ADN a été digérée 1 heure à 37°C avec les enzymes de restriction EcoRI et XhoI. La digestion a été vérifiée en séparant un aliquot par électrophorèse sur gel d'agarose. Les produits de la digestion ont été séparés à 4°C par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion 1%. La bande correspondant à *AnnLt1* a été excisée. Un volume de tampon TE a été ajouté au fragment d'agarose contenant l'ADN et la solution a été chauffée 10 minutes à 65°C pour faire fondre l'agarose. Un volume de phénol a été ajouté et après avoir mélangé, l'échantillon a été centrifugé 3 minutes à 10000 g. Après un second lavage de la phase aqueuse avec un volume de phénol, du LiCl a été rajouté afin d'avoir une concentration finale de 0.4M. Les acides nucléiques ont été précipités avec un volume d'isopropanol à -80°C. Le précipité a été resuspendu dans une quantité minimale de tampon TE après un lavage avec de l'éthanol 70%.

3.3 Marquage d'*AnnLt1*

La sonde *AnnLt1* a été marquée en utilisant la méthode des amorces aléatoires avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I (Feinberg et Vogelstein, 1984). Un aliquot d'ADN d'*AnnLt1* (10 à 50 ng) a été resuspendu dans 6 volumes d'H₂O et l'ADN a été dénaturé à 95°C pendant 5 minutes et immédiatement placé sur glace. Pour la réaction de marquage (50 µL), nous avons ajouté 10 µL d'OLB (voir annexe), 4 µL de [³²P]dCTP, 4 µL de [³²P]dTTP (act. spécifique 3000 Ci/mmol, Amersham) et 2 µL de BSA (albumine de sérum bovin). La réaction de polymérisation a été effectuée pendant 1 heure à 37°C en présence de 6U de Klenow (Pharmacia). La réaction a été arrêtée avec une solution contenant : 10 ml EDTA 0,5M, 10 ml acétate de sodium 3M pH5.2, 10 ml H₂O stérile et 10 ml d'ARNt 10mg/ml. L'ADN a été précipité avec 2.5 volumes d'éthanol 95%, lavé avec de l'éthanol 70% et dénaturé avec 100 µl de NaOH 0,1M à 95°C. Cette dernière a ensuite été neutralisée avec 100 µl de HCl 0,1M et ajoutée à la solution d'hybridation (section 3.6).

3.4 Extraction de l'ARN

L'ARN a été extrait selon un protocole bien établi dans le laboratoire (Houde et al., 1992). Les plantes (10g) ont été broyées dans la glace sèche. Le broyat a été mélangé à 25 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM pH 8,8, NaCl 100mM, EDTA 5mM, SDS 1%, héparine 40 Unités/ml) et 25 ml de phénol saturé avec Tris-HCl pH 8.8 contenant 0,5% d'hydroxyquinoline. Le mélange a été chauffé à 60°C, refroidi à la température de la pièce et agité pendant 20 minutes après l'ajout de 25ml de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). Ensuite, les phases ont été séparées par une centrifugation de 15 minutes à 8000g. La phase organique a été réextraite et recentrifugée. Les phases aqueuses combinées ont été réextraites une fois avec un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et une autre fois avec un volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). Une centrifugation de 15 minutes à

6000g a suivi chaque extraction. Les acides nucléiques ont été précipités avec 2,5 volumes d'éthanol 95% et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH5.5. Le précipité a ensuite été récolté avec une centrifugation de 20 minutes à 10000g. La concentration en ARN a été évaluée par absorbance à 260 nm.

3.5 Électrophorèse des ARN

Les ARN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,2% contenant de la formaldéhyde. Tout le matériel a été préalablement lavé et rincé avec de l'H₂O contenant du DEPC (0,1%). Les échantillons d'ARN ont été resuspendus dans trois volumes de tampon de charge (voir annexe). Les échantillons ont été chauffés 1 minute à 75°C avant d'être déposés sur le gel. Le gel d'agarose comprenait (pour 150 ml): 1,8g d'agarose, 15 ml de tampon MOPS (voir annexe), 4,5 ml de formaldéhyde 37% et de x vol. d'H₂O traitée au DEPC (0,1%). L'électrophorèse est effectuée dans le tampon MOPS à 100 volts.

3.6 Transfert des ARN et hybridation avec la sonde marquée

Les ARN ont été transférés sur une membrane de nylon par un courant continu de tampon induit par capillarité.. Le tampon de transfert était constitué de: NaCl 3M, NaOH 8mM, sarkosyl 1mM et le pH a été ajusté entre 10 et 11. Après un transfert de 2 heures, la membrane a été rincée pendant 1 minute dans une solution de SSC 1X (NaCl 150mM et citrate de sodium 15mM avec un pH ajusté à 7,0) et chauffée 20 minutes à 80°C.

La membrane a été préhybridée pendant toute la nuit dans un tampon préalablement chauffé à 42°C. Le tampon de préhybridation était constitué de: tampon SSC 5X, de EDTA 1mM, de Denhardt 2X (voir annexe), de SDS 0,1%, d'ADN de sperme de saumon 300 mg/ml et 50% de formamide. Le tampon d'hybridation était

constitué des mêmes composantes que celui de préhybridation sauf qu'il contenait la sonde marquée. L'hybridation a été effectuée pendant toute la nuit à 42°C.

Les lavages ont été effectués dans un tampon SSC de concentration variant entre 5 et 0,1X à différentes températures variant entre 42 et 65°C. Les variations de la composition du tampon de lavage se faisait de manière à augmenter sa stringence. La quantité de sonde accrochée à la membrane a été estimée entre chaque lavage avec un appareil Geiger. Lorsque les membranes semblaient suffisamment lavées, elles étaient exposées sur un film Kodak -80°C avec un écran intensifiant, pendant une période variant entre 1 jour et 2 semaines.

4.0 Criblages de banques d'ADNc

4.1 Criblage d'une banque d'ADNc de blé acclimatée avec l'ADNc d'*AnnLt1*

4.1.1 Étalement de la banque d'ADNc

La banque d'ADNc a été préparée par M. Jean Danyluk dans le vecteur lambda Zap II. L'ARN poly A+ utilisé pour la construction de la banque a été extrait de blé cv. Norstar acclimaté 1 jour au froid. La banque a été titrée à $5,6 \times 10^9$ phages/ml et étalée de manière à avoir 30000 phages par boîte de pétri (150 X 15 mm). La banque a été étalée sur un milieu NZY-agar (1,5%) en mélangeant préalablement les phages avec un milieu NZY contenant 0,6% d'agarose et des bactéries XL1 Blue. Les bactéries avaient préalablement poussées en présence de maltose (0,2%). Après étalement, les boîtes de pétri ont été placées à 37°C jusqu'à l'apparition de minuscules plages de lyse. Ensuite, elles ont été placées à 4°C jusqu'au lendemain.

4.1.2 Criblage

Des filtres de nylon ont été déposés sur chaque boîtes de pétri pendant 2 minutes. Les filtres ont ensuite été trempés 2 minutes dans une solution dénaturante contenant: NaCl 1,5 M et NaOH 0,5M. Ensuite, les filtres ont été trempés 5 minutes dans un tampon de neutralisation contenant: NaCl 1,5M et Tris 0,5M à pH 8,0 et rincés 30 secondes dans un tampon contenant: Tris 0,2M à pH 7,5 et SSC 2X. Après avoir séchées, les membranes ont été chauffées 1 heure à 80°C. Les membranes ont été préhybridées puis hybridées avec la sonde *AnnL11* et lavées selon le protocole utilisé lors des études de type northern.

4.2 Criblage d'une banque d'ADNc de blé acclimaté avec des oligonucléotides dégénérés de séquence peptidique d'annexine de plante.

4.2.1 Construction des oligonucléotides dégénérés

La comparaison des séquences peptidiques d'annexines de plantes, disponibles à la fin de 1995, nous a permis de choisir trois régions qui semblaient plus conservées entre les annexines. Le choix des séquences a aussi été influencé par le niveau de dégénérescence des oligonucléotides correspondants. La séquence **AFSGWGTNE** de *Lavatera thuringiaca* a été choisie, ainsi que la séquence **EDVAAAT/XGD** du maïs et la séquence **GTDEDALTRV** du fraisier. Les oligos ont respectivement été nommés A1, A2 et A3. L'oligonucléotide A3 a été synthétisé pour correspondre à la séquence inverse afin de permettre une éventuelle amplification par PCR. Les codons rarement représentés chez les plantes ont été omis lors de la construction des oligos (Murray et al., 1989). La séquence de A1 est **gcbttcwssggstggggsacsaacgag**, celle de A2 est **gaggacgtsgcbgcygcbacsacsaggsgac** et celle de A3 est **acscmggtvarrgegtcctcgtcsgtsc**. Il est à noter que s=g ou c; m=t ou g; v=a, c ou g; r=g ou a; b=t, c ou g; w=a ou t et y=t ou c. Avec ces choix d'acides aminés, A1 est dégénéré 192 fois et A2 et A3, 288 fois.

4.2.2 Étalement de la banque et préhybridation

Les filtres de nylon ont été traités comme pour le criblage avec l'ADNc d'*AnnLt1* mais deux filtres ont été produits pour chaque boîte de pétri afin de faire un criblage différentiel avec une paire d'oligonucléotide. Les solutions de préhybridation et d'hybridation étaient différentes de celles du criblage précédent. La solution de préhybridation était constituée de: SSC 6X, Denhardt 5X, 0,05% pyrophosphate de sodium, 0,5% SDS et 100 mg/ml d'ADN de sperme de saumon bouilli. La solution d'hybridation était constituée de: SSC 6X, Denhardt 1X, 0,05% pyrophosphate de sodium, 0,05% SDS et 100 mg/ml d'ARNt de levure. La préhybridation était d'une durée de 1 heure à 42°C.

4.2.3 Marquage des oligonucléotides et hybridation

250 pmoles de sonde ont été mis en présence de 240 mCurie de [^{32}P] ATP, de 6,1 Unités de T4 polynucléotide kinase (PNK), d' H_2O stérile et de tampon de T4 PNK. Le marquage s'est effectué à 37°C pendant 2 heures. Les acides nucléiques ont été précipités en ajoutant: 2,5 M NH_4OAc , 25 mg d'ADN de saumon, 25 mg d'ARNt de levure et 9 volumes d'éthanol 100%. Après une centrifugation à 10000g, le culot d'acides nucléiques a été lavé avec 500 ml d'éthanol 70%, centrifugé et relavé avec 500 ml d'éthanol 95% et de nouveau centrifugé. Après avoir retiré l'éthanol, le culot a été séché et resuspendu dans 100 ml de tampon TE. Cette solution de sondes marquées a été ajoutée au tampon d'hybridation et le tout a été agité toute la nuit en présence de la membrane de nylon à 65°C. Les étapes de lavage et de révélation des clones hybridants sont les mêmes que celles effectuées lors du criblage avec la sonde d'ADNc d'*AnnLt1*. La comparaison des films correspondant au criblage de même boîte de pétri avec des oligos différents a permis l'identification de zones d'hybridation similaires. Ces zones ont été prélevées sur la boîte de pétri et placées dans 500 ml de tampon SM (NaCl 0,1M, MgSO_4 10mM, Tris-HCl pH 7,5 50 mM et gélatine 2%) avec 10 ml de chloroforme.

Après une nuit, les phages ont été rééталés sur petites boîtes de pétri. Lorsque la densité était suffisamment faible pour pouvoir distinguer des plages de lyse séparées, les boîtes de pétri étaient criblées avec les mêmes oligos.

4.3 Criblage d'une banque d'ADNc de blé non-acclimaté avec l'anticorps anti-*AnnLtl* recombinante

La banque d'ADNc a été préparée par M. Louis-Pierre Chauvin dans le vecteur lambda Uni Zap (Stratagene). L'ARN poly A+ utilisé pour la construction de la banque a été extrait de blé cv. Fredrick non-acclimaté. La banque a été titrée à et étalée de manière à avoir 30 000 phages par boîte de pétri (150 X 15 mm). Les plages de lyse ont été mises en contact pendant 1 heure à 42°C avec des filtres de nitrocellulose préalablement imbibés dans de l'IPTG à 1mM et séchés. Les membranes ont ensuite été lavées en trempant 1 heure dans 100 ml d'une solution de tampon PBS-Tween contenant 4% de lait en poudre. L'immunodétection avec l'anticorps anti-*AnnLtl* recombinante a été effectuée selon le protocole de l'immunodétection de protéines électrotransférées sur membrane nitrocellulose (section 9.0).

5.0 Production de la protéine recombinante

5.1 Sous-clonage de l'ADNc de *AnnLtl* dans pTrcHis A

Les bactéries transformées par le plasmide contenant l'ADNc d'*AnnLtl* et celles transformées par le plasmide pTrcHis A ont été cultivées toute la nuit à 37°C dans 20 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline en agitant à 220 rpm. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par la méthode de la lyse alcaline (section 2.1).

La stratégie de clonage KpnI/BamHI place l'insert *AnnLtl* dans le cadre de lecture du vecteur pTrcHisA (Figure 1). Cette orientation permettra la production de la

protéine recombinante correspondant à *AnnLt1*. Le vecteur pTrc contient, dans le même cadre, les nucléotides codant pour une queue de six histidines. Cette queue sert à la purification de la protéine car elle se fixe aux ions divalents comme le nickel qui est immobilisé à la résine His-Bind. La qualité et la quantité des ADN du vecteur et de *AnnLt1* récupérés ont été vérifiées par migration sur gel d'agarose 1% contenant 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (migration dans du tampon TBE). Une fraction de chaque préparation a été digérée 1 heure par l'enzyme de restriction KpnI. Les digestions ont été vérifiées en séparant un aliquot par électrophorèse sur gel d'agarose.

Une deuxième digestion de chaque fraction a été effectuée avec l'enzyme BamHI. La digestion complète a été séparée à 4°C par électrophorèse sur gel d'agarose à bas point de fusion 1%. Après une bonne séparation, les bandes correspondant à *AnnLt1* et à pTrcHisA ont été excisées et isolées. Le vecteur pTrcHis A digéré KpnI/BamHI a été déphosphorylé 1 heure à 37°C avec la calf intestine alcaline phosphatase (CIAP). La déphosphorylation a été suivie d'un traitement au phénol afin d'éliminer les protéines.

Les deux extraits d'ADN ont été mélangés selon différents ratio avec une ligase afin de lier les deux fragments d'ADN à bouts cohésifs. La ligation a été effectuée toute la nuit à 12°C. La souche XL1 blue a été transformée par électroporation. Deux cents microlitres de mélange de transformation ont été étalés sur pétri contenant une gélose d'agar. Les pétris ont été incubés toute la nuit à 37°C. Des cultures de 10 mL dans le milieu LB ont été démarrées pour dix des quarante colonies qui avaient été observées. Des extractions d'ADN plasmidiques par lyse alcaline ont été faites sur trois des cultures. Après digestion par l'enzyme de restriction EcoRV, (une enzyme qui ne coupe pas dans *AnnLt1*) les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier la présence d'une bande de 5400 paires de base (pb) pour confirmer la réussite du sous-clonage d'*AnnLt1* dans pTrcHis A.

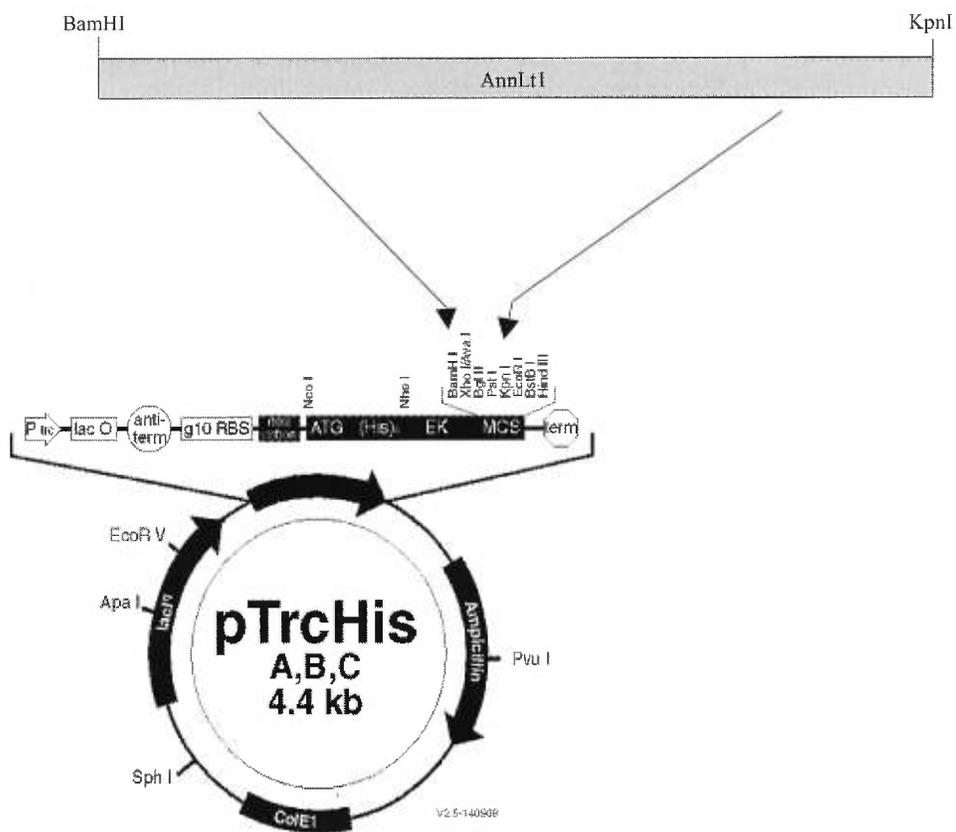


Figure 1. Schéma représentant le sous-clonage de *AnnLt1* dans pTrcHis A (Invitrogen).

5.2 Production de la protéine recombinante *AnnLtl1*-His

Une des souches recombinantes pTrcHis A a servi à inoculer 2 ml de milieu de culture SOB contenant 50 g/ml d'ampicilline. La culture a été incubé toute la nuit à 37°C avec agitation à 220 rpm. Le lendemain, la suspension cellulaire a servi à inoculer 50 mL de milieu SOB avec ampicilline (100 µg/ml). Après un certain temps d'agitation (densité optique à 600 nm de 0,6), de l'IPTG a été ajouté afin d'avoir une concentration finale de 1 mM. Après quatre heures d'induction, la suspension bactérienne a été centrifugée à 5000g pendant 5 minutes.

5.3 Purification sur colonne d'affinité de la protéine recombinante *AnnLtl1*-His

Le culot, resuspendu dans un volume minimal de tampon de liaison (Imidazole 5mM, NaCl 0.5M et Tris-HCl 20mM pH 7.9), a été soniqué pendant 5 minutes sur glace afin de briser les cellules. Après une centrifugation de 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant les protéines cellulaires et les protéines recombinantes a été incubé avec la résine His-Bind de Novagen sur la glace pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 2 minutes à 2000g, la résine a été lavée avec 9 volumes de tampon de liaison (3 fois 3 volumes avec une centrifugation entre chaque lavage). Ensuite, la résine a été lavée avec 6 volumes de tampon de lavage (60mM Imidazole, 0.5 M NaCl et 20 mM Tris-HCl pH 7.9) (2 fois 3 volumes avec une centrifugation entre chaque lavage). La protéine recombinante a été isolée en éluant avec un tampon d'éluion (Imidazole 1M, 0.5M NaCl et Tris-HCl 20mM pH 7.9).

5.4 Purification de la protéine par SDS-PAGE et électroélution

Les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide 10 % (SDS-PAGE). La bande correspondant à la protéine recombinante de 38,5 kDa a été découpée et les protéines ont été électroéluées avec du tampon SDS-

PAGE 0,5X et précipitées avec 4 volumes d'acétone 100% à -20°C. L'extrait protéique a été resuspendu dans 2 ml d'une solution contenant 0,85 M NaCl.

6.0 Production et purification des anticorps

6.1 Production de l'anticorps polyclonal

L'adjuvant MPL+TDM+CWS de Sigma Immuno Chemicals a été resuspendu avec les 2 ml de la solution protéique de *AnnLtl*. Un millilitre de cette solution a été injecté à un lapin. Le reste a été conservé au réfrigérateur et injecté 28 jours après la première inoculation. Un échantillon de sang a été prélevé avant la première injection afin d'avoir du sérum pré-immun. Le lapin a été sacrifié 7 jours après la deuxième injection. Le sang a été centrifugé et le surnageant a été placé à -20°C.

6.2 Purification de l'anticorps par colonne d'affinité

Les anticorps ont été purifiés sur une colonne d'affinité. Cette colonne était constituée d'*AnnLtl*-His recombinantes, purifiées par colonne His-Bind, liées à une résine activée (Affigel-10 de Bio-Rad). Trois milligrammes de protéines par millilitres de résine ont été liées dans un tampon Hepes 0.1 M à pH 7.5 avec 80mM CaCl₂. Le couplage s'est effectué à 4°C pendant une nuit avec agitation. La résine a ensuite été saturée avec une solution Tris-glycine 1M à pH 8.8 pendant une heure et lavée avec du tampon PBS avec 0,1 % NP-40. Un aliquot du sérum a été passé plusieurs fois sur la résine afin de fixer le maximum d'anticorps anti-*AnnLtl*. La colonne a été lavée avec plusieurs volumes de tampon PBS. Les anticorps ont été élués avec un faible volume de glycine 0,3M à pH 2.0. L'éluat correspondant aux anticorps anti-*AnnLtl* a immédiatement été neutralisé avec une solution Tris-base 1M, aliquoté et entreposé à 4°C.

7.0 Extraction des protéines

7.1 Extraction des protéines solubles

Luzerne et blé. Les protéines solubles des différentes parties de plants du cultivar TREK (feuilles, entre-nœuds, collet et racines) et de blé (feuille, collet et racine) ont été extraites dans des microtubes en broyant dans deux volumes de tampon contenant: 100 mM Tris-HCl (pH 9,6), 5 mM EDTA, 0,1% b-mercaptoéthanol et 1 mM PMSF. Le broyat a été centrifugé 10min. à 10 000g et le surnageant bouilli 10 min. à 95°C avec un volume de tampon Laemmli 2X (voir annexe).

Pour l'étude de l'effet de la composition du tampon sur la récupération des annexines dans la fraction soluble, les protéines du collet ont été extraites en mortier en broyant dans deux volumes de tampon 100 mM Tris-HCl (pH 9,6) contenant soit 5 mM EDTA, 5mM EGTA, 0,1% Triton X-100 ou 1mM CaCl₂ avec pour chacun, 0,1% b-mercaptoéthanol et 1 mM PMSF. Le broyat a été centrifugé 10 min. à 10 000g et le surnageant bouilli 10 min. à 95°C avec un volume de tampon Laemmli 2X.

7.2 Extraction des protéines totales

Blé. Les protéines totales des différentes parties de plants de 10 jours (feuilles, collets et racines) du cultivars Fredrick ont été extraites en mortier dans quatre volumes de tampon d'extraction contenant 10% TCA et 0,07% b-mercaphoéthanol. L'extrait a ensuite été centrifugé à 10 000g pendant 15 min. et lavé plusieurs fois avec de l'acétone contenant 0,07% b-mercaphoéthanol. Les protéines ont ensuite été resuspendues dans le tampon Laemmli et bouillies 10 min. à 95°C.

7.3 Extraction des protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC)

Luzerne et blé. Les plantes (luzerne cv. Trek et blé cv. Fredrick) ont été extraites selon le protocole de Blackbourn *et al.* (1991). Elles ont été broyées en mortier en ajoutant 5 volumes de tampon 10mM Hepes (pH 7.4) contenant 0.15M NaCl, 10mM EDTA, 2mM DTT et 0,25mM PMSF. Le broyat a été filtré avec 2 épaisseurs de Miracloth. Le filtrat a été centrifugé 30 min. à 30000g. Cinq milligrammes d'extrait de lipide bovin (Sigma) ont été ajoutés par gramme de plantes broyées. Une quantité de CaCl₂ a été ajoutée afin d'obtenir une concentration finale en CaCl₂ de 15mM. La solution a été placée 30 minutes sur glace et centrifugée 30 min. à 30000g. Le culot a été lavé deux fois avec des volumes décroissants du tampon initial où l'on a remplacé le EDTA par 1mM CaCl₂. Chaque lavage a été suivi d'une centrifugation de 30 min. à 30000g. Le culot final a été resuspendu dans un volume minimal de tampon initial (contenant 10 mM EDTA) et centrifugé 90 min. à 100 000g. Les protéines du surnageant ont été précipitées avec de l'acétone 100% et resuspendues dans le tampon de Laemmli 5X.

7.4 Extraction des protéines de la fraction microsomale

Blé. Des plants de blé du cultivar Fredrick ou Glenlea ont été broyés en mortier dans cinq volumes de tampon 50mM MOPS-KOH pH 7,6 contenant 0,5M sorbitol, 10mM EGTA, 2,5mM métabisulfite de potassium, 4mM acide salicyl hydroxamic, 1mM PMSF et 5% PVP-30 (polyvinylpyrrolidone) soluble. Après une première centrifugation de 15 min. à 14 000g, le surnageant a été centrifugé 30 min. à 156 000g. Les protéines du culot, correspondant à la fraction microsomale, ont été extraites au phénol. La suspension de microsomes a été resuspendue dans un volume de tampon 2X 1M Tris-HCl (pH 9,5) contenant 1,4M sucrose, 100mM EDTA, 0,2M KCl, 4% β-mercaptoéthanol et 4mM PMSF. Un volume de phénol a été ajouté et la solution a été centrifugée 10 min. à 10 000g. Un lavage de la phase phénolique a été effectué avec le

tampon d'extraction 1X et ensuite les protéines de la phase phénolique ont été précipitées avec 5 volumes d'acétate d'ammonium 0,1M dans du méthanol. Après une centrifugation de 10 min. à 10000g, le culot a été lavé trois fois avec de l'acétone 100% et resuspendu dans le tampon Laemmli 1X et bouilli 10 min. à 95°C.

Pour l'étude de l'effet de la composition du tampon sur la récupération des annexines dans la fraction microsomale, les feuilles ont été broyées en mortier dans le tampon 50mM MOPS du paragraphe précédent en remplaçant le 10mM EGTA soit par 1mM CaCl_2 , 10mM CaCl_2 et 10mM MgCl_2 . Les protéines de ces fractions ont été extraites par la méthode au phénol.

7.5 Extraction et purification de membranes plasmiques

À partir de la fraction microsomale, nous avons purifié les membranes plasmiques par séparation de type deux phases. La fraction microsomale a été resuspendue dans une solution contenant 0,25M sucrose et 10mM KH_2PO_4 (pH 7,8). Une première centrifugation à 156000g a permis de diminuer le volume de la fraction. Le culot a été resuspendu dans 2 ml de la solution contenant 0,25M sucrose et 10mM KH_2PO_4 (pH 7,8). Nous avons ensuite ajoutée 2,4g de Dextran T500 20%, 1,2g de PEG (polyéthylenglycol) 40%, 300ml de NaCl 800mM, 1,5 ml d'une solution 1M sucrose, 20mM KH_2PO_4 (pH 7,8). Le volume de la solution a ensuite été complété à 8g avec de l'eau. Les phases ont été mélangées en agitant faiblement et séparées par une centrifugation de 5 min. à 1000g. La phase supérieure a été séparée de la phase inférieure et les deux fractions ont été centrifugées 30 min. à 156 000g. Le culot de la fraction supérieure est enrichie en microsomes de membranes plasmiques (Larsson et al., 1987). Les protéines de la fraction riche en membranes plasmiques ont été extraites au phénol et resuspendues dans le tampon Laemmli et bouillies 10 min. à 95°C.

8.0 Tests de protection à la protéinase K

Blé. La protéinase K (10mg) seule ou avec Triton X-100 (0,1 ou 1 % finale) ont été ajoutés à la fraction microsomale (60 µg de protéines) resuspendue dans le tampon sucrose 0,25 M, KH_2PO_4 10 mM (pH 7.8). Le volume a été complété à 57 ml avec du tampon TE (10 mM Tris pH 7.5 et EDTA 1mM). La réaction de digestion a été faite sur glace pendant 30 min. et a été arrêtée en ajoutant 2ml de PMSF 100mM. Les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE après avoir ajouté un volume de tampon Laemmli 2X.

9.0 Immunodétections de AnnLt1

Les électrophorèses de protéines ont été effectuées sur des gels de polyacrylamide 10% mais il y avait toujours un premier gel de 4% (La composition des deux gels a été placée en annexe). La migration a été effectuée dans un tampon à pH8,3 contenant du Tris à 25mM, de la glycine à 190mM et du SDS à 0,1%. Le courant lors des électrophorèses a été maintenu constant à 20 mA. Après la sortie du bleu de bromophénol, les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham). La coloration est effectuée dans une solution contenant 40% méthanol, 10% acide acétique et 0,1% bleu de Coomassie R-250 et les protéines ont été révélées par une décoloration du gel avec agitation continue dans une solution de méthanol 30% et d'acide acétique 7%. Le transfert des protéines sur nitrocellulose à 25°C a été effectué à 100 volts pendant 1 heure. Le tampon de transfert était constitué du tampon de migration (Tris-HCl et glycine) sans SDS contenant 20% méthanol.

L'immunodétection des protéines sur les membranes de nitrocellulose a toujours été effectuée en plaçant préalablement les membranes dans une solution de tampon PBS avec 0,2% Tween 20 contenant 4% de lait en poudre pendant 1 heure avec agitation.

Ensuite, l'anticorps a été ajouté avec une dilution 1/1000. Les membranes ont été agitées toute la nuit et lavées deux fois le lendemain avec 30 ml de tampon PBS-Tween. Un deuxième anticorps anti-anticorps de lapin couplé à une peroxydase a été mis en présence des membranes dans une nouvelle solution de PBS-Tween avec 4% de lait en poudre pendant une heure avec agitation. La révélation des anticorps a été obtenue par chemiluminescence avec les solutions A et B de la trousse ECL de Boehringer Mannheim. La lumière émise par la réaction de chemiluminescence a ensuite été révélée en exposant les membranes sur des films Kodak XAR pendant généralement 2 minutes.

III. RÉSULTATS

1.0 Analyses de northern

Au début du projet, les efforts ont été concentrés dans le but d'identifier un transcrite d'annexine chez le blé. Le blé étant le modèle choisi par notre laboratoire, il y a une vingtaine d'années, pour l'étude du processus d'acclimatation au froid. La sonde d'annexine *AnnLtl* de *Lavatera thuringiaca* (gracieuseté de Alejandro Vazquez-Tello) a été utilisée pour l'analyse de northern. Les premiers tests ont été effectués en utilisant des membranes avec de l'ARN total. La sonde *AnnLtl* ne détectait rien de spécifique sur ces membranes avec des lavages à hautes (SSC 0,1X, 65°C) ou à basses (SSC 5X, 25°C) stringences (plusieurs conditions intermédiaires ont été utilisées). L'absence de signal à basse stringence pouvait indiquer soit un non-appariement due à une trop faible homologie entre la sonde et l'ARN recherché ou bien à une quantité trop faible de transcrite. Il semble que la première hypothèse soit la bonne car avec l'analyse de northern avec de l'ARN polyA+ (plus concentré en ARN codants), nous n'avons pas réussi à détecter de signal.

2.0 Criblage avec l'ADNc de *AnnLtl* et les oligonucléotides dégénérés

Dans le but d'avoir un ADNc d'annexine spécifique au blé, nous avons criblé une banque d'ADNc de blé. Nous avons à notre disposition plusieurs banques d'ADNc. Il y avait deux banques construites dans le vecteur Lambda Zap II et une banque construite dans le vecteur Uni Zap. Les deux premières étaient respectivement constituées d'ADNc de blé Norstar acclimaté 1 jour et 36 jours. La banque Uni Zap, possédant des inserts unidirectionnels dans le sens de transcription, contenait des ADNc de blé Frédéric non acclimaté. Sachant que l'augmentation du transcrite d'*AnnLtl* était détectable après deux jours au froid chez *Lavatera*, nous avons choisi d'utiliser la banque d'ADNc de blé Norstar acclimaté un jour. Le criblage de 150 000 clones de la banque avec l'ADNc de *AnnLtl* n'a

pas permis l'identification de clone d'annexine chez le blé. Il y avait un tapis de radioactivité lorsque les lavages des membranes étaient effectués à basses stringence (SSC 5X, 25°C) et aucun signal à haute stringence (SSC 0,1X, 65°C). Aucune condition n'a permis d'obtenir une situation intermédiaire permettant l'identification d'une région d'hybridation spécifique.

Les résultats du criblage étaient prévisibles car la sonde *AnnLt1* ne reconnaissait aucun transcrite lors des expériences de type northern. Une des hypothèses les plus plausibles, pour expliquer l'absence de résultat, est que l'homologie de séquence entre la sonde *AnnLt1* de *Lavatera thuringiaca* (une dicotylédone) et les transcrits de blé (monocotylédone) est trop faible pour permettre un appariement stable lors des hybridations. Dans le but de poursuivre l'isolation d'un clone d'annexine de blé, nous avons construit deux oligonucléotides correspondant à des régions conservées des trois fragments suffisamment longs d'annexine de plante disponibles à l'époque (lavatera, luzerne, et fraisier). Afin d'augmenter nos chances, nous avons utilisé la séquence d'un court fragment d'annexine de maïs pour générer un troisième oligonucléotide. Le maïs était la seule monocotylédone de l'époque (encore aujourd'hui) dont l'étude des annexines avait été poussée plus loin que la simple isolation d'ESTs. Le criblage différentiel d'environ 500 000 clones avec une paire d'oligonucléotides n'a pas permis d'isoler de clone d'annexine chez le blé. Encore une fois, il n'a pas été possible d'obtenir les conditions de lavage permettant d'observer un signal spécifique. Le criblage direct avec ces oligonucléotides n'avait pas non plus été concluant pour Battey et al. (1996) chez le maïs. Quelques conditions ont permis d'identifier des régions qui semblaient contenir des clones positifs mais il s'est révélé en criblage secondaire et tertiaire que l'hybridation n'était pas spécifique.

3.0 Production des anticorps polyclonaux anti-AnnLt1 recombinante

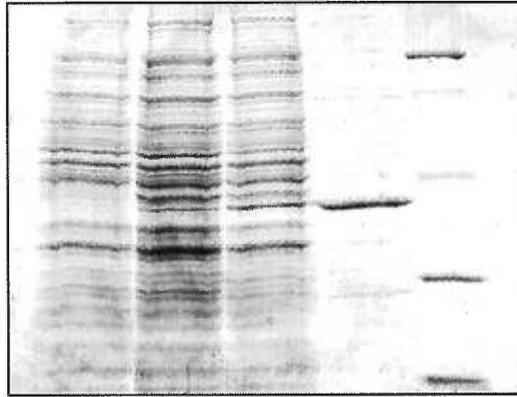
Dans le but de poursuivre les recherches d'un clone d'annexine chez le blé et d'avoir un outil pour des études supplémentaires, nous avons produit un anticorps polyclonal contre *AnnLt1* produite dans *E. coli*. Le gène *AnnLt1* a été sous-cloné dans le cadre de lecture du vecteur d'expression pTrcHis A. La protéine recombinante était visiblement induite par l'ajout d'IPTG (figure 2). Le rendement était toujours aux environs de 10mg par litre de milieu de culture après 4 heures d'induction. La protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité en utilisant la queue d'histidine incluse dans le cadre de lecture du vecteur pTrcHis. La queue se fixe préférentiellement sur la résine chargée d'ions nickel. L'extrait enrichi en annexine recombinante a été séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La bande correspondant à l'annexine recombinante a été excisée et les protéines ont été électroéluées et utilisées pour être injectées à un lapin.

Le sérum a été passé sur une colonne de fraction enrichie en AnnLt1 recombinante afin de purifier les anticorps anti-AnnLt1. L'éluat de cette chromatographie contenait des anticorps qui reconnaissaient une bande de 41 kDa d'un extrait soluble de protéines de *E. coli* transformées avec le vecteur pTrcHis-AnnLt1 et induite avec IPTG. Cette bande correspondait au poids moléculaire théorique de l'annexine AnnLt1 (35.5 kDa) avec la queue histine (5.5 kDa). Cet éluat reconnaissait aussi une protéine de 41 kDa de l'extrait purifié sur colonne liant les histidines. L'anticorps reconnaissait d'autres bandes de faibles poids moléculaires dans ces deux extraits. Ces bandes étaient probablement des produits de dégradation de la protéine recombinante causée lors de la purification. Les anticorps purifiés ne reconnaissaient rien dans l'extrait de la souche d'*E. coli* non transformée. Les anticorps du sérum pré-immun ne reconnaissaient pas la bande de 41 kDa induite avec IPTG et purifiée par chromatographie d'affinité avec la colonne His-Bind.

Figure 2. Expression et purification de la protéine recombinante AnnLt1-His dans *E. coli*.

Séparation des protéines solubles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et coloration au bleu de Coomassie R-250: 1: Protéines de *E. coli*; 2: Protéines de *E. coli* transformées avec le vecteur ptrcHisA contenant l'insert de *AnnLt1*; 3: Protéines de *E. coli* transformées avec ptrcHisA-*AnnLt1* et induites avec IPTG; 4: Éluat de la chromatographie d'affinité His-Bind des protéines de *E. coli* transformées avec ptrcHisA-*AnnLt1* et traitées avec de l'IPTG.

1 2 3 4 5



← 41 kDa

4.0 Criblage avec les anticorps polyclonaux

Des résultats préliminaires de détection d'annexine avec l'anticorps anti-AnnLt1 ont démontré que celui-ci ne détectait rien dans les extraits de protéines solubles de blé mais qu'une protéine de 22,5 kDa était reconnue dans les extraits de protéines totales. La quantité de cette protéine ne semblait pas varier au cours de l'acclimatation au froid (figure 10). Dans le but d'optimiser nos chances d'isoler un clone d'annexine de blé, nous avons criblé une banque d'ADNc de blé Frédrick non acclimaté construite dans Uni Zap. Le choix de cette nouvelle banque reposait sur deux facteurs. Premièrement, la banque Uni Zap ne contenait que des ADNc cloné unidirectionnellement dans le sens de leur transcription. Les chances qu'un clone de ce type de banque produise une protéine recombinante correspondante à l'ADNc cloné sont de une sur trois car il y a trois cadres de traduction possibles. Cette propriété fait en sorte que les chances de produire la bonne protéine recombinante sont deux fois plus élevée qu'avec une banque non directionnelle (Lambda Zap II). Dans une banque non directionnelle, le clone a un chance sur six d'être transcrit dans le bon cadre car il peut être cloné dans le sens inverse à sa transcription. La présence constitutive du signal de 22,5 kDa chez le blé nous permettait de choisir cette seule banque Uni Zap disponible malgré le fait qu'elle était construite avec des ADNc de blé non-acclimaté. La présence de transcrit d'annexine est autant probable dans cette banque que dans celles contenant des ADNc de blé acclimaté. Le criblage de 200 000 clones de cette banque avec l'anticorps anti-AnnLt1 n'a pas permis d'isoler de clone d'annexine de blé. Cette absence de résultat avec différentes techniques de criblage implique que les séquences nucléotidiques et d'acides aminés des annexines de blé ne sont pas assez homologues à celles de l'annexine *AnnLt1* de *Lavatera thuringiaca*.

5.0 Études des protéines reconnues par l'anticorps anti-AnnLt1 recombinante

5.1 Chez la luzerne

Notre but était d'étudier les annexines végétales au cours de l'acclimatation au froid. Pour ce faire, nous avons choisi une espèce de monocotylédone (blé) et une espèce de dicotylédone (luzerne) ayant la capacité de s'acclimater froid.

5.1.1 Localisation tissulaire des polypeptides détectés dans les fractions solubles par l'anticorps anti-AnnLt1

Toutes les extractions de protéines solubles ont été extraites avec un tampon contenant du EDTA 5mM. Nous avons ajouté ce chélateur de calcium pour récupérer le maximum d'annexines dans la fraction des protéines solubles. Sans cet agent, certaines annexines risquaient de suivre le culot de 10000g des extractions qui contiennent beaucoup de débris de membranes.

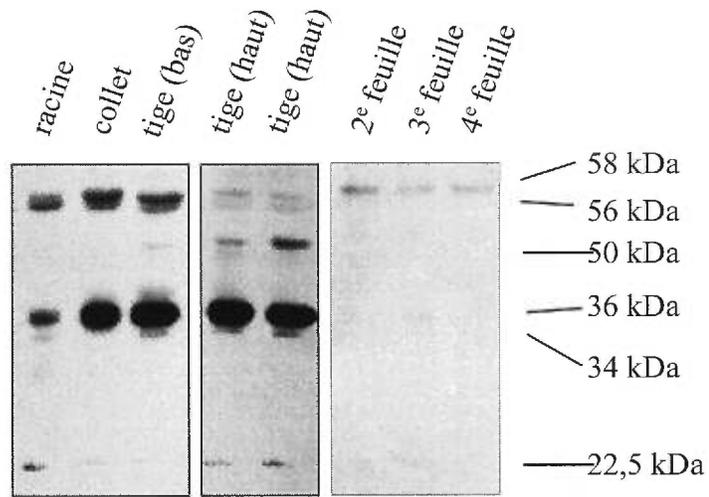
Dans l'extrait soluble de racine et de collet de luzerne, l'anticorps a reconnu des polypeptides de 22,5, 34, 36, 56 et 58 kDa (figure 3A). L'anticorps a détecté les mêmes protéines plus un polypeptide de 50 kDa dans les extraits d'entre-nœud constituant la tige (figure 3). Lorsque les pétioles étaient suffisamment longs, nous avons extrait les protéines de ces derniers. L'anticorps a détecté les mêmes polypeptides dans ces extraits que dans les extraits de la tige. Les protéines des 2^e, 3^e et 4^{ième} feuilles ont été extraites en prenant bien soin de broyer ensemble les feuilles des différents plants selon l'ordre qu'elles occupaient tout au long de la tige. Les feuilles situées plus haut sur la tige étaient trop petites pour être extraites sans contamination de pétiole. Il est à noter que le temps d'exposition pour l'immunodétection des polypeptides des fractions foliaires est de 2 minutes à comparer à 30 secondes pour les fractions de protéines de la tige et ce pour les mêmes quantités de protéines totales. L'anticorps a faiblement détecté un polypeptide

Figure 3. Localisation tissulaire des protéines détectées chez la luzerne avec l'anticorps anti-AnnLt1.

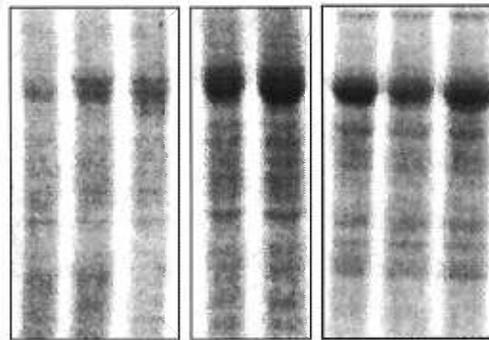
A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines (15 μ g) de fractions solubles de différents tissus de la luzerne (*Medicago sativa* cv. Trek) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps primaires sont révélés à l'aide d'anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase. L'enzyme est détectées à l'aide de la trousse ECL d'Amersham. (racine, collet, tige (haut et bas), 2^e, 3^e et 4^{ième} feuilles). Les membranes ont été exposées 30 secondes sauf celle des protéines de feuilles (2 minutes).

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.

A



B



d'environ 60 kDa dans les extraits de 2^e, 3^e et 4^{ème} feuilles.

Sauf une exception (VCaB42 de céleri, Seals et Randall, 1994), les annexines identifiées chez les plantes ont des poids moléculaires variant entre 33 et 36 kDa (Clark et Roux, 1995 et Delmer et Potikha, 1997). Notre anticorps a détecté, dans les extraits de protéines solubles de racine, de collet et de tige de luzerne, deux polypeptides de 34 et 36 kDa. Le polypeptide de 34 kDa a toujours été détecté en plus faible quantité que celui de 36 kDa et leur abondance ne variait pas du collet au bout de la tige. Les deux polypeptides étaient absents dans les extraits de feuilles et semblaient moins abondants dans la racine que dans la tige et le collet. Les formes de 56 et 58 kDa forment un doublet dont l'abondance du bas au haut du plant est l'inverse de celle de la forme de 50 kDa. Quant à l'abondance de la forme de 22,5kDa, elle semble variable d'une partie de la plante à l'autre et son immunodétection variait dépendamment des extractions et des électrotransferts.

5.1.2 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des protéines reconnues par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions solubles de collet

Les premiers tests d'immunodétection des annexines au cours de l'acclimatation au froid ont démontré qu'aucun polypeptide n'était présent dans la fraction soluble de feuille de luzerne acclimatée pendant 9 jours. Nous avons donc décidé de poursuivre nos tests avec les extraits de collet qui possèdent toutes les formes reconnues par l'anticorps. Les résultats présentés à la figure 3 démontrent que la quantité de toutes les formes détectées dans les extraits de collet ne varie pas au cours de l'acclimatation au froid (figure 4).

De plus, nous avons utilisé trois cultivars ayant des degrés de tolérance au gel différents (CUF 101, LT_{50} : -15°C; Apica, LT_{50} : -19°C et Rambler, LT_{50} : -23°C) afin de voir si il y avait une corrélation avec la quantité des polypeptides immunodétectés.

Figure 4. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez la luzerne.

A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fractions solubles de collet de luzerne acclimatée à 4°C (*Medicago sativa* cv. Trek) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes. (NA=non acclimatée, h=heure et j=jour).

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.

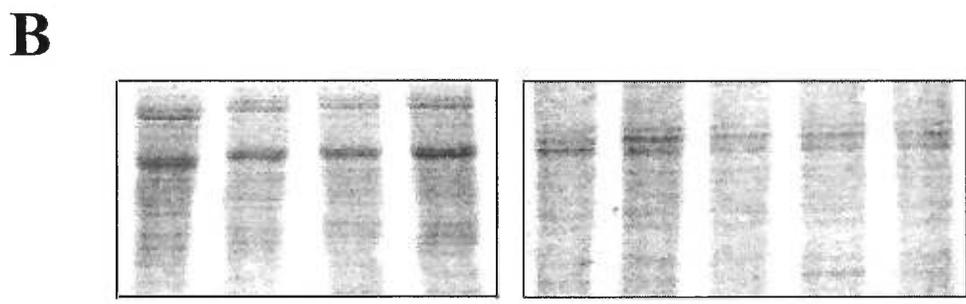
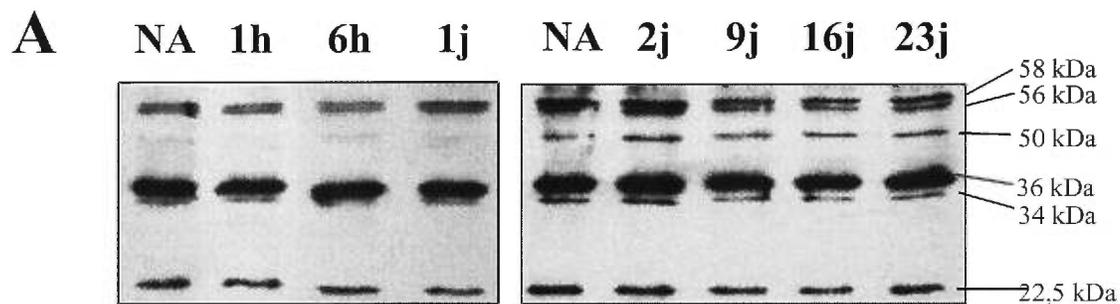
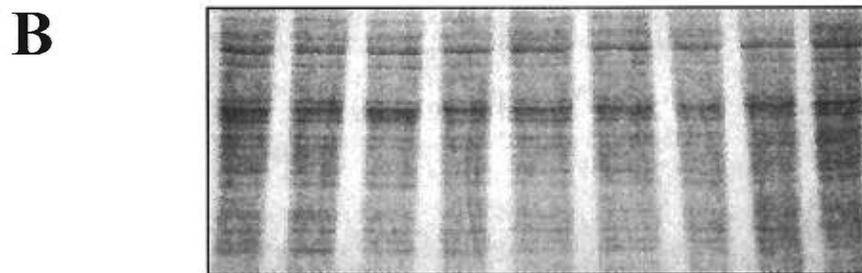
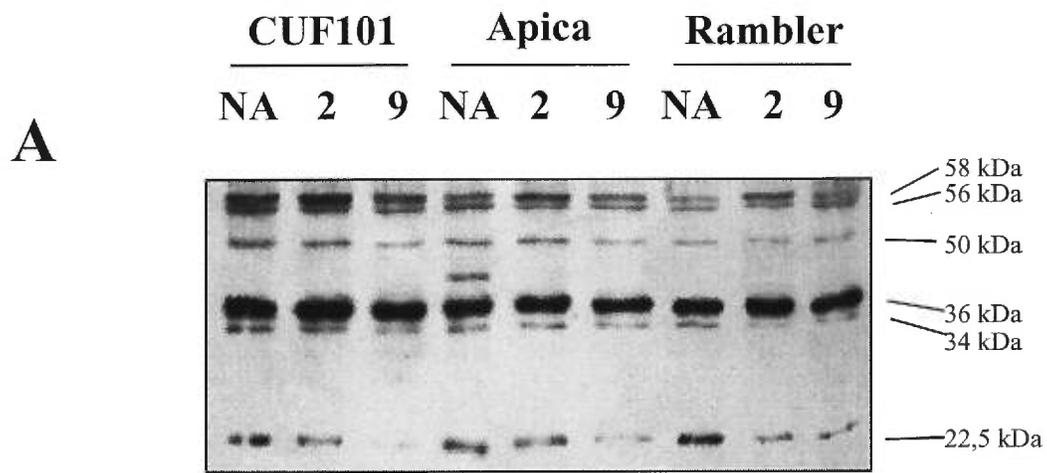


Figure 5. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid avec des cultivars de luzerne de tolérance variée.

A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines (8 μ g) de fractions solubles de collet de luzerne acclimatée à 4°C (*Medicago sativa* cv. CUF 101, Apica et Rambler) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les chiffres correspondent au nombre de jours d'acclimamation. La membrane a été exposée 2 minutes (NA=non acclimatée).

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.



Aucune corrélation entre le degré de tolérance au gel et la quantité relative de polypeptides détectés entre les trois cultivars n'a été observée (figure 5).

Gidrol *et al.* (1996) ont récemment observé qu'un traitement au peroxyde d'hydrogène ou à l'acide salicylique induisait l'expression d'un homologue des annexines chez *Arabidopsis thaliana*. Nous avons effectuée les mêmes traitements chez la luzerne afin d'observer leur effet sur les polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1. Ces produits appliqués aux mêmes concentrations n'ont eu aucun effet sur l'accumulation des polypeptides détectés dans la fraction des protéines solubles du collet.

5.1.3 Effets de la composition du tampon sur la quantité de polypeptides immunodétectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction soluble de collet

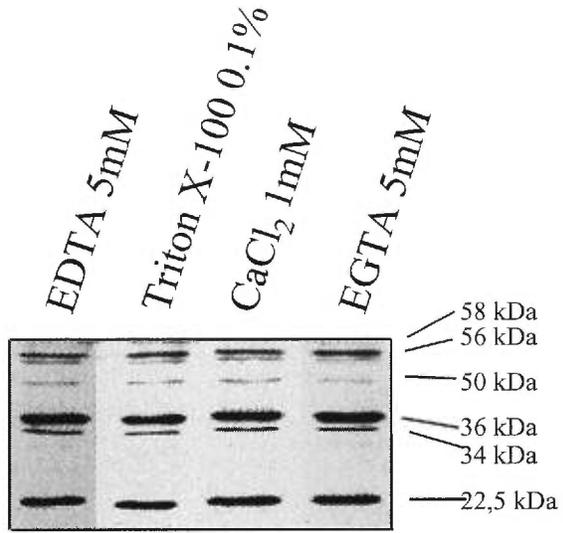
Il est connu que les annexines fixent les phospholipides en présence de calcium (Gerke et Moss, 1997). Il est donc possible qu'une certaine quantité d'annexine puisse être liée aux membranes *in vivo*. Afin d'extraire le maximum d'annexine dans la fraction soluble, nous ajoutons du EDTA (5mM) dans le tampon d'extraction. Pour cette série d'expérience, nous avons remplacé le EDTA par d'autres composés susceptibles de modifier la quantité des annexines récoltées dans la fraction soluble du collet de luzerne. Le remplacement du EDTA par un autre agent chélateur (EGTA) considéré comme étant plus spécifique pour les ions calcium n'a pas fait varier la quantité des protéines immunodétectées dans la fraction soluble (figure 6). Le Triton X-100, utilisé à faible concentration, décroche les protéines périphériques attachées à la membrane. L'ajout de Triton X-100 à une concentration de 0,1% n'a pas fait varier la quantité des protéines détectées (figure 6). En présence de CaCl_2 , les annexines fixent les phospholipides. Le remplacement du EDTA par du CaCl_2 n'a eu aucun effet sur la quantité de polypeptides immunodétectés dans la fraction des protéines solubles (figure 6).

Figure 6. Effet de la composition du tampon d'extraction sur la quantité d'annexine immunodétectée avec l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction soluble de collet de luzerne.

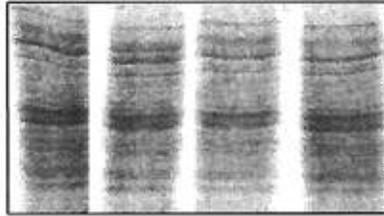
A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines (8 μ g) de fractions solubles de collet de luzerne acclimatée à 4°C pendant 6 semaines (*Medicago sativa* cv. Trek) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes.

B) protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.

A



B



5.1.4 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions des protéines de feuilles liant les phospholipides de manière dépendante du calcium au cours de l'acclimatation au froid.

Nous avons extrait les protéines liant les phospholipides de manière dépendante du calcium (PLPLDC) selon le protocole de Blackbourn *et al.* (1991). Une seule protéine de 36 kDa a été reconnue par l'anticorps dans la fraction des PLPLDC (figure 7). Cette protéine était présente autant dans la fraction du collet que dans celle de la feuille de luzerne. Il est à noter qu'une grande partie des polypeptides de 36 kDa observés n'a pas suivi la phase lipidique en présence de calcium (fraction soluble sans fraction PLPLDC). La majorité est restée dans la fraction des protéines solubles. Une ou deux formes d'environ 28-29 kDa ont été détectées par l'anticorps dans la fraction correspondant au culot 100 000g du lavage final avec EDTA. Les protéines de cette fraction peuvent être considérées comme faisant partie de la fraction microsomale qui contient les membranes des différents organelles de la cellule. Ce doublet n'a pas été caractérisé davantage.

Plusieurs extractions de fraction PLPLDC de feuilles de luzerne acclimatée à différents temps ou traitée avec du H₂O₂ ou de l'acide salicylique ont été effectuées. Les résultats de l'immunodétection de p36 dans ces fractions nous ont permis de voir que l'étape de précipitation avec des phospholipides en présence de calcium n'était pas quantitative. Malgré plusieurs essais, nous ne sommes pas arrivés à avoir plus de contrôle sur cette étape du protocole. La taille des feuilles, le temps de broyage, la force du broyage et le temps d'incubation avec les phospholipides sont des facteurs extrêmement difficiles à contrôler et semblent être la cause de l'échec de nos tentatives. L'impossibilité d'avoir des extractions reproductibles ne nous permet pas de conclure sur l'accumulation des polypeptides de cette fraction au cours de l'acclimatation au froid.

Figure 7. Enrichissement en protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC) chez la luzerne.

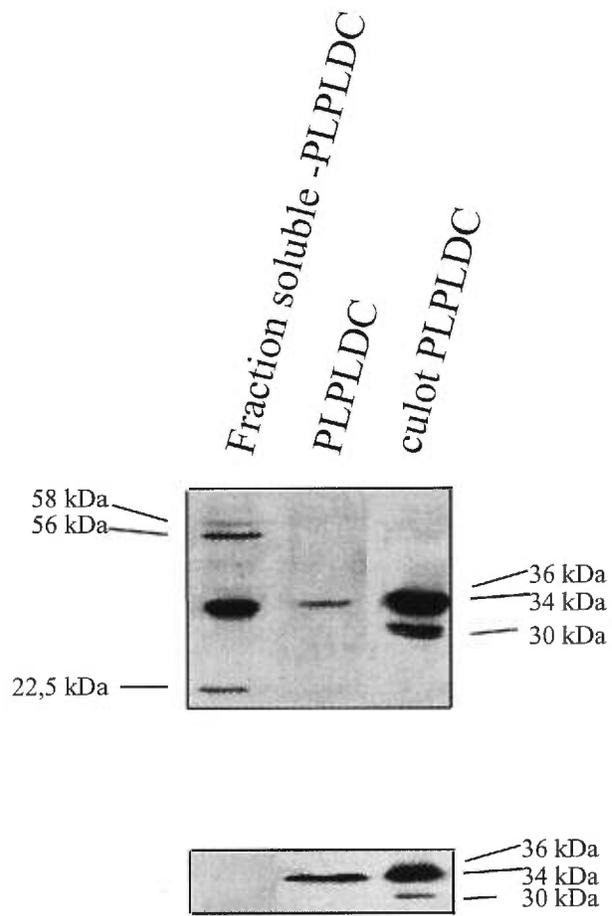
Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fractions solubles sans la fraction PLPLDC, enrichies en PLPLDC et microsomales sans PLPLDC de collet (**A**) et de feuilles (**B**) de luzerne acclimatée à 4°C pendant 1 semaine (*Medicago sativa* cv. Trek). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes.

A

Collet

B

Feuilles



5.2 Chez le blé

5.2.1 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions de protéines totales de feuille.

Les patrons d'immunodétection de l'anticorps anti-AnnLt1 chez le blé sont extrêmement différents de ceux obtenus chez la luzerne. Dans les fraction de protéines solubles de feuilles, de collet et de racine, l'anticorps a reconnu faiblement un polypeptide de 22,5 kDa. Dans un extrait de protéine totales de feuilles (TCA/acétone), l'anticorps a reconnu plus spécifiquement le polypeptide de 22,5 kDa (figure 8). Aucune variation de la quantité de ce polypeptide n'a été détectée dans cette fraction au cours de l'acclimatation au froid (figure 8). Comme dans le cas du polypeptide de 22,5 kDa reconnu dans les extraits soluble de luzerne, l'immunodétection du polypeptide de 22,5 kDa n'était pas reproductible car elle variait d'un électrotransfert à l'autre et entre les différents échantillons.

5.2.2 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans les fractions des protéines de feuille liant les phospholipides de manière dépendante du calcium.

Une extraction des protéines de feuilles liant les phospholipides de manière dépendante du calcium a été effectuée avec du blé acclimaté pendant 8 jours. L'immunodétection avec l'anticorps a permis d'identifier très spécifiquement (il n'y a aucun autre signal après 4 minutes d'exposition) deux polypeptides de 34 et 36 kDa (figure 9). La taille de ces polypeptides et leur capacité à lier les phospholipides en présence de calcium confirment sans aucun doute leur nature d'annexine. De plus, aucun polypeptide n'a été détecté par l'anticorps dans les extractions de protéines faites en omettant le calcium ou les phospholipides ou les deux à la fois. Des extractions de PLPLDC à différents temps

Figure 8. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez le blé.

A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fractions de protéines totales (10 μ g) de feuilles de blé acclimaté à 4°C (*Triticum aestivum* cv. Frédrick) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les chiffres correspondent au nombre de jours d'acclimamation. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes. (NA= non acclimatée). La membrane a été exposée 2 minutes.

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.

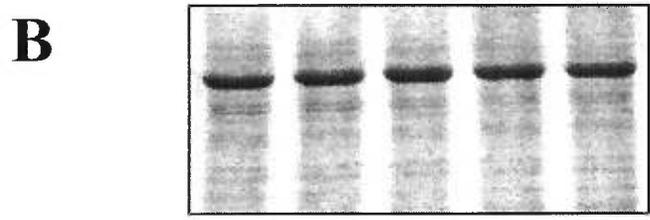
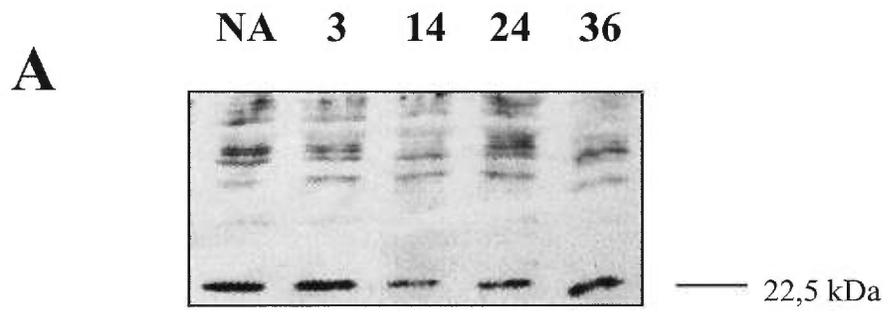
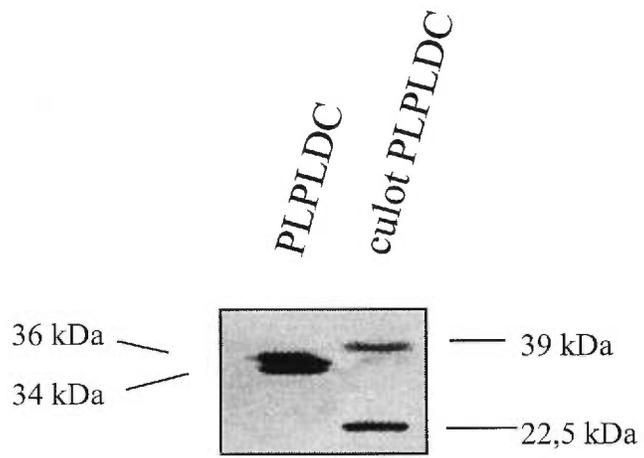


Figure 9. Enrichissement en protéines liant les phospholipides en présence de calcium (PLPLDC) chez le blé.

Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fractions, enrichies en PLPLDC et microsomaux de feuilles de blé acclimaté à 4°C pendant 3 semaines (*Triticum aestivum* cv. Frédrick). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes.



d'acclimatation ont été effectuées en parallèle avec celles des feuilles de luzerne. L'impossibilité d'avoir des extractions reproductibles ne nous permet pas de conclure sur l'accumulation des polypeptides de cette fraction au cours de l'acclimatation au froid.

La dernière étape du protocole d'extraction des PLPLDC comporte une centrifugation à 100000g du lavage EDTA de la fraction phospholipidique. Une extraction au phénol du culot de cette dernière centrifugation nous a permis d'éliminer une grande quantité des phospholipides. L'immunodétection des protéines de cette fraction a identifiée deux polypeptides de 22,5 et 39 kDa. La taille de la p39 (similaire à celle de certaines annexines de mammifère), sa présence dans le culot de la fraction enrichie en PLPLDC (fraction microsomale), la spécificité de son immunodétection et la reproductibilité de son électrotransfert, nous ont amené à poursuivre la caractérisation de ce polypeptide.

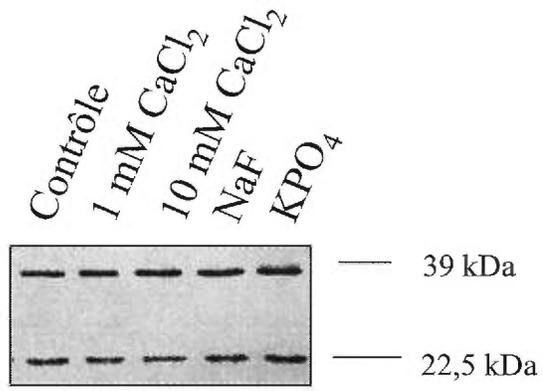
5.2.3 Effets de la composition du tampon sur la quantité de polypeptides immunodéTECTÉS par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuilles

Afin de caractériser la liaison de la p39 avec la fraction microsomale, nous avons utilisé un protocole bien établi d'extraction de fractions microsomales (Uemura et Yoshida, 1984). Le tampon d'extraction de ce protocole contient 10 mM de EGTA. Malgré la présence de ce chélateur spécifique d'ions calcium, une certaine quantité de p39 a été immunodéTECTÉE dans la fraction microsomale (figure 10A-contrôle) de feuilles de blé acclimaté pendant 2 semaines. La liaison de p39 à la fraction microsomale n'est pas influencée par la présence de calcium car la substitution du EGTA par 1 ou 10 mM CaCl_2 n'a pas modifié la quantité de p39 déTECTÉE dans la fraction microsomale (figure 10A). Le remplacement du EGTA par un autre ion (10mM MgCl_2) n'a pas non plus occasionné de changement. L'ajout d'inhibiteur non-spécifique de protéine phosphatase (NaF) ou de protéine kinase (KPO_4) n'a pas non plus permis d'observer de changement dans la quantité de p39 déTECTÉ.

Figure 10. Effet de la composition du tampon d'extraction sur la quantité de protéines immunodétectée avec l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuilles de blé.

Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fraction microsomales (10 μ g) de feuilles de blé acclimatée à 4°C pendant 3 semaines (*Triticum aestivum* cv. Frédrick). Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 10% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été exposées 2 minutes.

A



B

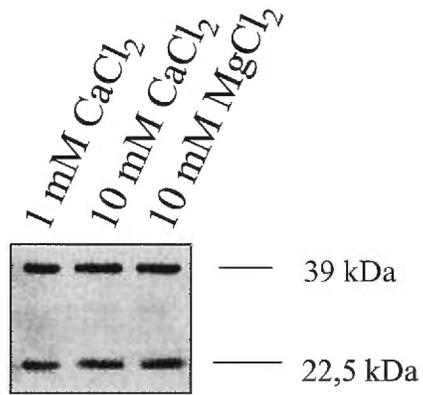
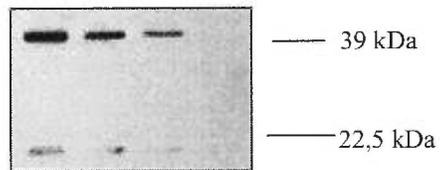


Figure 11. Digestion à la protéinase K d'extrait de protéines de fractions microsomales de blé.

Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fraction microsomales de feuilles de blé acclimatée à 4°C pendant 3 semaines (*Triticum aestivum* cv. Frédrick) en présence ou absence de protéinase K et /ou de Triton X-100 à différentes concentrations. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes.

Protéinase K	-	+	+	+
Triton X-100 (%)	-	-	0,1	1



Afin de pousser plus loin l'investigation de la nature de la liaison de p39 à la fraction microsomale, nous avons effectué des tests de digestion à la protéinase K. Cette enzyme dégrade les protéines de façon non spécifique. Si la protéine immunodétectée est transmembranaire, intégrale ou périphérique mais encastrée dans la membrane, elle sera protégée en partie ou en totalité lors de la digestion avec la protéinase K. Par contre, si elle est périphérique, elle ne sera pas protégée. Nos résultats ont démontré que l'ajout de protéinase K ne permettait pas de dégrader la totalité des p39 immunodétectées (figure 11). Cette dégradation partielle démontre que p39 n'est pas intégrale car une protéine intégrale n'aurait pas été dégradée. De plus, l'absence de détection de fragment de protéolyse de faible poids moléculaire démontre que p39 n'est pas une protéine transmembranaire. Si p39 est périphérique, il y a donc une certaine fraction protégée qui est probablement à l'intérieur des microsomes. L'ajout de deux concentrations de détergent Triton X-100 (0,1 et 1 %) a permis de démontrer qu'une solubilisation partielle ou totale des membranes des microsomes permet à la protéinase K de dégrader une partie ou l'ensemble des p39 immunodétectées dans la fraction contrôle. La détection de p39 en présence de protéinase K et de 0,1% de détergent démontre que cette protéine doit être profondément encastrée dans la bicouche des membranes.

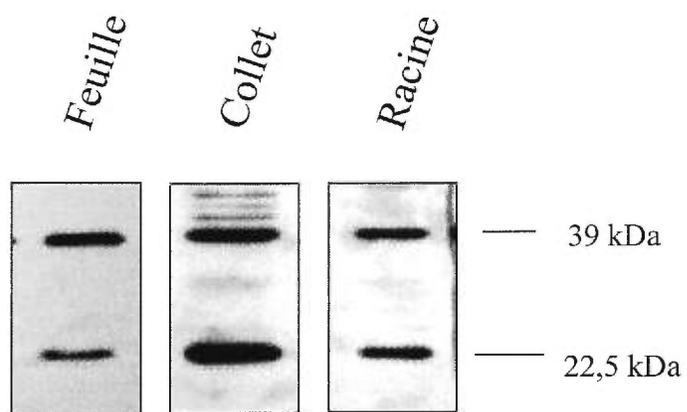
5.2.4 Localisation tissulaire et cellulaire de la p39

La forme de 39 kDa a été détectée dans les fractions microsomales (156 000g) de feuilles, de collets et de racines de blé (figure 12). L'abondance de la p39 dans chaque tissu est équivalente quoique un peu plus élevée dans la fraction du collet. L'anticorps reconnaît aussi le polypeptide de 22,5 kDa dans chacune de ces fractions.

Le fractionnement cellulaire par la technique des deux phases aqueuses de polymères a été mis au point par Uemura et Yoshida (1984) pour l'orge et utilisé par Zhou et al. (1994) pour le blé. Il permet de séparer les microsomes de membranes plasmique d'une fraction

Figure 12. Localisation tissulaire des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 chez le blé.

Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines (10 μ g) de fractions microsomales de différents tissus de blé (*Triticum aestivum* cv. Frédrick) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes.



microsomale totale. La densité spécifique des microsomes de membranes plasmique les transporte dans la phase supérieure lors de la séparation de phases par centrifugation. Une fraction enrichie en membranes plasmique par cette technique a démontré que p39 était détectable dans les deux phases. p39 est donc localisée à la membrane plasmique ainsi que dans les vésicules membranaires présentes dans la phase inférieure. Il est à noter que p22,5 n'a pas été détectée dans la fraction enrichie en membranes plasmique. Elle est donc détectable dans la fraction microsomale mais absente dans la fraction de membrane plasmique. Elle est peut être localisée dans d'autres membranes de la cellule (vacuole, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi,...).

5.2.5 Accumulation au cours de l'acclimatation au froid des polypeptides détectés par l'anticorps anti-AnnLt1 dans la fraction microsomale de feuilles

Dans un dernier effort pour déterminer si la quantité d'une protéine immunologiquement reliée aux annexines variait au cours de l'acclimatation au froid, nous avons extrait des fractions microsomales de blé acclimaté durant différentes périodes. Chaque extraction a été faite en triplicata et plusieurs électrotransferts ont été effectués avec ces échantillons. L'immunodétection de p39 dans chacune des fractions contenant une charge égale de protéine a démontré hors de tout doute que p39 s'accumulait dans la fraction microsomale lors de l'acclimatation au froid chez le blé (figure 13). Cette accumulation augmente de 22 fois après 1 jour d'acclimatation. L'immunodétection de p22,5 était très constante entre les différentes expériences et démontre aussi qu'il y a une augmentation de cette protéine dans la fraction microsomale au cours de l'acclimatation au froid. L'augmentation de p22,5 semble plus graduelle que celle de p39 avec des temps courts.

La figure 14 démontre que l'accumulation de p22,5 et de p39 dans la fraction microsomale du blé d'hiver tolérant (F=Frédrick, LT_{50} -15.6°C) est similaire à celle observée chez le blé de printemps moins tolérant (G=Glenlea, LT_{50} -5.5°C). Ceci suggère

que l'accumulation des deux polypeptides dans la fraction microsomale de ces deux cultivars n'est pas corrélée avec la capacité respective de ces cultivars à s'acclimater au froid. Il est donc fort probable que p22,5 et p39 ne soient pas directement impliquées dans la capacité de tolérer le gel chez le blé.

Figure 13. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez le blé.

A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines (10 μ g) de fractions microsomales de feuilles de blé acclimaté à 4°C (*Triticum aestivum* L. cv. Frédrick) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes. (NA= non acclimatée).

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.

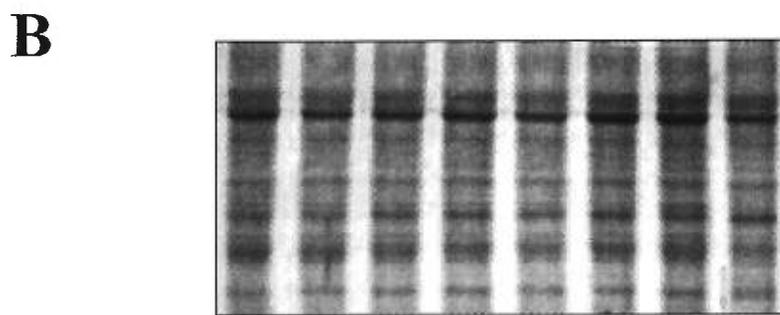
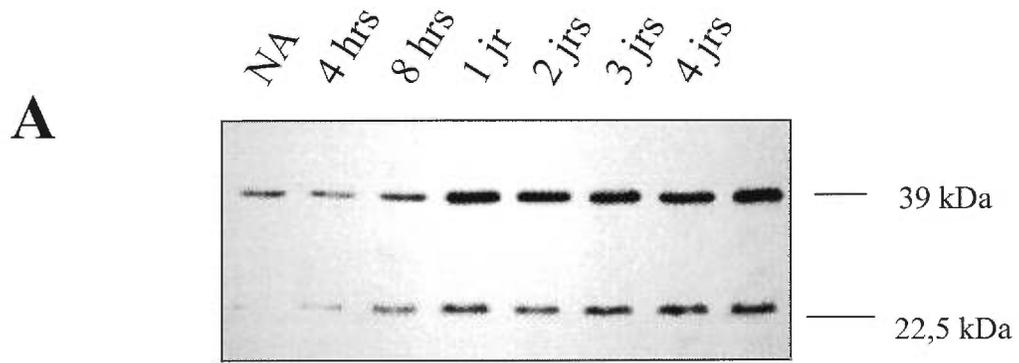
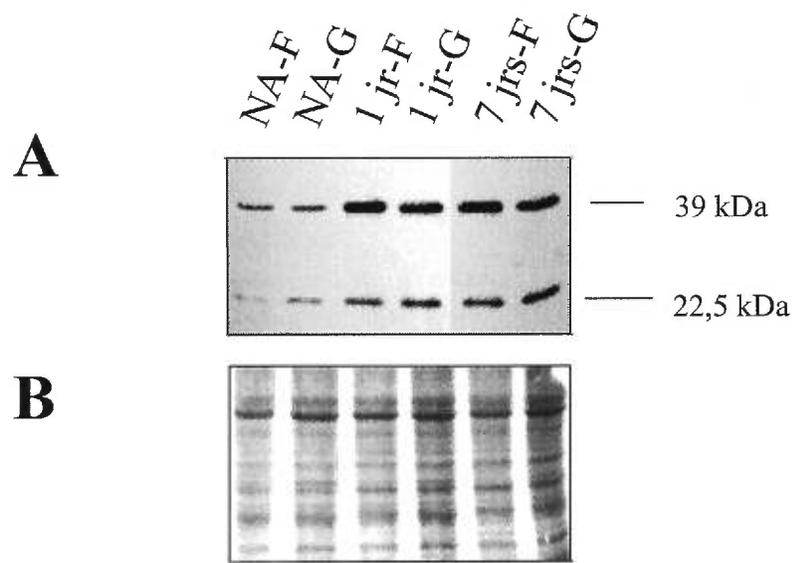


Figure 14. Cinétique d'expression des protéines détectées par l'anticorps anti-AnnLt1 au cours de l'acclimatation au froid chez des cultivars de blé de tolérance variée.

A) Immunodétection avec l'anticorps anti-AnnLt1 des protéines de fractions microsomales (10 μ g) de feuilles de blé acclimatée à 4°C (*Triticum aestivum* L. cv. Frédrick (F) et Glenlea (G)) séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% et électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Les protéines ont été détectées comme à la figure 3. La membrane a été exposée 2 minutes. (NA= non acclimaté)

B) Protéines colorées au bleu de Coomassie R-250.



IV. DISCUSSION

L'acclimatation au froid est un processus très complexe chez les plantes et associé à des modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires. Les modifications moléculaires comprennent l'induction de plusieurs gènes (Hughes et Dunn, 1996). Les mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de l'expression de ces gènes par les basses températures sont mal connus.

De récentes recherches ont démontré l'importance du calcium comme messenger secondaire entre la perception du froid par la plante et l'induction de gènes reliés à l'acquisition de la tolérance au gel (Monroy et Dhindsa, 1995; Knight *et al.*, 1996). Les recherches, tant dans le domaine animal que végétal, sur les processus impliquant les ions calcium ont permis d'identifier une famille de protéines nommée annexine. Les membres de cette famille ont tous la capacité de lier les phospholipides en présence de calcium. Plusieurs groupes de recherches étudient le rôle des annexines dans la régulation des voies de transmission de signal impliquant le calcium (Raynald et Pollard, 1994; Gerke et Moss, 1997). Afin d'étudier le rôle des annexines dans le processus de transmission du signal relié aux basses températures, nous avons caractérisé les annexines d'une monocotylédone et d'une dicotylédone ayant la capacité de s'acclimater au froid.

L'analyse moléculaire des gènes correspondant aux annexines chez les mammifères a démontré qu'ils étaient tous constitués de deux sections. La première comprend quatre domaines répétés (l'annexine VI en possède huit) et la deuxième, une queue amino-terminale de longueur variable. Les domaines répétés qui contiennent les sites de liaison aux phospholipides sont constitués de sous-domaines hautement conservés qui contiennent un site de liaison au calcium. La queue amino-terminale des annexines animales est de longueur variable et confère la spécificité de fonction. Par exemple, les dix annexines clonées chez les mammifères ont toutes des queues amino-

terminales de longueurs différentes. Ces queues contiennent des sites de phosphorylation, des sites de clivage par des protéases spécifiques et des sites de liaison à d'autres protéines (Gerke et Moss, 1997). Malgré l'énorme quantité de données publiées jusqu'à maintenant sur les annexines animales, leurs fonctions exactes restent à déterminer.

Le tableau semble différent pour les annexines végétales malgré le fait qu'elles fixent aussi les phospholipides en présence de calcium. La différence majeure réside dans la structure des gènes clonés jusqu'à maintenant. Ils ne codent pour aucune queue amino-terminale. L'importance de cette section chez leurs homologues animales fait que plusieurs croient que les annexines végétales ont des fonctions différentes (Delmer et Potikha, 1997 et Gerke et Moss, 1997). Trois autres particularités différencient les annexines végétales de leur homologues animales. La famille est moins nombreuse et semble ne contenir pas plus de deux ou trois membres. Les annexines de plantes ne possèdent, théoriquement, que deux sites de liaison pour le calcium (sur les domaines I et IV) (Battey *et al.*, 1996). La disposition des introns, qui est très conservée chez les annexines animales, est différente chez les annexines de plantes (Morgan et Fernandez, 1997).

Dans le but d'étudier le rôle des annexines dans le processus d'acclimatation aux basses températures, nous avons produit un anticorps contre l'annexine recombinante (AnnLt1) de *Lavatera thuringiaca*. Cet anticorps nous a permis d'étudier l'implication des annexines au cours de l'acclimatation au froid (4°C) chez une espèce de monocotylédone, le blé et une espèce de dicotylédone, la luzerne. Nous avons identifié des polypeptides de différentes tailles dans chacune des espèces végétales. Les polypeptides de 34 et 36 kDa sont, de par leurs tailles et leur immunogénicité, plus susceptibles de correspondre aux annexines déjà clonées ou purifiées chez les végétaux. Nous avons également identifié des polypeptides de 22,5; 30; 39; 50; 56 et 58 kDa. Le

polypeptide de 30 kDa de la fraction microsomale de luzerne n'a pas été caractérisé. Le tableau IV résume l'ensemble de ces résultats.

Tableau IV : Polypeptides immunodétectés avec l'anticorps anti-AnnLt1

Plante	Fraction Soluble	Fraction PLPLDC	Fraction microsomale
Luzerne	p22,5 p34/p36 p50 p56/p58	p36	p30 p34/p36
Blé	---	p34/p36	p22,5 p39

1.0 Le doublet p34/p36

La différence de signal immunologique obtenue entre la monocotylédone (blé) et la dicotylédone (luzerne) est un des résultats les plus étonnants de nos recherches. Chez le blé, aucun polypeptide n'a été détecté dans les extraits solubles. Tandis que le doublet p34/p36 était présent en grande quantité dans la fraction soluble de luzerne (sauf les feuilles). D'autres part, l'enrichissement en PLPLDC nous a permis de démontrer que le blé possédait les deux formes du doublet p34/p36. Par contre, cette extraction chez la luzerne ne nous a permis de détecter qu'un seul des polypeptides du doublet (p36). L'absence de p34 dans la fraction des PLPLDC de luzerne et la présence du doublet dans la fraction soluble après précipitation avec les phospholipides a démontré qu'il y avait probablement des formes d'annexine chez la luzerne qui ne possèdent pas la capacité de lier les phospholipides en présence de calcium. Les études sur l'effet de la composition du tampon d'extraction sur la quantité des polypeptides immunodétectés dans la fraction soluble ont aussi démontré que les doublets de cette fraction étaient insensibles au calcium. Nous avons nommé ces formes: non-PLPLDC. Le doublet p34/p36 existe donc

sous forme abondante non-PLPLDC chez la luzerne et sous forme peu abondante PLPLDC chez le blé et la luzerne (seulement p36).

Il est possible que les formes non-PLPLDC existent chez le blé mais que l'immunogénicité avec notre anticorps anti-annexine de dicotylédone soit trop faible pour les détecter. L'anticorps anti-doublet d'annexines p33/p35 de maïs a réagit contre un doublet abondant dans la fraction soluble de monocotylédones: le maïs, *Lilium longiflorum* et *Tradescantia virginia* (Blackbourn et Battey, 1991, 1992).

1.1 Formes non-PLPLDC

La présence de formes non-PLPLDC va à l'encontre du dogme voulant que toutes les annexines possèdent la capacité de lier les phospholipides en présence de calcium. Il n'y a par contre aucune donnée de la littérature qui va à l'encontre de cette possibilité. Il est compréhensible qu'aucune forme non-PLPLDC n'ait été purifiée car le protocole de purification a été conçu pour isoler les formes PLPLDC. Quant aux gènes d'annexines clonés jusqu'à maintenant, aucun d'entre eux n'a encore été associés sans ambiguïté à une annexine purifiée de type PLPLDC (Potikha et Delmer, 1997; Proust *et al.*, 1997b, 1996; Battey *et al.*, 1996; Hoshino *et al.*, 1995; Andrawis *et al.*, 1993; Blackbourn *et al.*, 1991). Il est donc possible qu'un d'entre eux puisse être un gène codant pour une annexine du type non-PLPLDC.

Nous avons déterminé que le doublet non-PLPLDC ne variait pas au cours de l'acclimatation au froid chez la luzerne. Quelle pourrait être la fonction d'une forme non-PLPLDC au cours de l'acclimatation au froid? Il a été démontré qu'un influx de calcium pénètre à l'intérieur de la cellule après un traitement aux basses températures (Knight *et al.* 1991) et que le calcium était nécessaire à l'induction de certains gènes responsable de l'acquisition de la tolérance au gel (Monroy *et al.*, 1993). Comment la cellule régule-t-elle cette hausse de calcium intracellulaire? Pour des stress comme le

vent et le toucher, qui implique des influx de calcium provenant de source intracellulaire (Knight *et al.* 1992), il a été démontré qu'un transcrit codant pour une calmoduline augmentait (Braam et Davis, 1990). La calmoduline est une protéine pouvant séquestrer les ions calcium. On croit qu'elle régule l'homéostasie du calcium durant ces stress. Récemment, Monroy et Dhindsa (1995) ont montré que le transcrit de la calmoduline ne variait pas au cours de l'acclimatation au froid (influx de calcium provenant d'une source extracellulaire) ce qui indique qu'elles ne sont pas impliquées dans l'homéostasie du calcium pendant ce stress. Ils proposent comme alternative que la vacuole jouerait un rôle de tampon pour maintenir l'homéostasie du calcium cytosolique. L'entrée de calcium dans la vacuole est régulée par une pompe à proton dépendante de l'ATP qui fait entrer les protons à l'intérieur de la vacuole. Cette entrée provoque un gradient qui active un antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ qui repousse les protons à l'extérieur de la vacuole en faisant entrer le calcium. L'alternative proposée par Monroy et Dhindsa n'est peut être pas possible car Yoshida (1995) a observé une inactivation des pompes à proton dépendante de l'ATP lors de basses températures. Cette inactivation doit donc empêcher l'activation des antiports $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. Devant cet état de fait, il est possible de proposer qu'une annexine ayant perdue sa capacité de lier les phospholipides en présence de calcium mais possédant encore la capacité de fixer les ions calcium puisse être impliquée dans la séquestration de cet ion au cours de l'acclimatation au froid. La nature des formes non-PLPLDC reste à prouver pour poursuivre les recherches en vue de confirmer cette hypothèse.

1.2 Formes PLPLDC

En ce qui concerne les formes régulières du doublet d'annexine. L'irreproductibilité de l'extraction des protéines liant les phospholipides en présence calcium ne nous a pas permis de savoir si p34 et p36 s'accumulaient au cours de l'acclimatation au froid chez le blé et la luzerne (p36).

La littérature sur les annexines de plantes porte presque uniquement sur l'identification du doublet \approx p33/p35. Plusieurs fonctions ont été proposées jusqu'à maintenant. Elles sont résumées dans le tableau V. Dans l'impossibilité d'associer nos formes de p34 et de p36 à l'une de ces fonctions, nous avons proposé des rôles à certaines de ces caractéristique.

Tableau V : Résumé des annexines caractérisées chez les végétaux

Source	Sujet d'étude	Protéine PLPLDC	Particularités	Gènes clonés	Expression génique
Maïs	Exocytose	p33 p35	-activité phosphodiesterase -tests avec liposomes et vésicules	2	-abondance croissante du premier au troisième mm de la racine.
Tomate	Transmission de signal	p34 p35.5	-liaison à l'actine -activité phosphodies-térase	-	
Céleri	Formation de la vacuole	p42	-corrélation avec le volume de la vacuole -liaison au calcium	-	
Coton	facteur inhibant la callose synthase	p34	-liaison à la callose synthase	2	-transcrit abondant durant la phase d'élongation des fibres
Poivron (2 équipes)	Mûrissement (exocytose)	p35	-tests avec liposome	1	-augmente durant le mûrissement du fruit
Fraisier	Mûrissement (exocytose)	non isolée		1	-augmente durant le mûrissement du fruit -spécifique au fruit
Pois	Élongation du tube pollinique (exocytose)	p35	-immunolocalisation	-	
<i>Bryonia dionica</i>	Thigmomorpho-génèse	p33 p35	-immunolocalisation	-	
Arabidopsis	réchappe mutant OxyR d' <i>E.coli</i>	non isolée	-activité peroxydasique	1	-augmente avec stress oxy-datif (H ₂ O ₂ et acide salicylique)

L'équipe de Deborah Delmer a isolé une annexine inhibant l'activité callose synthase chez le coton (Andrawis *et al.*, 1993; Potikha et Delmer, 1997). Récemment, ils ont identifié une sucrose synthase membranaire (Amor *et al.*, 1995). Ils proposent que cette enzyme canalise l'UDP-glucose vers la callose synthase et la cellulose synthase au niveau de la membrane plasmique. Dans leur revue de littérature sur les annexines, (Delmer et Potikha, 1997) ils citent les travaux de Shin *et al.* 1995. Cette équipe a aussi isolé l'annexine comme inhibiteur de la callose synthase chez le coton. Dans leur résumé de poster, Shin *et al.*, (1995) proposent que les annexines sont d'importants régulateurs de la synthèse de la callose et de la cellulose. Il a été démontré que les stress osmotiques affectent les propriétés mécaniques de la paroi cellulaire des plantes. Kazuyuki *et al.* (1997) ont déterminé que la paroi des cellules ayant subi un stress osmotique (60 mM PEG 4000) demeuraient extensibles comparées à celle des cellules témoins. Ils ont aussi remarqué que ce stress osmotique ralentissait la synthèse normale de la cellulose mais ne faisait pas varier le contenu en hémicellulose. Les auteurs ont proposé que la cellulose soit un constituant déterminant des propriétés mécaniques de la paroi et que la cellule bloquait la production normale de cellulose durant un stress osmotique afin de permettre à la paroi d'être plus extensible. Le stress provoqué par les basses températures est considéré en partie comme un stress osmotique lorsque l'eau sort de la cellule due au gel de l'eau extracellulaire. Il est donc possible que les annexines inhibent graduellement la cellulose synthase lors d'une baisse de température pour préparer la paroi à être plus extensible lors de la venue du gel.

Singh et Laroche (1984) ont observé une augmentation du nombre de vésicules de sécrétion au cours de l'acclimatation au froid de l'épicotyle de blé et d'orge. En 1988, ils proposaient que ces vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique pourraient être un moyen d'altérer la composition lipidique de la membrane. De plus, Zhou *et al.* (1994) ont identifié plusieurs protéines membranaires qui augmentaient au cours de l'acclimatation au froid chez le blé. Le transport des lipides et des protéines membranaires se fait par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion. Sans être excrétés à

l'extérieur de la cellule, ces constituants sont transportés à la membrane et se positionnent par des processus encore peu connus. Plusieurs groupes de recherche étudient l'implication des annexines dans le transport vésiculaire et la fusion des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique chez les plantes (Wilkinson *et al.* 1995; Clark *et al.*, 1992, 1995b; Battey et Blackbourn, 1993; Battey *et al.* 1996; Blackbourn et Battey, 1993; Blackbourn *et al.*, 1991, 1992; Hoshino *et al.*, 1995; McClung *et al.*, 1994; Proust *et al.* 1996). Considérant l'augmentation du nombre de vésicules de sécrétion au cours de l'acclimatation au froid, il est possible que les annexines jouent un rôle important dans le processus de transport par vésicules de sécrétion des lipides et des protéines vers la membrane plasmique.

Les travaux récents de l'équipe de Dianna Bowles (Calvert *et al.*, 1996) avec les annexines de suspension cellulaire de tomate ont démontré que les annexines p34 et p35.5 possédaient une activité phosphodiesterase et qu'elles pouvaient lier l'actine F (filamenteuse) en présence de calcium (respectivement à 100 et 300 μM de Ca^{2+}). Ils proposent que p34 et p35.5 pourraient jouer un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Danyluk *et al.* (1996) ont isolé un ADNc codant pour une ADF (facteur de dépolymérisation de l'actine) chez le blé qui s'accumule au cours de l'acclimatation au froid. Les auteurs ont suggéré que cette protéine pourrait être impliquée dans un processus de modifications du cytosquelette lors de l'acclimatation au froid afin de rendre la cellule moins rigide et par conséquent moins sensible aux dommages mécaniques pouvant être causés par le gel. D'autres résultats obtenus par Kerr et Carter (1990) suggèrent qu'il y a une restructuration du cytosquelette lors d'un stress aux basses températures. Une annexine possédant la capacité de lier l'actine et les phospholipides dépendamment du calcium pourrait avoir un rôle lors d'un stress impliquant un influx de calcium à la surface interne de la membrane plasmique et une restructuration du cytosquelette d'actine.

Gidrol *et al.* (1996) ont démontré que la transformation d'*E. coli* avec un ADNc d'annexine d'*Arabidopsis* permettait à un mutant OxyR de survivre en présence d'une haute concentration de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette récupération a été associée à une activité peroxydase de l'annexine d'*Arabidopsis*. Un traitement au H_2O_2 provoque un influx de calcium similaire à celui observé pour le stress aux basses températures (Knight *et al.*, 1996). Ce traitement induit aussi la tolérance au froid et certains gènes liés à la tolérance au froid chez une espèce sensible de maïs (Prasad *et al.*, 1994). Des travaux récents proposent aussi un rôle de second messenger pour le H_2O_2 (Medina *et al.*, 1997 et Foyer *et al.*, 1997). L'annexine ayant une activité peroxydase pourrait agir dans la voie de transmission de signal comme modulateur. Plusieurs équipes ont observé des augmentations de transcrits d'annexine ou des translocation d'annexine durant différents stress comme le pincement de l'entre-nœud, la blessure, le traitement à l'acide salicylique et le H_2O_2 (Thonat *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 1996 et Gidrol *et al.*, 1996). Ces stress sont soit mécaniques ou oxydatifs et ont déjà été relié à un influx de calcium intracellulaire. Il est possible que pour ce type de stress, qui inclut l'induction de la tolérance au froid, et peut être aussi une induction précoce de la tolérance au gel, les annexines induites faiblement puissent jouer un rôle de régulateur de signal en étant transloquées à la membrane pour agir comme peroxydase localisée.

Il a été démontré que la concentration de H_2O_2 à l'intérieur de la cellule augmentait durant le stress à 4°C chez une espèce de maïs sensible au froid (Prasad *et al.*, 1994). Les auteurs proposent que le H_2O_2 s'accumulerait chez ces plantes sensibles qui n'ont pas été acclimatées à la fraîche (14°C) et deviendrait dommageable pour la cellule. L'annexine exprimée en grande quantité pourrait agir comme agent de détoxification. Selon ce modèle, les plantes sensibles comme le maïs ne produiraient pas assez d'annexine car elles ne survivent pas aux dommages causés par un traitement de 7 jours à 4°C. Seules certaines plantes tolérantes au froid (comme le blé) ou transgéniques produisant une grande quantité d'annexine pourraient survivre à une production élevée de H_2O_2 . Récemment, Venkateswari, Kanrar *et al.* (1997) ont présenté des résultats qui

vont dans le sens d'un rôle d'agent détoxiquateur pour l'annexine-peroxydase d'*Arabidopsis*. La transformation de la moutarde indienne avec l'annexine-peroxydase a rendu la plante tolérante à plusieurs stress (salin, sécheresse, oxydatif et pathogéniques).

2.0 p22,5

Le polypeptide de 22,5 kDa (p22,5) était présent dans la fraction soluble de luzerne et dans les fractions totale et microsomale de blé. Ces résultats suggèrent qu'il est différent chez la luzerne et le blé. Chez la luzerne, il est soluble et présent en grande quantité et chez le blé, il est membranaire. Il est à noter que la p22,5 n'était pas présente dans la fraction riche en membrane plasmique. Elle est donc localisée sur un autre type de membrane puisqu'elle est présente dans la fraction microsomale. Blackbourn *et al.* (1991) ont isolé un polypeptide de 22kDa dans leur fraction de PLPLDC de coléoptile de maïs. Il est à noter que leur anticorps anti-doublet p33/p35 ne reconnaît pas la p22. Des tests de liaison à des liposomes de différentes compositions ont permis d'observer que p22 était plus sensible au calcium que les annexines p34 et p35. Par contre, p22, contrairement à p34 et p35, ne permettait pas l'agrégation des liposomes. Blackbourn *et al.* notent que Khanna *et al.* (1990) ont aussi identifié une protéine de 22 kDa dans un extrait de PLPLDC de cellules de poumon de bœuf.

Proust et al (1996) ont détecté une p20 dans des extraits de protéines solubles de feuilles et de fruits verts de poivrons avec l'anticorps anti-doublet p33/p35 de maïs. Ces protéines pourraient être les homologues de celles que nous avons identifiées dans les extraits solubles chez la luzerne. L'équipe travaillant avec l'entre-nœud de *Bryonia* a identifié un polypeptide de 23 kDa dans l'extrait de protéines membranaires avec l'anticorps anti-p35 de pois et la bande n'était pas visible dans les extraits de protéine solubles. Cette réponse est la même que nous avons obtenue avec notre anticorps chez le blé.

Ces résultats suggèrent qu'il y a probablement une forme d'annexine de 22 kDa chez les végétaux. Cette protéine correspond peut être à une annexine clivée par une protéase spécifique ou à une protéine de plus faible poids moléculaire codée par un gène plus court que celui des annexines clonées jusqu'à maintenant. Il n'est pas possible de proposer une fonction pour cette p22,5 avant d'avoir caractérisé davantage cette protéine.

3.0 p50 et le doublet p56/p58 chez la luzerne

Plusieurs autres polypeptides ont été identifiés. Il semble que leur localisation tissulaire ou cellulaire soit spécifique. Chez la luzerne, on retrouve le doublet 56/58 kDa dans les racines, le collet et la tige. La quantité de ce doublet décroît d'échantillon en échantillon du bas de la tige jusqu'au haut. Nous avons aussi identifié un polypeptide de 50 kDa qui a une localisation tissulaire à l'inverse du doublet 56/58 kDa. Sa distribution dans la plante va en augmentant du collet au haut de la tige. Ces trois polypeptides ont été détectés dans les extraits de collet traités aux basses températures et nous n'avons observé aucune variation quantitative au cours de la période d'acclimatation.

Des études d'immunodétection chez les fougères *Dryopteris filix-mas* et *Anemia phyllitidis* avec les anticorps anti-p35 de pois et anti-annexine V de poulet ont révélées un doublet de polypeptides d'environ 70 kDa dans les extraits solubles des gamétophytes (Clark *et al.*, 1995). Une p70 a été détectée chez le pois (Clark *et al.*, 1995) et une p68 dans des extraits solubles de *Tradescantia virginia* et de *Lilium longiflorum* (Blackbourn *et al.*, 1991), ainsi que dans des extraits de PLPLDC de maïs (McClung *et al.* 1994), de tomate et de patate (Smallwood *et al.*, 1992).

Quelle est la nature de ces polypeptides de haut poids moléculaires? En 1996, Calvert *et al.* ont associé une activité phosphodiesterase à un polypeptide de 70 kDa. L'échantillon correspondait aux annexines p34 et p35.5 sur gel dénaturant. Il y a donc formation de dimère dans la cellule. La faible résolution du gel natif ne leur permettait

pas de déterminer si le signal correspondait à des homodimères p34/p34 et p35.5/p35.5 ou à des hétérodimères p34/p35.5. Des études de chromatographie d'affinité avec une colonne d'annexine p35 de poivron ont démontré que p35 ne fixait en majorité que d'autres p35 (Hoshino *et al.*, 1995). Ces résultats démontrent aussi que la formation d'un dimère d'annexine est possible. Les polypeptides que nous observons sont préalablement dénaturés avant l'électrophorèse. Il pourrait donc s'agir de dimère stable. Des études effectuées avec l'annexine I ont démontré qu'elle pouvait être présente sous forme de dimère stable dans la cellule animale (Pepinsky *et al.* 1989). La liaison covalente était le résultat d'une transglutamination de deux annexine I en position 18 de leur queue amino-terminale. Les annexines de plantes ne possédant pas de queue amino-terminale, cette liaison se fait peut être ailleurs sur le polypeptide. Les formes que nous avons identifiées (doublet p56/58 et p50) pourraient correspondre à un agencement dimérique stable d'une des formes p34, p36 ou p22,5 kDa. À ce moment-là, l'ensemble des rôles que nous avons proposé pour les annexines p34 et p36 pourraient être proposés pour ces dimères.

4.0 p39 chez le blé

4.1 Caractéristiques

L'immunodétection de la p39 dans le culot du lavage EDTA des PLPLDC signifie que ce polypeptide ne lie pas les phospholipides de manière dépendante du calcium. Ce caractère a été confirmé en extrayant la fraction microsomale avec de l'EGTA ou différentes concentrations de calcium. p39 est présente dans la racine, le collet et la feuille. Nous l'avons localisé au niveau de la membrane plasmique en utilisant la technique de séparation en deux phases aqueuses de polymère (Uemura et Yoshida, 1984). Une analyse biochimique par protection à la protéinase K a démontré que p39 est fortement incrustée dans la membrane de façon périphérique. Nous avons ensuite démontré que p39 était présente dans la fraction microsomale de blé non

acclimaté et qu'elle s'accumulait au cours de l'acclimatation au froid. Il y a une augmentation d'un facteur 22 entre la 8^{ième} et la 24^{ième} heure de traitement à 4°C.

La seule équipe ayant caractérisé une annexine végétale autre que celle du doublet p34/p36 est celle de Randall. Ils ont identifié une p42 associée à la vacuole chez le céleri (Seals *et al.*, 1994). L'association est dépendante du calcium et est corrélée avec l'expansion de la cellule (Seals et Randall, 1997). Le gène correspondant à VCaB42 n'a pas été cloné. Ils spécifient que la localisation de leur p42 n'est peut être pas spécifique au tonoplaste. Ils ont immunodéetecté des homologues de VCaB42 dans les extraits de protéines solubles de maïs, de soya, d'avoine, de pois et de coton. La présence du polypeptide dans la fraction soluble de deux monocotylédones (maïs et avoine) et le caractère dépendant du calcium de la liaison à la membrane du tonoplaste nous laisse croire que ce polypeptide n'est pas la p39 que nous avons identifié chez le blé.

4.2 Homologie avec les annexines I et II de mammifères

Nous avons identifié une annexine de 39 kDa qui s'accumule dans la fraction membranaire au cours de l'acclimatation au froid. La liaison est résistante au EGTA et périphérique. Toutes les annexines végétales caractérisées jusqu'à maintenant possèdent une liaison à la membrane sensible au chélateur de calcium. Les annexines I et II des mammifères possèdent des isoformes qui peuvent s'attacher à la membrane de manière indépendante du calcium (Gerke et Moss, 1997). Les homologues de ces annexines n'ont jamais été identifiés chez les végétaux.

Nous croyons que p39 est un homologue de l'annexine I ou de l'annexine II des mammifères. Les gènes des annexines I et II codent respectivement pour des protéines du même poids moléculaires que l'annexine p39 de blé (38,6 et 38,5 kDa) (Raynald et Pollard, 1994). De plus, comme l'annexine p39 de blé, ces annexines sont localisées à la membrane plasmique et peuvent être relocalisé lors de certains stress.

Il y a donc quatre caractéristiques reliées à p39 qui nous permettent de croire qu'elle est un homologue de l'annexine I ou II de mammifère:

- a) son poids moléculaire
- b) sa localisation membranaire
- c) sa liaison à la membrane résistante au chélateur de calcium
- d) sa capacité d'être influencée par certains stress

Chez les cellules de fibroblaste humain, les annexines I et II sont localisées à la membrane plasmique. L'annexine II a un patron de localisation homogène le long de la membrane tandis que celui de l'annexine I est très ponctué (Barwise et Walker, 1996). Il a été démontré qu'un influx de calcium intracellulaire relocalisait l'annexine II à des endroits particuliers de la cellule. Blanchard *et al.* (1996) ont démontré le même phénomène chez des neuroblastomes humains. Liu *et al.* (1997) ont démontré qu'il y avait deux groupes distincts d'annexine II associés à la membrane plasmique des cellules épithéliales de poumon. Un de ces deux groupes a une liaison à la membrane résistante au EGTA. Une autre équipe de recherche ont fait la même distinction pour l'annexine I chez les cellules du placenta humain (Sheets *et al.*, 1987).

Il est aussi très intéressant de faire le parallèle entre la relocalisation de l'annexine II après l'entrée de calcium intracellulaire et l'augmentation que nous avons observé dans la fraction microsomale lors de l'acclimatation au froid. Plusieurs équipes ont observé un influx de calcium aux premiers instants de la réponse aux basses températures (Knight *et al.*, 1996 et Minorsky et Spanswich, 1989). Il a aussi été observé que certaines réponses aux basses températures étaient similaires à d'autres observées pour le stress oxydatif (Prasad *et al.*, 1994). Il est donc probable qu'une certaine composante du signal relié au froid soit perçue comme un stress oxydatif. Il a été démontré que le transcrit et la protéine de l'annexine II membranaire augmentaient après un stress oxydatif induit par le NO₂ dans les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire (Li *et al.*, 1997). Nos

résultats suggèrent que p39 est peut être un homologue de l'annexine I ou II chez les végétaux et qu'elle a une fonction importante lors de l'acclimatation au froid chez le blé.

4.3 p39 comme annexine I au cours de l'acclimatation au froid

De plus en plus d'indices laissent croire qu'il y aurait une voie de signalisation impliquant des acides gras comme messager secondaire chez les végétaux (Mazliak, 1997 et Scherer, 1995). Il a été démontré que des produits de réaction de la PLA₂ activaient le système d'oxydo-réduction de la membrane plasmique de la fève de soya (Brightman *et al.*, 1991), que l'auxine activait une PLA₂ de concombre (Scherer et André, 1989) et que des inhibiteurs spécifiques de PLA₂ animales inhibaient la croissance cellulaire dépendante de l'auxine (Scherer et Arnold, 1997). La voie de transmission de signal impliquant la PLA₂ a été beaucoup plus étudiée chez les cellules animales mais elle n'est pas encore élucidée complètement. Croxtall *et al.* (1995 et 1996) voient l'annexine I comme une protéine régulatrice de cette voie de transmission. Il a été démontré que le facteur de croissance épidermique stimulait le relâchement d'acide arachidonique (activité de la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂)) et la phosphorylation de la cPLA₂. Il a aussi été démontré que la forme phosphorylée de la cPLA₂ était beaucoup plus active que la forme non-phosphorylée. Un traitement à la dexaméthasone (un analogue des glucocorticoïdes) empêche le relâchement d'acide arachidonique et la phosphorylation de la cPLA₂ suite à l'ajout du facteur de croissance épidermique. L'ajout d'un anticorps anti-annexine I ou d'un peptide correspondant à sa région amino-terminale inhibent l'effet inhibiteur de la dexaméthasone sur la cPLA₂. Le mécanisme d'inhibition proposé ne peut pas être le mécanisme de d'obstruction de substrat généralement accepté car le peptide utilisé correspondait à une portion de l'extrémité amino-terminale de l'annexine qui ne contient pas de site de liaison aux lipides. Les auteurs croient qu'après l'induction du récepteur de facteur de croissance, la cPLA₂ est phosphorylée par une voie de transmission impliquant des MAPKs. Cette phosphorylation permet l'activation de la cPLA₂ et provoque la synthèse massive d'acide

arachidonique. Cette molécule est métabolisée en plusieurs autres molécules et le tout produit une myriade d'effet à l'intérieur de la cellule. La régulation de cette voie de transmission se ferait par l'intermédiaire des glucocorticoïdes. Leurs résultats ont démontré que l'annexine I ferait partie du mécanisme intracellulaire de contrôle de la réponse au facteur de croissance en inhibant la phosphorylation de la cPLA₂ ce qui mènerait à l'inhibition de son activité (Croxtall *et al.*, 1996). Puisqu'il est fort possible qu'une voie de transmission similaire existe chez les plantes, la p39 (homologue à l'annexine I) pourrait avoir le même rôle de régulateur en inhibant la cPLA₂. L'accumulation de la p39 à la membrane plasmique après 1 jour d'acclimatation au froid pourrait être corrélée avec l'inhibition d'une voie de transmission très efficace induite immédiatement au début du traitement à 4°C et qui impliquerait une cPLA₂.

4.4 p39 comme annexine II lors de l'acclimatation au froid

Récemment, Nilius *et al.* (1996a) ont démontré que l'activation de canaux chloriques, par un stress mécanique ou un changement du volume cellulaire, était sensible au statut hétérotétramérique de l'annexine II et de p11. p11 est une protéine reliée à la famille des protéines S-100 liant le calcium (Raynald et Pollard, 1994). La p11 n'a pas été identifié chez les plantes. Le site de liaison de p11 sur l'annexine II est situé sur la queue amino-terminale. Dans la cellule animale, on retrouve les annexines II sous la forme monomérique et hétérotétramérique (avec p11). On croit que les deux formes ont des rôles séparés. Les canaux chloriques activés par le volume de la cellule ($I_{Cl, vol}$) sont un type particulier de canal ionique. Ils sont impliqués dans une grande variété de fonction comme la régulation du volume cellulaire, la transmission de signal impliquant les ions calcium, la division cellulaire et la régulation du pH (Nilius *et al.* 1996b). Lorsqu'on traite des cellules CPAE (cellule de l'artère pulmonaire de veau) avec une solution hypotonique, il se produit une ouverture des canaux chlorique et une sortie d'ion chlore. Lors d'un traitement répétitif, l'amplitude de la réponse des canaux chlorique ne varie pas. Nilius *et al.* (1996a) ont démontré qu'une cellule chargée d'un

peptide correspondant au site de liaison de p11 sur l'annexine II provoquait une diminution de 28% de l'amplitude de la réponse à un traitement répétitif avec la solution hypotonique. L'utilisation d'un peptide mutant contenant une seule mutation qui réduit de 1000 fois l'affinité de p11 pour l'annexine II n'a eu aucun effet sur l'amplitude du signal lors du traitement répétitif. Ces résultats démontrent que la réceptivité des canaux chloriques aux changements extracellulaires est affectée lorsqu'on empêche la liaison p11-annexine II par compétition avec un peptide spécifique. Les auteurs concluent que le complexe annexine II-p11 module directement ou indirectement les canaux chloriques des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire. Dans leur revue sur les annexines, Gerke et Moss (1997) vont encore plus loin dans l'interprétation des résultats de Nilius *et al.* (1996a). En sachant que l'annexine II peut lier l'actine F et les phospholipides en présence de calcium, il est possible que l'hétérotétramère lie la membrane plasmique au cytosquelette. D'un côté, il y aurait une annexine II liée au cytosquelette d'actine et de l'autre, une annexine II liée à la membrane plasmique. Ces deux annexines seraient reliées ensemble par un doublet de p11. Ils proposent que cette configuration pourrait être requise dans des domaines membranaires pour donner une rigidité à la membrane plasmique nécessaire à la perception de stress mécanique. Récemment, Murata et Los (1997) ont spéculé sur le mécanisme de perception de la température chez les plantes. Ils croient que la cellule végétale est munie de senseur qui perçoivent des transitions de phase lipidique dans des microdomaines de la membrane plasmique qui surviendraient lors de baisse de température. Nous croyons que p39 (comme annexine II) peut jouer ce rôle de senseur proposer par Murata et Los (1997) lors de l'acclimatation au froid. L'accumulation de p39 pourrait être corrélée avec le besoin de la cellule d'être informée le plus précisément possible de la température extérieure. Plus la température descend, plus elle envoie des senseurs à la membrane pour s'ajuster aux rudesses des conditions extérieures. Il est possible aussi que p39 puisse agir simultanément, au moment de la perception de la transition de phase des lipides membranaires, comme un canal calcique *in vivo* et induire la réponse au froid menant à la tolérance au gel une activité de canal calcique a été démontrée pour l'annexine II (Gerke et Moss, 1997).

V.CONCLUSION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis de caractériser les annexines au cours de l'acclimatation au froid chez une espèce de monocotylédone, le blé et une espèce de dicotylédone, la luzerne. Ces deux espèces végétales possèdent la capacité de développer la tolérance au gel.

L'anticorps anti-annexine *AnnLtl* recombinante de *Lavatera thuringiaca* que nous avons produit a révélé des patrons de protéines très différents pour la monocotylédone et la dicotylédone. L'anticorps n'a rien détecté dans les extraits solubles de blé tandis que six polypeptides de 22,5; 34; 36; 50; 56; 58 kDa ont été détecté dans ces extraits chez la luzerne. Ils sont présents dans tous les tissus sauf les feuilles. Une caractérisation de ces polypeptides a démontré que leur quantité dans la fraction soluble n'était pas influencée par l'ajout, dans le tampon d'extraction, d'agents chélateur de calcium, de calcium ou de détergent solubilisant les membranes. De plus, l'immunodétection des fractions d'une extraction des protéines liant les phospholipides en présence de calcium a démontré qu'une grande partie des polypeptides identifiés dans la fraction soluble ne suivait pas les lipides en présence de calcium. L'ensemble de ces résultats indique la présence chez la luzerne, d'annexines de différents poids moléculaire qui sont soit insensible au calcium, aux phospholipides ou au deux à la fois. Nous avons démontré que ces polypeptides ne s'accumulait pas au cours de l'acclimatation au froid chez la luzerne.

L'immunodétection des fractions d'extraction de protéines liant les phospholipides en présence de calcium chez la luzerne et le blé a aussi permis d'identifier les homologues du doublet d'annexines végétales identifiées dans la littérature. Malheureusement, l'irreproductibilité de l'étape de précipitation avec les phospholipides ne nous a pas permis d'obtenir des résultats quantitatifs démontrant une accumulation au cours de l'acclimatation au froid.

Par contre, l'anticorps a aussi détecté des polypeptides de 22,5 et 39 kDa dans la fraction microsomale lors de l'extraction des protéines liant les phospholipides de manière dépendante du calcium. La présence de ces polypeptides dans cette fraction indique qu'ils sont liés assez fortement à la membrane pour ne pas être détachés par le lavage final avec l'EDTA. La caractérisation de ces polypeptides dans des extractions de fractions microsomales a permis de démontrer que leur attachement à cette fraction n'était ni influencée par le calcium ni par les chélateur de calcium (EDTA et EGTA). Nous avons déterminé que p39 était présent dans une fraction enrichie en membrane plasmique par la technique de séparation en deux phases.

La localisation à la membrane plasmique, le caractère indépendant du calcium pour la liaison aux membranes et le poids moléculaire de p39 font en sorte que cette protéine est fort probablement un homologue des annexines I ou II de mammifères qui possèdent aussi ces particularités.

L'annexine p39 augmente d'un facteur 22 dans le culot de la fraction microsomale de blé après un jour d'acclimatation au froid et cette augmentation n'est pas corrélée avec le niveau de tolérance au gel chez un cultivar de printemps et un cultivar d'hiver. Ces résultats suggèrent que p39 jouent un rôle au début de la réponse aux basses températures, possiblement comme régulateur de la transmission du signal relié au froid ou de l'exocytose de certaines protéines nécessaires à la protection à l'extérieur la cellule.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Ali, S.M., Geisow, M.J. et Burgoyne, R.D. (1989) A role for calpactin in exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature*. 340: 313-315.

Amor, Y., Haigler, C.H., Jonhson, S., Wainscott, M. et Delmer, D.P. (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 92: 9353-9357.

Andrawis, A., Solomon, M., et Delmer, D.P. (1993) Cotton fiber annexins: a potential role in the regulation of callose synthase. *The Plant journal*. 3: 763-772.

Bartels, D. et Nelson, D. (1994) Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant, Cell and Environment*. 17: 659-667.

Barwise, J.L., et Walker, J.H. (1996) Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts. *Jouranal of Cell Science*. 109: 247-255.

Batthey, N.H. et Blackbourn, H.D. (1993) The control of exocytosis in plant cells. *New Phytologist*. 125: 307-338.

Batthey, N.H., James, N.C. et Greenland, A.J. (1996) cDNA isolation and gene expression of maize annexins p33 and p35. *Plant Physiology*. 112:1391-1396.

Benz, J. et Hofmann, A. (1997) Annexins: from structure to function. *Biological Chemistry*. 378: 177-183.

Berberich, T. et Kusano, T. (1997) Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Molecular and General Genetics*. 254: 275-283.

Berendes, R., Voges, D., Demange, P., Huber, R. et Burger, A. (1993) Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science*. 262: 427-430.

Biener, Y. Feinstein, R., Mayak, M., Kaburagi, Y., Kadowaki, T. et Zick, Y. (1996) Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin recetor internalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 29489-29496.

Blackbourn, H.D., Barker, P.J., Huskisson, N.S. et Batthey, N.H. (1992) Properties and partial protein sequence of plant annexins. *Plant Physiology* 99: 864-871.

Blackbourn, H.D. et Battey, N.H. (1993) Annexin-mediated secretory vesicle aggregation in plants. *Physiologia Plantarum*. 89: 27-32.

Blackbourn, H.D., Walker, J.H. et Battey, N.H. (1991) Calcium-dependent phospholipid-binding proteins in plants - their characterisation and potential for regulating cell growth. *Planta*. 184: 67-73.

Blanchard, s., Barwise, J.L., Gerke, V., Goodall, A., Vaughan, P.F.T. et Walker, J.H. (1996) Annexins in the human neuroblastoma SH-SY5Y: demonstration of relocation of annexins II and V to membranes in response to elevation of intracellular calcium by membrane depolarisation and by calcium ionophore A23187. *Journal of Neurochemistry*. 67: 805-813.

Boustead, C.M., Smallwood, M., Small, H., Bowles, D.J. et Walker, J.H. (1989) Identification of calcium-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells. *FEBS Letters*. 244: 456-460.

Braam, J. et Davis, R.W. (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell*. 60: 357-364.

Brightman, A.O., Zhu, X.Z. et Morré, D.J. (1991) Activation of plasma membrane NADH oxidase activity by products of phospholipase A. *Plant Physiology*. 96: 1314-1320.

Burger, A., Berendes, R., Liemann, S., Benz, J., Hofmann, A., Gottig, P., Huber, R., Gerke, V., Thiel, C., Romisch, J. et Weber, K. (1996) The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *Journal of Molecular Biology*. 257: 839-847.

Burke, M.J., Gusta, L.V., Quamme, H.A., Weiser, C.J. et Li, P.H. (1976) Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 27: 507-528.

Cadieux, C., Sarhan, F. et Perras, M. (1988) Osmotic adjustment and photosynthetic electron transport response to cold hardening in winter and spring wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*. 26: 313-322.

Calvert, C.M., Gant, S.J. et Bowles, D.J. (1996) Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding. *The Plant Cell*. 8: 333-342.

Castonguay, Y. et Guckert, A. (1996) Adaptation of forage legumes to cold climates. *Grassland and Land use systems EGF Meetings 1996. contributions 532*: 911-917.

- Chasserot-Golaz, S. et Bader, M.-F. (1997) Transport vésiculaire dans les cellules neuroendocrines: l'annexine II est une protéine essentielle de l'exocytose contrôlée. *Médecine/Sciences*. 13: 236-240.
- Clark, G.B., Dauwalder, M. et Roux, S.J. (1992) Purification and immunolocalization of an annexin-like protein in pea seedlings. *Planta*. 187: 1-9.
- Clark, G., Dauwalder, M. et Roux, S. (1990) Purification, biochemical characterization and localization of a calcium-phospholipid binding protein in peas. *Journal of Cellular Biology*. 5: abstract: 356a.
- Clark, G., Dauwalder, M. et Roux, S. (1989) Partial purification and characterization of calcium-phospholipid binding proteins in peas. *Journal of Cellular Biology*. 4 abstract: 304a.
- Clark, G.B., Lloyd, A. et Roux, S.J. (1996) Two-hybrid analysis using two different annexin genes from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. suppl. 111: 157. no.728.
- Clark, G.B., Pai-Panandiker, A. et Roux, S.J. (1997) Biochemical characterization of nuclear pea annexins. *Plant Physiology*.suppl. 114: 265 résumé no.1371.
- Clark, G.B., Ross, G.S. et Ferguson, I.B. (1995a) Annexins in apples: Amplification and cloning of an annexin PCR fragment. *Plant Physiology* 111: no. 486.
- Clark, G.B. et Roux, S. J. (1995) Annexins of plant cells. *Plant Physiology*. 109: 1133-1139.
- Clark, G.B., Turnwald, S., Tirlapur, U.K., Hass, C.J., von der Mark, K., Roux, S.J. et Scheuerlein, R. (1995b) Polar distribution of annexin-like proteins during phytochrome-mediated initiation and growth of rhizoids in the ferns *Dryopteris* and *Anemia*. *Planta*. 197: 376-384.
- Covitz, P.A., Smith, L.S. et Long, S.R. (1997) Expressed sequence tags from a root hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. non publié.
- Creutz, C.E., Pazoles, C.J. et Pollard, H.B. (1978) Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *The Journal of Biological Chemistry*. 253: 2858-2866.
- Croxtall, J.D., Choudhury, Q., Newman, S. et Flower, R.J. (1996) Lipocortin-1 and the control of cPLA2 activity in A549 cells - glucocorticoids block EGF stimulation of cPLA2 phosphorylation. *Biochemical Pharmacology*. 52: 351-356.

Croxtall, J.D., Choudhury, Q., Tokumoto, H. et Flower, R.J. (1995) Lipocortin-1 and the control of arachidonic acid release in cell signalling - glucocorticoids inhibit G protein-dependent activation of cPLA2 activity. *Biochemical Pharmacology*. 50: 465-474.

Crumpton, M.J. et Dedman, J.R. (1990) Protein terminology tangle. *Nature*. 345: 212.

Cullimore, J.V., Gamas, P., Niebel, A., de Carvalho Niebel, F., Mathis, R., Lescure, N., Bono, J.-J., Gressent, F. et Ranjeva, R. (1996) Studies on the early stages of *Rhizobium meliloti-Medicago* symbiosis. Second european nitrogen fixation conference and nato advanced research workshop. abstract: L-D-3.

Danyluk, J., Carpentier, É. et Sarhan, F. (1996) Identification and characterization of a low temperature regulated gene encoding an actin-binding protein from wheat. *FEBS Letters*. 389: 324-327.

Danyluk, J., Houde, M., Rassart, E. et Sarhan, F. (1994) Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Letters*. 344: 20-24.

Danyluk, J., Rassart, E. et Sarhan, F. (1991) Gene expression during cold and heat shock in wheat. *Biochemistry and Cell Biology*. 69: 383-391.

Danyluk, J. et Sarhan, F. (1990) Differential mRNA transcription during the induction of freezing tolerance in spring and winter wheat. *Plant and Cell Physiology*. 31: 609-619.

Delmer, D.P. et Amor, Y. (1995) Cellulose biosynthesis. *The Plant Cell*. 7: 987-1000.

Delmer, D.P. et Potikha, T.S. (1997) Structures and functions of annexins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 53: 546-553.

Demange, P., Voges, D., Benz, J., Liemann, S., Gottig, P., Berendes, R., Burger, A. et Huber, R. (1994) Annexin V: the key to understanding ion selectivity and voltage regulation? *Trends in Biochemical Sciences*. 19: 272-276.

Ding, J.P. et Pickard, B.G. (1993) Modulation of mechanosensitive calcium-selective cation channels by temperature, *The Plant Journal*. 3: 713-720.

Donnelly, S.R. et Moss, S.E. (1997) Annexins in the secretory pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 53: 533-538.

Dorffling, K. Dorffling, H. et Lesselich, G. (1993) *In vitro*-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 142: 222-225.

- Emans, N., Gorvel, J.-P., Walter, C., Gerke, V., Griffiths, G. et Gruenberg, J. (1993) Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *Journal of Cell Biology*. 120: 1357-1369.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. et Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology*. 148: 2207-2216.
- Feinberg, A.P. et Vogelstein, B. (1984) Addendum to *Anal. Biochem.* 132: 6-13 (1983). A technique for labelling restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*. 137: 266-267.
- Ferguson, I.B. (1984) Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell and Environment*. 7: 477-489.
- Ferguson, I.B. et Drobak, B.K. (1988) Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *HortScience*. 23: 262-266.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. et Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxyde- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*. 100: 241-254.
- Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmyo, A., Okada, H. et Takano, M. (1990) Genomic DNA structure of two new horseradish-peroxidase-encoding genes. *Genes*. 89: 163-169.
- Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A. et Hopkins, C. (1993) Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Cell Biology*. 120: 77-83.
- Geisow, M.J., Fritsche, U., Hexham, J.M., Dash, B. et Johnson, T. (1986) A consensus amino acid sequence repeat in *Torpedo* and mammalian calcium-dependent membrane binding proteins. *Nature*. 320: 636-638.
- Gerke, V. et Moss, S.E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1357: 129-154.
- Gidrol, X., Sabelli, P.A., Fern, Y.S. et Kush, A.K. (1996) Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues Δ oxyR mutant of *Escherichia coli* from H_2O_2 stress. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 93: 11268-11273.
- Gruenberg, J. et Emans, N. (1993) Annexins in membrane traffic. *Trends in Cell Biology*. 3: 224-227.

- Guy, C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 41: 187-223.
- Guy, C.L., Niemi, K.J. et Brambl, R. (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 82: 3673-3677.
- Harvey, R.B. (1935) *An Annotated Bibliography of the Low Temperature Relations of Plants*. Burgess. Minneapolis. 203 pp.
- Hatano, S., Sadakane, H., Tutumi, M. et Watanabe, T. (1976) Studies on frost hardiness in *Chlorella ellipsoidea*. II. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis and surfactants on the process of hardening. *Plant and Cell Physiology* 17: 643-651.
- Henry, R.J. et Ronalds, J.A. (1994) *Improvement of cereal quality by genetic engineering*, Plenum Press, New York, 174 pp.
- Hirayama, T., Ohto, C., Mizoguchi, T. et Shinozaki, K. (1995) A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 3903-3907.
- Hofte, H., Desprez, T., Amselem, J., Chiapello, H. et Caboche, M. (1993) An inventory of 1152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 4:1051-1061.
- Holappa, L.D. et Walker-Simmons, M.K. (1995) The wheat abscisic acid-responsive protein kinase mRNA, PKABA1, is up-regulated by dehydration, cold temperature, and osmotic stress. *Plant Physiology* 108: 1203-1210.
- Hoshino, T., Mizutani, A., Chida, M., Hidaka, H. et Mizutani, J. (1995) Plant annexin form homodimer during Ca²⁺-dependent liposome aggregation. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 35: 749-755.
- Houde, M., Danyluk, J., Laliberte, J.-F., Rassart, E., Dhindsa, R.S. et Sarhan, F. (1992) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding a 50-kilodalton protein specifically induced by cold acclimation in wheat. *Plant Physiology* 99: 1381-1387.
- Hughes, M.A. et Dunn, M.A. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 47: 291-305.

Jarillo J.A., Capel J., Leyva A., Martinez-Zapater J.M. et Salinas J. (1994) Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology* 25: 693-704.

Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S. et Hirt, H. (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93: 11274-11279.

Jones, P.G., Moore, G.J., Waisman, D.M. (1992) A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 13993-13997.

Kawczynski, W. et Dhindsa, R.S. (1996) Alfalfa nuclei contain cold-responsive phosphoproteins and accumulate heat-stable proteins during cold treatment of seedlings. *Plant and Cell Physiology* 37: 1204-1210.

Kazuyuki, W., Takayuki, H. et Kamisaka, S. (1997) Changes in the mechanical properties of cell walls and the composition of cell wall constituents of wheat coleoptiles grown under osmotic stress conditions. *Plant Physiology suppl.* 114 : 85-86. résumé no.342.

Kerr G.P. et Carter J.V. (1990) Tubulins isotypes in rye roots are altered during cold acclimation. *Plant Physiology* 93: 83-88.

Khanna, N.C., Helwig, E.D., Ikebuchi, N.W., Fitzpatrick, S., Bajwa, R. et Waisman, D.M. (1990) Purification and characterisation of annexin proteins from bovine lung. *Biochemistry.* 29: 4852-4862.

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. *The Plant Cell* 8: 489-503.

Knight, M.R., Smith, S.M. et Trewavas, A.J. (1992) Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 89: 4967-4971.

Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. et Trewavas, A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch, cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526

- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. et Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology*. 105: 601-605.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pal, S.T. et Vanoers, M.H.J. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
- Larsson, C., Widell, S. et Kjelbom, P. (1987) *Methods in Enzymology* 148: 558-568
- Levitt, J. (1956) *The Hardiness of Plants*. Academic Press New York. 278 pp.
- Li, Y.D, Patel, J.M., Zhang, J. et Block, E.R. (1997) Overexpression of plasma membrane annexin II in NO₂-exposed pulmonary artery endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 129-126.
- Lim, C.O., Kim, H.Y., Kim, M.G., Lee, S.I., Chung, W.S., Park, S.H., Hwant, I. et Cho, M.J. (1996) Expressed sequence tags of Chinese cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiology* 111: 577-588.
- Liu, L., Tao, J.-Q. et Zimmermann, U.-J. P. (1997) Annexin II binds to the membrane of A549 cells in a calcium-dependent and calcium-independent manner. *Cellular Signaling*. 9: 299-304.
- Luecke, H., Chang, B.T., Maillard, W.S., Schlaepfer, D.D. et Haigler, H.T. (1995) Crystal structure of the annexin XII hexamer and implications for bilayer insertion. *Nature* 378: 512-515.
- Lynch, D.V. et Steponkus, P.L. (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* 83: 761-767.
- Lyons, J.M. (1973) Chilling injury in plants. *Annual review of Plant Physiology* 24: 445-466.
- Mazliak, P. (1997) Rôle des lipides végétaux dans la signalisation cellulaire. *Année Biologique*. 36: 165-180.
- Mazur, P. (1969) Freezing injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 20: 419-448.

- McClung, A.D., Carrol, A.D. et Battey, N.H. (1994) Identification and characterization of ATPase activity associated with maize (*Zea mays*) annexins. *Biochemical Journal* 303: 709-712.
- Medina, M.A., del Castillo-Olivares, A. et de Castro, I.N. (1997) Multifunctional plasma membrane redox systems. *BioEssays*. 19: 977-984.
- Mehta, N., Sathasivan, K. et Brown, Jr., R.M. (1996) Characterization of full-length annexin cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 111: 148 résumé no.671.
- Minorsky, P.V. (1989) Temperature sensing by plants: a review and hypothesis. *Plant, Cell and Environment* 12: 119-135.
- Minorsky, P.V. et Spanswick, R.M. (1989) Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant, Cell and Environment* 12: 137-143.
- Mira, J.-P., Dubois, T., Oudinet, J.-P., Lukowski, S., Russo-Marie, F. et Geny, B. (1997) Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272(16): 10474-10482.
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. et Shinozaki, K. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 93: 765-769.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H. et Shinozaki, K. (1995) Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 358: 199-204.
- Mollenhauer, J. (1997) Annexins: what are they good for? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 53: 506-507.
- Monroy, A.F., Labbe, E. et Dhindsa, R.S. (1997) Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts. *FEBS Letters* 410: 206-209.
- 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. *The 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 Physiology* 102: 1227-1235.
- Morgan, R.O. et Fernandez, M.P. (1997) Distinct annexin subfamilies in plant and protists diverged prior to animal annexins and from a common ancestor. *Journal of Molecular Evolution*. 44: 178-188.
- Murata, N. et Los, D.A. (1997) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiology*. 115: 875-879.
- Murray, E.E., Lotzer, J et Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*. 17: 476-498.
- Nadeau, P. et Castonguay, Y. (1997) Enzymatic control of soluble carbohydrate accumulation in cold hardened alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Physiology suppl.* 114: 130 résumé no. 599.
- Neumann, E. (1988) *Ferroelectrics* 86: 325-333.
- Newman, T., de Bruijn, F.J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., Retzel, E. et Somerville, C. (1994) Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology* 106: 1241-1255.
- Niki, T. et Sakai, A. (1983) Ultrastructure changes related to frost hardiness in the cortical parenchyma cells from mulberry twigs. *Canadian Journal of Botany* 61: 2205-2211.
- Nilius, B., Gerke, V., Prenen, J., Szucs, G., Heinke, S., Weber, K. et Droogmans, G. (1996a) Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 30631-30636.
- Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T. et Droogmans, G. (1996b) Volume-activated Cl⁻ channels. *General Pharmacology*. 27: 1131-1140.
- Nishida, I. et Murata, N. (1996) Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The crucial contribution of membrane lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 541-568.
- Ohnishi, M., Tokuda, M., Masaki, T., Fujimara, T., Tai, Y., Itano, T., (1995) Involvement of annexin-I in glucose-induced insulin secretion in rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 136: 2421-2426.

- Ouellet, F. (1998) Caractérisation du promoteur du gène *wcs120*, un gène induit au cours de l'acclimatation au froid chez le blé (*Triticum aestivum* L.). Thèse de Ph.D., Université de Montréal, Montréal, Canada.
- Park, Y.S., Kwak, J.M., Kwon, O.Y., Kim, Y.S., Lee, D.S., Cho, M.J., Lee, H.H. et Nam, H.G. (1993) Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. *Plant Physiology* 103: 359-370.
- Pepinski, R.B., Sinclair, L.K., Chow, E.P. et O'Brine-Greco, B. (1989) A dimeric form of lipocortin-1 in human placenta. *Biochemical Journal*. 263: 97-103.
- Perras, M. et Sarhan, F. (1984) Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides. *Physiologia Plantarum* 60: 129-132.
- Pirck, M., Hirt, H. et Heberle-Bors, E. (1994) The cDNA sequence encoding an annexin from *Medicago sativa*. *Plant Physiology*. 104: 1463-1464.
- Pomeroy, M.K. et Siminovitch, D. (1971) Seasonal cytological changes in phloem parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* in relation to cold hardiness. *Canadian Journal of Botany* 49: 787-795.
- Potikha, T.S. et Delmer, D.P. (1997) cDNA clones for annexin AnnGh1 and AnnGh2 from *Gossypium hirsutum* (cotton). *Plant Physiology*. 113: 305.
- 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. *The Plant Cell*. 6: 65-74.
- Proust, J., Houlne, G., Schantz, M.-L. et Schantz, R. (1997a) Regulation of biosynthesis and cellular localization of annexins in tobacco BY2 cells. non publié.
- Proust, J., Houlne, G., Schantz, M.-L., Schantz, R. (1997b) Functions of annexins in plant development. Congrès de la Société Internationale des Biologistes Moléculaires des Plantes (Singapour). Résumé de poster no 805
- Proust, J., Houlné, G., Schantz, M.L. et Schantz, R. (1996) Characterization and gene expression of an annexin during fruit development in *Capsicum annuum*. *FEBS letters* 383: 208-212.
- Raison, J.K. (1973) The influence of temperature-induced phase changes on kinetics of respiratory and other membrane-associated enzymes. *Journal of Bioenergetics* 4: 258-309.

- Randall, S.K. (1992) Characterization of vacuolar calcium-binding proteins. *Plant Physiology* 100: 859-867.
- Raynald, P. et Pollard, H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1197: 63-93.
- Reutelingsperger, C.P.M. et van Heerde, W.L. (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalysed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 527-532.
- Rochat, E. et Therrien, H.P. (1975) Études des protéines des blés résistant, Kharkov, et sensible, Selkirk, au cours de l'endurcissement au froid. I. Protéines solubles. *Canadian Journal of Botany* 53: 2411-2416.
- Rojas, E. et Pollard, H.B. (1987) Membrane capacity measurements suggest a calcium-dependent insertion of synexin into phosphatidylserine bilayers. *FEBS Letters* 217: 25-31.
- Rosing, J., Van Rijn, J.L.M.L., Bever, E.M., Van Dieijen, G., Comfurius, P. et Zwaal, R.F.A. (1985) The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation. *Blood* 65: 319-332.
- Roughan, P.G. (1985) Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiology* 77: 740-746.
- Salerno, G.L. et Pontis, H.G. (1989) Raffinose synthesis in *Chlorella vulgaris* cultures after a cold shock. *Plant Physiology* 89: 648-651.
- Sarhan, F. et Chevrier, N. (1985) Regulation of RNA synthesis by DNA-dependent RNA polymerases and RNases during cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Physiology* 78: 250-255.
- Sarhan, F. et D'Aoust, M.J. (1975) RNA synthesis in spring and winter wheat during cold acclimation. *Physiologia Plantarum*. 35: 62-65.
- Sarhan, F. et Perras, M. (1987) Accumulation of a high molecular weight protein during cold hardening of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant and Cell Physiology* 28: 1173-1179.
- Sarhan, F., Ouellet, F. et Vazquez-Tello, A. (1997) The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiologia Plantarum* 101: 439-445.

Sasaki, T., Song, J., Koga-Ban, Y., Matsui, E., Fang, F., Higo, H., Nagasaki, H., Hori, M., Miya, M., Murayama-Kayano, E., Takiguchi, T., Takasuga, A., Niki, T., Ishimaru, K., Ikeda, H., Yamamoto, Y., Mukai, Y., Ohta, I., Miyadera, N., Havukkala, I., et Minobe, Y. (1994) Toward cataloguing all rice genes: large-scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. *The Plant Journal* 6: 615-624.

Savitch, L.V., Gray, G.R. et Huner, N.P.A. (1997) Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. *Planta* 201: 18-26.

Schaffer, M.A. et Fischer, R.L. (1988) Analysis of mRNA that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiology* 87: 431-436.

Scherer, G.F.E. et Arnold, B. (1997) Inhibitors of animal phospholipase A₂ enzymes are selective inhibitors of auxin-dependent growth. Implications for auxin-induced signal transduction. *Planta*. 202: 462-469.

Scherer, G.F.E. (1995) The functional relationship of plant lipid-derived second messengers and plant lipid-activated protein kinase. *Biochemical Society Transactions*. 23: 871-875.

Scherer, G.F.E. et André, B. (1989) A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A₂ *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 163: 111-117.

Seals, D.F. et Randall, S.K. (1997) A vacuole-associated annexin protein, VCaB42, correlates with the expansion of tobacco cells. *Plant Physiology* 115: 753-761.

Seals, D.F., Parrish, M.L. et Randall, S.K. (1994) A 42-kilodalton annexin-like protein is associated with plant vacuoles. *Plant Physiology* 106: 1403-1412.

Seigneuret, M. et Devaux, P.F. (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape change. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 81: 3751-3755.

Senda, T., Okabe, T., Matsud, M. et Fujita, H. (1994) Quick-freeze, deep-etch visualisation of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localisation and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Research* 277: 51-60.

Sheets, E.E., Giugni, T.D., Goates, G.G., Schlaepfer, D.D. et Haigler, H.T. (1987) Epidermal growth factor dependent phosphorylation of a 35-kilodalton protein in placental membranes. *Biochemistry*. 26: 1164-1172.

- Shi, J., Dixon, R.A., Gonzales, R.A., Kjellbom, P. et Bhattacharyya, M.K. (1995) Identification of a cDNA clone encoding valosin-containing protein and other plant plasma membrane-associated proteins by a general immunoscreening strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4457-4461.
- Shin, H., Kudlicka et Brown, M. Jr. (1995) A biochemical study of β -glucan synthesis in the cotton fiber. *Plant Physiology*. 108: résumé no. 298.
- Siminovitch, D. et Briggs, D.R. (1949) The chemistry of the living bark of the black locust tree in relation to frost hardiness. I. Seasonal variations in protein content. *Archives in Biochemistry* 23: 8-17.
- Singh, J., et Laroche, A. (1988) Freezing tolerance in plants: a biochemical overview. *Biochemistry and Cell Biology* 66: 650-657.
- Singh, J. et Laroche, A. (1988) Freezing tolerance in plants: a biochemical overview. *Biochemistry and cell biology* 66: 650-657.
- Smallwood, M., Knok, J.P. et Bowles, D.J. (1996) *Membranes: specialized functions in plants*. Bios Scientific publishers, Oxford, 578 pp.
- Smallwood, M.F., Gurr, S.J., McPherson, M.J., Roberts, K. et Bowles, D.J. (1992) The pattern of plant annexin gene expression. *Biochemical Journal* 281: 501-505.
- Smallwood, M.F., Keen, J.N. et Bowles, D.J. (1990) Purification and partial sequence analysis of plant annexins. *Biochemical journal* 270: 157-161.
- Smith, P.D. et Moss, S.E. (1994) Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends in Genetics* 10: 241-246.
- Smolenska-Sym, G. et Kacperska, A. (1996) Inositol 1,4,5-triphosphate formation in leaves of winter oilseed rape plants in response to freezing, tissue water potential and abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 96: 692-698.
- Srivastava, L.M. et O'Brien, T.P. (1966) On the ultrastructure of cambium and its vascular derivatives. I. Cambium in *Pinus strobus* L. *Protoplasma* 61: 257-293.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Balsamo, R.A., Arvinte, et Lynch, D.V. (1988) Transformation of the cryobehavior of rye protoplasts by modification of the plasma membrane lipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 9026-9030.

Steponkus, P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 543-584.

Stone, J.M. et Walker, J.C. (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology* 108: 451-457.

Swairjo, M.A. et Seaton, B.A. (1994) Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structures*. 23: 193-213.

Taiz, L. et Zeiger, E. (1991) *Plant Physiology*. Benjamin/Cummings ed. New York. 559pp.

Thompson, G.A. (1986) Metabolism and control of lipid structure modification. *Biochemistry and Cell Biology* 64: 66-69.

Thonat, C., Mathieu, C., Crevecoeur, M., Penel, C., Gaspar, T. et Boyer, N. (1997) Effects of a mechanical stimulation on localization of annexin-like proteins in *Bryonia dioica* internodes. *Plant Physiology* 114: 981-988.

Uemura, M. et Yoshida, S. (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma). *Plant Physiology* 75: 818-826.

van de Loo, F.J., Turner, S. et Somerville, C. (1995) Expressed sequence tags from developing castor seeds. *Plant Physiology* 108: 1141-1150.

Vasil, I.K. (1994) Molecular improvement of cereals. *Plant Molecular Biology*. 25: 925-937.

Vazquez-Tello, A. et Uozumi, T. (1997) Cloning and characterization of a *Lavatera thuringiaca* cDNA encoding an annexin whose expression is stimulated by low temperature. non publié.

Vazquez-Tello, A., Breton, G., Uozumi, T. et Sarhan, F. (1997) Is annexin involved in the low temperature signal transduction in plants? *Plant Physiology*. 114: 252. résumé no. 1298.

Vazquez-Tello, A., Ouellet, F. et Sarhan, F. (1998) Low-temperature-stimulated phosphorylation regulates the binding of nuclear factors to the promoter of *wcs120*, a wheat cold-specific gene. *Molecular and General Genetics*. 257: 157-166.

Venkateswari, J., Kanrar, S., Bansal, K.C., Kush, A.K., Kirti, P.B. et Chopra, V.L. (1997) Overexpression of annexin-like protein protects indian mustard against drought, salt and alternaria stresses. Congrès de la Société Internationale des Biologistes Moléculaires des Plantes (Singapoure). Résumé de conférence no 361.

Weiser, C.J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* 169: 1269-1278.

Wiegand, K.M. (1906) The occurrence of ice in plant tissue. *Plant World* 9: 25-39.

Wilkinson, J. Q., Lanahan, M.B., Conner, T.W. et Klee, H.J. (1995) Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Molecular Biology* 27: 1097-1108.

Yoshida, S. (1995) Low temperature-induced alkalization of vacuoles in suspension-cultured cells of mungbean (*Vigna radiata* [L.] Wilcezek). *Plant and Cell Physiology*. 36: 1075-1079.

Zhang, L., Dunn, M.A., Pearce, R.S. et Hughes, M.A. (1993) Analysis of organ specificity of low-temperature-responsive gene family in rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Experimental Botany* 44: 1787-1793.

Zhou, B.L., Arakawa, K., Fujikawa, S. et Yoshida, S. (1994) Cold-induced alterations in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat. *Plant and Cell Physiology* 35: 175-182.

Zocchi, G., Rogers, S.A. et Hanson, J.B. (1983) Inhibition of proton pumping in corn roots is associated with increased phosphorylation of membrane proteins. *Plant Science Letters* 31: 215-221.

VII. ANNEXES

Revue de littérature:

Tableau II: Les numéros d'accèsion des 17 ESTs d'*Arabidopsis* sont: H36260, H36536, H37398, H76134, H76460, H77008, R29768, R30014, T22046, T22585, T4940, T42209, T43657, T76739, W95995, W96455 et W43175.

Tableau II: Les numéros d'accèsion des 6 ESTs d'*Arabidopsis* sont: Z17514, Z18518, Z26190, Z32565, Z33916, Z47714.

Matériels et Méthodes:

La solution de OLB est: un mélange A:B:C 100:250:150 :A:1 mL Tris-HCl 1,25M pH8,0, MgCl₂ 125 mM, 18 µl β-mercaptoéthanol, 5 µl dATP 0,1M, 5 µl de dGTP 0,1M; B: HEPES 2M pH6,6 et C: hexanucléotides 90 DO/mL dans du tampon TE.

Le tampon de charge (pour une solution de 1 ml): 750 µl de formamide, 150 µl de formaldéhyde 37%, 100 µl de tampon MOPS (voir plus bas), 1 µl de bromure d'éthidium et 1 µl de bleu de bromophénol 1%.

Le tampon MOPS est constitué de (pour une solution de 1l): 41.8g de MOPS, 16,6 ml d'acétate de sodium 3M, 20 ml d'EDTA 0,5M et de l'H₂O traitée au DEPC (0,1%).

La solution de Denharts est constituée de (pour 15ml): 0,3g de Ficoll 400, 0,3g de polyvinylpyrrolidone, 0,3g de BSA et d'H₂O.

Le milieu NZY est constitué de (pour 1l): 5g de NaCl, 1,2g de MgSO₄, 5g d'extrait de levure et 10g d'hydrolysate de caséine. Le pH du milieu a été ajusté à 7,5. Les milieux ont toujours été autoclavés 30 minutes.

Le gel de concentration à pH 6.8 contient: 4% d'acrylamide, 0,1% SDS, 0,1% de persulfate d'ammonium, 0,125M Tris-HCl et la polymérisation était provoquée par l'ajout de 2µl (0,01%) de TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthyl-éthylènediamine).

Le gel de séparation à pH 8.8 contient: 10% d'acrylamide, 0,375 M Tris-Cl, 0,1% SDS, 0,1 % APS et on y a ajouté 5µl (0,01%) de TEMED pour la polymérisation.

Le tampon Laemmli 2X est constitué de: 120 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glycérol, 0,004% bleu de bromophénol et 10% β-mercaptoéthanol).